

萝卜抗菌肽基因 *Rs* 对菌核病的抗性

曹慧慧¹, 黄军艳^{1,2}, 柯 涛³, 于景印¹, 董彩华^{1,2*}, 刘胜毅^{1,2*}

- (1. 中国农业科学院油料作物研究所, 农业部油料作物生物学与遗传育种重点实验室, 湖北 武汉, 430062;
2. 湖北大学生物资源绿色转化湖北省协同创新中心, 湖北 武汉, 430062;
3. 南阳师范学院生命科学与技术学院, 河南 南阳, 473061)

摘要:为分析萝卜抗菌肽 *Rs* 是否对核盘菌具有抗性, 人工合成了 *Rs* 基因, 并利用水稻 α -淀粉酶信号肽 α Amy3SP 引导目的基因在胞间隙和质体表达的作用特点, 通过基因重组技术构建植物表达载体 p35S-SP-*Rs*, 同时构建了 p35S-SP-GFP 载体, 基因枪轰击洋葱表皮。实验发现荧光信号主要存在于植物细胞的细胞壁和细胞膜之间, 说明在 35S 和信号肽 α Amy3SP 的引导下 *GFP* 在细胞间隙中有效表达。采用浸花法将植物表达载体 p35S-SP-*Rs* 转入拟南芥中, 通过卡那霉素抗性筛选和 PCR 检测, 获得 35 株 *Rs* 转基因阳性植株。qRT-PCR 显示 *Rs* 基因在转基因拟南芥中的表达水平得到显著提高, 而植株的生长发育未受影响。抗病鉴定结果显示, 转基因植株对菌核病的抗性显著增强。结果说明通过在细胞间隙中高量表达抗菌肽 *Rs*, 在避免对细胞产生毒性的同时, 显著抑制了核盘菌菌丝的扩展, 从而达到抗病目的。

关键词:拟南芥; 抗菌肽 *Rs* 基因; 基因转化; 菌核病

中图分类号:S436.654 **文献标识码:**A **文章编号:**1007-9084(2015)05-0614-08

Resistance of radish antimicrobial peptide gene *Rs* to *Sclerotinia sclerotiorum*

CAO Hui-hui¹, HUANG Jun-yan^{1,2}, KE Tao³, YU Jing-yin¹, DONG Cai-hua^{1,2*}, LIU Sheng-yi^{1,2*}

- (1. Oil Crops Research Institute of CAAS, Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Oil Crops, Ministry of Agriculture, Wuhan 430062, China; 2. Hubei Collaborative Innovation Center for Green Transformation of Bio-Resources, Hubei University, Wuhan 430062, China;
3. College of Life Science and Technology, Nanyang Normal University, Nanyang 473061, China)

Abstract: In order to analysis resistant ability of *Rs* to *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rs* was artificial synthesized and combined with a rice α -Amylase signal peptide α Amy3SP which can cargo proteins to plastids and intercellular space of plant cells to construct plant expression vector 35S-SP-*Rs* and 35S-SP-GFP. Gene gun bombardment onion experiment showed that fluorescent signal of GFP existed in the extracellular matrix between cell wall and membrane. This result illustrated that GFP was effectively transported as cargo into extracellular matrix under the guide of 35S and α Amy3SP. *Rs* gene was introduced into Arabidopsis via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. 35 positive p35S-SP-*Rs* transgenic plantlets were obtained by PCR assay and kanamycin selection. Relative expression level of *Rs* in transgenic Arabidopsis was much higher than that of WT lines as detected by qRT-PCR with normal growth and development. Disease resistance identification showed that *Rs* transgenic plants had higher resistance to *S. Sclerotiorum* than non-transgenic plants. This study showed that the presence of high amount of antimicrobial peptide *Rs* in extracellular matrix could reduce cytotoxicity and enhance resistance of plants to *S. sclerotiorum* by significantly inhibiting extension of fungal hyphae.

Key words: Arabidopsis; Antimicrobial peptide gene *Rs*; Genetic transformation; *Sclerotinia sclerotiorum*

收稿日期:2015-03-05

基金项目:国家 863 计划(2013AA102602);国家自然科学基金(31471536,31301039);油菜产业体系(CARS-13-05);公益性行业(农业)科研专项(201103016);湖北农业科技创新中心

作者简介:曹慧慧(1985-),女,山东人,博士研究生,主要从事抗菌肽研究

* 通讯作者:董彩华,女,湖北人,副研究员,主要从事油菜功能基因组研究, E-mail: dongch@oilcrops.cn

刘胜毅,男,安徽人,研究员,主要从事植物病理学研究, E-mail: Liusy@oilcrops.cn

核盘菌引起的菌核病是一种真菌性病害,寄主范围非常广泛,可侵染 75 个科 278 个属中的 408 个物种,包含了大多数双子叶植物,如油菜、大豆、花生、向日葵等油料作物以及一些重要的单子叶植物。菌核病是目前油菜产量的最主要限制因子,在我国长江流域,菌核病可造成油菜年产量损失在 10% ~ 30%,发病严重时可能造成年产量损失 80%^[1,2]。目前对菌核病的防治主要依靠化学农药。然而化学防治不仅成本高、污染环境,而且防效也不理想;同时,食品的安全性也受到严重影响。植物对核盘菌的寄主抗性的分子机制,我们依然知之甚少。迄今还没有发现完全免疫或者高抗的油菜栽培品种^[3],因此,探究植物对这种病原的抗性机制,发现新的抗性基因具有深远意义。

抗菌肽(antimicrobial peptides, AMP)是广泛存在于生物界的一类具有抗菌活性的天然小分子蛋白,是机体非特异性免疫的重要组成部分,在体内外均具有抗菌活性^[4]。抗菌肽有抗菌机理独特,抗菌谱广,高效、环保、不使病原菌产生耐药性等优点,近年来已经成为植物抗病基因工程、养殖饲料添加剂、食品防腐剂、新兴医药等领域的研究热点,在疾病防治领域中是抗生素的理想替代品^[5,6]。抗菌肽按照氨基酸序列及其二级结构可以分为多个种类,具有一些共性,如:小分子量(<10kDa),阳离子表面、正电荷以及两亲性。这些特性使得抗菌肽能够和细胞膜绑定并插入到细胞内部。大部分抗菌肽通过破坏细胞膜使目标细胞死亡而达到杀菌目的。而另一些抗菌肽却能够通过形成离子通道进入到细胞内部破坏细胞而不破坏细胞膜^[7],如脯氨酸富集类抗菌肽(PRP)的杀菌方式就是通过不破坏细胞膜,而是利用离子通道的方式进行的^[8]。与动物源抗菌肽相比,大多数类型的植物源抗菌肽对动物和植物细胞都没有毒性^[9],更易于在作物中表达和调控,不容易被细胞内的蛋白酶降解。与其他杀菌剂相比,植物来源的抗菌肽对环境的影响更小,更友好,更具开发成为抗真菌生物制剂的潜力^[6]。

萝卜抗菌肽 *Rs* - AFP(antifungal proteins)是一种植物来源抗菌肽,具有广谱抗菌性,对人类不造成危害的同时可以有效地抑制多种细菌和多种病原真菌的活性^[10]。近年来利用萝卜抗菌肽的广谱抗菌性通过转基因技术来提高其他植物抗性的实验很多,如将萝卜抗菌肽基因 *Rs* 转到马铃薯中可获得晚疫病抗性等^[11,12]。但是 *Rs* 是否具有抑制核盘菌的活性未见报道。

研究表明水稻 α - 淀粉酶信号肽(α Amy3SP)能

够指导 *GUS* 基因定位于内质网,并随后定位于胞间隙中^[13]。为了实现萝卜抗菌肽 *Rs* 基因在细胞间隙中表达的目的,本研究利用 α Amy3SP,以植物载体 pBI121 为载体骨架,与 35S 启动子连接,在启动子和信号肽的指引下将目标抗菌肽基因 *Rs* 导入细胞间隙中表达,以拟南芥为材料,利用转基因技术建立了一个实验模型,研究 *Rs* 基因在植物对核盘菌抗性中的作用。结果显示,在拟南芥细胞间隙高量表达萝卜抗菌肽在不影响植株生长的同时显著增强了对菌核病的抗性。本文的研究拟在利用基因工程技术提高油菜对菌核病的抗性方面提供新思路和新基因。

1 材料与方法

1.1 材料

野生型拟南芥为 Columbia 生态型 Col - 0,种植于中国农业科学院油料作物研究所温室中。核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)菌核采自武汉大田中核盘菌侵染后的油菜茎秆。大肠杆菌 DH5 α 和根癌农杆菌 EHA105 菌株由本实验室保存,植物表达载体 pCaMV35S - pBI121 为本实验室所构建。

Trizol RNA 提取试剂为 Invitrogen 产品;SYBR Green Real Time PCR Master Mix 试剂盒、逆转录酶(M - MLV)和 RNA 酶抑制剂购于 Promega 公司;卡那霉素、DNA 聚合酶、dNTP、PCR 产物回收试剂盒、PMD18 - Tvector、限制性内切酶均购自宝生物工程(大连)有限公司;T4DNA 连接酶、ExTag 高保真聚合酶、DNA Marker 等购自 TaKaRa 公司和上海生工公司,质粒小量提取试剂盒购自 AXYGENT 公司。钨粉、亚精胺、甘露醇、乙醇、利福平、蔗糖等购于国内公司,引物合成和测序由上海英俊公司和北京擎科公司完成。

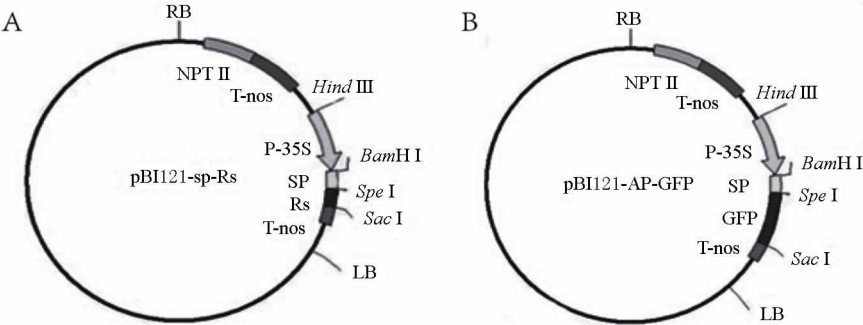
1.2 方法

1.2.1 基因的合成与植物表达载体的构建 根据萝卜抗菌肽的氨基酸序列(APD ID: AP00287)委托上海英俊公司进行全基因合成。信号肽 α Amy3SP 序列根据文献提供序列进行合成^[13]。分别根据 *Rs* 基因和 α Amy3SP 序列设计引物,并加上合适的酶切位点,引物序列如下(5' - 3'),*Rs* - 1: ACTAGTATG - CAGAAGCTTTG(*Spe* I);*Rs* - 2: GAGCTC - TCAACAAGGGAAGT(*Sac* I);SP - 1: GGATCCAT - GAAGAACACCAGCAGCTT(*Bam*H I);SP - 2: ACTAGTACTACGTACCTGGAAGA(*Spe* I);将合成的 *Rs* 和 α Amy3SP 片段用加了特异性酶切位点的引物 SP - 1, SP - 2, *Rs* - 1, *Rs* - 2 以及合成的 T - SP, T - *Rs*

载体质粒为模板进行 PCR 扩增,获得两侧分别加有合适酶切位点的 *Bam*H I - SP - *Spe* I 基因片段和 *Spe* I - Rs - *Sac* I 基因片段,回收测序后,将测序正确克隆分别用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Spe* I 以及 *Spe* I 和 *Sac* I 进行酶切后回收,最后连接到 pCaMV35S - pBI121 基础载体上,获得 p35S - SP - Rs 植物表达载体,结构如图 1A 所示。

同时,根据 *GFP* (NCBI ID: 7011691) 的核苷酸序列设计 1 对引物,并在引物的两端分别加上 *Spe* I 和 *Sac* I 酶切位点,引物序列为: GFP - 1: ACT-

AGTCATGGTGAGCAAGG (*Spe* I); GFP - 2: GAGCTCACGCGGCCGCTTTA(*Sac* I)。以实验室保存的 P - GFP 载体为模板,以 GFP - 1 和 GFP - 2 为引物进行 PCR 扩增得到 *Spe* I - GFP - *Sac* I 基因片段,回收测序后,将测序正确克隆分别用限制性内切酶 *Spe* I 和 *Sac* I 进行酶切后回收,用 T4 DNA 连接酶将回收后的 GFP 片段和之前回收的 α Amy3SP 片段进行酶连反应,最后连接到 pCaMV35S - pBI121 基础载体上,获得 p35S - SP - GFP 植物表达载体,结构如图 1B 所示。



注:A:植物表达载体 p35S - SP - Rs 示意图;B:植物表达载体 p35S - SP - GFP 示意图
Note:A: p35S - SP - Rs structure; B: p35S - SP - GFP structure

图 1 植物表达载体 p35S - SP - Rs 和 35S - SP - GFP 的结构示意图
Fig. 1 Structure diagram of plant expression vector p35S - SP - Rs and p35S - SP - GFP

1.2.2 基因枪轰击洋葱表皮观察 *GFP* 瞬时表达
洋葱表皮的遗传转化采用基因枪介导的粒子轰击转化办法,将带有 *GFP* 的植物表达载体质粒 p35S - SP - GFP 转化洋葱表皮细胞^[14,15]。将轰击结束后的材料,置于高渗培养基 MS 上暗培养约 18 ~ 20h。使用共聚焦显微镜 (Nikon A1) 在 488nm 波长下观察 *GFP* 的表达。

1.2.3 植物表达载体 p35S - SP - Rs 的拟南芥转化
将植物表达的载体 p35S - SP - Rs 采用花浸法 (floral dip) 转化拟南芥^[16]。侵染结束后,将拟南芥苗放在黑暗条件下保湿培养 16h。恢复长日照正常培养。一个星期后重复转化一次。收取种子烘干后,播种于生长间中进行转基因后代筛选。

1.2.4 转基因植株分子鉴定
取转化后收取的拟南芥种子,在含有卡那霉素 (终浓度为 50 μ g/mL) 的 MS 培养基上进行抗性筛选,将存活下来的幼苗进行移栽,取生长约 5 周大小植株的幼嫩叶片和同时期播种的野生型 (WT) 叶片,根据 CTAB 法提取组织总 DNA,作为 PCR 检测的模板,根据转基因载体 p35S - SP - Rs 的序列,设计转基因检测的特异引物, Primer I : 5' - CAGAAGCTTTGTCAGAGG - 3'; Primer II : 5' - ACAAGGGAAGTAGCAGA - 3'。对 T₀ ~ T₄ 转基因植株进行外源目标基因的 PCR 检测和遗传

分析。扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 7min; 94 $^{\circ}$ C 45s, 54.5 $^{\circ}$ C 45s, 72 $^{\circ}$ C 50s, 35 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min, PCR 体系为 30 μ L, 其中 10 $\times$ Buffer 3.0 μ L, 引物 2.0 μ L, dNTPs 1.5 μ L, 基因组 DNA 2.0 μ L, Taq 酶 1.0 μ L, ddH₂O 20.5 μ L, 总计 30.0 μ L。扩增产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测,筛选出转基因阳性植株。

1.2.5 目的基因表达的荧光定量 PCR 检测
取生长 5 周的拟南芥 WT 叶片和转基因拟南芥 T₁ - T₄ 代鉴定为阳性植株的叶片分别在液氮中研磨,利用 Trizol RNA 提取试剂盒 (Invitrogen 公司) 提取 RNA,然后使用 M - MLV 逆转录酶进行第一链的合成。使用 SYBR Green Real Time PCR Master Mix 试剂盒进行实时荧光 PCR 反应,方法参照试剂盒说明书。内参基因 *Actin* 引物为 AtActin (F: 5' - CCCGCTATG-TATGTCGCCA - 3', R: 5' - AACCTCGTAGATTG-GCACAG - 3'), *Rs* 基因的特异性引物为 (F: 5' - AGAAGCTTTGTCAGAGGCC - 3', R: 5' - GCAAGATCCATGTCTAGCCT - 3')。每组实验进行 3 次生物学重复,每个生物学重复至少做 3 次技术重复。分别测定目的基因和内参基因 *Actin* 的 Ct 值,通过 2^{- Δ C_t} 值来计算目标基因相对于内参基因的表达水平^[17,18]。

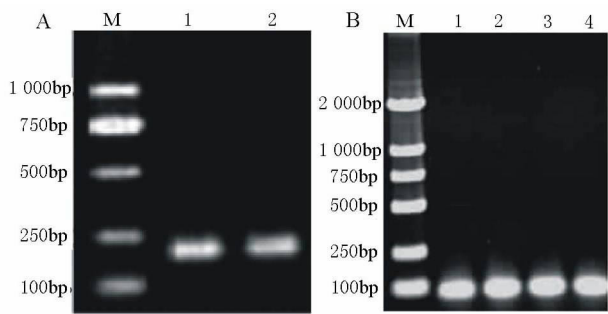
1.2.6 转基因植株菌核病抗病性鉴定
将筛选出

的转基因拟南芥 T₄ 纯系植株和野生型 (WT) 拟南芥,采用离体叶片接种法和活体叶片接种法鉴定转基因拟南芥植株的菌核病抗性^[19~21]。转基因材料和 WT 分别选择 3 个株系,每个株系 10 株,共进行 3 次生物学重复,接种后室内湿度范围保持在 85% ~ 90% 之间。接种后于 24h、36h、48h、60h 等时间点测量病斑长、宽,计算病斑的面积 (长 × 宽)。采用 DPS 统计分析软件分析数据。

2 结果与分析

2.1 萝卜抗菌肽基因的克隆

以公司化学合成后提供的含有 *Rs* 基因和信号肽 αAmy3SP 序列的 T 载体作为模板,以 1.2.1 设计的引物序列 *Rs* - 1、*Rs* - 2、SP - 1、SP - 2 进行 PCR 扩增,1% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果,如图 2 所示,PCR 扩增得到的 *Rs* 基因序列和信号肽 αAmy3SP 序列符合预期大小,分别为 220bp 和 95bp^[10,13]。



注:A:*Rs* 基因的 PCR 检测;B:信号肽 αAmy3SP 的 PCR 检测;M:DNA marker

A:条带 1 和 2,*Rs* 基因;B:条带 1~4,信号肽 SP 序列
Note:A:PCR detection of *Rs* gene;

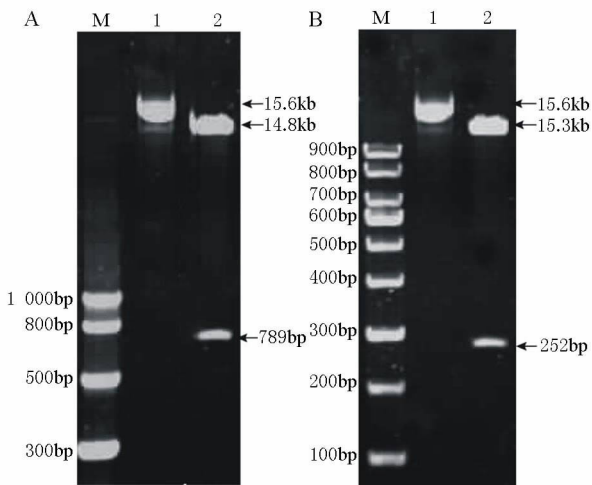
B:PCR detection of signal peptide αAmy3SP
M:DNA marker;A:Lane 1~2, *Rs* gene;
B:Lane 1~4, signal peptide αAmy3SP

图 2 萝卜抗菌肽基因 *Rs* 和信号肽 αAmy3SP 的琼脂糖凝胶检测

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis analysis of *Rs* gene and αAmy3SP

2.2 植物表达载体的构建

根据 1.2.1 的方法分别构建植物表达载体 p35S - SP - *Rs* 和 p35S - SP - GFP 并送公司测序,对测序正确的植物表达载体 p35S - SP - GFP 利用限制性内切酶 *Spe* I 和 *Sac* I 进行双酶切检测,结果如图 3A 所示:双酶切后得到小片段 *GFP* 大小为 789bp;植物表达载体 p35S - SP - *Rs* 利用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Sac* I 进行双酶切检测,结果如图 3 - B 所示,双酶切后得到小片段 SP - *Rs* 大小为 252bp,双酶切结果表明酶切的目的基因符合预期大小,证明植物表达载体构建成功。



注:A:p35S - SP - GFP 酶切检测图;B:p35S - SP - *Rs* 酶切检测图;
M:DNA marker;1:未酶切载体对照;2:双酶切后载体条带

Note:A:Restriction results of p35S - SP - GFP; B:Restriction results of p35S - SP - *Rs*; M:DNA marker; Lane 1:plant expression vector; Lane 2:Products of plant expression vector digested by restriction enzyme

图 3 植物表达载体 p35S - SP - *Rs* 和 p35S - SP - GFP 的酶切检测

Fig. 3 Double enzyme detection of plant expression vector p35S - SP - *Rs* and p35S - SP - GFP

2.3 基因枪轰击洋葱表皮观察 GFP 瞬时表达

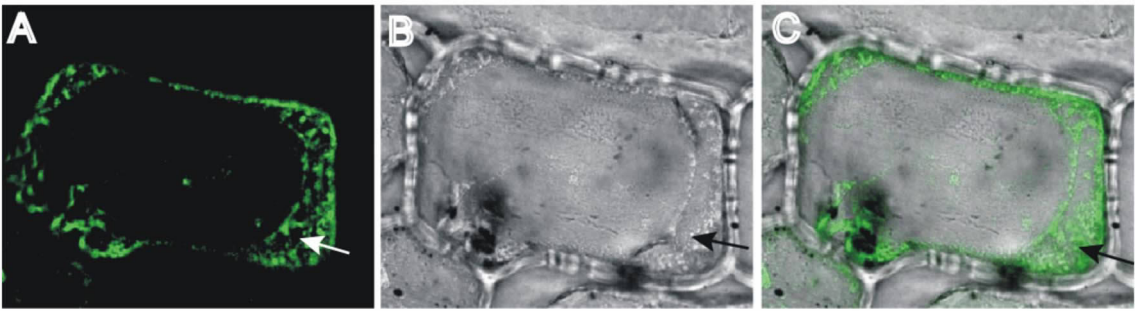
采用基因枪轰击洋葱表皮观察 GFP 瞬时表达,在共聚焦显微镜 (Nikon A1) 下观察,结果如图 4 所示。荧光通道下 GFP 荧光信号主要存在于植物细胞质膜以外的局部区域 (图 4A),结合白光视野观察,植物细胞在高渗培养基的作用下发生了质壁分离,荧光信号主要位于细胞壁与细胞膜之间 (图 4B);而重叠图更清晰地显示了 GFP 荧光信号存在于细胞间隙中 (图 4C)。这一实验结果显示水稻 α - 淀粉酶信号肽 αAmy3SP 能够指导 GFP 定位于细胞间隙中,表明信号肽 αAmy3SP 能有效帮助目的抗菌肽基因实现细胞间隙表达。

2.4 转基因植株的获得

用花浸法将植物表达载体 p35S - SP - *Rs* 转化拟南芥后,收取种子,萌发时用终浓度为 50μg/mL 的卡那霉素抗性筛选,选择存活植株的幼嫩叶片提取 DNA,用 SP - *Rs* 引物进行 PCR 检测鉴定。最终获得 35 株 p35S - SP - *Rs* 转基因阳性苗。部分检测结果如图 5 所示。扩增条带大小为 252bp。

2.5 转基因拟南芥中 *Rs* 基因表达水平的鉴定

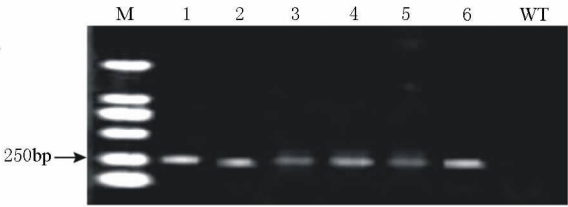
为了检测目的抗菌肽基因 *Rs* 在转基因植株中的表达水平,选择 *Rs* 高量表达的转基因纯系材料用于后续的抗病鉴定试验,利用荧光定量 PCR 对 T₄ 纯系转基因拟南芥阳性植株叶片中目标基因 *Rs* 的表达水平进行检测。分别从 4 个株系中选取了 5 株



注:A:荧光通道; B:白光通道; C:复合通道;箭头指示的部位是细胞膜与细胞壁之间的细胞间隙部分
Note: A: Fluorescence field; B: Bright field; C: Fusion field of fluorescence and bright.
The arrow indicates intercellular space between cell membrane and cell wall

图 4 基因枪轰击洋葱表皮观察 GFP 瞬时表达

Fig. 4 Transient expression of GFP gene by gun bombardment of onion skin

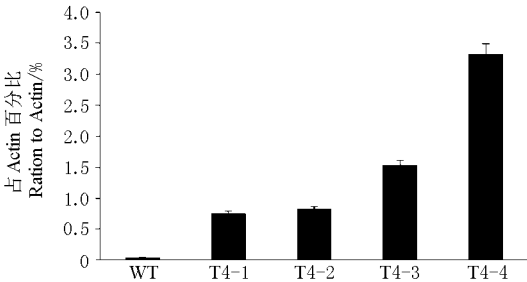


注: M: DNA marker; 1 ~ 5: 待测植株; 6: 质粒阳性对照
Note: M: DNA marker; Lane 1 ~ 5: transgenic Arabidopsis;
Lane 6: positive control

图 5 Rs 转基因拟南芥后代的 PCR 检测

Fig. 5 PCR detection progeny of Rs transgenic Arabidopsis

拟南芥进行了 *Rs* 的相对表达量检测(图 6)。4 个转基因株系中 *Rs* 的表达量均明显高于 WT, 转基因株系中目的基因的表达水平是 WT 株系的 17 ~ 74 倍。说明我们所构建的 p35S - SP - *Rs* 载体转化拟南芥成功, 萝卜抗菌肽 *Rs* 基因在转基因后代植株叶片中的表达得到显著提高。



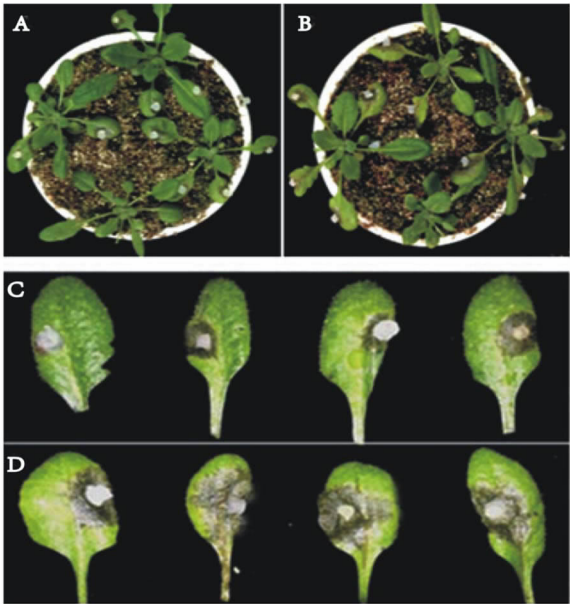
注: WT: 野生型植株; T4 - 1, T4 - 2, T4 - 3, T4 - 4: *Rs* 转基因拟南芥植株 T₄ 的 4 个纯合株系。以 *Actin* 基因的表达量作为内参
Note: WT: wild type Arabidopsis; T4 - 1, T4 - 2, T4 - 3, T4 - 4: 4 homozygous T₄ lines of transgenic Arabidopsis.
Actin gene expression level as reference

图 6 转基因拟南芥植株中 *Rs* 基因的表达水平检测
Fig. 6 Detection *Rs* gene expression level in transgenic Arabidopsis

2.6 转基因植株菌核病抗病性鉴定

播种 T₄ 的纯系拟南芥转基因种子, 同时播种野生型拟南芥作为对照。约 5 周时, 采用菌核病活体叶接种方法进行抗病性鉴定。拟南芥植株活体叶接

种 36h 后, *Rs* 转基因拟南芥叶片刚开始发病, 而 WT 拟南芥叶片开始发黄的同时, 发病也已经较为严重(图 7A、B)。接种 48h 后, WT 叶片病斑面积已经明显扩大, 逐渐接近叶片边缘区域(图 7D), *Rs* 转基因拟南芥叶片病斑明显小于 WT 叶片(图 7C)。这一结果显示, 活体状态和离体状态下 *Rs* 转基因拟南芥材料对核盘菌的抗性都显著增强。说明萝卜抗菌肽 *Rs* 具有很好的核盘菌抗性。



注: A, C: p35S - SP - *Rs* 转基因拟南芥阳性植株叶片; B, D: WT 叶片
Note: A, C: Leaves of transgenic Arabidopsis;
B, D: Leaves of WT Arabidopsis

图 7 拟南芥转基因植株接种菌核病鉴定结果
Fig. 7 Results of transgenic Arabidopsis inoculated with *Sclerotinia sclerotiorum*

为了细致研究 *Rs* 基因对菌核病抗性作用的可能机制, 我们分别测量了野生型拟南芥和 *Rs* 转基因拟南芥接种核盘菌后不同时间点的病斑面积, 对每个时间点的病斑面积进行方差分析, 结果如表 1 所示, 接种后 24h、36h、48h、60h 转基因株系的病斑面

积分别是 0.046 8、0.076 9、0.448 3、0.455 2 cm², 病斑面积明显小于非转基因对照植株, 表明转基因材料与野生型拟南芥相比对菌核病的抗性显著增强。根据上述数据绘制了核盘菌侵染拟南芥转基因植株

表 1 接种后不同时间点病斑面积及差异显著性分析
Table 1 Significant analysis of lesion size at different time points after inoculation with *S. sclerotiorum* mycelia

材料 Material	病斑面积均值/cm ² Average lesion size				5% 显著水平 5% significance level
	24h	36h	48h	60h	
WT	0.123 4	0.529 6	0.879 4	1.171 2	a
35s - SP - Rs	0.046 8	0.076 9	0.448 3	0.455 2	b

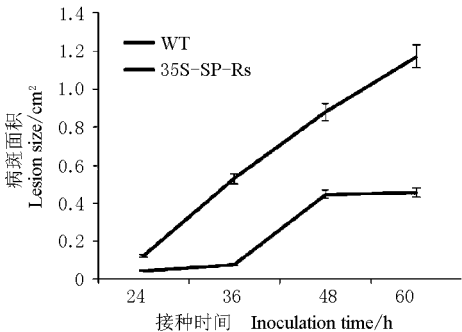


图 8 拟南芥的病斑扩展曲线
Fig. 8 Development of lesion size on Arabidopsis leaves

3 结论与讨论

抗菌肽是一类对细菌、真菌等微生物有抑制作用的小分子肽,在植物育种基因工程和培育农作物抗病新品种中具有广阔的应用前景^[22,23]。抗菌肽基因工程先后在模式植物烟草与马铃薯抗青枯病研究中获得成功^[24~26],随后又用于水稻白叶枯病菌和细条病菌、苹果的梨火疫病、菊花和辣椒等的细菌、真菌病,均取得了一定效果。1992 年 Terras 等^[10]从萝卜种子中分离出一类富含半胱氨酸的小分子量的抗真菌蛋白质(*Raphanus sativus* antifungal proteins, Rs - AFP),这种小蛋白在开花后 45d 合成并分泌至胞外,积累在细胞壁中。当种子萌发、种皮破裂时,蛋白质释放出来,有效地抵制了土壤中病原真菌的侵袭。Rs - AFP2 前体由包括 29 个氨基酸的信号肽和 51 个氨基酸的成熟肽,能够通过引起菌丝顶端膨大和过度分枝来抑制菌丝生长,对多种植物病原真菌和酵母菌有抑制作用,而且对植物和人体培养细胞没有影响^[27,28]。近年来利用萝卜抗菌肽通过转基因技术来提高植物抗性的实验很多,例如将萝卜抗菌肽通过农杆菌介导法导入到野罂粟中提高野罂粟对霜霉病的抗性;导入到马铃薯中提高马铃薯对青枯病的抗性;导入到玉米和小麦等农作物中提高了农作物对植物病原菌的抗性的同时提高了农作物

和 WT 植株后 0 ~ 60h 的病斑面积扩增曲线,转基因植株接种核盘菌 0 ~ 36h 时,菌丝扩展很慢(图 8),推测萝卜抗菌肽 Rs 主要抑制了核盘菌菌丝的扩展。

产量^[29~32]。通过本文的研究发现,萝卜抗菌肽基因 *Rs* 对核盘菌也有显著的抑制作用,将 *Rs* 通过转基因技术转化到拟南芥中得到的纯合株系对核盘菌的抗病性显著增强(图 7、图 8)。

核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*),属于子囊菌亚门(Ascomycotina),盘菌纲(Discomycetes),柔膜菌目(Helotiales),核盘菌科(Sclerotniaceae),核盘菌属(*Sclerotinia fuck*)^[33,34]。核盘菌由菌丝体形成休眠状态的菌核,菌核萌发后首先产生子囊柄,在子囊柄上形成筒状或棒状子囊盘,当子囊盘成熟时释放出椭圆形或纺锤形子囊孢子,子囊孢子为单细胞,无色,是病原菌侵染寄主的主要菌源,寄主范围广泛,对农作物危害性强^[35,36]。油菜种植范围广泛是世界上植物油的重要来源。1884 年,de Bary 最早提出并命名了油菜菌核病病原——核盘菌即 *Sclerotinia sclerotiorum*。菌核病主要通过侵染油菜茎秆,导致植株早枯,引起产量损失和含油量下降。核盘菌的生活史包括菌核形成、菌核萌发和菌丝生长三个阶段,核盘菌在温度为 20 ~ 22℃ 生长最好。李国庆等^[37]发现位于土表和深层的菌核不容易腐烂,在越夏后更容易存活,可以在次年进一步侵染植株^[38]。核盘菌的致病机制目前尚无定论,但普遍认为核盘菌致病的主要原因是致病基因编码着一系列侵染寄主所必需的产物,如降解酶和毒素(如草酸)等,它们帮助病原菌分解大部分寄主细胞壁,进一步促进核盘菌菌丝沿着细胞间隙扩展并进一步破坏寄主细胞结构^[39~43]。

利用电子显微镜观察核盘菌在油菜叶片上侵染过程,显示核盘菌丝首先在叶片上形成复合附着器,每个分枝末端生出侵染垫。借助于酶对寄主表面的软化、消解作用以及附着器产生的压力侵入叶表面腊质、角质层和表皮细胞壁后,在细胞间隙快速生长扩展,破坏细胞膜进入到细胞内部,杀死植物组织细胞,导致油菜组织溃烂,最后菌丝在腐烂叶片上集结

形成菌核^[44]。因此在细胞间隙表达抗菌肽可以在第一时间杀死菌丝,防止菌丝的进一步生长扩展,达到保护宿主细胞的目的。由于分泌表达蛋白容易受到外界环境的影响(如雨水等),无法稳定存在,因此在细胞间隙表达抗菌肽是更合理的选择。

研究表明水稻 α 淀粉酶信号肽(α Amy3SP)是指导 α -淀粉酶靶向细胞内和胞间隙储存淀粉和货运蛋白的必要条件^[13]。本研究利用基因枪轰击洋葱表皮,将p35S-SP-GFP植物表达载体导入其中,发现GFP荧光信号主要存在于植物细胞膜和细胞壁之间的细胞间隙中(图4),证实了 α Amy3SP能有效地将目的基因定位于细胞间隙。

本研究根据核盘菌菌丝主要在胞间隙扩展的特点,利用转基因技术将萝卜抗菌肽基因 R_s 和细胞间隙定位表达信号肽 α Amy3SP连接,在35S启动子的作用下,将目标基因导入到拟南芥以获得抗菌核病的拟南芥植株。转基因拟南芥植株能够正常生长并开花结实,说明萝卜抗菌肽基因 R_s 在信号肽 α Amy3SP的作用下实现的细胞间隙表达对植株没有毒害作用,不影响转基因植株及其后代植株的生长。荧光定量PCR鉴定结果显示,4个转基因株系中 R_s 的表达量均明显高于WT株系,最高是WT的74倍(图6)。而抗病鉴定实验发现获得的拟南芥T₄纯系植株与WT相比对菌核病的抗性增强(图7);通过绘制病斑曲线发现萝卜抗菌肽基因抑制核盘菌的方式主要是通过对抗菌菌丝的抗扩展(图7),这一特性和 α Amy3SP引导抗菌肽在细胞间隙表达,杀死菌丝,从而抑制了菌丝的生长和扩散的预期是一致的。以上实验结果说明,来自萝卜的抗菌肽基因 R_s 对核盘菌具有显著的抑制作用,可以用于拟南芥和油菜等十字花科植物的菌核病防治,为油菜抗菌核病的研究提供了新的基因源。

病虫害严重影响农作物产量,世界上作物产量1/3的损失归因于病害。基于DNA重组、遗传转化和组织培养三大技术基础之上的植物转基因工程技术能在分子水平上定向重组遗传物质,为培育抗病品种提供了新的手段。利用基因工程技术将抗菌活性强的抗菌肽基因转入植物体内从而达到植物抗病的目的已成为研究热点。本研究充分利用了信号肽 α Amy3SP细胞间隙表达定位的作用特点以及核盘菌菌丝主要通过胞间隙扩展进而侵染植物的特点构建了植物表达载体p35S-SP- R_s ,鉴定了一个新的对核盘菌有抑制作用的抗菌肽 R_s 基因,并成功建立了一个新的菌核病防治转基因体系,为油菜菌核病的防治提供了理论基础。

参考文献:

- [1] 傅廷栋. 油菜杂种优势研究利用的现状与思考[J]. 中国油料作物学报, 2008, 30(30): 1-5.
- [2] 陈利锋, 徐敬友. 农业植物病理学(南方本)[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001. 2.
- [3] Liu S, Wang H, Zhang J, et al. In vitro mutation and selection of doubled-haploid *Brassica napus* lines with improved resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* [J]. Plant Cell Rep, 2005, 24: 133-144.
- [4] Gordon Y J, Romanowski E G. A review of antimicrobial peptides and their therapeutic potential as anti-infective drugs[J]. Curr Eye Res, 2005, 30(7): 505-515.
- [5] Boman H G. Peptide antibiotics and their role in innate immunity[J]. Annu Rev Immunol, 1995, 13: 61-92.
- [6] Hancock R E, Chapple D S. Peptide antibiotics[J]. Antimicrob Agent Chemother, 1999, 43(6): 1317-1323.
- [7] Hwang P M, Vogel H J. Structure-function relationships of antimicrobial peptides[J]. Biochem Cell Biol, 1998, 76(2-3): 235-246.
- [8] Otvos L Jr. The short proline-rich antibacterial peptide family[J]. Cell Mol Life Sci, 2002(59): 1138-1150.
- [9] Murad A M, Pelegrini P B, Neto S M. Novel findings of defensins and their utilization in construction of transgenic plants[J]. Transgenic Plant Journal, 2001(1): 39-48.
- [10] Terras F R G, Schoofs H M E, De Bolle F C, et al. Analysis of two novel classes of antifungal proteins from radish seeds[J]. J Biol Chem, 1992(267): 15301-15309.
- [11] 任玉霞, 陈凌娜, 陈继峰, 等. 马铃薯转萝卜抗菌肽基因植株的获得及抗晚疫病的初步鉴定[J]. 中国蔬菜, 2012(6): 68-73.
- [12] Li Z, Zhou M, Zhang Z, et al. Expression of a radish defensin in transgenic wheat confers increased resistance to *Fusarium graminearum* and *Rhizoctonia cerealis* [J]. Funct Integr Genomics, 2011, 11(1): 63-70.
- [13] Chen M H, Huang L F, Li H M, et al. Signal peptide-dependent targeting of a rice α -Amylase and cargo proteins to plastids and extracellular compartments of plant cells[J]. Plant Physiology, 2004, 7(35): 1367-1377.
- [14] Eday C, Reader J, Davis S, et al. Inheritance and expression of introduced DNA in transgenic onion plant (*Allium cepa*) [J]. Ann Appl Biol, 2003, 142(2): 219-224.
- [15] Eday C, Davis S, Catanach A, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of leek (*Allium porrum*) and garlic (*Allium sativum*) [J]. Plant Cell Rep, 2005, 24: 209-215.
- [16] Zhang X, Henriques R, Lin S, et al. *Agrobacterium*-

- mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method [J]. *Nature Protocols*, 2006, 1 (2): 641 – 646.
- [17] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real – time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25 (4): 402 – 408.
- [18] Schmittgen T D, Livak K J. Analysis real – time PCR data by the comparative C (T) method [J]. *Nat Protoc*, 2008, 3 (6): 1 101 – 1 108.
- [19] 胡宝成, 费维新, 李强生, 等. 油菜菌核病抗耐性研究和遗传育种研究进展 [J]. *中国农学通报*, 1993, 9 (1): 10 – 12.
- [20] Kim H S, Sneller C H, Diers B W, et al. Evaluation of soybean cultivars for resistance to *Sclerotinia* stem rot in field environments [J]. *Crop Sci*, 1999, 39 (1): 64 – 68.
- [21] Kim H S, Hartman G L, Manandhar J, et al. Reaction of soybean cultivars to *Sclerotinia* stem rot in field, greenhouse and laboratory evaluations [J]. *Crop Sci*, 2000, 40 (1): 665 – 669.
- [22] Boman H G, Hultmark D. Cell free immunity in insects [J]. *Ann Rev Microbiol*, 1987, 41 (2): 103 – 107.
- [23] 于 健, 邱芳萍, 张 玲. 抗菌肽及其应用前景 [J]. *长春工业大学学报*, 2004, 25 (1): 65 – 67.
- [24] 贾士荣, 屈贤铭, 冯兰香, 等. 转抗菌肽基因提高马铃薯对青枯病的抗性 [J]. *中国农业科学*, 1998, 31 (3): 1 – 4.
- [25] 金光辉, 白雅梅, 孙秀梅, 等. 适合马铃薯晚疫病菌生长的培养基改良试验 [J]. *中国马铃薯*, 2007, 21 (6): 331 – 333.
- [26] 罗小英, 曾雪嘉, 肖月华, 等. 抗菌肽和几丁质酶基因提高烟草对黑胫病菌和赤星病菌的抗性研究 [J]. *植物病理学报*, 2005, 35 (3): 249 – 255.
- [27] Thevissen K, Ghazi A, De Samblanx G W, et al. Fungal membrane responses induced by plant defensins and thionins [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271: 15 018 – 15 025.
- [28] Spelbrink R G, Dilmac N, Allen A, et al. Differential antifungal and calcium channel blocking activity among structurally related plant defensins [J]. *Plant Physiology*, 2004, 8: 2 055 – 2 067.
- [29] Cheng M, Fry J E, Pang S Z, et al. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *Plant Physiology*, 1997, 115 (5): 971 – 980.
- [30] 蔡敏莺, 白永延, 赵艳丽, 等. 转抗菌肽基因提高马铃薯对青枯病的抗性 [J]. *中国农业科学*, 1988, 31 (3): 269 – 272.
- [31] 曾君祉, 王东江, 吴有深, 等. 用花粉管途径获得小麦转基因植株 [J]. *中国科学*, 1993, 23 (3): 256 – 262.
- [32] 王景雪, 孙 毅, 崔贵梅, 等. 花粉介导法获得玉米转基因植株 [J]. *植物学报*, 2001, 43 (3): 275 – 279.
- [33] 吴纯仁, 刘后利. 油菜菌核病致病机理的研究 VII 抗 (耐) 病性的组织病理学 [J]. *中国油料*, 1991 (1): 27 – 29.
- [34] 吴纯仁, 刘后利. 油菜菌核病致病机理的研究 I: 植物毒素的产生及毒素晶体扫描电镜观察 [J]. *中国油料*, 1989 (1): 22 – 24.
- [35] Bolton M D, Thomma B P, Nelson B D, et al. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2006, 7 (1): 1 – 16.
- [36] Boland G F, Hall R. An index of plant hosts susceptible to *Sclerotinia sclerotiorum* [J]. *Can J Plant Pathol*, 1994, 16 (2): 93 – 108.
- [37] 李国庆, 王道本. 核盘菌菌核田间存活初探 [J]. *华中农业大学学报*, 1993, 12 (3): 399 – 400.
- [38] 王道本. 核盘菌论丛 [M]. 北京: 农业大学出版社, 1986. 1 – 20.
- [39] 李秀丽, 高智谋. 核盘菌治病分子机理研究进展 [J]. *安徽农业大学学报*, 2013, 40 (2): 266 – 272.
- [40] Marciano P. Oxalic acid, cell wall – degrading enzymes and pH in pathogenesis and their significance in the virulence of two *Sclerotinia Sclerotiorum* isolates on sunflower [J]. *Physiol Plant Pathol*, 1983, 22 (11): 339 – 345.
- [41] Godoy G, Steadman J R, Dickman M B, et al. Use of mutants to demonstrate the role of oxalic acid in pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* on *Phaseolus vulgaris* [J]. *Physiol Mol Plant Pathol*, 1990, 37: 179 – 191.
- [42] Maxwell D P, Lumsden R D. Oxalic acid production by *Sclerotinia sclerotiorum* in infected bean and in culture [J]. *Phytopathology*, 1970, 60: 1 395 – 1 398.
- [43] Bateman D F, Beer S V. Simultaneous production and synergistic action of oxalic acid and polygalacturonase during pathogenesis by *Sclerotium rolfsii* [J]. *Phytopathology*, 1965, 55: 204 – 211.
- [44] Bateman D F. An induced mechanism of tissue resistance to polygalacturonase in *Rhizoctonia* – infected hypocotyls of bean [J]. *Phytopathology*, 1964, 54: 438 – 445.