

维管束发育相关基因 *sm-Nvas* 对水稻稻瘟病抗性分析

张俊, 卢卫, 谭艳平, 刘学群, 王春台*

(中南民族大学生命科学院, 生物技术国家民委重点实验室/武陵山区特色资源植物种质保护与利用湖北省重点实验室, 湖北武汉 430074)

摘要 [目的]探究烟草维管束发育相关基因 *sm-Nvas* 对水稻稻瘟病的抗性。[方法]构建 pCambia1305.1-*sm-Nvas* 二元表达载体, 利用农杆菌介导的愈伤转化法转化水稻 YTB, 对转基因阳性植株接种稻瘟病菌后进行抗性观察。[结果]成功构建了 pCambia1305.1-*sm-Nvas* 二元超表达载体, 获得了转 *sm-Nvas* YTB 植株。离体接种稻瘟病菌后转基因植株的病斑比受体品种 YTB 的小。[结论]转 *sm-Nvas* 基因水稻具有稻瘟病抗性。

关键词 维管束; *sm-Nvas*; 稻瘟病; 抗性

中图分类号 S188 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2019)13-0090-02

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2019.13.029

开放科学(资源服务)标识码(OSID): 

Analysis on Resistance of Tobacco Vascular Bundle Related Gene *sm-Nvas* to Rice Blast

ZHANG Jun, LU Wei, TAN Yan-ping et al (Key Lab for Biotechnology of State Ethnic Affairs Commission, Hubei Provincial Key Laboratory for Protection and Application of Special Plants in Wuling Area of China, College of Life Science, South-Central University for Nationalities, Wuhan, Hubei 430074)

Abstract [Objective] To investigate the resistance of tobacco vascular bundle related gene *sm-Nvas* to rice blast. [Method] A plant binary expression vector pCambia1305.1-*sm-Nvas* was constructed, and transformed to recipient variety YTB by *Agrobacterium*-mediated callus transformation. The resistance of the transgenic positive plant was investigated after inoculation with the rice blast fungi. [Result] The pCambia1305.1-*sm-Nvas* binary over-expression vector was successfully constructed, and the transgenic YTB with *sm-Nvas* was obtained. The scab of the transgenic plant was smaller than that of the receptor variety YTB after inoculation of rice blast fungi *in vitro*. [Conclusion] The transgenic rice with *sm-Nvas* gene is resistance to rice blast.

Key words Vascular bundle; *sm-Nvas*; Rice blast; Resistance

植物维管束是植物体内一种相互连通的系统, 连接植物地下部和地上部, 在支撑植物向上生长以及水分和营养物质的运输上起到了关键作用^[1]。许多病虫害也能利用维管束系统在植物体内传播, 影响植物的生长发育^[2]。维管束相关基因在维管束系统中特异表达, 从而调节维管束生长发育, 增强植物维管束病虫害的防控能力^[3-5]。杨泽峰等^[6]发现水稻 *TAL* 基因在维管组织中特异表达, RNA 干扰该转基因植株水稻后, 表型出现矮化和叶片卷曲易染病的特征。马玲^[7]发现水稻 *AVB* 基因启动子在水稻维管束韧皮部特异表达, 可应用于维管束疾病的防治。Singer 等^[8]发现脐橙蔗糖合成酶 1(CsSUS1p)启动子可以驱动外源基因在维管束韧皮部表达, 可应用于防治维管束疾病。Liu 等^[9]采用差异显示技术, 从烟草中分离得到一个受甲基茉莉酸和水杨酸双重诱导的基因序列, 该基因启动子使外源基因在维管束组织中特异表达^[10], 命名为 *sm-Nvas*。为了研究 *sm-Nvas* 基因在水稻中是否与病害的抗性相关, 笔者以 pCambia1305 为骨架构建 *sm-Nvas* 基因的超表达载体, 并转入水稻品种粤泰 B(YTB)中, 考察水稻中超表达 *sm-Nvas* 对水稻稻瘟病抗性的影响, 以期揭示该基因的生物学功能提供证据。

1 材料与方法

1.1 材料 稻瘟病菌 race007、水稻粤泰 B(YTB)、W38 型烟

草、根瘤农杆菌 EHAI05、载体 pCambia1305、载体 PUD18-T 均由中南民族大学武陵山区特色资源植物种质保护与利用湖北省重点实验室提供。rTaq 酶、DNA 分子质量 Marker 购买于 TaKaRa 公司; DNA 引物合成由擎科生物技术有限公司(武汉部)完成。

1.2 仪器 FC5515R 微型高速冷冻离心机(美国); C1000 touch thermal cycler PCR 仪(美国 Bio-Rad); Universal Hold II 凝胶成像系统(美国); SBD50-1 Heto-Holten 水浴锅(丹麦); Nikon SMZ1500 Microscop 荧光体式显微镜(日本)。

1.3 方法

1.3.1 植株表达载体的构建。维管束发育相关基因 *sm-Nvas* 全序列参考文献[9], 通过软件分析并利用具有 *PmaC* I 和 *Nco* I 酶切位点引物扩增 *sm-Nvas* 基因全长。用 *PmaC* I 和 *Nco* I 双酶切 *sm-Nvas* 基因 PCR 扩增产物和 pCambia1305.1 载体质粒 DNA, 经过电泳及回收, 用 T₄ DNA 连接酶连接质粒与目的片段(图 1), 然后转化到大肠杆菌中, 提取质粒 DNA 用载体引物进行菌落 PCR 检测, 大小正确的质粒进一步进行测序鉴定。

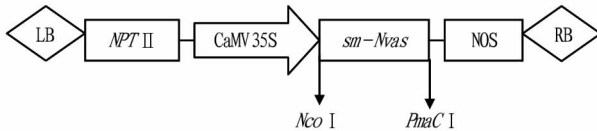


图 1 二元表达载体的结构示意图

Fig. 1 The structure diagram of dual expression vector

1.3.2 根瘤农杆菌介导的遗传转化。将构建成功的二元表达载体电击转化农杆菌 EHA105, 筛选阳性农杆菌, 用 MS 培

基金项目 湖北省技术创新专项重点项目(2018BFC360); 中央高校基本科研业务费专项(CZY18029、CZP17017)。

作者简介 张俊(1991—), 男, 湖南龙山人, 硕士研究生, 研究方向: 生物化学与分子生物学。* 通信作者, 教授, 博士, 硕士生导师, 从事分子遗传学研究。

收稿日期 2019-03-15

培养基将转化成功的农杆菌悬浮培养到菌液浓度 OD₆₀₀ 约为 0.5,将受体品种 YTB 种子诱导的愈伤组织在浸染液中浸染 30 min,将干燥的愈伤组织转移到共培养基上暗培养 3 d,在筛选培养基暗培养 20 d,转移到分化培养基上光培养 30 d 左右,最后移到生根培养基上继续培养 15 d 左右,炼苗并种植。

1.3.3 阳性植株的鉴定。采用 CTAB 法进行 DNA 样品提取。取转基因水稻叶片,加液氮后迅速研磨成粉末状,加入 65 ℃ 预热的 CTAB 提取液并充分混匀,放入水浴锅中 1 h 后至室温,加入等体积氯仿:异戊醇(24:1),混匀离心取上清液,加入 2 倍体积无水乙醇,混匀后冰浴。离心弃上清,用 75% 乙醇洗涤沉淀,沉淀自然风干后加 TE 溶解,-20 ℃ 保存。

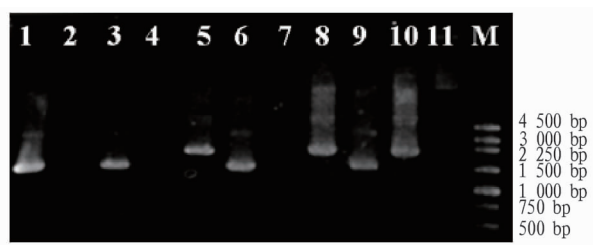
利用引物 HPTF226(序列为 5'-GAAGTGCTTGACATTGGGGAGT-3')和 HPTF697(序列为 5'-AGATGTTGGCGACCTCGTATT-3')进行潮霉素检测。15 μL PCR 反应体系包括 1.5 μL 10×*rTaq* buffer、引物 F 和 R (10 μmol/L) 各 0.25 μL、1 μL dNTP Mix (2.5 mmol/L)、0.1 μL *rTaq* 酶 (5 U/μL)、1.5 μL DNA 模板和 10.4 μL 去离子水。反应程序为 94 ℃ 预变性 3 min;94 ℃ 变性 30 s,57 ℃ 复性 30 s,72 ℃ 延伸 1 min,34 个循环;72 ℃ 延伸 5 min。反应结束后用 1% 琼脂糖凝胶检测。

1.3.4 转基因水稻的种植及抗病性鉴定。常规方法在温室盆栽转 *sm-Nvas* 水稻株系及对照品种粤泰 B (YTB)。

取保存于-20 ℃ 的稻瘟病菌生理小种 race007 菌株于燕麦培养上活化后并扩大培养,待菌体覆盖整个燕麦培养基表面后,除去白色菌丝置于紫外灯下培养产孢,配制孢子悬浮液,取水稻剑叶置于苯并咪唑湿润滤纸上,将孢子悬浮液喷洒在水稻叶片上,保湿培养后观察发病情况。

2 结果与分析

2.1 *sm-Nvas* 超表达双元载体构建 将构建好的表达载体进行菌落 PCR 检测,扩增出的目的条带与预期大小相符的有泳道 3、6、9 共 3 个阳性克隆(图 2),进一步的测序结果表明超表达载体构建成功。



注:1~10. 不同重组质粒;11. 阴性对照
Note:1~10. Different recombinant plasmids;11. Negative control

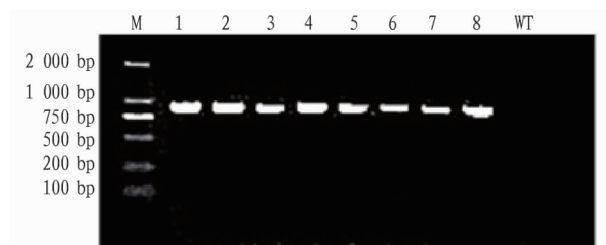
图 2 重组质粒的菌落 PCR 检测

Fig.2 Identification of recombinant plasmid by cloning PCR

2.2 转基因植株阳性鉴定 提取超表达 *sm-Nvas* 的转基因植株基因组 DNA 进行潮霉素抗性基因检测,阳性转基因植株能扩增出特异条带(800 bp 左右),而对照组 WT 受体材料 YTB 没有,图 3 表明已成功获得转 *sm-Nvas* 的阳性植株。

2.3 转 *sm-Nvas* 基因水稻抗性鉴定 当转基因 *sm-Nvas* 水稻植株剑叶抽出来后,取剑叶与倒数第二叶进行稻瘟病菌

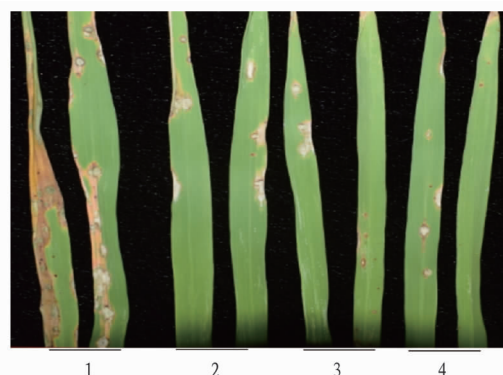
race007 离体接种,5 d 后观察的结果显示阳性转基因植株与对照组 YTB 相比,染病的病斑面积、宽度和长度明显比对照组受体品种 YTB 的小(图 4)。



注:1~8. 不同转基因植株;WT. 受体品种 YTB
Note:1~8. Different transgenic plants;WT. Recipient variety YTB

图 3 转 *sm-Nvas* 基因 YTB 阳性植株的 PCR 检测

Fig.3 PCR detection of the transgenic *sm-Nvas* gene YTB positive plants



注:1. 受体品种 YTB;2~4. 不同转基因植株
Note:1. Recipient variety YTB;2~4. Different transgenic plants

图 4 不同转基因植株对稻瘟病菌的反应

Fig.4 The reaction of different transgenic rice on rice blast fungi

3 讨论

越来越多的研究通过寻找合适的维管束相关基因来解决植物的病虫害问题,Chen 等^[1]研究发现 *GbaVd1* 和 *GbaVd2* 基因在拟南芥中提高了转基因株系维管束的木质化程度,增强了对大丽轮枝菌的抗性,表明 *GbaVd1* 和 *GbaVd2* 基因具有抗黄萎病功能。

该试验通过构建一个 pCambia1305.1-*sm-Nvas* 双元表达载体,利用农杆菌介导成熟种子胚愈伤转化水稻。在研究转基因 *sm-Nvas* 水稻植株的抗性时,发现转基因 *sm-Nvas* 在水稻中具有水稻叶瘟抗性特征,其抗性机理正在研究中。该研究结果为弄清 *sm-Nvas* 基因在植物体内的生物学功能提供了重要参考。

参考文献

- [1] ELO A,IMMANEN J,NIEMINEN K,et al. Stem cell function during plant vascular development[J]. Semin Cell Dev Biol,2009,20(9):1097-1106.
- [2] 杨郁文,张保龙,陈天子,等. 棉花 PGHNS 启动子维管束特异表达元件的分离及功能研究[J]. 江苏农业学报,2012,28(6):1223-1228.
- [3] 张明菊,王红梅,王书珍,等. 植物对维管束病原菌的防卫反应机制研究进展[J]. 植物生理学报,2015,51(5):601-609.
- [4] ZHANG B L,OUYANG Y N,XU J Y,et al. Cadmium remobilization from shoot to grain is related to pH of vascular bundle in rice[J]. Ecotoxicol Environ Saf,2018,147:913-918.

130 bp, *mtg* 长度 1 200 bp。电泳结果如图 4 所示,目的片段总长度 1 330 bp,与 PCR 所得片段大小一致,说明片段 *SP_{wapA}-mtg* 成功插入到载体 pMA5 上。将 PCR 鉴定正确的阳性克隆接种于 LB+氨苄霉素的液体培养基中,培养过夜,提取质粒送去公司测序。

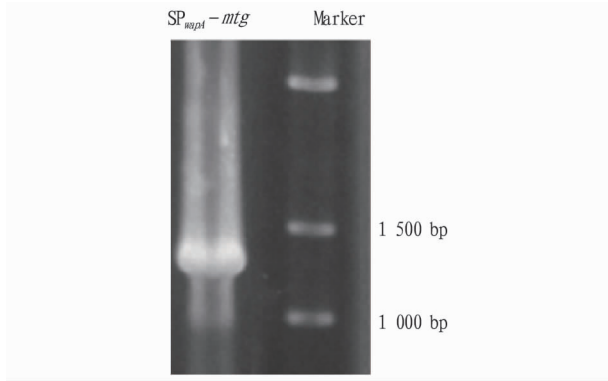


图 4 大肠杆菌菌落 PCR 验证

Fig. 4 PCR validation of *E. coli* colony

2.5 双酶切验证 将测序正确的 pMA5_{*mtg*} 重组质粒转入枯草芽孢杆菌中,在抗性平板上涂布并培养过夜,挑取单克隆接种于 LB+卡那霉素的液体培养基中培养过夜,提取质粒,进行 *Nde*I 和 *Nhe*I 双酶切验证。电泳结果如图 5 所示,重组质粒 pMA5_{*mtg*} 经双酶切作用后有 2 条清晰的条带,较小的片段大小为 1 300 bp 左右,较大的片段为 7 100 bp 左右,与 *SP_{wapA}-mtg* 大小(1 330 bp)和 pMA5 片段大小(7 107 bp)相符,且其 DNA 片段测序结果显示所插入的序列完全正确。

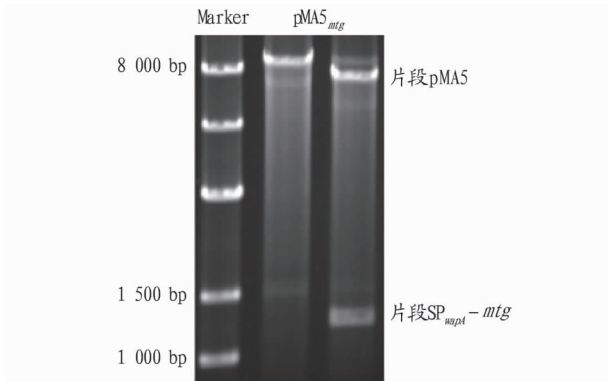


图 5 重组质粒双酶切验证

Fig. 5 Double restriction enzyme digestion of recombinant vector

3 讨论

谷氨酰胺转氨酶是催化蛋白质或多肽间发生共价交联反应的转移酶,可促进蛋白质凝胶化,在食品、医药、化妆品等领域有广泛应用^[7-8]。微生物来源的谷氨酰胺转氨酶是目前研究的热点,但存在成本高、活力低、稳定性差等问题^[9]。利用分子生物学技术对 MTG 基因进行改造并实现异源表达是目前最为有效的方法^[10-11]。

该试验通过基因工程技术在大肠杆菌中构建 pMA5_{*mtg*} 重组载体,再将其转入枯草芽孢杆菌中,从而获得重组表达菌株。这为 MTG 在革兰氏阳性菌中的表达研究提供了依据,同时也证明了枯草芽孢杆菌作为异源蛋白工业生产的宿主具有很大的潜力,是一个有意义的研究性课题。

参考文献

- [1] YOKOYAMA K, NIO N, KIKUCHI Y. Properties and applications of microbial transglutaminase [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2004, 64 (4): 447-454.
- [2] GASPAR A L C, DE GÓES-FAVONI S P. Action of microbial transglutaminase (MTGase) in the modification of food proteins: A review [J]. Food Chem, 2015, 171: 315-322.
- [3] JAROS D, PARTSCHEFELD C, HENLE T, et al. Transglutaminase in dairy products: Chemistry, physics, applications [J]. J Texture Stud, 2006, 37 (2): 113-155.
- [4] YANG M T, CHANG C H, WANG J M, et al. Crystal structure and inhibition studies of transglutaminase from *Streptomyces mobaraense* [J]. J Biol Chem, 2011, 286 (9): 7301-7307.
- [5] GUERRA-RODRÍGUEZ E, VÁZQUEZ M. Evaluation of a novel low-cost culture medium containing exclusively milk, potato and glycerol for microbial transglutaminase production by *Streptomyces mobaraensis* [J]. Chem Eng Res Des, 2014, 92 (4): 784-791.
- [6] LIU L, LIU Y F, SHIN H D, et al. Developing *Bacillus* spp. as a cell factory for production of microbial enzymes and industrially important biochemicals in the context of systems and synthetic biology [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2013, 97 (14): 6113-6127.
- [7] GRIFFIN M, CASADIO R, BERGAMINI C M. Transglutaminases: Nature's biological glues [J]. Biochem J, 2002, 368 (Pt 2): 377-396.
- [8] HONG G P, XIONG Y L. Microbial transglutaminase-induced structural and rheological changes of cationic and anionic myofibrillar proteins [J]. Meat Sci, 2012, 91 (1): 36-42.
- [9] MACEDO J A, SETTE L D, SATO H H. Purification and characterization of a new transglutaminase from *Streptomyces* sp. isolated in Brazilian soil [J]. J Food Biochem, 2011, 35 (4): 1361-1372.
- [10] MARX C K, HERTEL T C, PIETZSCH M. Soluble expression of a pro-transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* in *Escherichia coli* [J]. Enzyme Microb Technol, 2007, 40 (6): 1543-1550.
- [11] ITAYA H, KIKUCHI Y. Secretion of *Streptomyces mobaraensis* pro-transglutaminase by coryneform bacteria [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2008, 78 (4): 621-625.

(上接第 91 页)

- [5] 李梦阳, 彭冠云, 邓彪, 等. 水稻维管束的研究进展 [J]. 植物生理学报, 2017, 53 (9): 1586-1590.
- [6] 杨泽峰, 周勇, 梁国华, 等. 陆生植物 TAL 基因的水平转移起源及对水稻维管束发育和产量性状的作用 [C]// 内蒙古民族大学、浙江省生物信息学会. “农业健康与环境”组学大数据整合生物信息学研讨会论文集. 杭州: 浙江省科学技术协会, 2017.
- [7] 马玲. 水稻维管束发育相关基因 AVB 的图位克隆与功能分析 [D]. 重庆: 西南大学, 2016.
- [8] SINGER S D, HILY J M, COX K D. The sucrose synthase-1 promoter from *Citrus sinensis* directs expression of the β -glucuronidase reporter gene in

phloem tissue and in response to wounding in transgenic plants [J]. Planta, 2011, 234 (3): 623-637.

- [9] LIU X Q, XU X, WANG C T, et al. A novel family of gene expression induced by methyl Jasmonate in tobacco (*Nicotiana tabacum*) [C]// The international conference on status of plant, animal & microbe genome research XI. San Diego: [s. n.], 2003: 833.
- [10] 谭艳平, 叶莲, 何福收, 等. 烟草维管束发育相关基因 Nvas 启动子顺式作用元件鉴定 [J]. 中南民族大学学报 (自然科学版), 2018, 37 (2): 31-35.
- [11] CHEN J Y, LI N Y, MA X F, et al. The ectopic overexpression of the cotton Ve1 and Ve2-homolog sequences leads to resistance response to verticillium wilt in *Arabidopsis* [J]. Front Plant Sci, 2017, 8: 844.