

DIO:10.3724/SP.J.1238.2011.00143

拮抗菌 2-Q-9 抑菌相关基因 *BCCodY* 转化烟草及其功能

彭曙光^{1,2}, 陈武^{3a}, 程诚^{3b}, 黎定军^{3c,4*}

(1.湖南省烟草公司 烟叶处, 湖南 长沙 410007; 2.中国烟草中南农业试验站, 湖南 长沙 410128; 3.湖南农业大学 a.作物学博士后流动站; b.农学院; c.生物安全科学技术学院, 湖南 长沙 410128; 4.湖南广播电视大学, 湖南 长沙 410004)

摘要: 将拮抗菌 2-Q-9 的 1 个抑菌相关基因 *BCCodY* 连接至遗传转化载体并转化烟草品种 K326。PCR 结果表明, 该基因被成功转化。反转录 PCR 结果表明, *BCCodY* 基因在 K326 中被转录成 mRNA, 说明该基因能在转基因植株中表达。为了鉴定 *BCCodY* 在转基因 K326 中的生物学功能, 采用叶腋针刺法将烟草青枯病菌接种转基因植株, 在接种后 7 d 内从转基因植株中分离出的青枯病菌菌落数低于非转基因植株; 但接种 9 d 后, 从两类植株中分离出的青枯病菌菌落数趋于一致, 病情指数也基本相同。说明转 *BCCodY* 基因的烟草植株在接种青枯菌初期能抑制青枯病菌, 但后期的抑制效果不明显。

关键词: 拮抗菌 2-Q-9; *BCCodY* 基因; 烟草; 功能

中图分类号: Q785 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2011)02-0143-04

Transformation and function of *BCCodY* of antagonistic bacterium 2-Q-9 in transgenic tobacco variety K326

PENG Shu-guang^{1,2}, CHEN Wu^{3a}, CHENG Cheng^{3b}, LI Ding-jun^{3c,4*}

(1.Department of Tobacco-Leaf, Hunan Tobacco Company, Changsha 410007, China; 2.China Tobacco South Experimental Station, Changsha 410128, China; 3.a.Postdoctoral Research Station of Crop Science; b.College of Agronomy; c. College of Bio-Safety Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 4. Hunan Radio and TV University, Changsha 410004, China)

Abstract: This paper is an attempt to ligate the *BCCodY* gene of *Bacillus choshinensis* strain 2-Q-9 to vector pCHF3, and then transforme the recombination vector *pCHF3::BCCodY* into tobacco variety K326, which was successfully identified by polymerase chain reaction (PCR). Reverse transcription (RT)-PCR was performed to analyze expression of *BCCodY* gene in transgenic plants. The results illustrated that *BCCodY* gene can be transcribed by CaMV 35s promoter. To characterize the biological function of *BCCodY* in transgenic K326 plants, transgenic plants were inoculated with *Rolstonia solanacearum* strain RS2-1 by injection. The results showed that the colony number of RS2-1 isolated from transgenic K326 plants was fewer than wild plants within 7 days after inoculation, but the difference of colony number of transgenic and wild plant gradually disappeared after 9 days. It could be deduced that the *BCCodY* gene maybe performed antagonistic ability against *R. Solanacearum* in transgenic K326 plants.

Key words: *Bacillus choshinensis* 2-Q-9; *BCCodY* gene; tobacco; function

前期研究表明, 拮抗菌 *Bacillus choshinensis* 2-Q-9 对烟草青枯病菌不仅有较强的抑制作用^[1], 还能提升烟草幼苗根系中还原型脱氢酶的表达水

平^[2]。拮抗菌在培养过程中向胞外分泌的抑菌物质理化性质稳定, 耐高温处理^[3], 进一步发现, 抑菌活性成分为肽类物质, 串联质谱测序结果表明, 它

收稿日期: 2011-03-04

基金项目: 湖南省自然科学基金项目(BK0431); 湖南省教育厅青年项目(03B012)

作者简介: 彭曙光(1973—), 男, 湖南益阳人, 硕士, 农艺师; *通信作者, dingjun64@hunau.net

与 *Clostridium tetani* E88 的转录因子抑制子 CodY(CECodY)相似^[4]。在此基础上,利用简并 PCR 和染色体步移等方法克隆了拮抗菌 *B. choshinensis* 的 1 个与抑菌相关的基因(*BCCodY*),该基因属于 *CodY* 基因家族,它编码的产物与 CodY 在氨基酸水平的相似性达 77%^[5],笔者继续将该抑菌相关基因转化烟草 K326,以进一步验证其功能。

1 材料与方法

1.1 材料

拮抗菌 *B. choshinensis* 2-Q-9、烟草青枯病菌 (*Rolstonia solanacearum*) 强致病力菌株 RS2-1, 均为湖南农业大学生物安全科技学院植物病理教研室保存; *Escherichia coli* DH5 α 及 *Agrobacterium* 菌株 C58C1 均为中国农业科学院蔬菜花卉研究所生物技术室保存; 农杆菌转化载体 pCHF3 由中国农业科学院蔬菜花卉研究所陈国华博士惠赠。

烟草品种 K326 由中国烟草公司中南农业试验站提供。

基本培养基(MS1): MS 培养基+3%蔗糖+0.7%琼脂粉, pH 5.8; 预培养及共培养培养基(MS2): MS1+1.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA; 选择培养基(MS3): MS1+1.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA + 250 mg/L Cef + 50 mg/L Kan; 生根培养基(MS4): MS1+0.2 mg/L NAA + 250 mg/L Cef + 30 mg/L Kan; 细菌培养用培养基 LB 液体及固体培养基, 用以培养 *E. coli* DH5 α 和农杆菌菌株 C58C1; 转化

重组质粒 pCHF3::*BCCodY* 后应往培养基中加入 50 μ g/mL 壮观霉素(Spectinomycin)。

质粒提取试剂盒购自天根公司(北京); 限制性内切酶、*T*₄ 连接酶均购自 NEB; TRIZoL 购自 Invitrogen; 反转录酶、RNase 抑制剂、T 载体试剂盒和 Oligo dT 购自 TAKARA; MS 培养基及抗生素购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 重组转化载体 pCHF3::*BCCodY* 的构建

碱裂解法提取质粒载体, 纯化后用限制性内切酶 *Bam*HI 完全酶切, 再用去磷酸化酶(CIP)处理后备用; 用于扩增 *BCCodY* 的上下游引物的 5'末端分别加上 *Bam*HI 的酶切位点: 用高保真酶从 *B. choshinensis* 2-Q-9 基因组 DNA 中扩增 *BCCodY* 并连接至 T 载体, 送测序验证; 验证正确的 *BCCodY* 经 *Bam*HI 完全酶切后与 pCHF3 16 $^{\circ}$ C 连接过夜, 随即转化 *E. coli* DH5 α 的感受态细胞; 再从含重组质粒的 *E. coli* DH5 α 中提取质粒, 利用引物组合进行 PCR 验证(引物序列见表 1), 选择插入方向正确的重组质粒电激转化农杆菌菌株 C58C1, 电激操作参照电激仪所附说明书(Bio-Rad, MicroPlus)。在含四环素和壮观霉素的 LB 平皿上培养, 选择单菌落接种含相同抗生素的 LB 液体培养基, 28 $^{\circ}$ C 培养至 $OD_{600}=0.4$ 时, 4 000 r/min 离心后收集菌体; 用液体 MS 漂洗 1 次后再次离心收集菌体, 最后用相同体积的液体 MS 重悬, 用于后续的转基因操作。

表 1 PCR 引物

Table 1 Primers used for PCR and reverse transcription(RT)-PCR

引物	序列	产物大小/bp	退火温度/ $^{\circ}$ C	备注
M-F	5'-CACAATCCCCTATCCTTCG-3'	868	55	验证插入片段的连接方向
<i>BCCodY</i> -R	5'-TTCTTGTTTTGACAGTAGATCCAT-3'			
<i>BCCodY</i> -F	5'-ATGGATCTACTGTCAAAAACAAGAA-3'	780	53	烟草转基因验证、测序及反转录
<i>BCCodY</i> -R	5'-TTCTTGTTTTGACAGTAGATCCAT-3'			
<i>NPT II</i> -F	5'-TATGACTGGGCACAACAGACAA-3'	674	59	烟草转基因验证
<i>NPT II</i> -R	5'-ATACCGTAAAGCACGAGGAAGC-3'			
<i>BCC</i> -F	5'-ggatccATGGATCTACTGTCAAAAACAAGAA-3'	780	62	加 <i>Bam</i> HI 酶切位点的 <i>BCCodY</i> 引物
<i>BCC</i> -R	5'-ggatccTTCTTGTTTTGACAGTAGATCCAT-3'			

1.2.2 烟草植株的遗传转化

烟草的遗传转化参照文献[6]方法进行; 用 CTAB 法提取转基因烟草植株的基因组 DNA^[7], 利用 PCR 初步鉴定再生植株是否为转基因植株。

1.2.3 RNA 提取及反转录

参照随 TRIZoL 所附说明书提取转基因植株幼嫩叶片的总 RNA, 反转录及 PCR 均参照试剂所附说明进行。测序时用引物 *BCCodY*-F/R 分别向两侧

测序, 随后将二者的序列组装, 用于比对。

1.2.4 转基因烟草接种青枯病菌 RS2-1

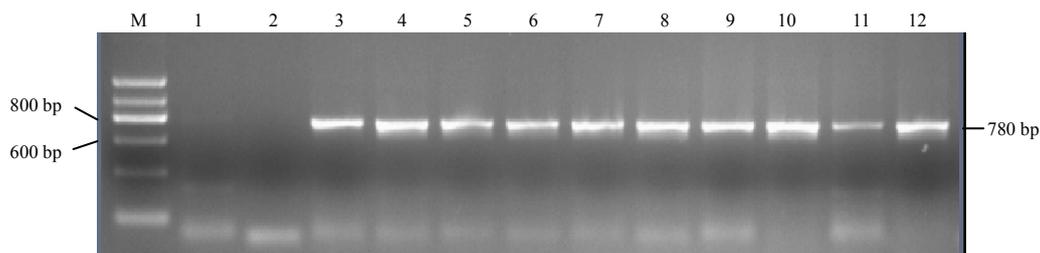
收集转基因验证呈阳性植株的种子, 播种于温室, 14 h 光照, 28 °C, 长至 6~8 片真叶时接种青枯病菌。强致病力青枯病菌的菌落在含 0.03 %TTC 的固体 LB 平皿上培养, 强致病力菌落的特征为中间粉红色、外围呈乳白色。挑取强致病力单菌落, 接种于 LB 液体培养基过夜培养, 第 2 天取适量菌液按 1 : 10 比例稀释于新鲜 LB 液体培养基, 振荡培养 4 h。4 000 r/min 离心 8 min 收集菌体, 用液体 MS 培养基漂洗 1 次后再次离心收集菌体, 最后用液体 MS 稀释至终浓度为 3×10^8 CfU/mL。青枯病菌的接种采用叶腋针刺法^[7]。对照 1 为接种青枯病菌的未转基因烟草植株, 对照 2 为接种清水的未转基因植株, 每个处理 3 次重复; 其余植株用于统计接种后不同时间点的病情指数^[8]。接种后自第 1 天至

第 13 天, 每间隔 1 d 自接种部位剪取 1 g 植物茎组织, 加 1 mL ddH₂O 和适量石英砂研磨, 再加 1 mL 无菌水洗涤研钵, 合并 2 次液体, 1 000 r/min 瞬间离心后取上清液定容至 2 mL, 分别取 2 μ L 用无菌水稀释 1 000 倍 取 100 μ L 涂布于含 0.03 %的 TTC 的 LB 平皿, 每个样品重复 3 皿, 28 °C 培养 2 d 后统计菌落数目(TTC 对其他细菌有抑制作用, 故可以初步认为平皿上的菌落均为青枯病菌)。

2 结果与分析

2.1 *BCCodY* 转化烟草及转基因植株的检测

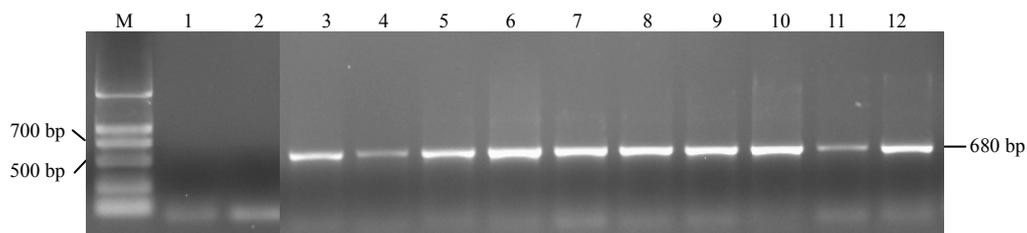
对转基因烟草植株进行 PCR 鉴定, 结果表明, 从转基因烟草基因组 DNA 中分别扩增出 *BCCodY* 和 *NPT II* 基因(图 1、图 2)。说明 *BCCodY* 基因已成功转化烟草品种 K326。



M DNA 分子量标准 1; 1 ddH₂O; 2 非转基因烟草; 3~12 转基因烟草植株。

图 1 转基因烟草 *BCCodY* 基因的 PCR 检测

Fig.1 PCR amplification for *BCCodY* of transgenic K326 plants



M DNA 分子量标准 2; 1 非转基因烟草; 2 ddH₂O; 3~12 转基因烟草植株。

图 2 转基因烟草 *NPT II* 基因的 PCR 检测

Fig.2 PCR amplification for *NPT II* of transgenic K326 plants

2.2 *BCCodY* 在转基因烟草植株中的表达

BCCodY 来源于原核微生物, 该基因的密码子偏好性与真核生物不尽相同, 这可能导致其不转录或转录不正确。笔者提取转基因烟草植株的总 RNA, 利用 *BCCodY* 的下游引物将其反转录成 cDNA, 再进行 PCR 检测, 随后的结果表明, 扩增片段大小为 780 bp, 与预期一致; 回收 PCR 片段连接 T 载体, 测序结果与 *BCCodY* 序列用 DNAMAN

的 Dot Matrix Comparison 比对, 结果表明, 从转基因植株中反转录 PCR 扩增的序列与 *B. choshinensis* 2-Q-9 中 *BCCodY* 的编码序列完全一致, 说明 *BCCodY* 在转基因烟草中被成功转录。

2.3 转 *BCCodY* 的烟草植株对青枯病菌的抗性

接种青枯病菌 RS2-1 后 3 d 内, 从转基因植株的接种部位分离出的青枯菌数目少于非转基因植

株,但二者之间并没有显著性差异;随着时间的推移,这种差异逐渐缩小,至第9天,二者的菌落数基本持平;与之相对应的是,二者的病情指数也维持在相当的水平(表2)。

表2 转基因与非转基因 K326 接种青枯病菌后不同时间点分离的菌数

Table 2 Colony number extracted from transgenic and wild K326 plants after inoculated with *R. solanacearum* strain RS2-1

接种后 时间/d	菌落数/($\times 10^7$ Cfu·mL ⁻¹)			病情指数	
	转基因 植株	非转基因 植株	清水	转基因 植株	阴性 对照
1	2.60	2.62	0	0	0
3	2.49	2.70	0	0	0
5	3.02	3.27	0	1	1
7	3.21	3.53	0	2	2
9	3.99	4.01	0	3	3
11	4.23	4.21	0	4	4
13	4.40	4.45	0	4	4

3 讨论

青枯病是烟草生产上的第一大细菌性病害,每年给中国烟草生产造成的经济损失高达10亿元以上,严重威胁烟草的优质和安全生产(国家烟草专卖局内部统计资料)。目前,利用化学药剂和农业栽培措施防治青枯病的效果不佳,加之烟草对青枯病菌的抗性机理复杂、抗性种质资源匮乏^[9],所以寻找外源的抗青枯病基因就显得尤为重要。土壤中含有大量潜在的生防菌资源,这些生防菌分泌抑菌物质,通过破坏细胞膜的完整性、抑制细胞壁合成和/或抑制初级代谢反应杀死或抑制青枯菌^[10-11]。因此,从生防菌中挖掘抑菌相关基因,并通过转基因的方法筛选具有良好抗性表型的转基因材料,对降低烟草青枯病菌的危害具有重要的现实意义^[12]。

2-Q-9 抑菌相关基因 *BCCodY* 转化烟草品种 K326 后,在 CaMV 35S 启动子的驱动下正常转录成 mRNA。转录是基因表达调节的关键一步,通常也是唯一的一步。尽管转录后阶段或基因表达的其他阶段有时也参与调节过程,但大多数的调节发生在转录前期^[13]。转基因烟草中 *BCCodY* 基因的正常转录说明该基因可能被翻译成蛋白质(肽)。

转 *BCCodY* 基因的烟草对青枯病菌抑制能力较弱的原因可能是:① *B. choshinensis* 2-Q-9 是原核生物,而烟草是高等真核生物,二者的转录、翻译、

修饰及密码子的偏好性等存在较大差异,源自 2-Q-9 菌株的 *BCCodY* 蛋白可能在烟草内未能获得正确的翻译后加工或修饰,进而使其活性降低;② *BCCodY* 并不是 *B. choshinensis* 2-Q-9 外泌主效抗菌肽的编码基因;③ *BCCodY* 在转基因烟草中的表达水平偏低,其浓度低于最低抑菌浓度。在后续试验中,将验证上述推测,以获得具有良好抗性水平的转基因烟草材料。

参考文献:

- [1] 黎定军,廖晓兰,罗宽. 湖南烟草青枯病土壤拮抗菌的筛选[J]. 湖南农业大学学报:自然科学版, 1997, 23(3): 256-259.
- [2] 陈武,何命军,易建华,等. 三株拮抗菌对烟草幼苗根系活力的影响[J]. 湖南农业科学, 2005(4): 26-27.
- [3] 黎定军,陈武,罗宽. 侧孢芽孢杆菌 2-Q-9 外泌抑菌物质性质[J]. 湖南农业大学学报:自然科学版, 2007, 33(4): 471-474.
- [4] 陈武,彭曙光,周清明,等. 侧孢芽孢杆菌 2-Q-9 菌株外泌抗菌肽的纯化与鉴定[J]. 湖南农业大学学报:自然科学版, 2011, 37(1):26-30.
- [5] 张旭,陈武,杨玉婷,等. 青枯菌拮抗菌 2-Q-9 的分子鉴定及抑菌相关基因的克隆[J]. 湖南农业大学学报:自然科学版, 2009, 35(3): 233-236.
- [6] 杨玉婷,陈武,李颖,等. 拟南芥抗病基因 *RPP8* 转化烟草及其表达分析[J]. 作物研究, 2009, 23(2): 125-128.
- [7] 王关林,方宏筠. 植物基因工程[M]. 3版. 北京:科学出版社, 2009: 435-438.
- [8] 邓正平,匡传富,周志成,等. 湖南烟草青枯病菌生理小种测定[J]. 湖南农业大学学报:自然科学版, 2004, 30(1): 47-49.
- [9] Carmelle A, Caranta C, Dintinger J, et al. Identification of QTLs for *Ralstonia solanacearum* race 3-phylo-type II resistance in tomato[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2006, 113(1): 110-121.
- [10] Otto M. Bacterial sensing of antimicrobial peptides[J]. Contrib Microbiol, 2009, 16: 136-149.
- [11] Brogden K A. Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria[J]. Nature Reviews Microbiology, 2005(3): 238-250.
- [12] Montesinos E. Antimicrobial peptides and plant disease control[J]. FEMS Microbiol Lett, 2007, 270: 1-11.
- [13] 本杰明·卢因. 基因VIII[M]. 余龙,江松敏,赵寿元,主译. 北京:科学出版社, 2005: 271-273.

责任编辑: 罗慧敏

英文编辑: 易来宾