

海岛棉 *GbRar1* 和 *GbSgt1* 基因的过量表达 提高烟草离体叶片对赤星病的抗性

李为民 王志兴 张永强 贾士荣*

中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081

摘要 RAR1 和 SGT1 是两个植物抗病蛋白 (R) 防卫反应的信号元件, 在 R 蛋白下游和活性氧产生之间发挥作用. 利用简并引物 PCR 及 3'RACE 等技术, 克隆了海岛棉 *GbRar1* 和 *GbSgt1* 的编码基因. Northern blot 表明, 海岛棉 *GbRar1* 和 *GbSgt1* 基因在转录水平上受棉花黄萎病菌的诱导, 诱导后 mRNA 表达量显著增加. 构建组成型植物表达载体 pRar 和 pSgt, 分别转化烟草品种 NC89. 离体叶片抗病性鉴定表明, 两类转基因烟草对赤星病的抗性明显提高, 为植物防卫反应信号元件 RAR1 和 SGT1 在广谱抗病基因工程中的应用提供了实验证据.

关键词 海岛棉 防卫反应信号元件 转基因烟草 赤星病 抗病性

植物受病原物侵染后, 若植物抗病蛋白 (R) 能识别病原物无毒因子 (avr), 就会激发活性氧暴发, 产生活性氧中间物 (ROI) 及超敏反应 (HR). HR 导致侵染部位周围细胞迅速死亡, 诱导植物产生系统获得性抗性 (SAR), 从而提高未侵染部位的广谱抗病能力^[1].

根据结构特征, 植物 R 蛋白可分为 5 大类, 其中最大的一类是 NB-LRR R 蛋白, 在靠近 N 端具有核苷酸结合位点 (NBS), C 端有一个富含亮氨酸的重复序列 (LRR). 根据 N 端结构特点, NB-LRR R 蛋白又可分为两类: TIR-NB-LRR 和 CC-NB-LRR^[2].

有关植物 R 蛋白的研究已取得了重大进展, 但迄今对植物 R 防卫反应信号的机制还知之甚少. 最早报道的植物防卫信号元件是大麦 *Mla12* 介导的白粉病特异抗性的信号元件 RAR1 和 RAR2^[3, 4]. 利用拟南芥突变体已鉴定了 NDR1 (non-race-specific disease resistance), EDS1 (enhanced disease susceptibility), RAR1 (required for *Mla*-specified resistance)

及 SGT1 (suppressor of the *G₂* allele of *SKP1*) 等几个 R 下游参与植物防卫反应的信号元件. NDR1 编码一种膜结合蛋白^[5], 是 CC-NB-LRR 蛋白防卫途径的重要元件^[6]; EDS1 是一种类脂酶蛋白^[7], 介导 TIR-NB-LRR 蛋白的防卫反应^[6].

Rar1 编码大约 30 ku 的锌结合蛋白, 包含两个高度相似但截然不同的锌结合蛋白结构域, 分别称为 CHORD-I 和 CHORD-II^[8]. RAR1 是首次发现的 TIR-NBS-LRR 和 CC-NBS-LRR R 蛋白防卫信号途径的结合点^[9].

Sgt1 最早是在酵母中发现的一个与发育相关的重要基因, 植物中与酵母同源的 *Sgt1* 基因编码一个 40 ku 的蛋白质, 有 5 个结构域: 一个重复结构域 (TPR)、两个可变区 (VR1 和 VR2)、一个 CS 基元 (CHORD 和 SGT1) 及一个 SGS 基元 (SGT1-specific motif). 在植物 R 基因激发的信号途径中, SGT1 可能通过泛肽途径指导某些蛋白降解, 激发植物的防卫反应^[10, 11]. SGT1 可同时介导 NB-LRR 及其他类型 R 蛋白的防卫反应, 还与非寄主抗性有

2003-07-29 收稿, 2003-09-10 收修改稿

* 联系人, E-mail: jiasr@mail.caas.net.cn

关^[12].

RAR1 与 SGT1 是两种相互作用的蛋白质, 参与作用的结构域是 RAR1 的 CHORD- II 与 SGT1 的 CS 基元^[13]大麦 *Rar1* 和 *Sgt1* 共沉默增加了对白粉病的感病性^[11], 拟南芥 *sgt1/rar1* 双突变体高感霜霉病, 超敏反应及活性氧积累下降^[14]. 由此推测 RAR1 与 SGT1 可能以 3 种形式 (SGT1/RAR1, SGT1, RAR1) 参与植物的防卫反应^[10, 15].

基因工程为作物抗病育种提供了一条新途径. 特别是广谱抗病基因工程, 虽然目的基因本身并无抗病活性, 但却能诱发植物的防卫反应, 产生 SAR, 并对病原菌没有严格的种属专一性.

海岛棉 (*Gossypium barbadense*) 的抗病性明显优于陆地棉和中棉, 特别对当前棉花生产中危害最重的黄萎病表现高抗^[16]. 本研究克隆了海岛棉中 R 下游防卫反应信号元件的编码基因 *GbRar1* 和 *GbSgt1*, 转基因烟草叶片的离体鉴定表明, 这两种基因的表达可明显提高对烟草赤星病的抗性.

1 材料与方法

1.1 植物材料

海岛棉 7124 (*G. barbadense* var. 7124) 和烟草品种 NC89 为本实验室保存.

1.2 棉花黄萎病菌接种实验

(1) 孢子的制备: 将棉花黄萎病菌在棉籽培养基中 25℃ 培养 3 周, 收集孢子, 调整孢子浓度为 10⁷/mL. (2) 无菌苗的准备: 海岛棉 7124 棉籽用 70% 酒精消毒后, 播种于含灭菌土的纸钵中, 28℃ 培养 3 周. (3) 黄萎病菌接种: 将纸钵底部撕去, 在棉花幼苗根部造成伤口, 蘸取孢子溶液, 28℃ 继续培养 5 d, 取样品 -70℃ 保存备用.

1.3 *GbRar1* 和 *GbSgt1* 的克隆

从棉花黄萎病菌处理的海岛棉 7124 叶片中提取总 RNA, 进行 cDNA 第一链的合成, 具体操作参照试剂盒说明书 (Gibco/BRL 公司) 进行.

1.3.1 *GbRar1* 的克隆 用拟南芥 (AF192262)、烟草 (AF480487)、大麦 (AF192261) 的 *Rar1* 基因序列, Blast 分析 GenBank EST 库, 获得与其同源的 5 个中棉 EST 克隆 (BQ403789, BF276058,

BG443488, BG446854, BQ412690) 和 2 个陆地棉 EST 克隆 (AW187113, AW187078). 根据 EST 序列设计引物 5' atggcggagcaagctgtt 3' 和 5' attcctctcatgcttatgac 3', 以合成的 cDNA 第一链为模板, 进行 PCR 扩增. 反应条件为: 96℃ 3 min; 94℃ 30 s, 52℃ 30 s, 72℃ 30 s, 30 个循环; 72℃ 5 min. 根据获得片段的测序结果, 设计引物 5' cagctgtactggctaagag 3', 进行 3' RACE (TaKaRa 公司) 获得 *GbRar1* 3' 端序列. 同时, 用 LA PCRTM *in vitro* Cloning Kit (TaKaRa 公司) 分离了 *GbRar1* 5' 上游非翻译区和部分 5' 上游调控序列.

1.3.2 *GbSgt1* 的克隆 用拟南芥 (AF439976/5)、烟草 (AF494083)、大麦 (AF439974) 的 *Sgt1* 基因序列, Blast 分析 GenBank EST 库, 获得与其同源的 4 个中棉 EST 克隆 (BG443702, BG440215, BG443081, BM359396) 和 1 个陆地棉 EST 克隆 (AI728933), 分析 EST 序列, 设计简并引物 5' atggckctctgatytkgagaccaa 3' 和 5' rkactccayttcttsasytccat 3'. 采用 Touch-Down PCR, 反应条件为: 96℃ 3 min; 94℃ 30 s, 50℃/48℃/46℃/44℃ 30 s, 72℃ 30 s, 2 个循环; 94℃ 30 s, 42℃ 30 s, 72℃ 30 s, 28 个循环; 72℃ 5 min.

1.3.3 DNA 序列和推导的氨基酸序列分析 将 PCR 产物克隆到 pMD18-T-vector 中 (TaKaRa 公司), 对阳性克隆测序. DNA 序列与氨基酸序列的分析用 NCBI Blast 及 DNAMAN4.0 软件包进行.

1.4 Northern blot 检测

将 20 μg RNA 用毛细管法转移到 HybondTM N⁺ 膜上, 分别以 *GbRar1* 和 *GbSgt1* cDNA 为模板, 用 Primer-a-gene Labeling System (Promega 公司) 制备探针, 用 α-³²P-dCTP 标记, 具体操作参考 Sambrook 等^[17].

1.5 植物表达载体 pSgt 和 pRar 的构建

根据获得的海岛棉 *GbRar1* 和 *GbSgt1* 的 cDNA 序列, 设计引物 pRarF (5' gactgcagaatggcggagcaagctgtt 3') 和 pRarR (5' taccgggttagggcactggatcgga 3'), pSgtF (5' gacctgcaggatggcgtctgattttgag 3') 和 pSgtR (5' taccggggetaggactcccattttctc 3'), 在 pRarF

和 pSgtF 中分别引入酶切位点 *Pst* I 和 *Sse*8387 I, 在 pRarR 和 pSgtR 中引入酶切位点 *Sma* I. 以海岛棉第一链 cDNA 为模板, PCR 扩增获得目的基因, 连接到 pMD18-T-vector 中, 获得中间载体 pMDRar 和 pMDSgt. 分别用 *Pst* I/*Sma* I, *Sse*8387 I/*Sma* I 酶切中间载体, 回收目的片段备用. 用 *Eco*R I/*Hind* III 酶切 p2Pma 和 pCAMBIA2301 质粒, 回收目的片段, 连接成中间载体 pC2P, 用 *Pst* I 和 *Hpa* I 酶切 pC2P, 将目的片段与上述回收的片段重组, 构建成植物表达载体 pSgt 和 pRar. *GbRar1* 和 *GbSgt1* 基因分别由两个 35S 启动子驱动表达, 3' 末端为 poly(A)_n 尾巴和 NOS 终止子(图 1).

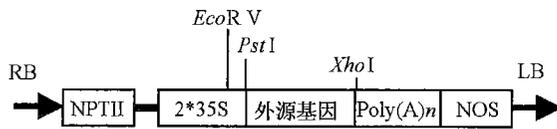


图 1 植物表达载体 pRar, pSgt 基因表达盒的示意图

1.6 烟草的遗传转化及转基因烟草的分子检测

用冻融法将 pRar 和 pSgt 分别导入根癌农杆菌 LBA4404, 叶盘法^[18]转化烟草 NC89. 随机挑选再生植株, 提取基因组 DNA, 取 20 μg 转 *GbRar1* 烟草的总 DNA 用 *Pst* I/*Xho* I 彻底酶切, 转 *GbSgt1* 的烟草总 DNA 用 *Eco*RV/*Xho* I 彻底酶切. 毛细管法转移到 HybondTM-N⁺ (Am-Pharmacia 公司) 膜上, 分别以 *GbRar1* 和 *GbSgt1* cDNA 为模板制备探针, Southern blot 操作参考 Sambrook 等^[17].

1.7 转基因植株的抗病性鉴定

采用离体叶片接种法, 以非转基因烟草为对照, 重复 3 次. (1) 孢子制备: 将烟草赤星病菌 (*Alternaria alternata*) 接种在燕麦培养基上 25℃ 培养 2~3 周, 收集孢子, 调整孢子浓度 5×10^4 /mL; (2) 在转 *GbRar1* 或 *GbSgt1* 基因的烟草中各取长势良好均一的 15 个单株用于检测, 取供试烟草的顶部第 3 片叶, 叶背面朝上置于无菌的湿纱布上, 用石英砂制造微伤, 在伤口处接种 10 μL 孢子悬浮液, 100% 的相对湿度保湿 24 h; (3) 接种后连续 7 天观察发病情况.

2 结果

2.1 *GbRar1* 和 *GbSgt1* 基因的克隆及序列分析

2.1.1 *GbRar1* 基因的克隆和序列分析 获得的海岛棉 *GbRar1* cDNA 全长 1395 bp, 其中部分 5' 调控区和 5' 非翻译区 451 bp, 编码区 663 bp, 3' 非翻译区 278 bp (不包括终止密码子 TAA). 推测开放阅读框编码一个包含 221 个氨基酸残基的 24 ku 蛋白质 (图 2). *GbRar1* 基因编码的蛋白包含 RAR1 的 3 个特征性的结构域或基元, 从 N 端到 C 端依次为: CHORDI, CCCH, CHORDII (图 3). 由此推断该基因是 *NtRar1*, *HvRar1*, *AtRar1* 在海岛棉中的一个同源基因, 命名为 *GbRar1*. *GbRar1* 基因组 DNA 全长 3300 bp, 包含 3 个内含子 (结果未显示). 用 PlantCARE (<http://oberon.rug.ac.be:8080/plantCARE/inde.html>) 分析了 TATA box 和 CAAT box 在部分 5' 调控序列中的位置 (图 2).

2.1.2 *GbSgt1* 基因的克隆和序列分析 获得的海岛棉 *GbSgt1* 基因片段长 1089 bp, 包含完整的编码区 1086 bp, 终止密码子 TGA. 推测开放阅读框编码一个包含 362 个氨基酸残基的 40 ku 蛋白质 (图 4). SGT1 包含以下 5 个特征结构域或基元: TPR, VR1/VR2, CS 和 SGS. 分析表明, 我们分离的基因其编码的蛋白质同样包含 5 个类似的结构域 (图 5). 由此推断该基因是 *Sgt1* 在海岛棉中的一个同源基因, 命名为 *GbSgt1*.

2.2 棉花黄萎病菌诱导 *GbRar1* 和 *GbSgt1* 的表达

取接种棉花黄萎病菌 5 d 后的海岛棉 7124 幼苗, 以未接菌幼苗为对照, 提取 20 μg RNA 进行 Northern blot 分析, 结果表明, 在病菌诱导 5 d 后, *GbRar1* 和 *GbSgt1* 的 mRNA 表达量比诱导前明显增加 (图 6).

2.3 烟草的遗传转化及再生植株的分子检测

用含有植物表达载体 pRar 或 pSgt 的根癌农杆菌 LBA4404 转化烟草, 分别获得再生烟草各 20 个单株. Southern blot 显示, 检测的转 *GbRar1* 或 *GbSgt1* 的再生植株都有特异的信号带出现 (图 7), 表明两种基因已分别整合到烟草的基因组 DNA 中.

```

CTTTATTTAAATTTTGAATAATTAAGATGTTAAATTCATCAATTTAATAATAAAAAGACTAATCAATTAGCTATTTAT 79
ATTATAAGTACCTTTTAGATACATTCACCTAATTTGTCAGTCGGTAGGAAGAAGAAATGAAAAAGATAATTCGAAAAGAA 160
AGAAAAATATTCCTCTCAAAATGAAAAAGAAAAATGAAAAAGATATTCGATCATAAACCGTCAGGGTGTTCACAGTGG 241
CAATCTAGAGAGAACGAAGAAAGAGGGAGGCAGAGTGCCTCATCGTAGAGAGTAAAAGGACGTAGTAATCAATCCATAAC 322
CTGAAGAAATCGTGATTCGCCCTCGCTTGACTTTCCATTTCCTCGCCGTCGCTTAGTCAACCGAGTTGTAAGGAAAGA 403
AACCAGCCGCCACCACCACCACCACCATTTCCCTAAAAGCGTTAAAAATGGCGGAGCAAGCTGTTAAGCTTCGGTGCCAA 484
M A E Q A V K L R C Q 11
CGAATCGGGTGCATGCTACCTTCACCGAAGACGATAATCCCGAGGGTTCCTGCACITTCACACTTCGGTTCCTATTTTT 565
R I G C N A T F T E D D N P E G S C T F H T S G P I F 38
CATGATGGAATGAAAGAGTGGAGTTGTTGCAAAAAAAGAGCCACGACTTTTCTTTTATTCCTAGAAAATTCCTGGGTGTAAG 646
H D G M K E W S C C K K R S H D F S L F L E I P G C K 65
ACAGGTAAGCACACAACCGAGAAGCCAGTGTGAATAAGCCAGTAGCTACTAAGACGATTCCAACITCTAGTCTGCTGTT 727
T G K H T T E K P V L N K P V A T K T I P T S S P A V 92
ACTCTTCCACCAGTGCACATCAAAAAGATCCTGCGCTAGGTCCTCAGGGTTTCTTTTGTCTGATCATGTTCCACAG 808
T L S T S A T S K E S C P R C S Q G F F C S D H G S Q 119
CCCAAAGTACCGAACCTTACCCAGCTGTACTGGCTAAGAGCAGTCCGATGTTAAGGAGTCTTCCTCCACCAAAAGAG 889
P K V P N P T P A V L A K S S A D V K E S S P P P K K 146
AAAGTTCCACCAAGCCCTCAGACTTGCAAAAAAGAGGATGTTGGCAAAAGTTTCAAGAAATAGAGAACCATTGGTCT 970
K V D I N Q P Q T C K N K G C G K V F K E I E N H G S 173
GCATGTAGTTACCATCCCGGACCTGCTGTTTCCACGATCGAGTGGAGGGTGAAGTGTGTGACATTTATGTGAAGGAA 1051
A C S Y H P G P A V F H D R V R G W K C C D I Y V K E 200
TTTGATGAGTTCATGACCATCCACCATAAAGAGGGATGCCACGATCCCGATCCAGTCCCTAAGTCATAAGCATGAGG 1132
F D E F M T I P P Y K K G W H D A D P V P < 227
AGGAATAAGTTCCTGCTTCTTAAAGAGGTTTCCTTTATCTTCTTCTTTCCCTATTTTGAACGGACTCTAGGTTAT 1213
TCAATTACTTACCGAAGTGAATCTAGGATATGCAATATGAATGTGTGGAAATGTTCTTTTTGCACTATCTTGCACAC 1294
CAAAACATTTGAGACTGTTATGTTGTTATTTGTTGATGAACATGCTATGGATTCAAAATGTGATATCGGAGTGGT 1375
GATGTCCAAAAAATTTTTT
    
```

图2 海岛棉 *GbRar1* cDNA 的核苷酸序列和推导的氨基酸序列
推测的 TATA box 和 CAAT box 分别用下划线表示

<i>GbRAR1</i>MAEQAVKLRQIRIGCNATFTEDDNEPESCTFHTSGELFHDGMKEWSCKKRR	51
<i>AtRAR1</i>MTTILKVLVNEMLPYEFFHDGMKEWSCKKQR	31
<i>NtRAR1</i>MERLRQIRIGCNATFTEDDNEPENSCTYHESGELFHDGMKEWSCKKKS	47
<i>HvRAR1</i>	MSAETERSAAAPAPAPMRCQIRIGCDAMFTDDNPDGSCYHHPSCGELFHDGMKEWSCKKQR	60
<i>GbRAR1</i>	SHDFSLFLLEIPGCKTGKHTTEKPVLNKPVATKTIPTSSPAVTLSTSAT...SKESCPRC	107
<i>AtRAR1</i>	SHDFSLFLLEIPGCKTGKHTTEKPVLAQSVKHPVAAPTSSPDANAATKDS...GSRG	85
<i>NtRAR1</i>	SHDFSLFLLEIPGCKTGKHTTEKPVIANPAANRNRAIPAPTSTNVSPK...EA...GPRG	101
<i>HvRAR1</i>	SHDFSLFLLEIPGATGKHTTEKPVTKAVSLNSSKATPPKSAPOVSSKQGVETEA...GSRG	118
<i>GbRAR1</i>	SCGFFCSDHGSCPEKVPNETPAVLAQSSADVKESSPPP...KKKVDINQIQTCNKNKGC	161
<i>AtRAR1</i>	RCGFFCSDHGSC...PKEQIKQTLNTPGQAEBEKIEPLAPPVQKAVDINQIQVCKNKNKGC	142
<i>NtRAR1</i>	RCGFFCSDHGSCPPEVIEPKASNTVTSVPSSENTDIQQCHPAPVKKVDINQIQVCKNKNKGC	161
<i>HvRAR1</i>	RCGFFCSDHGSC...PKAQKPAVNGTNTESVQKSSVPEPKKVDINQIRVCKNKNKGC	173
<i>GbRAR1</i>	GKVFKEIENHGSACSYPHGGPAVHDFRMRGWKCCIIYVKEFDEFMELPEYKKGWHDADPVP	221
<i>AtRAR1</i>	GQTFKERDNEHTACSHHGGPAVHDFRMRGWKCCIVHVKEFDEFMELPECTKGWHSSEDP	202
<i>NtRAR1</i>	GKTFTEKENHDTACSYPHGGPAVHDFRMRGWKCCIIHVKEFDEFMSECTTGWHNASPAS	221
<i>HvRAR1</i>	GKTYKEDNHDACDYPHGGPAVHDFRMRGWKCCIVHVKEFDEFMELPECTKGWHDADAV	232
<i>GbRAR1</i>		
<i>AtRAR1</i>	AV	204
<i>NtRAR1</i>		
<i>HvRAR1</i>		

图3 海岛棉 *GbRAR1*, 拟南芥 *AtRAR1*(AF192262), 烟草 *NtRAR1*(AF480487), 大麦 *HvRAR1*(AF192261)氨基酸序列的比较
CHORD I, CCCH 及 CHORD II 结构域分别用黑色、点状及灰色下划线表示

```

ATGGCGTCTGATTTTGAGACAAAAGCCAAAAGCCCTTCATCGATGACCCTTCGAGCTTGGCGTCCATCTCTACTCTCAAAGCCATCCAA 90
M A S D F E T K A K E A F I D D H F E L A L H L Y S Q A I Q 30
CTTAATCCTAAACACGCCGAGCTCTATGCTGACCGTGCCTCAAGCCAACATCAAACCTCAATAATCTCACGAGCCTGTGGCCGATGCCAAC 180
L N P K H A E L Y A D R A Q A N I K L N N L T E A V A D A N 60
AAAAGCGATTGAGTTGGATCCTTCCATGTCTAAAGCTTATCTGCGTAAAGCCACTGCCTGCATGAAGCTTGAAGAGTATCAAACCTGCTAAG 270
K A I E L D P S M S K A Y L R K A T A C M K L E E Y Q T A K 90
TCTGCGCTGGGACTGGCGCTGCTTTGGCACCTGCAGAGTCAAGATTTTCCAAGTTGATAAAAAGAATGTGAAGAGCGAATTGCCAGAAGAA 360
S A L G T G A A G L A P A E S R F S K L I K E C E E R I A E E 120
ACTGGTGTATCTATGACAGATGCCAGAACATTGGCTAAAAAATGATGTACCAGCAAAAAGAAATGAGCTGGACAAGGATCAGCCTAAT 450
T G D V S M Q M P E A L A K N D V P A K E I E L D K D Q P N 150
CTAGAGATTGAGGCTGCACCTCCCAAACCAGCGTACAGGCATGAATTTTACCAGAAAACCAGAGGAAGTGGTTGTACAAATATTGTCTAAA 540
L E I E A A P P K P A Y R H E F Y Q K P E E V V V T I F A K 180
GGAATACCCGATGATTGTGTTAAAAGTAGATTATGGTGAACAAACACTAAGTGTTCCTATCGATGCTCCTGGTAAGGAGGCATATCAITTC 630
G I P H D C V K V D Y G E Q T L S V A I D A P G K E A Y H F 210
CAACCTCGATTATTTGCCAAAAGATAATACCTGAGAAGTGCAGATATGATGTTTTGCCAACCAAGTTGAGATTAGCTAGCAAAAATCTGTA 720
Q P R L F A K I I P E K C R Y D V L P T K V E I R L A K S V 240
CCCATTCAATTGGACATCTCTTGAATTCAGCAGGGAAGTTGCTATAACCCAAAAGGGTTAATGTATCTTCGTGTTCTGCAAGTCAACGACCA 810
P I H W T S L E F S R E V A I T Q R V N V S S V S A S Q R P 270
TCATACCCATCCTCCAAACCACAAAAGGTAGATTGGGATAAAAATGAAAGTCAAGTAAAGAAAGGAGAGAAAGATGAAAAGCTAGATGGT 900
S Y P S S K P Q R V D W D K I E A Q V K K E E K D E K L D G 300
GATGCGGCTTTGAAACAAATTTTCCGGGCATTTATAAGGATGCGGATGAAGACACAGAAGGCCATGCAAAAATCTTTTGTGGAGTCT 990
D A A L N K F R D I Y K D A E D T R R A M Q K S F V E S 330
AATGGGACAGTCTATCAACAAATTGGAAAAGATTGGTGCAAAAGGTGGTGAAGGAAAGTCTCCTGATGGTATGGAGCTGAAGAAAATGG 1080
N G T V L S T N W K E V G A K V V E G S P P D G M E L K K W 360
GAGTCCTAG 1089
E S * 362
    
```

图4 海岛棉 *GbSgt1* cDNA 的核苷酸序列及推导的氨基酸序列

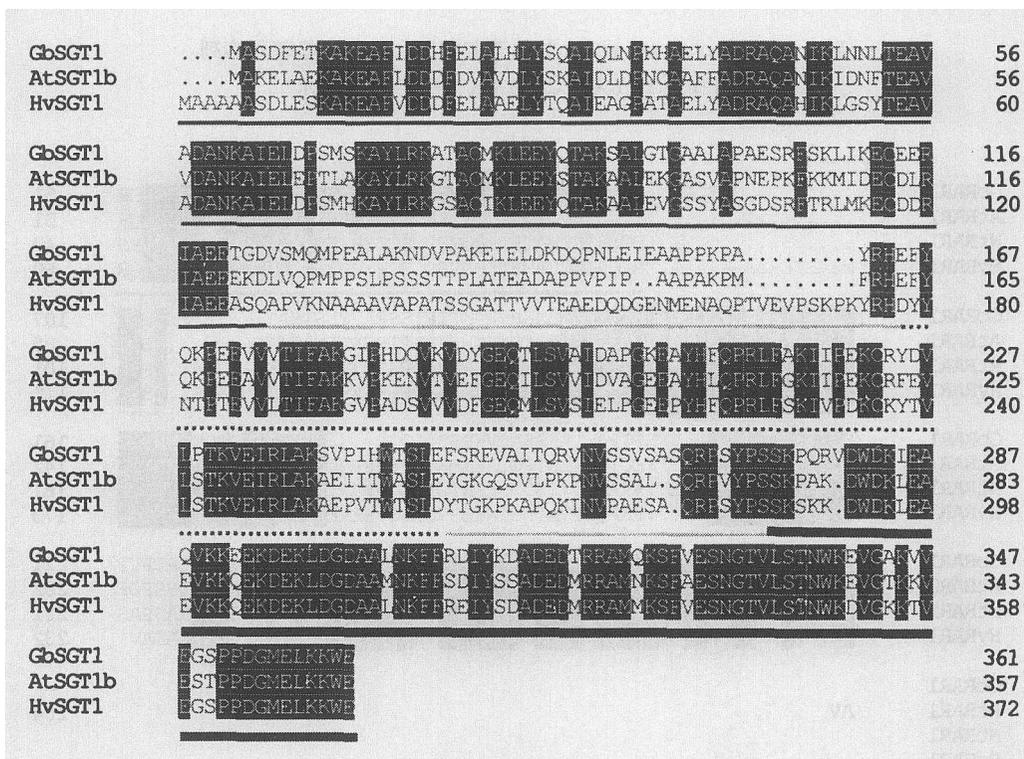


图5 海岛棉 *GbSgt1*, 拟南芥 *AtSgt1a* (AF439976/5), 拟南芥 *AtSgt1b* (AF192262), 大麦 *HvSgt1* (barely, AF439974), 水稻 *OsSgt1* (AF192467) 氨基酸序列的比较
TPR, VR1/VR2, CS 及 SGS 结构域和基元分别用黑细线、灰线、点状线、黑粗线表示

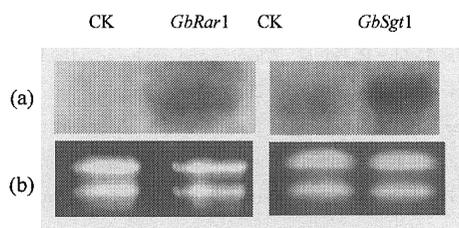


图6 Northern blot 分析棉花黄萎病菌 (*Verticillium dehlia*) 诱导 *GbRar1*, *GbSgt1* 基因的表达

(a) Northern blot 结果; (b) 总 RNA 上样量对照. CK, 诱导前; *GbRar1* 和 *GbSgt1*, 诱导 5 d 后

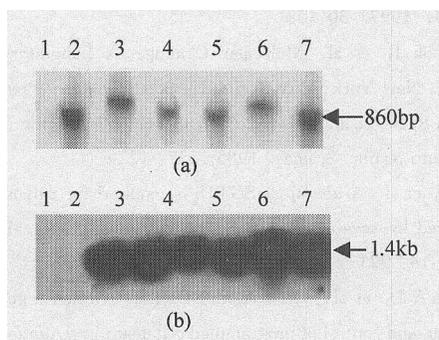


图7 转基因烟草的 Southern blot 检测

(a) 转 *GbRar1* 基因烟草. 1, 非转基因对照; 2~7, 转基因植株.
(b) 转 *GbSgt1* 基因烟草. 1, 非转基因对照; 2~7, 转基因植株

2.4 转基因烟草的抗病性分析

用离体叶片法鉴定转基因烟草对烟草赤星病的抗性. 对照组叶片接种 2~3 d 后, 接种部位形成水渍状病斑, 7 d 时, 病斑变黑甚至腐烂, 有白色菌丝赘生, 病灶扩大, 周围出现退绿 (图版 I, 4), 表明烟草赤星病孢子萌发后, 已成功地侵染到叶片组织中. 在供试的转 *GbRar1* 或 *GbSgt1* 基因烟草中 (各 15 个单株), 分别有 7 株或 5 株抗病性显著提高, 接种 3 d 后, 接种部位无明显变化, 7 d 时, 形成轻微的坏死, 表现出明显的过敏性坏死反应 (图版 I, 1, 2, 5, 6). 有意思的是, 在转 *GbSgt1* 和 *GbRar1* 基因的烟草中分别有 2 株和 1 株表现比较特殊的抗病反应, 接种 3 d 后, 接种部位与对照相似, 形成水渍状病斑, 但 3~7 d 病斑迅速坏死, 无菌丝赘生, 限制了病原菌的进一步侵染 (图版 I, 3, 7).

3 讨论

植物防卫反应途径信号元件作为一个新兴的研

究领域, 已取得了一些引人瞩目的成就. *RAR1*, *SGT1*, *NDR1*, *EDS1* 和 *NPR1* (non-expression of PR genes) 是已鉴定的几个植物防卫反应信号元件. *RAR1* 和 *SGT1* 分别作用于不同类型的 R 蛋白下游与活性氧激发之间^[18,19]; *NDR1* 定位于活性氧激发与随后的水杨酸 (SA) 合成之间^[20]; *EDS1* 作用于 SA 介导的防卫反应上游^[7]; *NPR1* 功能定位于 SA 合成与 SAR 发生之间, 是 SAR 的一个重要调控因子. 这些蛋白质本身对病原物并无抑制作用, 但作为信号元件参与不同植物防卫反应途径的调控.

广谱抗病基因工程是一条令人振奋的途径, 越来越多的研究小组已成功地将其应用到实践中^[21]. 广谱抗病基因工程的理论基础是 HR 和 SAR, 通过植物的超敏反应, 导致侵染部位周围细胞死亡, 诱导植物产生 SAR, 提高植物防卫反应的强度或加快防卫反应的速度, 从而增强未侵染组织的广谱抗病能力, 使植物表现抗病性. 这一策略从理论上讲应该比导入单一的抗性基因更有效.

棉花黄萎病是当前棉花生产中危害最为严重的一种真菌病害. 本文用棉花黄萎病菌接种海岛棉证明, 黄萎病菌诱导后 *GbRar1*, *GbSgt1* 基因在转录水平上的表达量显著增加. *RAR1* 和 *SGT1* 是两种重要的防卫反应信号元件, 介导多种 R 蛋白的防卫反应. 推测 *GbRar1* 和 *GbSgt1* 在海岛棉的防卫反应中可能扮演了重要的角色.

在拟南芥、水稻中过量表达 *NPR1*, 可以提高拟南芥对 *P. syringae* 和 *P. parasitica* 等病原菌的抗性^[22] 及水稻对白叶枯的抗性^[23], 而 *NPR1* 表达水平必须达到某一阈值时, 转基因植株才表现明显的抗性^[22, 23].

本文将 35S 驱动的 *GbRar1*, *GbSgt1* 基因分别转入烟草, 离体叶片抗病性鉴定表明, 转基因烟草对赤星病的抗性明显提高. 由此推测, *GbRar1*, *GbSgt1* 的过量表达可能激发转基因烟草的某些防卫途径, 使 R 蛋白能够利用组成型表达的 *GbRar1*, *GbSgt1* 蛋白调动植物的防卫机制, 迅速作出应答.

目前有关 *Rar1* 和 *Sgt1* 的研究仅限于对一些相关突变体的分析, 尚没有 *Rar1* 和 *Sgt1* 在转基因植物中抗病性分析的报道. 本文首次为植物防卫反应信号元件 *Rar1* 和 *Sgt1* 在植物抗病基因工程中的应用提供了直接的实验证据.

参 考 文 献

- 1 McDowell J M, et al. Signal transduction in the plant immune response. *Trends Biochem Sci*, 2000, 25: 79
- 2 Dangl J L, et al. Plant pathogens and integrated defence response to infection. *Nature*, 2001, 411: 826
- 3 Jørgensen J H. Effect of three suppressors on the expression of powdery mildew resistance in barley. *Genome*, 1996, 39: 492
- 4 Jørgensen J H. Genetic analysis of barley mutants with modifications of powdery mildew resistance gene *Ml-a12*. *Genome*, 1988, 30: 129
- 5 Century K S, et al. NDR1, a pathogen-induced component required for *Arabidopsis* disease resistance. *Science*, 1997, 278: 1963
- 6 Aarts N, et al. Different requirements for EDS1 and NDR1 by disease resistance genes define at least two R gene-mediated signaling pathways in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 10306
- 7 Falk A, et al. EDS1, an essential component of R gene-mediated disease resistance in *Arabidopsis* has homology to eukaryotic lipases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 3292
- 8 Shirasu K, et al. A novel class of eukaryotic zinc-binding proteins is required for disease resistance signaling in barley and development in *C. elegans*. *Cell*, 1999, 99: 355
- 9 Liu Y, et al. Tobacco Rar1, EDS1 and NPR1/NIM1 like genes are required for N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *Plant J*, 2002, 30: 415
- 10 Austin M J, et al. Regulatory role of SGT1 in early R gene-mediated plant defenses. *Science*, 2002, 295: 2077
- 11 Azevedo C, et al. The RAR1 interactor SGT1, an essential component of R gene-triggered disease resistance. *Science*, 2002, 295: 2073
- 12 Peart J R, et al. An EDS1 orthologue is required for N-mediated resistance against tobacco mosaic virus. *Plant J*, 2002, 29: 569
- 13 Schulze-Lefert P, et al. Closing the ranks to attack by powdery mildew. *Trends Plant Sci*, 2000, 5: 343
- 14 Parker J E, et al. Genetic analysis of plant disease resistance pathways. In: *Rice Biotechnology: Improving Yield, Stress Tolerance and Grain Quality*. Chichester: Novartis Found Symp 236, 2001. 153
- 15 Muskett P R, et al. *Arabidopsis* RAR1 exerts rate-limiting control of R gene-mediated defenses against multiple pathogens. *Plant Cell*, 2002, 14: 979
- 16 马存, 等. 我国棉花抗黄萎病育种现状、问题及对策. *中国农业科学*, 1997, 30: 58
- 17 Sambrook J, et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- 18 Horsch R B, et al. A simple and general method for transferring genes into plants. *Science*, 1985, 227: 1229
- 19 Tor M, et al. *Arabidopsis* SGT1b is required for defense signaling conferred by several downy mildew resistance genes. *Plant Cell*, 2002, 14: 993
- 20 Shapiro A D, et al. The role of NDR1 in avirulence gene-directed signaling and control of programmed cell death in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2001, 127: 1089
- 21 Keller H, et al. Pathogen-induced elicitor production in transgenic tobacco generates a hypersensitive response and nonspecific disease resistance. *Plant Cell*, 1999, 11: 223
- 22 Cao H, et al. Generation of broad-spectrum disease resistance by overexpression of an essential regulatory gene in systemic acquired resistance. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 6531
- 23 Chern M S, et al. Evidence for a disease-resistance pathway in rice similar to the NPR1-mediated signaling pathway in *Arabidopsis*. *Plant J*, 2001, 27: 101



转基因烟草抗烟草赤星病鉴定(接种后 7 d)

叶片(1,2,3),(5,6,7)分别采自转 *GbRar1* 或 *GbSgt1* 基因烟草的不同单株,以烟草品种 NC89 (4)为对照