



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105349576 A

(43) 申请公布日 2016. 02. 24

(21) 申请号 201510942475. 7

A01H 5/00(2006. 01)

(22) 申请日 2015. 12. 16

(71) 申请人 中国热带农业科学院南亚热带作物
研究所

地址 524000 广东省湛江市麻章区湖秀路 1
号

(72) 发明人 张燕梅 周文钊 李俊峰 陆军迎
林映雪

(74) 专利代理机构 广州市南锋专利事务有限
公司 44228

代理人 李慧

(51) Int. Cl.

C12N 15/82(2006. 01)

C12N 15/55(2006. 01)

权利要求书1页 说明书8页

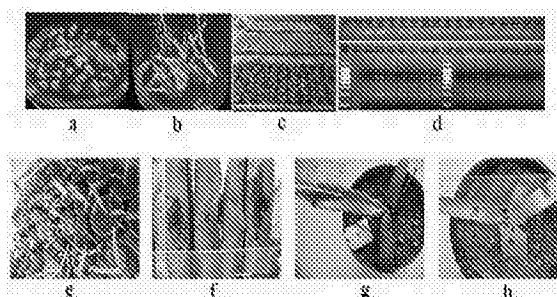
序列表3页 附图2页

(54) 发明名称

一种提高剑麻斑马纹病抗性的方法

(57) 摘要

本发明涉及一种提高剑麻斑马纹病抗性的方法,属于转基因技术领域;该方法首先基于已知基因序列设计特异性引物,克隆 AFP1 和 AFP2 目的基因,其全长分别为 279bp 和 276bp,编码 92 和 91 个氨基酸,均含有 41 个氨基酸的小分子信号肽,通过构建包含有 AFP1 和 AFP2 的植物表达载体 pISV2678 并转化剑麻 H. 11648 愈伤组织,获得含有 AFP1 和 AFP2 的转基因剑麻植株;与非转基因剑麻相比,本发明转 AFP1 和 AFP2 基因剑麻在接种烟草疫霉菌后病斑明显变小,抗性明显增强,参与活性氧清除的过氧化物酶 POD 和过氧化氢酶 CAT 的活性,参与酚类化合物和木质素合成的多酚氧化酶 PPO 的活性明显比非转基因植株高。本发明为提高剑麻斑马纹病的抗性提供了一条新的有效途径。



1. 一种提高剑麻斑马纹病抗性的方法,其特征在于:包括如下步骤:

(1) 橡胶素类多肽蛋白酶基因 AFP1 和 AFP2 的克隆

以牵牛花成熟种子为材料,采用改良 Trizol 法提取总 RNA,经 Ferments 公司反转录试剂盒合成第一链 cDNA 后,采用 RT-PCR 的方法克隆 AFP1 和 AFP2 基因,AFP1 和 AFP2 基因全长分别为 279bp 和 276bp,编码 92 个氨基酸和 91 个氨基酸,AFP1 和 AFP2 同源性高达 95% 以上,均含有 41 个氨基酸的小分子信号肽;

(2) 植物表达载体构建

设计带酶切位点的引物,以第一链 cDNA 为模板,通过 PCR 扩增目的基因 AFP1 和 AFP2,通过定向酶切与载体 pISV2678 连接,并电击转化农杆菌 EHA105,构建含有目的基因 AFP1 和 AFP2 的植物表达载体;

(3) 农杆菌介导法转化剑麻

以剑麻 H. 11648 愈伤组织为受体材料,采用农杆菌介导法浸染愈伤组织,然后将浸染后的愈伤组织接种在含有卡那霉素 kan⁺和除草剂 Basta 的不定芽诱导培养基上诱导不定芽,待不定芽长到 4-6 厘米高时,转入生根培养基上进行生根,待再生植株长出 4-5 条壮根时,移植到基质为椰糠和河沙的塑料遮光大棚中继续培育;

愈伤组织诱导培养基为:MS 基本培养基+0.1-1.0mg/L 萘乙酸 NAA+1.0-3.5mg/L 6-苄氨基腺嘌呤 6-BA,不定芽诱导培养基为:SH 基本培养基+1.0-5.0 mg/L 6-苄氨基腺嘌呤 6-BA+0-1.5 mg/L 萘乙酸 NAA+0-1.5 mg/L 吲哚 3 丁酸 IBA+ 200mg/L 卡那霉素 kan⁺+ 250 μg/L 除草剂 Basta,生根培养基为添加 200 mg/L 羧苄霉素的 MS 基本培养基;

(4) 剑麻转化植株的鉴定

取 1 克转基因植株叶片提取基因组 DNA,以 DNA 为模板,以 AFP-F 和 AFP-R 为引物,以非转基因植株为阴性对照,经 PCR 检测后发现基因 AFP1 和 AFP2 已经成功转入剑麻;

引物 AFP-F:5' -CACAACAGTGTGGGAGTCAAGCC-3' ;

引物 AFP-R:5' -CGGTTGATTGGTTTGCAGTGGTAG-3' ;

(5) 剑麻转化植株抗病性检测

采用叶面针刺法活体和离体接种烟草疫霉菌,48 小时候后观察病斑扩展情况,发现转基因植株叶片病斑明显比非转基因植株小;

(6) 剑麻转基因植株重要防御酶活性测定

采用叶面针刺法活体接种烟草疫霉菌,在接种 0 小时、24 小时、48 小时和 72 小时分别测定转基因和非转基因植株超氧化物歧化酶 SOD、过氧化物酶 POD、过氧化氢酶 CAT 和多酚氧化酶 PPO 的活性,发现转基因植株参与活性氧清除的过氧化物酶 POD 和过氧化氢酶 CAT 的活性,参与酚类化合物和木质素合成的多酚氧化酶 PPO 的活性明显比非转基因植株高。

2. 根据权利要求 1 所述一种提高剑麻斑马纹病抗性的方法,其特征在于:步骤(3)所述培养基的 pH 为 5.8-6.0;光照 12-14h,黑暗 10-12h,光照强度为 2000 Lux,温度 28±2℃。

3. 根据权利要求 1 所述一种提高剑麻斑马纹病抗性的方法,其特征在于:步骤(3)所述椰糠和河沙的质量比为 1:1。

一种提高剑麻斑马纹病抗性的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种提高剑麻斑马纹病抗性的方法,具体涉及一种从牵牛花中克隆橡胶素类多肽蛋白酶基因 AFP1 和 AFP2 及其在提高剑麻抗性中的应用,尤其适用于在剑麻抗斑马纹病中的应用,属于转基因技术领域。

背景技术

[0002] 剑麻是主要的热带纤维作物,是当今世界用量最大、范围最广的一种硬质纤维,其纤维质地坚韧,具有拉力强、抗撕裂、耐磨、耐腐蚀、耐盐碱等特性,广泛应用于国防、航海、交通运输、石油、冶金等领域,剑麻茎心是酿造龙舌兰酒的主要原料,剑麻麻渣含有较高皂素,可用来制药,同时剑麻也是一种重要的生物质能源,有非常重要的经济价值。

[0003] 剑麻原产于墨西哥等热带、亚热带地区,我国保存的种质资源有 80 余份,种质资源严重缺乏。目前的主栽品种 H. 11648 是 1963 年从坦桑尼亚引进,其种植面积占剑麻总面积的 98% 以上。由于该品种抗真菌能力差,加上单一品种多年种植,品种退化严重,病虫害不断滋生,严重影响了剑麻产业的发展,因此培育出抗病高产品种或对现有品种遗传改良已迫在眉睫。

[0004] 剑麻生命周期长,一生仅开一次花,花期不遇现象普遍存在,加上我国剑麻种质资源严重缺乏,多倍体广泛存在,要在短期内培育出高产抗性强的品种十分困难。因此,寻求高效快速的方法便成了育种学家们的首要任务,同时也是剑麻产业中的主要问题之一。

[0005] 随着分子生物学的迅速发展,各种技术方法日益成熟和完善,利用基因工程技术对现有种质资源进行遗传改良已广泛应用于作物育种中,并在拟南芥、番茄、马铃薯、水稻等作物中已有许多成功的报道,同时也为剑麻生物技术育种提供了参考。

[0006] 植物多肽抗生素是一类对细菌、真菌等微生物及某些昆虫和动植物细胞具有抑制或杀灭作用的小分子多肽,其结构和组成复杂多样,目前已发表的植物多肽抗生素主要有芥菜素、环肽、脱皮素、硫素、植物防御素、转脂蛋白、橡胶素、打结素和凤仙花素,其中橡胶素为含有 29-44aa, 可能含有 3 对、4 对或 5 对二硫键的小分子多肽。研究表明橡胶素对革兰氏阳性菌和真菌表现出抗性。曾有报道称,在千穗谷莧菜中克隆了一个橡胶素类多肽 Ah-AMP2 基因,该基因在烟草中表达后,可提高烟草对烟草青枯病和黑胫病的抗性。

[0007] 剑麻斑马纹病主要致病菌为烟草疫霉,田间病株多数从叶片开始,进而麻茎、叶轴均会受到侵染,引起叶片坏死、茎腐和轴腐,进而导致整株死亡,此病迅速蔓延,极易造成极大经济损失。传统的防治方法还是采用农业措施、化学药剂防治相结合的综合防治措施,从牵牛花中克隆橡胶素类多肽蛋白酶基因 AFP1 和 AFP2 用于提高剑麻抗性还未见报道。

发明内容

[0008] 本发明的目的是针对现有技术的不足,提供一种提高剑麻斑马纹病抗性的方法,本方法通过基因工程手段,将外源基因导入剑麻中,通过转基因技术获得具有一定抗性的转基因剑麻植株,本发明为提高剑麻斑马纹病的抗性提供了一条新的有效途径。

[0009] 为实现上述目的,本方法采用的技术方案是:

1. 橡胶素类多肽蛋白酶基因 AFP1 和 AFP2 的克隆

以牵牛花成熟种子为材料,采用改良 Trizol 法提取总 RNA,经 Ferments 公司反转录试剂盒合成第一链 cDNA 后,采用 RT-PCR 的方法克隆 AFP1 和 AFP2 基因,AFP1 和 AFP2 基因全长分别为 279bp 和 276bp,编码 92 个氨基酸和 91 个氨基酸,AFP1 和 AFP2 同源性高达 95% 以上,均含有 41 个氨基酸的小分子信号肽。AFP1 和 AFP2 核酸和氨基酸序列见 SEQ ID No. 1、SEQ ID No. 2、SEQ ID No. 3、SEQ ID No. 4。

[0010] 2. 植物表达载体构建

设计带酶切位点的引物,以第一链 cDNA 为模板,通过 PCR 扩增目的基因 AFP1 和 AFP2,通过定向酶切和与载体 pISV2678 连接,并电击转化农杆菌 EHA105,构建含有目的基因 AFP1 和 AFP2 的植物表达载体。表达载体图谱见附图 1。

[0011] 3. 农杆菌介导法转化剑麻

以剑麻 H. 11648 愈伤组织为受体材料,采用农杆菌介导法浸染愈伤组织,然后将浸染后的愈伤组织接种在含有卡那霉素(kan+)和除草剂(Basta)的不定芽诱导培养基上诱导不定芽,待不定芽长到 4-6 厘米高时,转入生根培养基上进行生根。愈伤组织诱导培养基为:MS 基本培养基+0.1-1.0mg/L 萘乙酸 NAA+1.0-3.5mg/L 6-苄氨基腺嘌呤 6-BA,不定芽诱导培养基为:SH 基本培养基+1.0-5.0 mg/L 6-苄氨基腺嘌呤 6-BA+0-1.5 mg/L 萘乙酸 NAA+0-1.5 mg/L 吲哚 3 丁酸 IBA+200mg/L 卡那霉素 kan++250 μg/L 除草剂 Basta,生根培养基为添加 200 mg/L 羧苄霉素的 MS 基本培养基。培养基的 pH 为 5.8-6.0;光照 12-14h,黑暗 10-12h,光照强度为 2000 Lux,温度 28±2℃。待再生植株长出 4-5 条壮根时,移植到基质为椰糠和河沙(椰糠:河沙=1:1)的塑料遮光大棚中继续培育。

[0012] 4. 剑麻转化植株的鉴定

取 1 克转基因植株叶片提取基因组 DNA,以 DNA 为模板,以 AFP-F 和 AFP-R 为引物,以非转基因植株为阴性对照,经 PCR 检测后发现基因 AFP1 和 AFP2 已经成功转入剑麻。AFP-F:5'-CACAACAGTGTGGGAGTCAAGCC-3';AFP-R:5'-CGGTTGATTGGTTTGAGTGGTAG-3'。PCR 检测结果见附图 2d。

[0013] 5. 剑麻转化植株抗病性检测

采用叶面针刺法活体和离体接种烟草疫霉菌,48 小时候后观察病斑扩展情况,发现转基因植株叶片病斑明显比非转基因植株小。发病情况见附图 2f、附图 2g 和附图 2h。

[0014] 6. 剑麻转基因植株重要防御酶活性测定

采用叶面针刺法活体接种烟草疫霉菌,在接种 0 小时、24 小时、48 小时和 72 小时分别测定转基因和非转基因植株超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)和多酚氧化酶(PP0)的活性,发现转基因植株参与活性氧清除的过氧化物酶 POD 和过氧化氢酶 CAT 的活性,参与酚类化合物和木质素合成的多酚氧化酶 PP0 的活性明显比非转基因植株高。具体酶活见附图 3。

[0015] 本发明的有益效果是:本研究利用分子生物学的方法,从牵牛花中分离橡胶素类多肽蛋白酶基因 AFP1 和 AFP2 并转入剑麻,提高剑麻抵抗斑马纹病的能力,与非转基因剑麻相比,本发明转 AFP1 和 AFP2 基因剑麻在接种烟草疫霉菌后病斑明显变小,抗性明显增强;参与活性氧清除的过氧化物酶 POD 和过氧化氢酶 CAT 的活性,参与酚类化合物和木质素合

成的多酚氧化酶 PPO 的活性明显比非转基因植株高,为解决剑麻产业中斑马纹病的发生问题具有重要的理论和现实意义。

附图说明

[0016] 图 1 表达载体构建路线图;

图 2 转基因剑麻的筛选,PCR 检测和病原菌接种;

其中 a 为转基因抗性愈伤组织的筛选;b 为转基因抗性植株的筛选;c 为转基因植株的移栽;d 为转基因植株的 PCR 检测;e 为转基因植株活体接种烟草疫霉菌;f 为转基因植株叶片接种烟草疫霉菌;g 为非转基因植株接种烟草疫霉菌 48 小时后的发病情况;h 为转基因植株接种烟草疫霉菌 48 小时后的发病情况;

图 3 病原侵染过程中重要防御酶 CAT、POD、SOD、PPO 活性变化情况;

其中 a 为过氧化氢 CAT 酶活、b 为过氧化物 POD 酶活、c 为超氧化物歧化酶 SOD 酶活、d 为多酚氧化酶 PPO 酶活。

具体实施方式

[0017] 下面通过实例对本发明做进一步详细说明,这些实例仅用来说明本发明,并不限制本发明的范围。

[0018] 实施例 1

本发明所提供的 2 个橡胶素类多肽蛋白酶基因 AFP1 和 AFP2,均从牵牛花中克隆得到,其核酸序列分别为 SEQ ID No. 1 和 SEQ ID No. 2 (序列 1 和序列 2)。

[0019] AFP1 和 AFP2 基因编码的蛋白质,命名为 AFP1 和 AFP2 蛋白质,其氨基酸序列如 SEQ ID No. 3 和 SEQ ID No. 4 (序列 3 和序列 4)。

[0020] 一. 橡胶素类多肽蛋白酶基因(AFP1 和 AFP2)的克隆

上述 AFP1 和 AFP2 基因的克隆包括如下步骤:

1. RNA 提取

取 1 克牵牛花(*Pharbitis nil*)成熟种子加入 0.1 克 PVP40,迅速用液氮研磨成粉末,加入 4 mL 70%丙酮(2% β -巯基乙醇),充分混匀,8000 rpm,10 °C 离心 3 min,重复 1-2 次。然后加入 4 mL Trizol 裂解液,室温放置 5min,加入 800 μ L 酚:氯仿:异戊醇(25:24:1),混匀后 12,000rpm 离心 10 min,取上清,加入 800 μ L 氯仿:异戊醇(24:1)抽提,最后加入 2 mL 异丙醇室温静置 30 min 以沉淀核酸,沉淀经 70%乙醇和无水乙醇各洗涤 1 次后用 ddH₂O 溶解,取 2 μ L 总 RNA 在含有 Goldenvue 的 1.5 % 琼脂糖凝胶中电泳 10 分钟,并拍照保存。其余的 RNA -80°C 保存备用。

[0021] 2. RT-PCR 克隆 AFP1 和 AFP2 基因

具体步骤如下:

取 1 克总 RNA,采用 Ferments 公司的反转录第一链 cDNA 合成试剂盒合成 cDNA,具体操作按照说明书进行。然后以 cDNA 为模板,根据已报道的基因序列设计特异性引物,用 Transgene 公司的 pfu 高保真酶进行特异 PCR 扩增,50 μ L 反应体系:10 μ L 5×buffer, 5 μ L dNTP (10 mmol/L),上下游引物 (10 μ mol/L) 各 1 μ L,酶 (5U/L) 1 μ L, cDNA 2 μ L,水 29 μ L。反应程序为 95 °C 5 min, [95 °C 30 s, 52 °C 30 s, 72 °C 40 s] 30 个

循环,72℃ 10 min。所用 AFP1 正向引物:5'-ATGAAATACTGTACTATGTT-3', AFP1 反向引物 5'-TCAGTTGGCACC GCCG-3'。AFP2 正向引物和反向引物分别与 AFP1 正向引物和反向引物序列相同。

[0022] 取 10 μL PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,检测扩增片段大小,剩余 40 μL 采用宝生物公司的凝胶回收试剂盒回收,取 2 μL 回收产物 16℃与 pMD19-18 载体连接 2~4 h,连接产物转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞,采用蓝白斑筛选阳性转化子,经 PCR 检测后送公司测序,测序结果证实所得到的序列为牵牛花橡胶素类多肽蛋白酶基因 AFP1 和 AFP2。核酸和氨基酸序列如 SEQ ID NO. 1、SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 3、SEQ ID NO. 4。

[0023] 二. 含 AFP1 和 AFP2 基因植物表达载体构建

构建含有 AFP1 和 AFP2 基因的植物表达载体,采用农杆菌浸染法转化剑麻,获得转 AFP1 和 AFP2 转基因剑麻,从而提高剑麻对斑马纹病的抗性。

[0024] 1. 带酶切位点编码区的扩增

设计带酶切位点的引物,引物序列如下:

正向引物 AFP1F :5'-GCTCTAGAGCATGAAATACTGTACTATGTT-3' ;

反向引物 AFP1R :5'-CGGAATTCCGTCAGTTGGCACCGCCGGCGG -3' ;

正向引物 AFP2F :5'-CGGAATTCCGATGAAATACTGTACTATGTT-3' ;

反向引物 AFP2R :5'-CCCTCGAGGGTCAGTTGGCACCGCCGGCGG-3' ;

以第一链 cDNA 为模板,分别采用 AFP1F 和 AFP1R、AFP2F 和 AFP2R 为引物扩增目的基因 AFP1 和 AFP2。

[0025] PCR 反应体系为:50 μL 反应体系:10 μL 5×buffer,5 μL dNTP (10 mmol/L),上下游引物 (10 μmol/L) 各 1 μL,酶 (5U/L) 1 μL,cDNA 2 μL,水 29 μL。

[0026] 反应程序为 95℃ 5 min, [95℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 40 s] 30 个循环, 72℃ 10 min。

[0027] PCR 产物切胶纯化后与 pBS-T 载体连接,连接产物命名为 pBS-AFP1 和 pBS-AFP2,转化大肠杆菌 JM109 感受态后,采用蓝白斑筛选转化子,取白斑进行 PCR 检测后送公司测序,测序结果证实得到的转化子分别为带酶切位点的 AFP1 和 AFP2 基因。

[0028] 2. 植物表达载体构建

用限制性内切酶 Xba I 和 EcoR I 双酶切含有 APF1 目的基因的重组质粒 pBS-AFP1 和植物表达载体 pISV2678,回收目的片段并连接,转化大肠杆菌 TOP10 感受态后,采用蓝白斑筛选转化子,取白斑进行 PCR 检测后送公司测序,测序结果证实得到的转化子为带酶切位点的 pISV2678-AFP1 单价表达载体。

[0029] 用限制性内切酶 EcoR I 和 Xho I 双酶切 pBS-AFP2 和 pISV2678-AFP1 表达载体,回收目的片段并连接,将连接产物转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞,经 PCR 鉴定后送公司测序,若所测序列含有目的基因,则证明植物表达载体构建成功。

[0030] PCR 扩增引物为:上游引物 AFP-F: 5'-CACAACAGTGTGGGAGTCAAGCC-3'; 下游引物 AFP-R: 5'-CGGTTGATTGGTTTGCAGTGGTAG-3'。PCR 反应体系为:20 μL 反应体系:2 μL 10×buffer,2 μL dNTP (10 mmol/L),上下游引物 (10 μmol/L) 各 0.5 μL,酶 (5U/L) 0.2 μL,质粒 DNA 2 μL,水 12.8 μL。反应程序为 95℃ 5 min, [95℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 40 s] 30 个循环,72℃ 10 min。

[0031] 3. 植物表达载体导入农杆菌

采用电击转化的方法将植物表达载体导入根癌农杆菌 EHA105 中,具体步骤如下:

农杆菌感受态细胞的制备

(1)挑取根癌农杆菌 EHA105 单菌落接种于含有 10 μ g/ml 利福平和 100mg/l 卡那霉素的 3 mL LB 液体培养基中,28 $^{\circ}$ C,220 rpm 震荡培养过夜。

[0032] (2)取 1mL 过夜培养的菌液加到 200 mL 含有同样抗生素的 LB 培养基中,28 $^{\circ}$ C,220rpm 震荡培养 3-4 小时,直至 OD600 在 0.4 至 0.8 之间。收集菌液并分装于 50ml 离心管中,冰上放置 15-30 分钟(说明:接下来的操作均在冰上进行,所用试剂和耗材必须提前预冷)。

[0033] (3)4 $^{\circ}$ C 4000 rpm 离心 15 分钟。弃上清,加入等体积的无菌水悬浮细胞,冰上放置 10 分钟。

[0034] (4)4 $^{\circ}$ C 4000 rpm 离心 15 分钟,弃上清,加入 1/2 体积的无菌水,悬浮细胞,冰上放置 10 分钟。4 $^{\circ}$ C 4000 rpm 离心 15 分钟,弃上清,加入 1/4 体积的无菌水,悬浮细胞,冰上放置 10 分钟。

[0035] (5) 4 $^{\circ}$ C 4000 rpm 离心 15 分钟,弃上清,加入 1-2 mL 无菌水(OD600=0.4 加 1 mL,OD600=0.8 加 2 mL)悬浮细胞,加入 DMSO 至浓度为 7%,混匀后即为电击用农杆菌 EHA105 感受态。将上述感受态细胞分装于 1.5 mL EP 管中,液氮速冻后 -80 $^{\circ}$ C 保存备用。

[0036] 电击转化

将电击杯清洗干净后用 75% 酒精浸泡 2 小时,然后用无水乙醇冲洗,晾干备用。

[0037] 取 2 μ L 质粒 DNA 于 40 μ L EHA105 感受态中,轻打混匀后移入预冷的电击杯中,1800V 电击,直到啪的一声电击完毕。

[0038] 迅速加入 1 mL LB 液体培养基至电击杯中,混匀,将混合液转入 1.5 mL EP 管中,28 $^{\circ}$ C,120 rpm 轻摇 2-4 小时。

[0039] 取适量菌液涂布于含 50 mg/L 利福平和 100 mg/L 卡那霉素的 LB 固体培养基上,28 $^{\circ}$ C 培养 36-48 小时。并对菌落进行 PCR 检测。剩余的菌液 -80 $^{\circ}$ C 保存备用。

[0040] 三. 农杆菌介导法转化剑麻

以剑麻 H. 11648 茎尖愈伤组织为受体材料,采用农杆菌介导法转化剑麻。具体步骤如下:

取保存于实验室的剑麻无菌苗茎尖,切成 3 mm $\times$ 5 mm 大小,接种于愈伤组织诱导培养基(培养基组成:MS 基本培养基 +3.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/LNAA)上培养,每天光照 12-14 小时,暗培养 10-12 小时,光照强度 2000 Lux,培养温度为 28 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C。待愈伤组织长出后,挑取色泽鲜艳的浅黄绿色愈伤组织,将其切成 1/2 绿豆大小后接种在愈伤组织诱导培养基中,作为转化的受体。

[0041] 取保存于 -80 $^{\circ}$ C 的菌液适量,涂布于含 50 mg/L 利福平和 100 mg/L 卡那霉素的 LB 固体培养基上,28 $^{\circ}$ C 培养 36-48 小时。挑取单克隆于添加有 50 mg/L 利福平和 100 mg/L 卡那霉素的 LB 液体培养基中,200rpm,28 $^{\circ}$ C 培养,待吸光度 OD600 值在 0.6-0.8 之间,5000 rpm 离心,收集菌体,然后加入 1 mL MS 液体基本培养基重悬菌液,最后加入 20mL 添加有 200 mg/L 的乙酰丁香酮 AC 的 MS 液体基本培养基,混匀后作为转化浸染液备用。

[0042] 将提前准备好的剑麻 H. 11648 愈伤组织转入三角瓶中,快速加入转化浸染液后摇

匀,150 rpm 震荡 15min, 过滤,用滤纸吸干,然后将浸染后的愈伤组织接种在 MS 基本培养基+3.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/LNAA+200 mg/L 的乙酰丁香酮 AC 的培养基中共培养 2-3 天,用无菌水洗三遍后滤纸吸干,最后将愈伤组织转入含有卡那霉素(kan+)和除草剂(Basta)的不定芽诱导培养基上诱导不定芽,待不定芽长到 4-6 厘米高时,转入生根培养基上进行生根,愈伤组织诱导培养基为:MS 基本培养基+0.1-1.0 mg/L 萘乙酸 NAA+1.0-3.5 mg/L 6-苄氨基腺嘌呤 6-BA,不定芽诱导培养基为:SH 基本培养基+1.0-5.0 mg/L 6-苄氨基腺嘌呤 6-BA+0-1.5 mg/L 萘乙酸 NAA+0-1.5 mg/L 吲哚3丁酸 IBA+ 200 mg/L 卡那霉素 kan++ 250 μ g/L 除草剂 Basta。生根培养基为添加 200 mg/L 羧苄霉素的 MS 基本培养基。培养基的 pH 为 5.8-6.0;光照 12-14 h,黑暗 10-12 h,光照强度为 2000 Lux,温度 28 ± 2 $^{\circ}\text{C}$ 。待再生植株长出 4-5 条壮根时,将其置于自然条件下炼苗 1 周,然后将其移出,洗净基部残留的培养基,用 3% 高锰酸钾浸泡 1-3 min 后移植到基质为椰糠和河沙(椰糠:河沙=1:1)的塑料遮光大棚中,大棚遮光度 75%,白天最高温度不超过 32°C ,夜晚最低温度不低于 20°C ,每天早晚各浇透水 1 次,再生植株的成活率在 90% 以上,幼苗长出新叶后开始追施 2% 复合肥水肥,施肥后用清水喷淋一次,待幼苗长出新叶 3 片、苗高 10cm 即移栽到育苗盆中继续培育。

[0043] 四. 转基因植株 PCR 检测

取 1 克转基因植株叶片,采用天根生化科技公司的植物基因组 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA,以 DNA 为模板,以 AFP-F 和 AFP-R 为引物,以非转基因植株为阴性对照,PCR 反应体系为:20 μ L 反应体系:2 μ L 10 $\times$ buffer,2 μ L dNTP (10 mmol/L),上下游引物 (10 μ mol/L) 各 0.5 μ L,酶 (5U/L) 0.2 μ L,质粒 DNA 2 μ L,水 12.8 μ L。反应程序为 95°C 5 min, [95°C 30 s, 56°C 30 s, 72°C 40 s] 30 个循环, 72°C 10 min。经 PCR 检测后发现基因 AFP1 和 AFP2 已经成功转入剑麻。PCR 检测结果见附图 2d。

[0044] 五. 转基因剑麻斑马纹病抗性鉴定

1. 转基因剑麻离体叶片斑马纹病抗性鉴定

取转基因剑麻叶片和非转基因剑麻叶片,冲洗干净后晾干,采用叶面针刺法接种烟草疫霉菌,48 小时后观察斑马纹病发病情况。具体步骤如下:

用灭菌的大头针将叶片正面的表皮刺破,将菌饼的菌丝生长面贴在针刺的位置,用无菌湿棉花覆盖后放入托盘中,用保鲜膜把整个托盘覆盖后,置于 28°C ,湿度 80% 以上的条件下培养,48 小时后测量病斑大小。结果发现,接种 24 小时后非转基因剑麻叶片明显出现病斑,48 小时后病斑扩展迅速,病斑大小均在 3 厘米以上(附图 2f),而转基因剑麻叶片病斑明显比非转基因剑麻病斑小,病斑大小均在 0.8-2 厘米之间(附图 2f)。即转基因剑麻叶片抗斑马纹病的能力明显比非转基因剑麻强。

[0045] 2. 转基因剑麻活体斑马纹病抗性鉴定

为了进一步检测转基因剑麻抗斑马纹病的能力,采用活体接种法直接将菌斑接种在转基因剑麻叶片上,用湿棉花覆盖,用保鲜膜保湿,每 2 小时加一次水,48 小时后测量病斑大小。结果表明:转基因剑麻的病斑明显比非转基因剑麻病斑小,说明转基因剑麻的抗烟草疫霉菌的性能比非转基因剑麻强。即采用转基因的方法,将橡胶素类多肽蛋白酶基因转入剑麻中,可提高剑麻对斑马纹病的抗性(附图 2e, 2g, 2h)。

[0046] 六. 转基因剑麻防御酶活性测定

取盆栽的转基因剑麻植株和非转基因剑麻植株,采用活体接种法接种烟草疫霉菌,分

别在接种 0 小时, 24 小时、36 小时和 48 小时取叶片, 液氮研磨后保存于 -80°C 备用。

[0047] 取保存于 -80°C 样品 0.5 g, 放入预冷的研钵中, 加 2 mL 预冷的提取液(含有 1% 聚乙烯吡咯烷酮的 0.05 mol/L 磷酸缓冲液, pH 7.8) 及适量的石英砂, 冰浴下研磨成浆, 再加提取液冲洗 2-3 次(提取液总体积为 5ml), 转入离心管。于 4°C 10000 rpm 下离心 15 min, 上清液即为粗提取酶液。取上清液分装, -20°C 保存。可用于超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT) 和多酚氧化酶(PPO) 活性的测定。

[0048] 1. 超氧化物歧化酶(SOD) 活性测定

超氧化物歧化酶 SOD 作为生物自由基的清除剂, 具有清除逆境胁迫时体内过量的超氧化物自由基, 维持活性氧代谢平衡的功能, 在植物-病原物相互作用过程中, 参与了植物的抗病反应, 起着非常重要的作用。

[0049] 采用黄嘌呤氧化酶法测定转基因植株和非转基因植株在接种烟草疫霉菌后的超氧化物歧化酶 SOD 的活力, 具体方法参照南京建成生物技术公司 SOD 试剂盒进行。以每克鲜样中 SOD 抑制率达 50% 时所对应的 SOD 量为一个酶活单位(U)。按如下公式计算:

$$\text{SOD 活力 (U/g)} = \frac{\frac{\text{对照 OD 值} - \text{测定 OD 值}}{\text{对照 OD 值}} - 50\%}{\frac{\text{提取酶液总体积}}{\text{鲜重量 (g)}}} \div \text{待测样品蛋白浓度 (mgprot/ml)}$$

在整个烟草疫霉菌侵染过程中, 转基因剑麻和非转基因剑麻超氧化物歧化酶 SOD 酶活性呈下降趋势, 两者无显著差异。结果如图 3c。

[0050] 2. 过氧化物(POD) 活性测定

采用愈创木酚法测定转基因植株和非转基因植株在接种烟草疫霉菌后的过氧化物 POD 的活力。酶的反应体系包括 2.9 mL 0.05mol/L 磷酸缓冲液, 1.0mL H_2O_2 (2%), 1.0mL 0.05mol/L 愈创木酚和 0.1mL 酶液, 以加热煮沸 5 分钟的酶液做对照。反应体系加入酶液后, 于 37°C 水浴保温 15min, 迅速放入冰浴并立即加入 2 mL 20% 三氯乙酸终止反应, 以酶的比活力表示其活性变化。按如下公式计算:

$$\text{过氧化物酶活 (U/g} \cdot \text{min)} = (\Delta A_{470} \times VT) / (W \times V_s \times 0.01 \times t)$$

ΔA_{470} : 反应时间内吸光度的变化; VT: 提取酶液总体积; W: 样品鲜重; V_s : 测定时取用酶液体积; t: 反应时间。

[0051] 大量研究表明, 过氧化物酶活性于植物的抗病性具有正相关关系。用病原菌接种, 抗病品种的过氧化物酶活性迅速升高, 而与之相对照的感病品种的过氧化物酶活性或者没有变化, 或者活性升高的时间延迟。本发明中的剑麻转基因植株和非转基因植株, 在接种烟草疫霉菌 24 小时内, 转基因植株和非转基因植株 POD 酶活性急剧下降, 然后在接种 24 小时至 72 小时内, POD 酶活性迅速增加, 而且转基因植株比非转基因植株 POD 酶活性明显增加快, 增加的幅度大。即转基因剑麻植株比非转基因剑麻植株抗烟草疫霉菌的能力强。结果如图 3b。

[0052] 3. 过氧化氢(CAT) 活性测定

采用比色法测定转基因植株和非转基因植株在接种烟草疫霉菌后的过氧化氢 CAT 活性。3mL 反应液包括 1.0mL 2% H_2O_2 , 0.05mL 酶液和 1.95mL 蒸馏水, 在 240nm 处测定 OD 值变化, 以 OD₂₄₀ 每分钟减少 0.1 为一个酶活性单位(U)。每 15 秒测 OD 值。按如下公式计算:

$$\text{过氧化氢酶活 (U/g} \cdot \text{min)} = (\Delta A_{240} \times VT) / (W \times V_s \times 0.01 \times t)$$

VT :提取酶液总体积 ;W :样品鲜重 ;VS :测定时取用酶液体积 ;t :反应时间。

[0053] 过氧化氢 CAT 是生物氧化过程中重要的抗氧化酶,能有效地清除各种活性氧基团,防止这些基因对细胞膜系统的损坏,在植物抗病过程中起着非常重要的作用。在整个接种烟草疫霉菌过程中,转基因剑麻和非转基因剑麻过氧化氢 CAT 活性呈上升趋势,而且转基因剑麻过氧化氢 CAT 活性比非转基因剑麻强,从而间接地提高了转基因剑麻抗烟草疫霉菌的能力。结果如图 3a。

[0054] 4. 多酚氧化酶 PPO 活性测定

采用邻苯二酚法测定转基因植株和非转基因植株在接种烟草疫霉菌后的多酚氧化酶 PPO 活性。反应体系为 :0.05mol/L 磷酸缓冲液 2.9mL,0.1mol/L 儿茶酚(0.55 儿茶酚加缓冲液至 50mL) 1mL,酶液 0.1mL,反应体系中加入酶液后立即于 30℃ 保温 10min,保温后迅速放入冰浴,立即加入 2mL20% 的三氯乙酸 TCA 终止反应。测 398nm 或 525nm 下 OD 值,以 $\Delta OD_{398nm}/g \cdot Fw \cdot min$ 表示酶活性。按如下公式计算 : $OD_{398nm}(g \cdot fr. w. cm \cdot min) = OD_{398} \times N / (W \times T \times n \times D)$

其中,N 为酶初提取液总体积 mL ;W 为样品鲜重 g ;T 为反应时间 min,n 为反应液所用酶初提取液体积(mL),D 为比色皿直径(cm)。

[0055] 多酚氧化酶 PPO 参与植物体内酚类物质氧化产生醌类化合物和木质素形成,以杀死和抑制病原菌的繁殖而起到抗病作用。在整个烟草疫霉菌侵染过程中,转基因剑麻多酚氧化酶 PPO 活性迅速升高,且比非转基因剑麻升高显著,非转基因剑麻 PPO 活性略有增加,但递增不显著。从而间接地说明通过转基因技术提高了剑麻对烟草疫霉菌的抗性。图 3d。

序列表

<110> 中国热带农业科学院南亚热带作物研究所

<120> 一种提高剑麻斑马纹病抗性的方法

<160>8

<210>1

<211>279

<212>DNA

<213> 牵牛花 <221>misc_feature

<223>n =a 或 g 或 c 或 t

<400>1

```

atgaaattct gtactatggt tcttggtgtc ttggcttttag ccagcttggt gttgacacca 60
tcaacaataa tggcacaaca gtgtggggagt caagcccgtg ggcgtctgtg cggcaacggc 120
ctttgctgca gccagtgggg ctactgtggc tccactgcag cctactgtgg agctggctgc 180
cagagccaat gcaaattctac tgctgcttct gccaccgaca ccaccaccac tgcaaaccaa 240
tcaaccgcta agtcggatcc cgccggcggt gccaaactga 279

```

<210>2

<211>276

<212>DNA

<213> 牵牛花 <221>misc_feature

<223>n =a 或 g 或 c 或 t

<400>2

```

atgaaatact gtactatggt tattgttctc ttgggttttag gcagcttggt gttgacacca 60
acaacaataa tggcacaaca gtgcggggaga caagccagtg ggcgtctgtg cggcaacggc 120
ctttgctgca gccagtgggg ctactgtggc tccactgcag cctactgtgg agctgggtgc 180
cagagccaat gcaaattctac tgctgcttct tccaccacca ctaccactgc aaaccaatca 240
accgctaagt cggatcccgc cgccgggtgcc aactga 276

```

<210>3

<211>92

<212> 氨基酸

<213> 牵牛花

<221>misc_feature

<223>n =a 或 g 或 c 或 t

<400>3

```

Met Lys Phe Cys Thr Met Phe Leu Val Val Leu Ala Leu Ala Ser
1           5           10           15
Leu Leu Leu Thr Pro Ser Thr Ile Met Ala Gln Gln Cys Gly Ser
16          20          25          30
Gln Ala Arg Gly Arg Leu Cys Gly Asn Gly Leu Cys Cys Ser Gln

```

31 35 40 45
Trp Gly Tyr Cys Gly Ser Thr Ala Ala Tyr Cys Gly Ala Gly Cys
46 50 55 60
Gln Ser Gln Cys Lys Ser Thr Ala Ala Ser Ala Thr Asp Thr Thr
61 65 70 75
Thr Thr Ala Asn Gln Ser Thr Ala Lys Ser Asp Pro Ala Gly Gly
76 80 85 90
Ala Asn

91

<210>4

<211>91

<212>氨基酸

<213>牵牛花

<221>misc_feature

<223>n =a 或 g 或 c 或 t

<400>4

Met Lys Try Cys Thr Met Phe Ile Val Leu Leu Gly Leu Gly Ser
1 5 10 15
Leu Leu Leu Thr Pro Thr Thr Ile Met Ala Gln Gln Cys Gly Arg
16 20 25 30
Gln Ala Ser Gly Arg Leu Cys Gly Asn Gly Leu Cys Cys Ser Gln
31 35 40 45
Trp Gly Tyr Cys Gly Ser Thr Ala Ala Tyr Cys Gly Ala Gly Cys
46 50 55 60
Gln Ser Gln Cys Lys Ser Thr Ala Ala Ser Ser Thr Thr Thr Thr
61 65 70 75
Thr Ala Asn Gln Ser Thr Ala Lys Ser Asp Pro Ala Gly Gly
76 80 85 90
Ala Asn

91

<210>5

<211>20

<212>DNA

<221>未知

<223>n =a 或 g 或 c 或 t

<400>5

5' -ATGAAATACTGTACTATGTT-3'

<210>6

<211>20

<212>DNA

<221> 未知

<223>n =a 或 g 或 c 或 t

<400>6

5' - TCAGTTGGCACCGCCG GCGG-3'

<210>7

<211>23

<212>DNA

<221> 未知

<223>n =a 或 g 或 c 或 t

<400>7

5' -CACAACAGTGTGGGAGTCAAGCC-3'

<210>8

<211>24

<212>DNA

<213> 牵牛花

<221> 未知

<223>n =a 或 g 或 c 或 t

<400>8

5' -CGGTTGATTGGTTTGCAGTGGTAG-3'

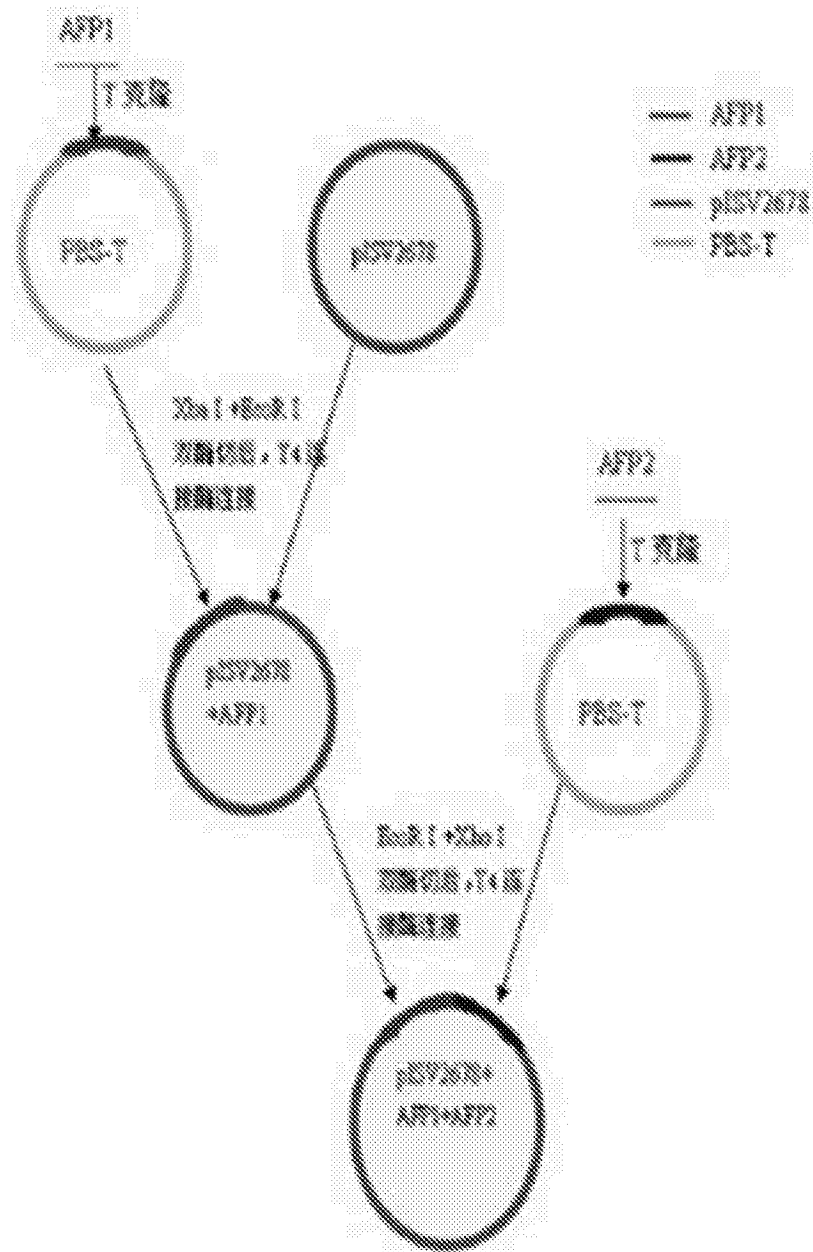


图 1

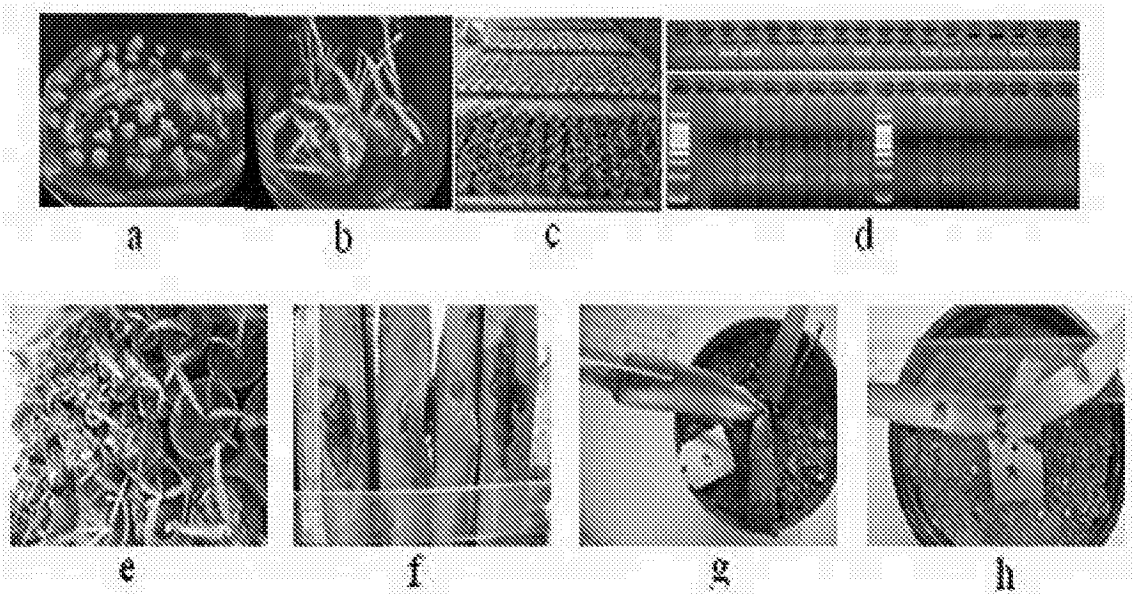


图 2

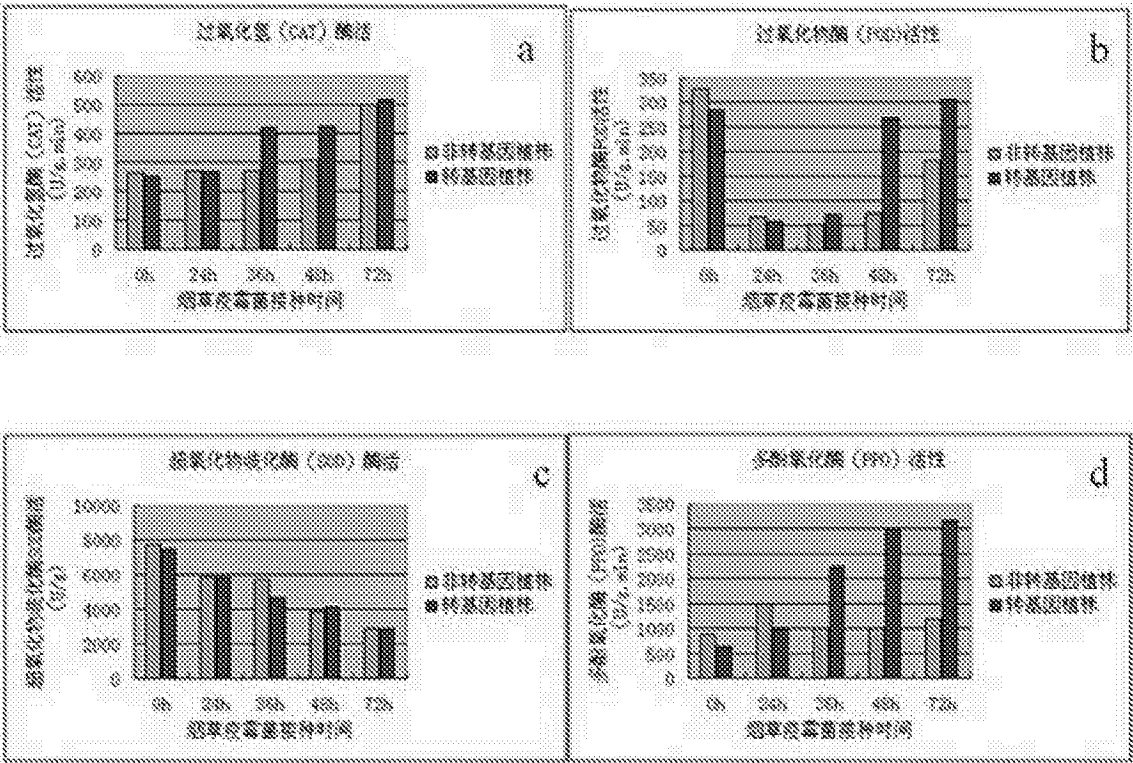


图 3