

## 表达 Osmotin 蛋白的转基因马铃薯对晚疫病的抗性分析\*

李汝刚 伍宁丰 范云六 宋伯符

(中国农学院生物技术研究中心 北京 100081)

G. A. A. Vleeshouwers A. Pereira

(荷兰 CPRO-DLO 分子生物学系)

**摘 要** 将缺失 C 端信号肽序列的 Osmotin 基因和在第 96 位氨基酸处发生琥珀突变的 Osmotin 基因置于 CaMV 双 35S 启动子驱动下, 转化马铃薯, 获得 NPTII 抗性植株。经对 20 株 NPTII 抗性植株的 Southern 检测和对 55 株 NPTII 抗性植株的 Northern 分析, 证实了 Osmotin 基因的插入和转录。对 21 株转 Osmotin 基因和 17 株转琥珀突变 Osmotin 基因植株的抗病性测定, 分别筛选出 8 株和 10 株抗病性与非转基因植株有显著差异 ( $\alpha=0.05$ ) 的转基因植株。对 8 株转 Osmotin 基因植株的 Dot blot-ELISA 和 Western 杂交分析, 证明 Osmotin 蛋白胞外分泌能够赋予转基因植株叶片抗晚疫病的能力, 研究结果暗示 Osmotin 蛋白具有抑菌活性的部位可能位于其 N 端。

**关键词** Osmotin 胞外分泌 转基因植株 马铃薯晚疫病

**分类号** S435.32 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)02-0135-40

Osmotin 是从受盐胁迫的烟草细胞培养物中发现的一种蛋白<sup>[1,2]</sup>, 在一级结构上与非洲浆果 (*Thaumatococcus daniellii*) 高强度的甜味蛋白具有相似性。烟草 Osmotin 蛋白能被烟草花叶病毒 (TMV) 侵染诱导表达, 是一种病程相关蛋白。体外实验表明, 烟草 Osmotin 蛋白对马铃薯晚疫病菌 *Phytophthora infestans* 具有抑制活性, 当浓度大于 40 nmol/L 时, 裂解 *P. infestans* 孢子囊的顶端, 当浓度大于 400 nmol/L 时, 对 *P. infestans* 菌丝生长有很强的抑制作用<sup>[3]</sup>; 番茄受 *P. infestans* 侵染后也产生一种 Osmotin-like 蛋白, 对 *P. infestans* 产生抑制作用<sup>[3]</sup>。Liu 等人证明组成型表达烟草 Osmotin 蛋白的马铃薯植株推迟病斑出现时间<sup>[4]</sup>。最近, Zhu 等人又报道组成型表达马铃薯 Osmotin-like 蛋白的马铃薯植株能降低 *P. infestans* 的侵染频率<sup>[5]</sup>。*P. infestans* 是以细胞间为主要繁殖场所的专性寄生菌, 为获得高抗晚疫病的转基因马铃薯, 作者克隆了缺失 C 端信号肽序列 (引导蛋白在细胞液泡内定位) 保留 N 端信号肽序列 (引导蛋白分泌至胞外) 的烟草 Osmotin 基因<sup>[6]</sup>。在基因克隆过程中, 由于 PCR 错配, 获得了一个在第 96 位氨基酸处产生琥珀突变的 Osmotin 基因。本文研究了转这两个 Osmotin 基因的马铃薯对晚疫病的抗性, 证明 Osmotin 蛋白胞外分泌能够赋予转基因植株叶片抗晚疫病的能力, 并暗示 Osmotin 蛋白具有抑菌活性的部位可能位于其 N 端。

\* 国家自然科学基金资助项目 (No. 39700094)。

收稿日期: 1998-01-09 修回日期: 1999-01-20。



标,通过线性回归,估计病斑生长速率(LGR),LGR 的统计分析用 ANOVA 进行。

## 2 结果与分析

### 2.1 Osmotin 蛋白基因植物高效表达载体的构建

用 *Nco*I 和 *Bam*HI 将质粒 pRLGEMC5 和 pRLGEMC3 中的 Osmotin 基因片段切下,克隆在质粒 pBI525 上,构建 Osmotin 基因植物表达载体,得到重组质粒 pRLBIC5 和 pRLBIC3(图



图 1 Osmotin 基因植物表达载体

Fig. 1 Plant expression vector of Osmotin gene

1)。用 *Hind*III、*Eco*RI 将质粒 pRLBIC5 和 pRLBIC3 上的 Osmotin 基因表达盒切下克隆在 Ti 质粒 pBINPLUS 上,得到重组 Ti 质粒 pBINC5 和 pBINC3。经液氮冻融法将 Ti 重组质粒转化农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404,经卡那霉素(100  $\mu$ g/mL)和利福平(50  $\mu$ g/mL)筛选,获得含有重组 Ti 质粒的农杆菌单菌落。

### 2.2 马铃薯遗传转化及转基因植株再生

以马铃薯二倍体基因型 LineV 和 R2 为转化起始材料,用叶盘法转化马铃薯茎段外殖体,经卡那霉素抗性筛选,获得 55 株卡那霉素抗性植株,其中来自基因型 LineV 的有 44 株,来自基因型 R2 的有 11 株。

### 2.3 Osmotin 基因的整合

从 2 个 Osmotin 基因转化的植株中各取 10 株,提取叶片总 DNA,通过 *Eco*RI 酶解,进行 Southern 分析,表明 Osmotin 基因已整合进马铃薯基因组,整合点因植株而异,至少有 1~6 个整合点。图 2 示 6 株转基因植株的 Southern 杂交结果。

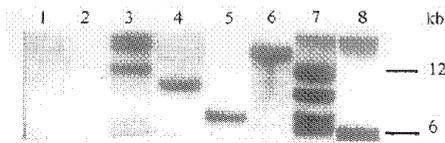


图 2 Osmotin 基因在转基因马铃薯植株中的拷贝数分析

Fig. 2 Analysis of copy number of Osmotin gene in transgenic potato

1, 2. Untransformed plant; 3~8. Transgenic plants

### 2.4 Northern 分析

对转 Osmotin 基因的 33 株和琥珀突变 Osmotin 基因的 22 株植株进行 Northern 分析(图 3),证明 Osmotin 基因在 mRNA 水平上进行了表达。

### 2.5 转基因植株的抗病性鉴定

以病斑生长速率(LGR)为指标,测定了转基因植株对 *P. infestans* 的抗性。在接种的 15 片小叶上,未转基因植株 LineV(对照)的平均 LGR 值为  $3.44 \pm 0.44$  mm/d, R2(对照)的平均 LGR 值为  $4.16 \pm 0.33$  mm/d。根据对 LGR 值的统计分析,在表达 Osmotin 蛋白基因的 21 株转基因植株中(8 株来自基因型 R2) 8 株的抗病性与对照差异显著( $\alpha = 0.05$ ),其 LGR 值分别为  $2.49 \pm 1.07$ ,  $1.68 \pm 0.63$ ,  $1.80 \pm 0.14$ ,  $0.84 \pm 0.43$ ,  $1.24 \pm 0.33$ ,  $1.38 \pm 0.43$ ,  $1.43 \pm 0.21$ (画线者来自 R2 基因型), 7 株和对照差异极显著( $\alpha = 0.01$ )。在表达琥珀突变 Osmotin 基因的 17 株转基因植株中(其中 3 株来自基因型 R2), 10 株的抗病性与对照差异显著( $\alpha = 0.05$ ),其 LGR 值分别为  $2.08 \pm 0.84$ ,  $2.12 \pm 0.23$ ,  $2.13 \pm 0.78$ ,  $2.37 \pm 1.57$ ,  $1.88 \pm 0.47$ ,  $1.24 \pm 0.07$ 。

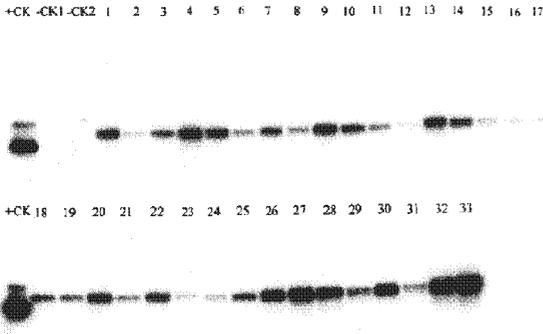


图 3 转基因马铃薯的 Northern 分析

Fig.3 Northern analysis of transgenic potato plants  
+CK. Positive ; -CK1 , -CK2. Negative ;  
1~33. Transgenic plants

1.68 ± 0.26 , 2.43 ± 1.01 , 2.22 ± 0.12 ,  
3.00 ± 1.09 (画线者来自 R2 基因型), 其  
中 8 株和对照差异极显著 (α=0.01)。

### 2.6 蛋白质表达及其胞间分泌

对 6 株转 Osmotin 基因抗病植株的  
蛋白表达及其胞间分泌进行了研究。  
Dot-blot ELISA 检测表明 ,Osmotin 基因  
在翻译水平上得到表达(图 4)。取 2 株抗  
病转基因植株的叶片,通过对细胞总蛋白、  
胞间蛋白和细胞内蛋白的 SDS-  
PAGE、Western blotting 分析,证明 Os-  
motin 蛋白表达后,在自身 N 端信号肽的  
引导下分泌到了细胞外。

## 3 讨 论

过去几年来,对 PR 蛋白的研究发现,除 PR-1a 蛋白外<sup>[14]</sup>,液泡内的碱性 PR 蛋白比  
胞外的酸性蛋白具有更强的抗菌活性<sup>[15]</sup>,液泡内抑菌性强的 PR 蛋白分泌至胞外后显著  
提高转基因植株的抗性水平<sup>[16~18]</sup>,这与大部分  
病原菌的侵染初期发生在寄主细胞间有关。事  
实上,非转基因马铃薯中也有 Osmotin-like 蛋白  
的积累,但出现的时间较晚,一般在 *P. infestans*  
侵染后的 96h,但由于侵染后期 *P. infestans* 生  
长(致病作用)占主导地位,即使高的 Osmotin-like  
蛋白量,也难以抑制 *P. infestans* 的旺盛生长<sup>[5]</sup>。  
因此在 *P. infestans* 侵染初期细胞被破坏后,Osm-  
motin 蛋白的及早释放对抗病效果尤为重要。

根据 *P. infestans* 的生长繁殖以细胞间为主  
要场所的寄生特点,本实验改变 Osmotin 蛋白在  
转基因植株内的定位空间,使转基因植株在 *P.*  
*infestans* 侵染初期发挥抑菌作用。抗病性测定  
表明,虽然接种的生理小种致病性强(复合小  
种)接种浓度比较高,仍然显示 Osmotin 蛋白的胞  
外分泌赋予转基因马铃薯叶片抗晚疫病的能力。

对于 Osmotin 蛋白的抑菌机制,尚不清楚。  
从玉米等禾谷类作物种子中分离纯化了与 Os-  
motin 蛋白一级结构类似的 Zeamatin 或 Zea-  
matin-like 蛋白,体外实验证明这些蛋白对 *Can-*  
*dida albicans*(人类病原)、*Trichoderma reesei*(菌

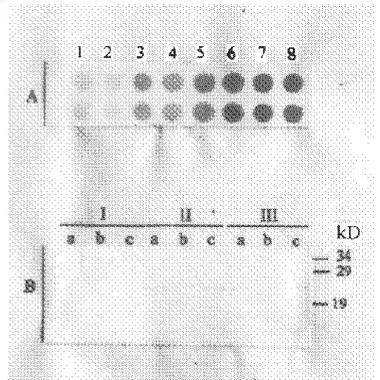


图 4 转基因植株中 Osmotin 蛋白  
的表达与胞外分泌

Fig.4 Expression and intercellular secretion  
of Osmotin protein in transgenic plants  
A. Detection of Osmotin protein expression by  
Dot-blot ELISA

1. positive ; 2. untransformed plants ; 3 ~ 8.  
transgenic plants  
B. Analysis of intercellular secretion of ex-  
pressed Osmotin protein by Western-blotting  
I. Untransformed plants ; II , III. Transgenic  
plants  
a. Intercellular protein ; b. Intracellular  
protein ; c. Total cell protein

物病原) *Alternaria solani*(植物病原)和 *Neurospora crassa*(非病原菌)等真菌具有不同强度的抑菌活性<sup>[19]</sup>。它们共同的结构特征是含有 16 个半胱氨酸, 8 个二硫键, 具有强疏水性, 分子量在 22~24kD 之间, 推测这些结构类似的抑菌蛋白在抑菌机制上可能通过改变菌株细胞膜的透性使菌株致死。如果这种假设成立, 那么 Osmotin 蛋白在结构上至少应有两个结构域, 一个结构域负责与真菌细胞膜的结合, 另一个结构域负责细胞膜穿孔。

本实验测定了一个发生琥珀突变的 Osmotin 基因, 在马铃薯中表达后对晚疫病的影响。该基因终止密码子提前至包括 5' 端信号肽序列在内的 96 个氨基酸处(全长基因编码 232 个氨基酸)。经遗传转化和抗病性测定发现在 22 株转基因植株中, 有 10 株具有抗病性, 其中有 3 株转基因植株的 LGR<1.5。Northern 分析表明这一非完整的 Osmotin 基因已被导入转基因植株, 并在 mRNA 上得到表达。Malehorn *et al.* 报道玉米 Zeamatin-like 蛋白在转基因番茄内表达后通过一未知机制降解掉第 180 位氨基酸后的 C 端肽链(降解的肽链中含有 5 个二硫键)纯化后的水解蛋白仍保持原有的抑菌活性<sup>[20]</sup>。对转非完整 Osmotin 基因植株, 尽管需要从蛋白表达方面进行进一步分析, 但暗示 Osmotin 蛋白具有抑菌活性的部分可能位于蛋白的 N 端。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] N. H. Singh, A. K. Handa, P. M. Hasegawa *et al.* *Plant Physiol*, 1985 **79** :126~137.
- [ 2 ] N. H. Sing, C. A. Bracker, P. M. Hasegawa *et al.* *Plant Physiol*, 1987 **85** :529~536.
- [ 3 ] C. P. Woloshuk, J. S. Meulenhoff, M. Sela-Buurlage *et al.* *Plant Cell*, 1991 **3** :619~628.
- [ 4 ] Liu D, K. G. Raghothama, P. M. Hasegawa *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994 **91** :1888~1892.
- [ 5 ] Zhu B, Chen T. H. H, Li P. H. *Planta*, 1996 **198** :70~77.
- [ 6 ] 李汝刚, 伍宁丰, 范云六. 农业生物技术, 1996 **(4)** :329~334.
- [ 7 ] J. Sambrook, E. F. Fritsch. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [ 8 ] R. G. F. Visser, E. Jaconson, A. Hesseling-meinders *et al.* *Plant Molecular Biology*, 1989 **12** :329~337.
- [ 9 ] D. M. Hillis, A. Larson, S. K. Davis *et al.* *Molecular Systematics*. Sinauer, Sunderland, MA. pp. 18~370.
- [ 10 ] J. M. Jaynes, P. Nagpala, L. dest Fanoo-Beltran *et al.* *Plant Sciences*, 1993 **89** :43~53.
- [ 11 ] P. J. G. M. G. Wit de Spikman. *Physiologica Plant/ Pathology*, 1982 **21** :1~11.
- [ 12 ] C. E. Caten, J. L. Jinks. *Canadian Journal of Botany*, 1986 **64** :329~347.
- [ 13 ] W. A. Hodgson. *America Potato J.*, 1961 **38** :259~264.
- [ 14 ] D. Alexander, R. M. Goodman, M. Gut-Rella *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993 **90** :7327~7331.
- [ 15 ] M. B. Sela-Buurlage, A. S. Ponstein, S. A. Bres-Vloemans *et al.* *Plant Physiol*, 1993 **101** :857~863.
- [ 16 ] Zhu Q, E. A. Maher, S. Masoud *et al.* *Bio/Technology*, 1994 **12** :807~812.
- [ 17 ] E. Jongedijk, H. Tigelaar, J. S. C. van Roekel *et al.* *Euphytica*, 1995 **85** :173~180.
- [ 18 ] G. Jach, B. Gornhardt, J. Mundy *et al.* *The Journal of Plant*, 1995 **(1)** :97~109.
- [ 19 ] A. J. Vigers, W. K. Roberts, C. P. Selitrennikoff *Molecular Plant-Microbe Interact*, 1991 **(4)** :315~323.
- [ 20 ] D. E. Malehorn, J. R. Borgmeyer, C. E. Smith *et al.* *Plant Physiology*, 1994 **106** :1471~1481.

## Analysis of Late Blight Disease Resistance in Transgenic Potato Plants Expressing Osmotin Protein Gene

Li Rugang    Wu Ningfeng    Fan Yunliu

(*Biotechnology Research Center, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081*)

G. A. A. Vleeshouwers    A. Pereira

(*CPRO-DLO, Wageningen, the Netherlands*)

**Abstract** Potato transformation was conducted using tobacco Osmotin gene without carboxyl terminal prepropeptide and Osmotin gene with a stop codon ( TUG ) at 96th amino acid driven by CaMV double 35S promoter and putative transgenic potato plants with NPT II resistance were produced. Southern and Northern analysis of 20 and 55 NPT II-resistant plants respectively confirmed the integration and transcription of Osmotin gene. Twenty one plants transformed with Osmotin gene and 17 plants transformed with varied Osmotin gene were tested for resistance to late blight disease. Eight and 10 plants were shown to have significant resistance at the level of  $\alpha = 0.05$  compared to untransformed plants. Dot blot-ELISA and Western blot analysis of 8 late blight-resistant plants transformed with osmotin gene confirmed that intercellular secretion of expressed osmotin gene conferred transgenic plants high resistance to infection of *Phytophthora infestans*. The research result was also pointed to be that antifungal part was possibly located at N end of Osmotin protein.

**Key words** Osmotin , intercellular secretion , transgenic plants , potato late blight disease