

小麦蓝矮病植原体 *FruX* 基因的 克隆及致病性测定

张 珏^a, 赵 震^a, 吴云锋^b, 张春平^b

(西北农林科技大学 a 生命科学学院, b 植物保护学院 陕西省农业分子生物重点实验室, 陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 【目的】克隆小麦蓝矮病(WBD)植原体 β -1,4-内切葡聚糖酶基因(*FruX*),验证其在植原体侵染寄主中的作用,为更好地防控小麦蓝矮病奠定理论基础。【方法】采用 PCR 技术从小麦 WBD 植原体中扩增到 *FruX* 全基因,将其插入到病毒载体 pgR107 中,构建重组病毒载体 pgR107-*FruX*,用农杆菌介导法侵染本氏烟草,观察烟草表型的变化。【结果】*FruX* 基因全长 1 071 bp,编码 356 个氨基酸。重组病毒载体接种烟草 22 d 后,有 9 株烟草植株表现出明显的花叶、黄化症状,RT-PCR 检测到发病植株接种 7 d 后的叶片有 *FruX* 基因的转录。【结论】*FruX* 基因接种烟草导致烟草表型发生变化,推测其与植原体病害的发生有关。

【关键词】 小麦蓝矮病植原体; β -1,4-内切葡聚糖酶基因;序列分析;致病性测定

【中图分类号】 S435.121

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2010)07-0187-04

Cloning and pathogenicity analysis of endo-1,4-beta-glucanase gene (*FruX*) from wheat blue dwarf phytoplasma

ZHANG Jue^a, ZHAO Zhen^a, WU Yun-feng^b, ZHANG Chun-ping^b

(a College of Life Science, b College of Plant Protection, Shaanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】 In order to effectively control the wheat blue dwarf(WBD) phytoplasma and identify the WBD phytoplasma has the similarities to known phytoplasma virulence factors, we cloned the endo-1,4-beta-glucanase (*FruX*) gene from WBD. 【Method】 We amplified the endo-1,4-beta-glucanase (*FruX*) gene from WBD by polymerase chain reaction, then inserted the *FruX* gene to double expression virus vector pgR107 and inoculated tobacco through agrobacterium to observe symptoms manifested. 【Result】 The *FruX* gene from WBD phytoplasma was 1 071 bp in length, encoding a predicted protein of 356 amino acids. Inoculated tobacco with pgR107-*FruX* showed shrinking and mottle after 22 days, we detected *FruX* gene were transcribed in infected plant after 6 days. 【Conclusion】 The phenotype of tobacco changed after *FruX* gene were inoculated, so we infer it related to the occurrence of phytoplasma disease.

Key words: wheat blue dwarf phytoplasma; endo-1,4-beta-glucanase; sequencing analysis; pathogenicity analysis

小麦蓝矮病(Wheat blue dwarf, WBD)是我国首次报道的植原体病害,也是我国西北地区继小麦

黄矮病之后的第 2 大病害,其通常引起植株叶片褪绿、矮缩,造成减产,严重时甚至绝收。因此,分离

* [收稿日期] 2010-01-11

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30871625);公益性行业(农业)科研专项“稻麦重要病毒病株鉴定和防控技术体系研究”(nyhyzx07-051);高等学校学科创新引智计划项目(B07049)

[作者简介] 张 珏(1985—),女,陕西蒲城人,在读硕士,主要从事微生物和植物病理学研究。E-mail: zj333zcd2006@126.com

[通信作者] 吴云锋(1960—),男,陕西乾县人,教授,博士生导师,主要从事植物病毒学研究。E-mail: wuyf@nwsuaf.edu.cn

WBD 植原体致病性基因并揭示其致病分子机理不仅可为小麦蓝矮病的防治提供理论依据,也可为我国报道的 100 余种其他植原体病害的防治提供借鉴。

过去关于 WBD 植原体的研究仅仅局限在分类和寄主范围方面,顾沛雯等^[1]、安凤秋等^[2]利用 16S rDNA 基因和延伸因子 *tuf* 基因序列对小麦蓝矮病植原体从亚组水平上进行了分类,认为小麦蓝矮病植原体属于植原体 16Sr I -C 亚组;顾沛雯等^[3]对小麦蓝矮病植原体寄主范围进行了鉴定,并对病原多态性进行了分析,但目前关于植原体的致病机理报道很少。早期的研究提出了激素假说,认为植原体的侵染打破了寄主体内的激素平衡,引起丛枝症状,出现腋芽丛生与矮化生长^[4]。洋葱黄化植原体基因组的研究暗示,分泌蛋白 β -1, 4-内切葡聚糖酶(FrvX)与症状的诱导和致病性有关^[5-8]。 β -1, 4-内切葡聚糖酶是一类由真菌、细菌、昆虫、动物、植物等组织产生的纤维素水解酶,不同生物的 β -1, 4-内切葡聚糖酶基因的特征不同。对线虫 β -1, 4-内切葡聚糖酶的研究认为,该酶在线虫穿刺植物根部表皮及在根内移动时,可软化植物细胞壁^[9]。关于细胞壁水解酶在致病过程中的作用,已在几类定居植物细胞间的细菌、真菌和线虫中进行了一些研究^[10],但尚未见其在植原体致病过程中的作用报道。为此,本研究对 WBD 植原体 β -1, 4-内切葡聚糖酶基因进行了克隆,将其构建到 PVX 侵染性克隆载体上,并对其致病性进行了测定,以期为进一步揭示 WBD 植原体的致病机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

小麦蓝矮病植原体、泡桐丛枝植原体(阳性对照),均由陕西省农业分子生物重点实验室分子植物病毒室提供。*Taq* DNA 聚合酶购于 Fementas 公司;质粒 pMD18-T simple 载体、DNA Marker、T4 DNA 连接酶,均为 TaKaRa 公司产品;凝胶回收试剂盒、质粒微量提取试剂盒,均购于 U-gene 生物工程有限公司;马铃薯 X 病毒载体 pgR107 和农杆菌菌株 GV3101(含辅助质粒 pJIC Sa-Rep),均由聊城大学曹雪松教授提供。

1.2 植原体 DNA 的提取

采用 CTAB 法提取植原体基因组 DNA,具体参照顾沛雯等^[1]的方法进行。

1.3 β -1, 4-内切葡聚糖酶基因(*FrvX*)的克隆、纯化及测序

根据 GenBank 中公布的 AY、OY 植原体全基因组序列,从中查找 β -1, 4-内切葡聚糖酶基因,在序列两侧的保守区设计 1 对特异性引物 frvX-F 和 frvX-R: frvX-F 5'-AAA TGA GAA TGA AAA TGA GTG AT-3', frvX-R 5'-TTT ATT GAA ATA AAA TTT CGT TA-3'。引物由上海捷瑞生物工程技术服务有限公司合成。

FrvX 基因的 PCR 扩增反应体系为 25 μ L: 10 $\times$ PCR buffer 2.5 μ L、MgCl₂ (25 mmol/L) 2 μ L、dNTP (2.5 mmol/L) 2 μ L、上下游引物 (10 μ mol/L) 各 2 μ L、*Taq* DNA 聚合酶 (5 U/ μ L) 0.2 μ L、模板 DNA 2 μ L,补充灭菌去离子水至 25 μ L。反应条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94 $^{\circ}$ C 1 min,50 $^{\circ}$ C 2 min,72 $^{\circ}$ C 2 min,共 30 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。取 PCR 产物,在 10 g/L 琼脂糖凝胶上用 1 $\times$ TAE 缓冲体系中电泳后,用 EB 溶液染色,切割目的片段凝胶带,参照凝胶回收试剂盒说明书进行纯化。上述试验以健康小麦植株总 DNA 和无菌双蒸水为阴性对照。

将纯化的 PCR 产物连接到 pMD18-T simple 载体上,然后将连接产物转化到 *E. coli* JM109 感受态细胞中,经 PCR 鉴定,筛选出含有目标外源片段的重组克隆,将其送上海英俊生物技术有限公司进行序列测定。利用 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 中的 ORF finder 软件找出该基因的最大开放读码框,并推导其编码的氨基酸序列。

1.4 *FrvX* 基因 PVX 侵染性载体的构建

根据已获得的 *FrvX* 全长序列,精确设计加有 *Cla* I 和 *Sal* I 酶切位点的引物对 frvX-C/frvX-S: frvX-C: 5'-CC ATC GAT ATG AGA ATG AAA ATG AGT G-3'(下划线部分为 *Cla* I 酶切位点), frvX-S: 5'-ACGC GTC GAC TTA TTG AAA TAA AAT-3'(下划线部分为 *Sal* I 酶切位点),进行 PCR 扩增。PCR 反应体系和程序同 1.3。取 PCR 产物,经 *Cla* I 和 *Sal* I 双酶切后,与经过相同酶切处理的 pgR107 载体于 16 $^{\circ}$ C 条件下用 T4 DNA 连接酶连接,得到重组质粒 pgR107-FrvX。将重组质粒 pgR107-FrvX 转化 *E. coli* JM109,用卡那霉素和四环素筛选出阳性克隆,按照 1.3 节中的反应程序进行 PCR 鉴定和双酶切验证。

1.5 农杆菌转化烟草

用电激法将重组质粒 pgR107-FrvX 转化农杆

菌 GV3101 感受态细胞,进而筛选出重组子。选取生长至 5~6 叶期的本氏烟幼苗,接种重组质粒,以空载体为对照,具体操作为:将转化有重组病毒质粒的农杆菌在 LB 培养基(含 50 mg/L Genta、50 mg/L Rif、5 mg/L Tet 和 50 mg/L Kan, 10 mmol/L 2-N-吗啉基乙磺酸(MES)和 20 μ mol/L 乙酰丁香酮(As))中,于 28 $^{\circ}$ C 过夜振荡培养,之后按体积比 1:50 的比例扩大培养。在培养物 OD₆₀₀ 约为 1.0 时,4 $^{\circ}$ C、4 000 r/min 离心 10 min,收集农杆菌,加入等体积诱导缓冲液(10 mmol/L MgCl₂、10 mmol/L MES,100 μ mol/L As)重悬菌体沉淀。将农杆菌悬浮液在室温下静置 2~3 h 后,用 1 mL 无针头无菌注射器将其压入烟草幼苗叶脉中,接种除子叶外的所有叶片,共接种 20 株。接种后,植物在培养箱中(22 $^{\circ}$ C、空气湿度 75%、黑暗)培养 2 d,转入人工气候室培养,分别于接种后 7,15,22 d 观察接种植株表型的变化,统计发病株数。分别取接种重组质粒和未接种的烟草 1 g,提取总 RNA 进行 RT-PCR 检测。

2 结果与分析

2.1 *FruX* 基因的 PCR 扩增与测序

利用引物对 frvX-F/frvX-R 对小麦蓝矮病病株总 DNA 进行 PCR 扩增,结果表明,在感病小麦和阳性对照中均扩增到约 1 100 bp 的特异性条带,而健康小麦植株和双蒸水均未出现特异扩增带(图 1)。

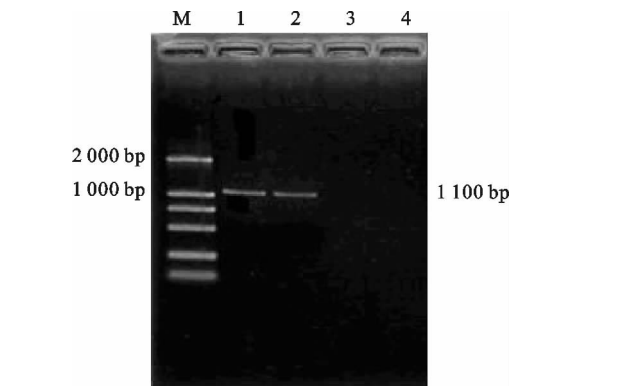


图 1 小麦蓝矮病植原体 *FruX* 基因的 PCR 扩增结果
M, DNA Marker DL-2000;1. 小麦蓝矮病植原体;
2. 泡桐丛枝植原体;3. 健康小麦;4. 无菌双蒸水
Fig.1 PCR amplification of *FruX* gene from WBD
M, DNA Marker DL-2000;1. WBD;2. PaWB;
3. Healthy wheat;4. ddH₂O

测序结果表明,WBD 的 *FruX* 基因扩增片段全长为 1 071 bp,G+C 含量为 36.4%(GenBank 登录

号为 FJ866635)。应用 [http://www. ncbi. nlm. nih. gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) 中的 ORF finder 软件对测定的核苷酸序列进行翻译,结果表明该基因共编码 356 个氨基酸,产物即是 β -1,4-内切葡聚糖酶。

2.2 *FruX* 基因侵染性载体的构建

提取已构建成功的 pgR107-FrvX 重组质粒,经 *Cla* I 和 *Sal* I 双酶切鉴定,酶切产生了长约 1 071 bp 的目的片段及 pgR107 载体片段(图 2),说明侵染性载体构建成功。

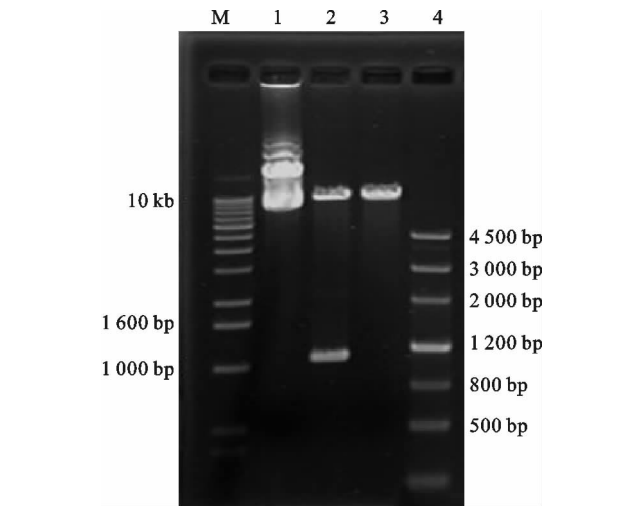


图 2 重组质粒 pgR107-FrvX 的双酶切鉴定
M, 1 kb ladder;1. pgR107-FrvX 重组质粒;2. *Cla* I 和 *Sal* I 双酶切的 pgR107-FrvX 质粒;3. PVX 空载体;4. Marker III
Fig.2 Characterization of pgR107-FrvX plasmid by restriction enzyme
M, 1 kb ladder;1. pgR107-FrvX plasmid;2. pgR107-FrvX digested by *Cla* I and *Sal* I ;3. PVX vector; 4. Marker III

2.3 烟草转化植株的表型分析

由表 1 可见,7 d 时,接种 pgR107 空质粒的烟草有 12 株出现病毒积累症状,但 22 d 时病症并未发展,生长正常;注射有重组质粒的 20 株烟草有 13 株的注射部位开始出现轻微黄化、皱缩现象,表明农杆菌已侵染成功,22 d 时,已表现黄化的 13 株烟草中有 9 株出现严重花叶、黄化(图 3A);未接种的烟草植株生长正常(图 3B)。在第 7 和第 22 天,采集注射重组质粒的烟草叶样,提取总 RNA 进行 RT-PCR 检测,结果显示,9 株表现严重花叶的烟草均可扩增出长 1 071 bp 的条带,而接种空载体的烟草及健康烟草均未扩增出目的条带。由表 1 可知,农杆菌介导的 *FruX* 可以引起 45% 的烟草发病,推测分泌蛋白 FrvX 可能与植原体病害发病有关。

表 1 重组质粒接种烟草的发病情况

Table 1 Incidence of different plasmid infected tobacco

质粒 Plasmid	接种烟草总数 The total number of inoculated plants	发病情况 Incidence of tobacco		
		7 d	15 d	22 d
pgR107	20	12(60%)	0(0)	0(0)
pgR107-FrvX	20	13(65%)	9(45%)	9(45%)

注:括号中的数据为发病烟草占接种烟草总数的百分率。
Note:The data in brackets were the percentage of infected tobacco account for total number of inoculated plants.

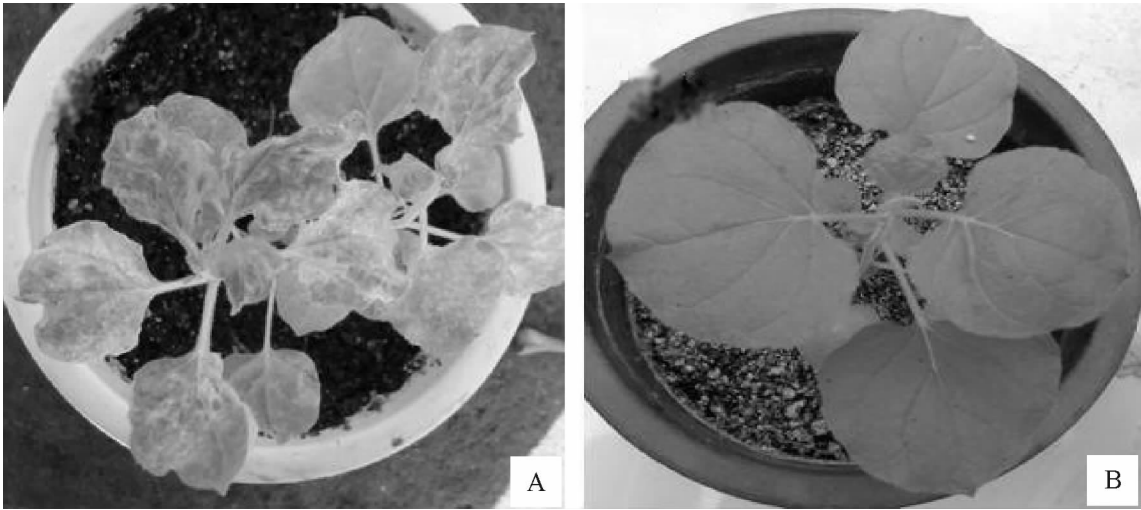


图 3 重组病毒载体侵染前后烟草的表型

A. 接种重组病毒 22 d 后的烟草;B. 正常生长的植株

Fig. 3 Phenotype of tobacco plants after pgR107-FrvX and pgR107 infection

A. The tobacco at age of 22 days after infected with recombinant plasmid;B. The normal plant

3 讨 论

植原体病害能感染 700 多种植物,严重影响作物的产量和质量,但由于植原体不能在体外进行人工培养,所以对植原体病害的防治研究进展缓慢,其致病机理、代谢机制、致病基因的筛选鉴定等方面的研究也受到极大阻碍。近年来,利用病毒载体在植物中表达外源基因的方法能真实反映植物体内的基因表达模式,快速检测到表达产物的功能,与传统的转基因相比,具有易操作、周期短、表达效率高^[11]等优点。

本研究将小麦蓝矮病植原体的 *FrvX* 基因整合进双元表达载体 pgR107 中,转化农杆菌后注射烟草叶片,进行瞬时表达^[12],RT-PCR 检测到了目的基因的表达。

本研究发现,利用农杆菌介导 pgR107-FrvX 能引起 45%的寄主叶片感染发生皱缩、黄化等症状,对烟草的生长具有致病性,初步推测 *FrvX* 是植原体的一个致病相关基因。 β -1,4-内切葡聚糖酶的作用主要是通过破坏 β -1,4-糖苷键降解纤维素,引起

植物细胞形态和功能上的变化^[13],从而使植原体在细胞间更易移动,这可能是植原体致病的主要原因。为了进一步确定该基因在小麦蓝矮病植原体致病过程中的作用,下一步的研究将进行体外定点突变试验,从而筛选出该基因的活性位点。

[参考文献]

[1] 顾沛雯,安凤秋,吴云锋,等. 小麦蓝矮病植原体 16S rDNA 基因片段的比较分析 [J]. 植物病理学报,2005,35(5):403-411.
Gu P W, An F Q, Wu Y F, et al. Comparition and analysis of 16S rDNA fragment of phytoplasma of wheat blue dwarf [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2005, 35(5): 403-411. (in Chinese)
[2] 安凤秋,顾沛雯,吴云锋,等. 小麦蓝矮病植原体延伸因子(EF-TU)*tuf* 基因序列的同源性分析 [J]. 中国农业科学,2006,39(1):74-80.
An F Q, Gu P W, Wu Y F, et al. Homologic analysis of *tuf* gene for elongation factor Tuf of phytoplasma from wheat blue dwarf [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2006, 39(1): 74-80. (in Chinese)