

DOI: 10.3969/j.issn.1000-3142.2013.02.007

党峰峰 林金辉 陈成聪 等. 过量表达水杨酸羟基酶 *NahG* 降低烟草对青枯菌的抗性[J]. 广西植物 2013, 33(2): 177–180

Dang FF, Lin JH, Chen CC, et al. Overexpression of salicylate hydroxylase *NahG* declines resistance to *Ralstonia solanacearum* infection in tobacco [J]. *Guihaia* 2013, 33(2): 177–180

过量表达水杨酸羟基酶 *NahG* 降低烟草对青枯菌的抗性

党峰峰¹, 林金辉¹, 陈成聪¹, 陈永萍³, 官德义², 何水林^{1, 2*}

(1. 福建农林大学 生命科学学院, 福州 35002; 2. 福建农林大学 作物遗传改良和综合利用教育部重点实验室, 福州 35002; 3. 福建农林大学 园艺学院, 福州 35002)

摘要: 研究构建了 pMDC32-*NahG* 植物表达载体, 并获得了其超表达的转基因烟草 T1 代株系。结果表明: 这些株系与其野生型植株没有明显表型差异, 但却表现出较野生型植株更敏感的青枯菌侵染抗性。同时, 研究还发现 *NahG* 的超表达还显著提高了茉莉酸(JA)-依赖的基因 *NtPR1-b* 的表达, 降低了(SA)-依赖的相关基因 *NtPR3* 和 *NtPRQ* 的表达。这表明 SA 累积的缺陷降低了烟草对青枯菌侵染的抗性。

关键词: 水杨酸; *NahG*; 青枯菌

中图分类号: Q943.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2013)02-0177-04

* Overexpression of salicylate hydroxylase *NahG* declines resistance to *Ralstonia solanacearum* infection in tobacco

DANG Feng-Feng¹, LIN Jin-Hui¹, CHEN Cheng-Cong¹,
CHEN Yong-Ping³, GUAN De-Yi², HE Shui-Lin^{1, 2*}

(1. College of Life Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 2. National Education Minister Key laboratory of Crop Genetic Improvement and Comprehensive Utilization, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 3. College of Horticulture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: Studies showed that the plant expression vector of pMDC32-*NahG* was constructed in tobacco K326, and obtained *NahG*-OE T1 lines. Comparing to wild type K326, *NahG*-OE lines did not exhibit any phenotypic difference but exhibited higher susceptibility to *Ralstonia solanacearum* inoculation. Meanwhile, it was found to be coupled with up-regulated expression of JA-dependent *NtPR1-b* and down-regulated expression of SA-dependent *NtPR3* and *NtPRQ*. Results suggested that SA-degrading *NahG* tobacco plants declined resistance to *R. solanacearum* infection.

Key words: salicylic acid; *NahG*; *Ralstonia solanacearum*

植物生长和发育过程中经常会遭受各种病原微生物的入侵, 由于植物缺乏像动物那样的逃避机制

与免疫细胞(Dangl & Jones, 2001; Ausubel, 2005), 在长期进化过程中形成了精细复杂的天然免疫系统

* 收稿日期: 2012-10-20 修回日期: 2012-12-09

基金项目: 国家自然科学基金(30971718); 国家高等教育博士研究基因重大专项(20093535110004); 转基因重大专项(2009ZX08001-015B); 福建省自然科学基金(2008J049)

作者简介: 党峰峰(1986-) 男, 陕西富平人, 硕士研究生, 研究方向为植物基因表达与调控 (E-mail) cenascdfist@163.com。

通讯作者: 何水林, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为植物生物技术与分子生物学 (E-mail) shllhe2007@yahoo.com.cn。

(Jones & Dangl 2006; Chisholm *et al.* 2006)。植株激素在病原菌防御应答过程中扮演了重要角色(Pieterse *et al.* 2009),尤其是水杨酸(SA(Dempsey *et al.* 1999),诱导植物产生系统获得性抗性的关键信号分子之一(Gaffney *et al.* 1993)。通过调控SA信号途径相关的防御应答(Malamy & Klessig 1992),抵抗各种病原微生物的入侵(Alvarez 2000)。相反,在拟南芥和烟草中,通过异源表达假单胞菌(*Pseudomonas*)水杨酸羟基酶(salicylate hydroxylase *NahG*)基因,抑制了水杨酸的累积,证实了SA累积的缺陷降低了植株对病原微生物入侵的抗性(Gaffney *et al.* 1993, Bi *et al.* 1995, Friedrich *et al.* 1995)。

烟草是一种重要的经济作物和典型的忌连作茄科植物,我国南方烟草生产常因频繁发生青枯病等土传性病害而经常导致严重的经济损失(Hayward 1997)。目前解决烟草等作物青枯病的主要手段是抗病育种,烟草抗病育种具有周期长,抗性丧失快等缺点(Granda 1975)。研究烟草抗病分子机制,在此基础上探索新的抗病策略将在解决烟草等茄科作物抗病问题中发挥重要的作用。鉴于此,本研究在获得假单胞菌*NahG*基因的基础上,研究了该基因过量表达对烟草青枯菌侵染的抗性,为进一步剖析烟草功能基因在防御应答青枯菌侵染过程中的分子机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 植物生长与环境

烟草(K326),由福建农林大学何水林教授提供,对于青枯菌菌株FJC100301敏感,栽培于温室。K326和过量表达*NahG*(*NahG*-OE)的T1代种子经过75%乙醇30 s,10%的过氧化氢10 min,无菌水清洗5次,播种于含有75 mg·L⁻¹的Kan的MS培养基上14~21 d。生长一致K326和*NahG*-OE株系幼苗移栽于无菌的营养基质中(泥炭土:土:珍珠岩=2:1:1, *v*:*v*:*v*) 14~21 d。之后大小一致的K326和*NahG*-OE株系小苗移栽于无菌的营养基质中21~28 d。温室条件:温度为(25±2)℃,光照强度为1 500~2 000 lx,相对湿度为70%,16 h-light/8 h-dark周期。

1.2 青枯菌培养与接种

青枯菌菌株FJC100301分离于福建省福清发病

的辣椒植株,参照Kelman(1954)描述方法进行。青枯菌的培养及抗病性接种鉴定参照Minkyun Kim描述方法进行(Jung *et al.* 2007)。

1.3 *NahG* 过量表达植株的构建

通过gateway克隆技术(Invitrogen, USA)将*NahG*全长的cDNA克隆于含有CaMV35S启动子的pMDC32植物表达载体中,形成的pMDC32-*NahG*载体并导入农杆菌菌株LBA105中(Oh *et al.* 2005),进一步通过农杆菌介导的遗传转化法进行烟草K326的遗传转化。T0代植株通过卡那霉素抗性进行筛选,最后5个株系通过卡那霉素基因特异性引物进行PCR验证。

1.4 实时荧光定量PCR

根据Applied Biosystems 7500 Real-time PCR和SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II(Perfect Real Time)指导说明进行靶标基因(引物见表1)相对表达量分析。K326和*NahG*-OE株系的RNA的分离与cDNA的合成分别通过TRIzol(Invitrogen[™], Carlsbad, CA)和PrimeScript[™] RT-PCR kit 10 μL反应体系用于靶标基因和内参基因的扩增,反应条件均为:95℃ 30 s; 95℃ 5 s, 60℃ 34 s, 40循环; 95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 95℃ 15 s, 60℃ 15 s。数据分析采用Livak方法(Livak & Schmittgen 2001),即K326和*NahG*-OE株系靶标基因的相对表达水平通过2^{-ΔΔCT}进行分析。

1.5 K326 和 *NahG*-OE 株系植株的抗病性鉴定

K326和*NahG*-OE株系植株的抗病性鉴定采用针注方法从盆栽烟株顶芽下第3伸长叶叶背的叶脉,用针(4号针头)将菌液注射到叶片细胞间隙,病情病级和抗性标准均参照Minkyun Kim方法进行(Jung *et al.* 2007)。

2 结果与分析

2.1 *NahG* 过量表达载体的构建与遗传转化

*NahG*基因全长cDNA从南开大学蔡宝立教授友情提供含有*NahG*基因的原核表达载体上克隆得到,进一步经过gateway技术构建pMDC32-*NahG*植物表达载体(图1:A)。通过农杆菌介导的烟草叶盘法转化方法,获得了转基因烟草T0代植株,收获种子并对种子进行卡那霉素浸种处理,所获得的植株构成T1代株系5个(图1:B),并未发现*NahG*-OE与K326存在任何表型差异。

表 1 研究主要应用的引物
Table 1 Main primers for PCR used in this study

Gene	Accession No.	Left primer(5' to 3')	Right primer(5' to 3')	bp
<i>NtPR1-b</i>	M60460	TGATGCCCTTTTGGATTCTATG	AGTTCCTGCCCGCGCTTT	175
<i>NtACS1</i>	X65982	CATTAGCGAGGATTTCGGAGTT	GTGGTGAATG AGGGATAGGA GA	180
<i>Ntacc deaminase</i>	Z46349.1	TCTGAGGTTACTGATTGCGATTGG	TGGACATGCTGGATAGTTGCT	264
<i>NtPR3</i>	X51425	CAGGAGGTTATTGCTTTGTTAGG	CGTGGGAAGATGGCTTGTTC TC	222
<i>NtPRQ</i>	M29868.1	ACCACAGGACAACAAGCCATCT	ATCTTCCACTGCGTCATTCCGT	163
<i>NtEF1α</i>	D63396	TGCTGCTGTAACAAGATGGATGC	GAGATGGGGA CAAAGGGGATT	134

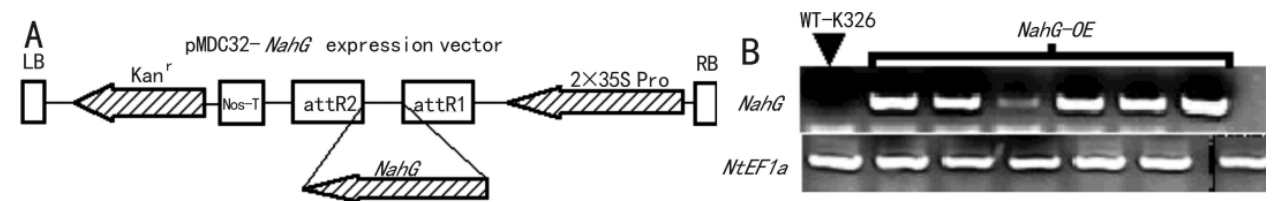


图 1 烟草中水杨酸羟基酶 *NahG* 过量表达 A. 过量表达 *NahG* 植物表达载体构建模式图 LB, RB, T-DNA 左端和右端; attR1, attR2. Gateway 克隆技术重组位点; 2×35SPro. 2 个拷贝花椰菜花叶病毒 35S 启动子; Nos-T. 终止密码子; Kanr. 卡那霉素抗性基因。B. RT-PCR 分析了卡那霉素抗性基因表达水平在 5 个过量表达 *NahG* T1 转基因株系和野生型 K326 植株, *NtEF1-α* 作为内对照。
Fig. 1 Overexpression of salicylate hydroxylase *NahG* in tobacco A. Schematic representation of the pMDC32-*NahG* constructs LB, RB, left and right borders of the T-DNA; attR1 attR2, recombination sites for Gateway cloning; 2×35SPro, two copies of the Cauliflower Mosaic Virus 35S promoter; Nos-T, nos-terminator; Kanr, Kanamycin resistance gene. B. RT-PCR analysis *NahG* gene transcript levels in five *NahG*-OE lines and wild-type tobacco plants, *NtEF1-α* served as endogenous control.

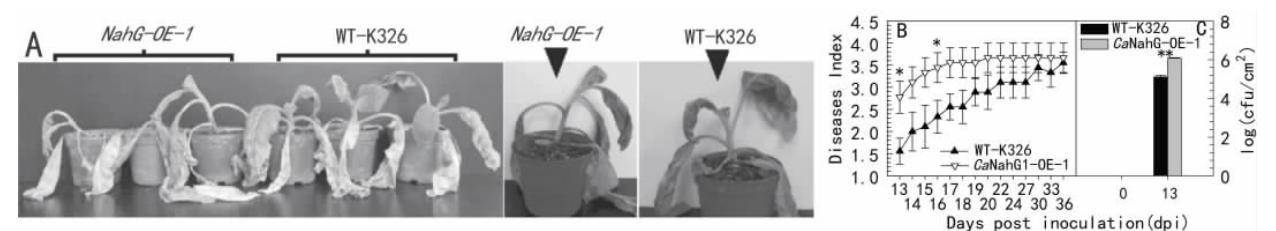


图 2 过量表达 *NahG* 增强烟草植株对青枯菌的抗性 A. 7 周大的 *NahG*-OE 株系和 K326 植株进行青枯菌抗性分析, 采用叶脉注射, 每株注射 10 μ L 108 cfu/mL (OD=0.8), 接种后 13 d 拍照。B. 病情指数统计分析, 范围 0~4: 0(植株健康) 1(1~25% 枯萎) 2(26%~50% 枯萎) 3(51%~75% 枯萎) 4(76%~100% 枯萎或者死亡)。C. 接种后 13 d 统计分析 *NahG*-OE 和 K326 植株进行青枯菌生长情况。数值来源于三个生物学重复平均 cfu(菌落形成单位)。误差线代表标准误, Student-Newman-Keuls 检验, 星号用来表示显著性差异(* $P<0.05$; ** $P<0.01$)。
Fig. 2 Overexpressing *NahG* enhances the resistance of tobacco plants to *R. solanacearum* A. Seven-week-old plants of the representative transgenic *NahG*-OE line and its parental wild type line(WT-K326) 13 days after inoculation of their third leaves with 10 μ L suspension of 10^8 colony forming units(cfu) mL^{-1} of the highly virulent *R. solanacearum* strain FJC100301. B. *R. solanacearum*-inoculated plants score using a disease index ranging from 0 to 4: 0(no wilting) 1(1 to 25% wilted) 2(26 to 50% wilted) 3(51 to 75% wilted) , and 4(76 to 100% wilted or dead) . Averages presented are based on three biological replicates each comprising five plants. C. *R. solanacearum* growth in third leaves of wild type(WT-K326) and *NahG*-OE tobacco plants 0 and 13 days post-inoculation(dpi) . Values presented are average cfu based on three biological replicates each comprising three plants. Error bars indicate the standard error. A sterisk indicates a significant difference(SNK-test, * $P<0.05$ or ** $P<0.01$) .

2.2 过量表达 *NahG* 增强了烟草对青枯菌的敏感性

采用高致病性青枯菌菌株 FJC100301, 随机挑选 3 个株系的植株进行抗病性鉴定, 13 d 后开始观察统计发病程度。结果表明, 与野生型 K326 相比, 3 个 *NahG*-OE 株系均展现了较高的青枯菌敏感性。一个典型的株系 *NahG*-OE-1 用于记录与详细抗性分析。在接种后 13 d(13 dpi, days post inoculation) ,

NahG-OE-1 株系发生了相当严重的烟草青枯病, 而野生型 K326 仅仅发生中度的烟草青枯病(图 2: A)。在接种后 13 d 和 18 d 病情指数分析发现野生型 K326 烟草青枯病病情程度仅为 *NahG*-OE-1 株系的 71% 和 82%(图 2: B) , 而在 *NahG*-OE-1 株系植株中青枯菌的扩增速度显著性高于在野生型 K326 植株中(图 2: C)。可见, 过量表达 *NahG* 增强了烟

草对青枯菌的敏感性。

2.3 过量表达 *NahG* 对防御相关基因表达的影响

为了进一步验证上述抗病表型分析结果,进一步分析了 *NahG* 超表达对防御反应相关基因的表达的影响。结果表明, *NahG* 过量表达显著上调了茉莉酸(JA)依赖的 *NtPR1-b* 基因转录水平。相反的,下调了水杨酸(SA)依赖的 *NtPR3* 和 *NtPRQ*(图3)防御相关基因的表达水平。

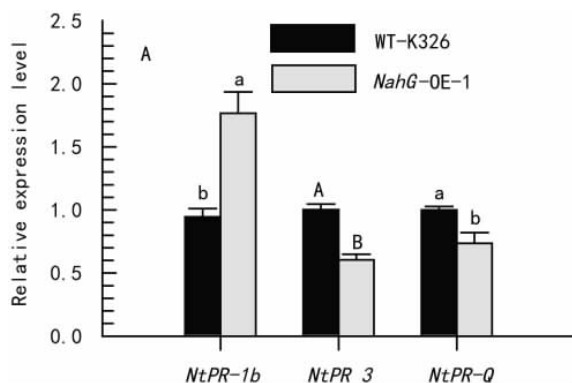


图3 *NahG*-OE-1 和 WT-K326 植株中防御相关基因组成型表达 A. QRT-PCR 分析了防御相关基因相对表达水平在 *NahG*-OE-1 和 WT-K326 植株中。WT-K326 中防御相关基因的表达水平作为对照,表达水平设为“1”。误差线代表标准误差,Student-Newman-Keuls 检验,不同字母用来表示显著性差异(小写字母不同代表 $P < 0.05$; 大写字母不同代表 $P < 0.01$)。Fig. 3 Constitutive expression of defense markers in *NahG*-OE-1 or WT-K326 tobacco A. QRT-PCR analysis of relative transcript levels of tobacco defense marker genes in *NahG*-OE-1 tobacco or wild type(WT-K326) plants. Defense-related genes transcript contents of WT-K326 are used as control, which is set to 1. Error bars indicate the standard error. Different letters indicate significant difference as determined by Student-Newman-Keuls Test (lowercase difference $P < 0.05$; uppercase difference $P < 0.01$).

3 讨论

到目前为止,研究表明 SA 信号途径在植物防御应答过程中具有重要的作用。在 SA 信号途径介导的各种抗性中,研究主要集中在假单胞菌等的模式菌株与模式作物拟南芥和水稻。青枯菌,土传性植物病害,严重威胁到我国南方烟草等茄科作物的生长。为进一步探索 SA 信号途径在烟草功能基因,如 WRKY, NAC, ERF 等转录因子正或者负调控的青枯菌侵染过程中的作用。在本研究中,构建了 SA 累积缺陷的 *NahG* 超表达烟草植株,结果表明显著降低了对青枯菌侵染的抗性。而且, *NahG* 超表达烟草植株在降低对青枯菌抗性的同时与 SA 依赖

的防御相关基因的下调相关。研究发现, SA 累积的缺陷降低了 SA-依赖的相关基因的转录水平,但同时增强了 JA-依赖相关基因的转录水平。这些结果与前人关于报道的 SA 和 JA 信号途径之间 crosstalk 结果一致。

研究表明,在过量表达水杨酸羟基酶 *NahG* 的植株中,降低了对各种病原微生物入侵的抗性。但在烟草等茄科作物防御青枯菌侵染过程中 *NahG* 基因作用鲜有报道。青枯病是一种重要的茄科植物病害,在高温高湿下发病危害严重。本研究发现 *NahG* 的超表达可显著提高转基因烟草对青枯病的敏感性,表明了 SA 累积在烟草等茄科植物对青枯菌抗性中具有重要作用,因此深度剖析 SA 信号途径在烟草等茄科植物防御青枯菌侵染过程中的作用机制,为进一步提高其对青枯菌抗性具有重要的研究价值。

致谢 非常感谢南开大学蔡宝立教授友情提供含有 *NahG* 基因的原核表达载体,福建农林大学方树民教授在青枯病病株样本收集过程中的友情帮助。

参考文献:

- Alvarez ME. 2000. Salicylic acid in the machinery of hypersensitive cell death and disease resistance [J]. *Plant Mol Biol* **44**: 429–442
- Ausubel FM. 2005. Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved [J]. *Nat Imm* **6**: 973–979
- Bi YM, Jenton P, Mur L, et al. 1995. Hydrogen peroxide does not function downstream of salicylic acid in the induction of PR protein expression [J]. *Plant J* **8**: 235–245
- Chisholm ST, Coaker G, Day B, et al. 2006. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response [J]. *Cell* **124**: 803–814
- Dangl JL, Jones JD. 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection [J]. *Nature* **411**: 826–833
- Dempsey D, Shah J, Klessig DF. 1999. Salicylic acid and disease resistance in plants [J]. *Crit Rev Plant Sci* **18**: 547–575
- Friedrich L, Vernooij B, Gaffney T, et al. 1995. Characterization of tobacco plants expressing a bacterial salicylate hydroxylase gene [J]. *Plant Mol Biol* **29**: 959–968
- Gaffney T, Friedrich L, Vernooij B, et al. 1993. Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance [J]. *Science* **261**: 754
- Granda G. 1975. Characteristics of Colombian isolates of *Pseudomonas solanacearum* from tobacco [J]. *Phytopathology* **65**: 1004–1009
- Hayward A. 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt (下转第 198 页 Continue on page 198)

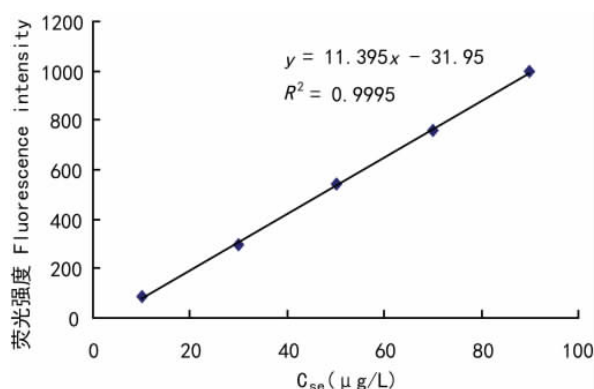


图3 硒标准曲线

Fig.3 Selenium standard curve

桉树躯干	Se	1.21	1.00	2.13	92.16	1.43
桉树根	Se	1.17	1.00	2.14	97.14	0.92

3 结论

本实验测定了桉树各部位的硒含量,加标回收率在92%~99%之间。结果表明,桉树中硒主要集中在躯干和树根部分,少量存在于树皮和树叶中。在探究掩蔽剂的实验中,得出铁氰化钾、聚环氧琥珀酸和酒石酸有较好的掩蔽效果,乙二胺的效果最差。

参考文献:

- Arthur JR, McKenzie R, Checkett GJ. 2003. Selenium in the immune system[J]. *J Nut* **133**(5): 1457-1459
- Chen YY(陈月圆), Lu FL(卢凤来), Li DP(李典鹏). 2010. Analysis of volatile constituents of different types of *Eucalyptus* leaf by GC-MS(不同品种桉树挥发性成分的GC-MS分析)[J]. *Guihaia*(广西植物) **30**(6): 895-898
- Feng WJ(冯文健), Chen SX(陈少雄). 2001. The food and medical value of *Eucalyptus*(桉树的食物和药用价值)[J]. *Eucalypt Sci & Technol*(桉树科技) **3**(2): 11-13
- Gao YX(高愈希), Wang ZJ(王子健), Leng CH(冷春华). 2001. Determination of trace selenium in environmental waters after microwave digestion and fluorometric determination with 2,3-diamino-naphthalene(利用微波消解和高效液相色谱荧光检测法测定环境水中痕量硒)[J]. *Chin J Analy Chem*(分析化学研究报告) **29**(6): 629-632
- Hu XR(胡晓荣), Wang LX(王丽鑫), Xu PY(徐培渝), et al. 2004. The toxic interaction of mercuric chloride and sodium selenite to rats(氯化汞和亚硒酸钠对大鼠的毒性相互作用)[J]. *Chem Res & Appl*(化学研究与应用) **16**(3): 317-319
- Luo LG(罗连光), Tian C(田昌), Liu CH(刘朝晖). 2010. Effects of Se-nutrients on yield and Se-content of super rice(富硒植物营养素对超级稻产量及稻米硒含量的影响初探)[J]. *Hunan Agric Sci*(湖南农业科学) **1**(5): 70-72
- Shi GY(石贵玉), Chen MM(陈明媚). 2005. Effects of Cr^{6+} and Se on the growth and physiology of rice seedling(铬、硒对水稻幼苗生长和生理的影响)[J]. *Guihaia*(广西植物) **25**(3): 281-284
- Song YF(宋永芳). 1998. Using and prospect of eucalyptus resources in our country(我国桉树资源的利用与展望)[J]. *For Chem Comm*(林业化工通讯) **13**(45): 163-169
- Wang G(王光), Sun J(孙健), Zhang P(张萍). 1995. Determination of trace selenium in foods by atomic absorption spectrophotometry(原子吸收法测定食品中微量硒)[J]. *Chin J Spectr Lab*(光谱实验室) **12**(5): 64-69
- Wang Y(王莹), Tie M(铁梅), Kang PL(康平利), et al. 2009. Comparison of ICP-MS and two other analytical methods for determination of selenium content in cordyceps militaris(ICP-MS等三种测定蛹虫草硒含量方法的比较)[J]. *Spectrosc Spect Anal*(光谱学光谱分析) **29**(3): 815-818
- (上接第180页 Continue from page 180)
- caused by *Pseudomonas solanacearum*[J]. *Ann Rev phytopathol*, **29**(1): 65-87
- Jones JDG, Dangl JL. 2006. The plant immune system[J]. *Nature*, **444**: 323-329
- Jung J, Won SY, Suh SC, et al. 2007. The barley ERF-type transcription factor HvRAF confers enhanced pathogen resistance and salt tolerance in *Arabidopsis*[J]. *Planta* **225**: 575-588
- Kelman A. 1954. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium[J]. *Phytopathology* **44**: 693-695
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2(-\Delta\Delta C_T)$ Method[J]. *Methods* **25**: 402-408
- Malamy J, Klessig DF. 1992. Salicylic acid and plant disease resistance[J]. *Plant J* **2**: 643-654
- Oh SK, Park JM, Joung YH, et al. 2005. A plant EPF-type zinc-finger protein, CaPIF1, involved in defence against pathogens[J]. *Mol Plant Pathol* **6**: 269-285
- Pieterse CMJ, Leon-reyes A, Van Derent S, et al. 2009. Networking by small-molecule hormones in plant immunity[J]. *Nat Chem Biol* **5**: 308-316