

来源于耐旱荒漠植物蛋白 CkND 对棉花黄萎病的抑制作用及其抗旱性研究

李付广^{1*}, 侯玉霞^{2*}, 方鑫², 龚玉梅², 张雪妍¹

(1. 中国农业科学院棉花研究所棉花遗传改良重点开放试验室, 河南安阳 455000;

2. 中国农业大学理学院, 北京 100193)

摘要:利用蛋白组学策略分离了荒漠植物-牛心朴子(*Cynanchum komarovii*)抗病、抗旱功能相关蛋白 CkND。以棉花黄萎病菌为供试菌株,研究了蛋白 CkND 对棉花黄萎病的抑制作用。结果表明:蛋白 CkND 对棉花黄萎病菌菌丝生长及孢子萌发具有较好的抑制作用。离体试验中,100 mg·L⁻¹的蛋白 CkND 对棉花黄萎病菌菌丝生长抑制效果在 24 h、48 h、72 h 分别为 79.53%、83.01%、87.50%,35 mg·L⁻¹的蛋白 CkND 对孢子萌发抑制率为 100%;活体试验中,蛋白 CkND 对棉花黄萎病具有显著的防治效果。另外,本研究将 *CkND* 基因构建到 pCAMBIA1304 表达载体 CaMV35S 启动子下游,将 pCAMBIA1304-*CkND* 通过农杆菌介导转化法转入野生型拟南芥植株中。将 33 个株系的转 pCAMBIA1304-*CkND* 的 T₂ 代拟南芥和 21 株转 pCAMBIA1304 的 T₂ 代拟南芥,同时进行抗旱性试验。结果显示,转 pCAMBIA1304 的 T₂ 代拟南芥 14 个株系枯死,而转 pCAMBIA1304-*CkND* 的 T₂ 代拟南芥有 24 个株系的转基因植株存活,且叶片保持绿色,植株生长良好,根系、须根发达,须根数目明显增多。转 pCAMBIA1304-*CkND* 拟南芥株高增加了 30%,显著提高了植物抗旱性。

关键词:牛心朴子;蛋白 CkND;棉花黄萎病;抗旱性

中图分类号:S435.621 文献标识码:A

文章编号:1002-7807(2009)02-0089-05

Studies on the Inhibition of Plant Derived Protein CkND Against *Verticillium dahliae* and Its Drought Resistance

LI Fu-guang^{1*}, HOU Yu-xia^{2*}, FANG Xin², GONG Yu-mei², ZHANG Xue-yan¹

(1. Key Laboratory of Cotton Genetic Improvement, Cotton Research Institute, Chinese Academy of Agriculture Sciences, Anyang, Henan 455000, China; 2. College of Science, China Agriculture University, Beijing 100193, China)

Abstract: Protein CkND, a novel disease-resistant and drought-resistant protein, was extracted from the roots of *Cynanchum Komarovii* by method of proteomics. In this study, we tested the fungicidal activities and resistance of protein CkND against *Verticillium dahliae*. The results showed that short protein CkND may have a good inhibition on the spore germination and mycelial growth of *Verticillium dahliae*. In vitro test suggested that 100 mg·L⁻¹ of protein CkND on mycelial growth at 24 h, 48 h, 72 h was 79.53%, 83.01% and 87.50%, respectively, and 35 mg·L⁻¹ of protein CkND on spore germination of *Verticillium dahliae* was 100%. In vivo test showed that protein CkND had good inhibitory effects against *Verticillium dahliae*. In addition, the *CkND* gene was constructed into the downstream of the CaMV35S promoter of the pCAMBIA1304 expression vector and transfer of

收稿日期: 2009-02-28

作者简介:李付广(1966-),男,研究员,博士;*共同第一作者,通讯作者:lifug@cricaas.com.cn, houyuxia@tsinghua.org.cn

基金项目:国家“863”计划项目(2006AA100105)

pCAMBIA1304-*CkND* was transferred into *Arabidopsis thaliana* mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. We take 33 pCAMBIA1304-*CkND* T₂ transgenic plants and 21 pCAMBIA1304 T₂ transgenic plants into drought-resistant experiments at the same time. The results showed that 14 of the pCAMBIA1304 T₂ transgenic plants died, but 24 pCAMBIA1304-*CkND* T₂ transgenic plants survived. The leaves kept green, the plant grew well, roots and fibrous roots developed strongly, and the number of fibrous roots increased obviously. The drought-resistant of pCAMBIA1304-*CkND* transgenic plants increased 30%, which obviously enhance the drought-tolerance of plants.

Key words: *Cynanchum komarovii*; *CkND* protein; *Verticillium dahliae* Kleb; drought-resistant

目前,我国棉花品种对黄萎病抗病性还达不到高抗水平,在环境条件适宜情况下棉花黄萎病连续流行、危害,已成为严重影响我国棉花高产稳产的主要障碍^[1-3]。另外,由于水资源匮乏,干旱、半干旱地区逐渐扩大,日益严重的干旱问题已成为制约我国棉花生产稳定发展的问题。而且,干旱胁迫对棉花黄萎病病原菌致病力的影响显著,即高温较长时间的选择压力,病原菌的致病力明显提高^[4]。创制抗病、耐旱棉花种质,培育优良抗病、耐旱棉花新品种,是提高干旱和半干旱地区棉花生产的关键,对持续、稳定发展我国棉花生产极其重要。

利用蛋白组学策略分离得到荒漠植物-牛心朴子(*Cynanchum komarovii*)抗病、耐旱功能相关蛋白 *CkND*,以棉花黄萎病菌(*Verticillium dahliae*)为供试菌株进行蛋白 *CkND* 生物活性研究。并且,将 *CkND* 基因通过农杆菌介导转化法转到拟南芥植株中,进行抗旱性研究,为在棉花生产中的应用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 蛋白 *CkND* 及其基因

植物蛋白 *CkND* 是从荒漠抗旱植物-牛心朴子草(*Cynanchum komarovii*)中分离的一种活性蛋白。

CkND 基因利用 RACE-PCR 技术克隆获得。

1.2 供试菌株和棉花品种

供试棉花黄萎菌(*Verticillium dahliae*)为安阳菌系-NY1,由本试验室采自河南安阳郊区棉花大田,经分离、纯化、鉴定后获得。棉花品种为中棉所 45。

1.3 试验仪器

OLYMPUS BX60 多功能显微镜、超净工作台、培养箱、81-2 型恒温磁力搅拌器、DK-S28 型

电热恒温水浴锅、高压灭菌锅、低温超速离心机、-86℃冰箱等。

1.4 蛋白 *CkND* 对棉花黄萎病菌菌丝生长抑制作用^[5-6]

采用生长速率法进行测定。用 PDA 培养基(马铃薯 20 g,葡萄糖 20 g,琼脂 13 g,加蒸馏水至 1000 mL)进行单孢纯化培养,在 25℃ 培养箱中培养 3 d。制备含蛋白 *CkND* 的 PDA 培养基蛋白浓度为 5 mg · L⁻¹、50 mg · L⁻¹、100 mg · L⁻¹。将 5 mm 菌饼菌丝面朝下置于培养基上,设置空白对照(CK),每处理重复 3 次,置于 25℃ 恒温培养,分别在 24 h、48 h、72 h 用十字交叉法测量菌落直径,测量 3 次,记录数据,根据下列公式计算抑制率。

抑制率(%) = (对照菌落直径 - 处理菌落直径) / (对照菌落直径 - 菌饼直径) × 100

1.5 蛋白 *CkND* 对棉花黄萎病菌孢子萌发抑制作用^[5]

在单孢纯化培养的菌落边缘取菌饼,转接于产孢培养基,于 25℃ 恒温培养,诱导孢子产生。用灭菌水将孢子充分稀释,制成 1.0 × 10⁷ · mL⁻¹ 的悬浮液,加入 0.2% 葡萄糖以促进孢子萌发。将蛋白 *CkND* 配制成 5 mg · L⁻¹、15 mg · L⁻¹、25 mg · L⁻¹、35 mg · L⁻¹、45 mg · L⁻¹ 的溶液,分别取 20 μL 孢子悬浮液和 20 μL 的不同浓度的蛋白溶液加到凹玻片中,混合均匀,设置空白对照(CK),每处理重复 3 次,在保湿条件下 25℃ 静置培养,置于 OLYMPUS BX60 多功能显微镜下观察,计算萌发率和抑制率。

孢子萌发率(%) = (萌发孢子总数 / 观察孢子总数) × 100;

抑制率(%) = (对照孢子萌发率 - 处理孢子萌发率) / 对照孢子萌发率 × 100;

孢子畸形率 = 萌发孢子中畸形孢子数 / 萌发孢子总数 × 100%。

1.6 蛋白 CkND 抑制棉花黄萎病菌的致萎活性

采用幼苗浸渍法检测蛋白 CkND 对棉花黄萎病菌的致萎活性。棉花种子经过 2.5% 次氯酸钠表面灭菌 30 min, 无菌水清洗 3 次, 然后播种在含有 MS 无机盐的 0.8% 琼脂培养基上, 置于 25℃ 恒温培养。分别制备 30 mL 含有 5 mg·L⁻¹、50 mg·L⁻¹、100 mg·L⁻¹ 蛋白液。棉花幼苗分别移入盛有 30 mL 蛋白液的培养管中, 加入相同量的病原菌悬浮液后, 置于 25℃ 恒温培养, 每 12 h 观察幼苗的萎蔫情况。以不加蛋白液的病原菌处理为对照(CK), 计算致萎指数, 以致萎指数大小表示蛋白 CkND 抑制棉花黄萎病菌的致萎活性。

棉花幼苗萎蔫分级标准: 0 级: 健康幼苗; 1 级: 子叶下垂, 失水, 真叶无变化; 2 级: 子叶下垂, 黄化, 失水, 真叶轻度下垂, 卷曲; 3 级: 子叶下垂, 黄化, 失水, 真叶下垂, 失水, 枯萎; 4 级: 全株萎蔫, 真叶脱落。

致萎指数 = (各级病株数 × 相对级数值) / (调查总株数 × 4) × 100

1.7 蛋白 CkND 对棉花种子萌发的影响

选取大小一致的健壮棉花种子, 分别在浓度为 5 mg·L⁻¹、50 mg·L⁻¹、100 mg·L⁻¹ 的蛋白 CkND 液中浸种 6 h, 以无菌水为空白对照, 浸种液体积为 5 mL。浸种后, 把种子均匀摆放在铺双层滤纸的 9 cm 培养皿中, 每皿 20 粒种子, 每处理设置 3 个重复, 置于 25℃ 智能光照培养箱中培养。以芽长超过 1/2 种子长为萌发标准, 每 24 h 记录萌发率, 检测棉花种子的萌发率。萌发率 = (处理萌发数 - 对照萌发数) / 对照萌发数 × 100%。

1.8 转 CkND 基因植物抗旱性研究

采用 Floral dip 法转化拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) Columbia 植株, 将转化的拟南芥植株保湿、黑暗过夜, 移入温室继续培养, 收集种子进行筛选。

将 T₀ 代种子平铺于 MS 培养基(含 25 mg·L⁻¹ 潮霉素)上, 4℃ 黑暗条件下春化 3 d, 然后在 22/18℃、16/8 h 光周期条件下培养 10 d。从 MS 培养基(含 25 mg·L⁻¹ 潮霉素)上挑出潮霉素抗性的转 pCAMBIA1304-CkND 拟南芥, 转移到土壤中培养, 收获 T₁ 代种子。将转 pCAMBIA1304-CkND 拟南芥和转 pCAMBIA1304 拟南芥 T₁ 代种子在 MS 选择培养基上筛选出转基因苗, 4℃ 冰箱放置 3 d 后置于正常培养, 10 d 后将转基因苗移至蛭石和草炭土的营养基质中培养, 两个半月后收 T₂ 代种子, 将 T₂ 代转基因种子培育成小苗, 进行抗旱性试验。

将转 pCAMBIA1304-CkND T₂ 代拟南芥和转 pCAMBIA1304 T₂ 代拟南芥, 同时对称地移栽到同一小钵的两侧, 设置 3 个重复。常规管理, 浇水 3 次后停止浇水, 停止浇水后三周复水, 复水 1 周后观察转基因植株。利用在 PEG 胁迫下转基因和未转基因拟南芥种子发芽率, 断水前后拟南芥的存活数、株高等评价其抗旱性。

2 结果与分析

2.1 蛋白 CkND 对棉花黄萎病菌菌丝生长的抑制作用

蛋白 CkND 对棉花黄萎病菌菌丝生长抑制作用显著, 见表 1。蛋白 CkND 的不同处理时间对棉花黄萎病菌菌丝生长的抑制效果不同, 当蛋白浓度为 100 mg·L⁻¹ 时, 菌丝生长抑制率达到 79.53%~87.50%。

2.2 蛋白 CkND 对棉花黄萎病菌孢子萌发的抑制作用

蛋白 CkND 对棉花黄萎病菌孢子萌发的抑制效果达到 100%, 如表 2 所示。研究结果表明, 蛋白 CkND 对棉花黄萎病菌孢子萌发具有致畸作用。尽管蛋白 CkND 在低浓度(5 mg·L⁻¹)引起孢子萌发畸形率为 15.67%, 但是随着蛋白 CkND 浓度的增加, 孢子萌发的畸形率呈现上升趋势, 当蛋白 CkND 浓度为 35 mg·L⁻¹ 时, 孢子畸形率达到 100%。孢子萌发畸形主要表现为, 芽管前端膨大, 芽管前端产生分枝。

不同浓度蛋白 CkND 对棉花黄萎病菌孢子萌发的抑制作用如表 3 所示。当 35 mg·L⁻¹ 蛋白 CkND 处理棉花黄萎病菌孢子时, 孢子萌发抑制率为 100.0%。

2.3 蛋白 CkND 抑制棉花黄萎病菌的致萎活性

采用幼苗浸渍法检测蛋白 CkND 抑制棉花黄萎病菌的致萎活性。研究结果表明, 蛋白 CkND 对棉花黄萎病菌具有显著的防治效果。100 mg·L⁻¹ 的蛋白 CkND 在 24 h 和 36 h 完全抑制了黄萎病菌对棉花的侵染(表 4)。

2.4 蛋白 CkND 对棉花种子萌发的影响

由表 5 看出, 蛋白 CkND 处理对棉花种子萌发具有促进作用, 在蛋白 CkND 处理第 4 天棉花种子萌发率达到最大。蛋白 CkND 浓度为 50 mg·L⁻¹ 时, 棉花种子最大萌发率为 98.5%, 比对照萌发率高 8.5%。

表1 蛋白 CkND 对棉花黄萎病菌菌丝生长的抑制作用

Table 1 Inhibition of CkND protein on mycelia growth of *Verticillium dahliae*

蛋白 CkND 浓度 / (mg · L ⁻¹)	24 h		48 h		72 h	
	菌落直径/mm	抑制率/%	菌落直径/mm	抑制率/%	菌落直径/mm	抑制率/%
CK	24.2±0.05	-	50.9±0.11	-	103.7±0.10	-
5	22.6±0.16	8.33	43.8±0.03	15.47	80.6±0.72	23.40
50	8.7±0.32	80.73	16.2±0.59	75.59	34.3±1.04	70.31
100	7.4±0.21	87.50	12.8±0.03	83.01	25.2±0.83	79.53

表2 蛋白 CkND 对棉花黄萎病菌孢子的致畸作用

Table 2 Teratogenic effects of CkND protein on spores of *Verticillium dahliae*

蛋白 CkND/(mg · L ⁻¹)	孢子畸形率/%
CK	0.00
5	15.67
15	71.33
25	92.67
35	100.0
45	100.0

表3 蛋白 CkND 对棉花黄萎病菌孢子萌发的抑制作用

Table 3 Inhibition of CkND protein on spore germination of *Verticillium dahliae*

蛋白 CkND/(mg · L ⁻¹)	孢子萌发率/%	抑制率/%
CK	89.12	--
5	73.37	17.67
15	25.55	71.33
25	3.07	86.05
35	0	100.0
45	0	100.0

表4 蛋白 CkND 抑制棉花黄萎病菌的致萎活性

Table 4 Inhibition of CkND protein on wilting activities of *Verticillium dahliae*

蛋白 CkND 浓度 / (mg · L ⁻¹)	致萎指数			
	24 h	36 h	48 h	72 h
CK	27.3±0.15	28.5±0.33	56.3±0.77	76.5±0.73
5	16.4±0.91	25.4±0.19	32.2±0.19	58.8±0.69
50	12.8±0.21	22.2±0.21	26.0±0.92	52.4±0.13
100	0	0	11.6±0.85	14.2±0.28

表5 蛋白 CkND 对棉花种子萌发的影响

Table 5 Effect of CkND protein on seed germination of cotton

蛋白 CkND 浓度 / (mg · L ⁻¹)	棉花种子萌发率/%			
	第1天	第2天	第3天	第4天
CK	49.3	66.7	87.0	90.0
5	57.7	70.0	92.0	92.0
50	69.3	83.0	95.7	98.5
100	60.3	71.3	93.0	96.0

2.5 转 CkND 基因植物抗旱性研究

采用 Floral dip 法转化拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 植株。将 pCAMBIA1304-CkND 重组质粒导入农杆菌 GV3101 中, 获得重组菌。用重组菌 GV3101-CkND 在 YEB 固体培养基(含 50 mg · L⁻¹ Rif, 50 mg · L⁻¹ Kna) 上筛选浸染过的拟南芥植株后, 移入温室继续培养, 转基因植株能正常地开花生长, 2~3 周后种夹开始变黄, 收集种子进行筛选。将 T₀ 代种子平铺于 MS 培养基(含 25 mg · L⁻¹ 潮霉素) 上, 在 22/18℃、16/8 h 光周期条件下培养 10 d, 转 pCAMBIA1304-CkND 拟南芥苗大, 根特别长, 且有真叶形成, 而转 pCAM-BIA 1304 拟南芥幼苗小且没有真叶的形成(图 1)。



图1 转基因拟南芥抗性苗的筛选

Fig. 1 Selection of resistant shoots of some transgenic *Arabidopsis thaliana*

转 pCAMBIA1304-CkND 拟南芥和转 pCAMBIA1304 拟南芥 T₁ 代种子在 MS 选择培养基上筛选出转基因苗, 培养 10 d 后将转基因苗

移至蛭石和草炭土的营养基质中培养,收 T₂ 代种子。将 T₂ 代转基因种子培育成小苗,共得到了 33 个株系的转 pCAMBIA1304-CkND T₂ 代拟南芥,21 株系转 pCAMBIA1304 T₂ 代拟南芥,进行耐旱试验。

转 CkND 基因株系和未转基因株系在 PEG 胁迫下的发芽率差异较大。在 PEG 胁迫下,抗旱性强的转基因株系发芽率高,未转基因株系发芽率低,说明在水分胁迫下,转基因拟南芥种子具有很强的抗旱性。

将 33 个株系的转 pCAMBIA1304-CkND T₂ 代拟南芥和 21 株转 pCAMBIA1304 T₂ 代拟南芥进行干旱胁迫。试验结果显示:断水前,转 CkND 基因拟南芥和未转基因拟南芥株高相差不大,说明转 CkND 基因拟南芥和未转基因拟南芥基本处于同一个生育时期。在干旱胁迫下,转 CkND 基因拟南芥比未转基因拟南芥株高增加 30% 以上,说明干旱胁迫下,提高了转 CkND 基因株系水分的利用率,以增强自身的抗旱能力^[7]。

干旱胁迫 3 周以后,转 pCAMBIA1304 T₂ 代拟南芥 14 株枯死,而转 pCAMBIA1304 -CkND T₂ 代拟南芥的 33 个株系中,有 24 个株系的转基因植株存活,且叶片保持绿色,植株生长良好,转基因拟南芥耐旱性提高了 30% 以上((转基因植株实际存活数/转基因植株总数)一干旱胁迫下未转基因植株存活率),转 CkND 基因拟南芥植株对干旱胁迫有着正面效应。

3 小结与讨论

3.1 蛋白 CkND 对棉花黄萎病菌的菌丝生长、孢子萌发有抑制作用,并且对芽管发育存在致畸作用

蛋白 CkND 对棉花黄萎病菌菌丝生长及孢子萌发具有显著影响。当蛋白浓度为 100 mg · L⁻¹ 时,菌丝生长抑制率达到 79.53% ~ 87.50%。蛋白 CkND 对孢子萌发具有较好的抑制作用。当蛋白 CkND 浓度为 35 mg · L⁻¹ 时,孢子畸形率达到 100%,能引起芽管发育畸形,导致芽管不能正常发育^[6]。

3.2 蛋白 CkND 具有促进棉花种子萌发,提高植物抗病、抗旱性的作用

不同浓度的蛋白 CkND 处理棉花种子后,对种子萌发具有不同程度的促进作用。研究结果表明,不同浓度蛋白 CkND 浸种处理棉花种子后,均能不同程度的促进种子萌发,根系的生长,并且处理后的根系须根发达,须根数目明显增多。根

系是植物正常生长发育的重要器官,发达的根系保证了植物在逆境中对水分和矿物质等的需求与吸收,提高了植物的抗病性。

3.3 转 CkND 基因植物抗旱性显著提高

通过对 T₂ 代转 CkND 基因拟南芥的抗旱性试验,转 CkND 基因 T₂ 代拟南芥 33 个株系有 24 个株系的转基因植株存活,且植株生长良好,提高了转基因拟南芥的抗旱性。

参考文献:

- [1] 简桂良,卢美光,仇家山. 棉花黄萎病防治策略[J]. 中国植保导刊, 2004, 24(4): 30-31.
JIAN Gui-liang, Lu Mei-guang, Qiu Jia-shan, et al. The control tactics of *Verticillium Dahliae* in cotton [J]. China Plant Protection, 2004, 24(4): 30-31.
- [2] 简桂良,邹亚飞,马存. 棉花黄萎病连年流行的原因及对策[J]. 中国棉花, 2003, 30(3): 13-14.
JIAN Gui-liang, Zou Ya-fei, Ma Cun. Occurring rules and research into the control measures of *Verticillium Dahliae* in cotton [J]. China Cotton, 2003, 30(3): 13-14.
- [3] 何美仙. 棉花黄萎病的生物防治研究进展[J]. 中国蔬菜, 2004, 5: 29-31.
HE Mei-xian. A Survey of the research on biological prevention and treatment of *Verticillium Dahliae* in cotton [J]. China Vegetables, 2004, 5: 29-31.
- [4] 朱荷琴,宋晓轩,简桂良. 温度胁迫对棉花黄萎病菌致病力的影响[J]. 棉花学报, 2003, 15(1): 33-36.
ZHU He-qin, Song Xiao-xuan, Jian Gui-liang. The effect of temperature stress on pathogenicity of *Verticillium dahliae* Kleb in cotton [J]. Cotton Science, 2003, 15(1): 33-36.
- [5] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 152-154.
FANG Zhong-da. The research method of plant disease [M]. Beijing: China Agriculture Press, 1998: 152-154.
- [6] 孟娜,汤斌,黄晓东,等. 4 种木霉菌对棉花黄萎病菌抑制作用的测定[J]. 生物学杂志, 2007, 24(4): 58-61.
MENG Na, Tang Bin, Huang Xiao-dong, et al. The inhibition of four *Trichoderma* species against *Verticillium dahliae* [J]. Journal of Biology, 2007, 24(4): 58-61.
- [7] SEONG E S, Kwon S S, Ghimire B K, et al. Lebz-IP2 induced by salt and drought stress and transient overexpression by *Agrobacterium* [J]. BMB Repm, 2008, 41(10): 693-701.