

苏云金芽孢杆菌 *aiiA* 基因载体构建及石斛兰转化*

潘丽晶, 张妙彬, 梁擎中, 范干群, 程萍
(珠海市农业科学研究中心, 广东 珠海 519070)

摘要: 细菌性软腐病是石斛兰及其它兰花栽培和生产中的一大危害。苏云金芽孢杆菌 *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) 中含有 *aiiA* 基因, 该基因转入一些植物可赋予植物表现出软腐病抗性。从 *Bt* 菌中克隆出 *aiiA* 基因, 并装载入植物表达载体 pCAMBIA1301, 构建出可用于转入石斛兰的 pSAN 载体; 首次利用根癌农杆菌 EHA105 将 pSAN 载体转入石斛兰, 并获得潮霉素抗性苗。这些抗性苗经 GUS 组织化学染色和 PCR 检测证实为转基因苗, 这将为获得具有软腐病抗性的石斛兰品种打下基础。

关键词: 软腐病; *aiiA* 基因; 载体构建; 根癌农杆菌; 石斛兰转化

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 0529-6579 (2009) 01-0067-05

Construction of Vector Carrying *aiiA* Gene of *Bacillus thuringiensis* and Transformation of *Dendrobium*

PAN Lijing, ZHANG Miaobin, LIANG Qingzhong, FAN Ganqun, CHENG Ping
(Zhuhai Agricultural Science Research Centre, Zhuhai 519070, China)

Abstract: Soft rot disease is a great threat to the cultivation and production of *Dendrobium* and other orchids. *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) contains *aiiA* gene encoding AiiA protein which could enable plants resistance to the soft rot disease. *aiiA* gene was amplified from *Bt* and constructed into the binary vector pCAMBIA1301 to construct the expression vector pSAN. For the first time, the *aiiA* gene was transferred into *Dendrobium* by *Agrobacterium tumefaciens* EHA105. Through 4-month selection cultivation, the hygromycin-resistant shoots regenerated from PLBs. Subjected to GUS assay and PCR analysis, the shoots were proved to be transformed shoots. This research work may contribute to cultivate novel *Dendrobium* species which could resistant to soft rot disease.

Key words: soft rot; *aiiA* gene; vector construction; *Agrobacterium tumefaciens*; *Dendrobium* transformation

石斛属是兰科中最大的属之一, 广泛分布于亚洲热带和亚热带地区至大洋洲。石斛兰因其种类繁多、花姿优美、花色艳丽、花期长, 其中许多种类还带有芳香的气味, 既可盆栽观赏, 又可做成切花装饰, 深受人们喜爱, 具有良好的市场前景。目前, 国际上最具商业价值的几个大属的兰花(包括石斛兰), 普遍存在着病虫害严重、栽培和养护环境苛刻、成花周期长、开花控制难度大、花色花形不丰富等问题^[1]。其中, 病害问题乃是兰花生产者最头痛的问题, 因为目前的兰花主要是在温室

生产, 温室内种植密集, 且常年温暖湿润, 通风不畅, 极利于病虫害繁殖和传播, 管理稍有不慎便会引发兰花病害, 而多数病害一旦发生即对兰株造成永久的贬值, 令生产者蒙受巨大的经济损失。

在石斛兰的各种病害中, 软腐病 (soft rot) 是主要的细菌性病害, 该病菌在兰科中可以危害蝴蝶兰、文心兰、石斛兰、拖鞋兰和狐狸尾兰等, 是目前台湾蝴蝶兰上最普遍最致命的病害之一。软腐病的主要病原菌是欧氏杆菌 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, 欧氏杆菌的毒性基因表达受 N-乙

* 收稿日期: 2008-06-03

基金项目: 广东省科技计划资助项目 (2006B20130004)

作者简介: 潘丽晶 (1976年生), 女, 助理研究员; 通讯作者: 程萍; E-mail: nkpcheng@163.net

酰高丝氨酸内酯 (N-acylhomoserine lactone, AHL) 信号分子的调控。因此, AHL 信号分子为生物防治植物细菌病害提供了新靶点。Dong 等^[2]从芽孢杆菌—亚种 *Bacillus* sp. 240B1 中分离到一个编码 AHL 水解酶类基因 *aiiA* (autoinducer inactivation)。将 *aiiA* 基因导入烟草和马铃薯, 转基因的烟草叶子和马铃薯块茎对 *E. carotovora* 侵染的抗性明显比非转基因的对照组强, 表现为侵染后不出现病斑或显著推迟病斑的出现^[3]。Lee 等^[4]发现 *aiiA* 基因广泛存在于多个苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, *Bt*) 亚种中, 将这些 *aiiA* 基因与 Dong 等人^[3]分离的 *aiiA* 基因进行比对发现, 其核苷酸序列和编码的蛋白序列的相似性分别高达 89% ~ 95% 和 90% ~ 96%, 并且证实, *Bt* 的 *aiiA* 基因同样可降解 AHL 致病信号因子以及降低 *E. carotovora* 致病的活性。2007 年, 柴鑫莉等将来自 *Bt* 经密码子优化的人工合成 *aiiA* 基因导入魔芋, 其 AHL 内酯酶活性检测表明转基因植株魔芋叶片的蛋白可以降解 AHL 信号分子^[5]。周燧^[6]、张霞^[7]也分别证实了 *Bt* 中 *aiiA* 基因的抗软腐病活性。

近来, 转基因技术在植物新品种选育中日益发挥重要作用, 也为石斛兰的品种改良提供新途径。至今, 未见将 *aiiA* 转入石斛兰以及其它兰花品种的相关报道。本研究从苏云金芽孢杆菌 (*Bt*) 中克隆出 *aiiA*, 并将其装载入植物表达载体 pCAMBIA1301 中, 利用根癌农杆菌 EHA105 介导转入石斛兰, 以期培育出具有软腐病抗性的石斛兰品种, 进而为其它兰花品种的软腐病防治提供新的参考和有效途径。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 植物材料 供试验的石斛兰品种为栽培于珠海市农业科学研究中心兰花资源圃的“大熊猫 1 号” (*Dendrobium ekaol* ‘Panda no. 1’), 取其自交种子经无菌萌发的类原球茎 (PLBs) 为转化受体。

1.1.2 菌株及质粒 苏云金芽孢杆菌 Bt-10 为中山大学庞义教授赠送; 质粒载体 pCAMBIA1301 来自 CAMBIA, Canberra, Australia; 大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α 、根癌农杆菌 (EHA105) (具有利福平抗性) 为本室保存。

1.2 方 法

1.2.1 石斛兰类原球茎 (PLBs) 的培养 取石斛兰“大熊猫 1 号”的自交果实经次氯酸钠消毒, 切开果实将种子播种在萌发培养基 (1/2 MS 培

基 + 20 g·L⁻¹蔗糖 + 1 g·L⁻¹活性炭 + 8 g·L⁻¹琼脂粉, pH 5.8) 上, 25 °C、每日光照 16 h 条件下进行无菌培养。一个月后取无菌萌发的类原球茎 (PLBs) 作为菌液侵染受体。

1.2.2 含 *aiiA* 基因的植物表达载体的构建

(1) 引物设计及 PCR

根据 pCAMBIA1301 全序列和 *aiiA* 基因全序列特征, 运用 DNASTAR 软件, 分别设计扩增 CaMV35S 启动子、Nos polyA 片段和 *aiiA* 基因全长读码框的引物。

CaMV35S 启动子: C1: 5'-GAATTCATGGTG-GAGCAGCAGACT-3' (引入的位点: *EcoR* I)

C2: 5'-GGTACCAGAGATAGATTTGTAGAG-3' (引入的位点: *Kpn* I)

Nos polyA: N1: 5'-CTGCAGCGTTCAAACATTT-GGCAATAAA-3' (引入的位点: *Pst* I)

N2: 5'-AAGCTTCCCGATCTAGTAACATAG-3' (引入的位点: *Hind* III)

aiiA 基因: A1: 5'-GGATCCATGACAGTAAA-GAAG-3' (引入的位点: *Bam*H I)

A2: 5'-CTGCAGCTATATATACTCAGG-3' (引入的位点: *Pst* I)

(下划线部分为引入的酶切位点)。引物由 Invitrogen 公司合成。50 μ L PCR 反应体系: 模板 DNA 50 ng, 两种引物各 0.25 μ mol·L⁻¹, Taq 酶 0.5 U, dNTP 200 μ mol·L⁻¹。以 pCAMBIA1301 为模板扩增 CaMV35S 启动子和 Nos polyA 片段, 以 Bt-10 单菌落为模板扩增 *aiiA* 基因, 扩增条件为: 95 °C 变性 5 min, 50 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min。

(2) 载体的构建

转基因载体的构建策略如图 1 所示。质粒提取、酶切, DNA 片段回收、连接、转化等按文献 [8] 的方法略加修改进行。PCR 产物连入 pMD18-T 克隆载体, 连接产物转化 *E. coli* DH5 α , 经序列测定后, 以相应的限制性内切酶酶切, 回收并纯化,

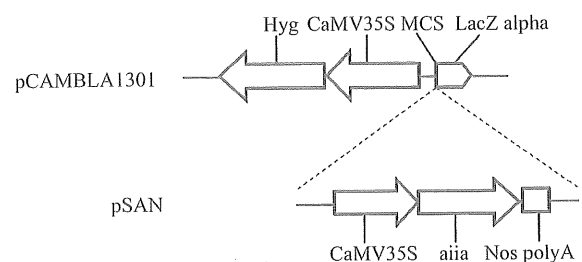


图 1 植物表达质粒 pSAN 的构建

Fig. 1 Construction of recombinant plasmid pSAN

分别连入 pCAMBIA1301, 转化 DH5 α , 得到重组质粒 pSAN。重组质粒经酶切鉴定后, 进一步经 ABI PRISM377 (ersion3.3) 自动分析仪进行测序鉴定。

1.2.3 根癌农杆菌介导的石斛兰转化 参照张妙彬等的方法^[9], 取 100 ~ 200 μL 保存于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱含表达载体 pSAN 的农杆菌 EHA105, 转接到 40 mL 附加利福平和卡那霉素的 YEB 液体培养基中, $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 200 r/min 培养至一定 A_{600} 。取 10 mL 菌液, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 000 r/min 离心 10 min, 收集菌体, 去上清, 用 20 mL 稀释培养基 (1/2 MS 基本培养基 + 20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖, pH 5.5) 重悬菌液。稍切去类原球茎的顶端, 将其浸入农杆菌侵染液中, $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 180 r/min 侵染 30 min。取出 PLBs, 用灭菌滤纸吸干, 转入共培养基 (1/2 MS 基本培养基 + 1.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA + 20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖 + 8 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 琼脂粉 + 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酰丁香酮, pH 5.5), $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 暗培养 5 d。将 PLBs 转到选择培养基 (1/2 MS 基本培养基 + 1.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA + 20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖 + 1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 活性炭 + 8 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 琼脂粉 + 20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 潮霉素 + 250 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 头孢霉素, pH 5.8), $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养, 每日光照 16 h。每隔 20 d 将存活 PLBs 进行转瓶继代培养, 丢弃褐化死亡的 PLBs。

1.2.4 抗性植株的检测 当抗性石斛兰 PLBs 在含潮霉素的选择培养基上筛选 5 ~ 6 个月时已经分化出叶片, 这时可进行转基因植株的检测。

(1) GUS 染色检测: 参照 Jefferson 等^[10] 的 GUS 组织化学染色方法进行染色。取抗性和对照植株的叶片浸于 X-Gluc 染色液中, 于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保温 3 ~ 12 h 后, 用乙醇脱色, 观察蓝色斑点形成情况。

(2) PCR 检测: 采用张妙彬等的改良 CTAB 法 (未发表) 提取抗性石斛兰小苗基因组 DNA, 分别扩增 T-DNA 区域 *aiiA* 基因以及潮霉素抗性基因 (*hpt*) 片段。

hpt 引物: HPT1: 5'-GCTGGGGCGTCCGTTTC-CACTATCCG-3';

HPT2: 5'-CGCATAACAGCGCTCATTGACTGGAGC-3'。

引物 A1 与 A2, PCR 反应体系与反应条件同 1.2.2。反应结束后, 取样 5 μL 在 $w = 1.0\%$ 琼脂糖凝胶上进行电泳检测。

2 结果与分析

2.1 载体构建

以 Bt-10 单菌落为模板扩增 *aiiA* 基因, 取 PCR 产物 4 μL 电泳检测, 获得约 765 bp 大小的条带

(图 2, 泳道 1); 以 pCAMBIA1301 为模板扩增 CaMV35S 启动子和 Nos polyA 片段, 分别得到 520 bp 和 250 bp 大小的扩增产物 (图 3, 泳道 1、2)。将 3 个片段分别克隆到 pCAMBIA1301 表达载体上, 转化 *E. coli* DH5 α , 得到重组质粒 pSAN, 挑选阳性克隆, 纯化质粒, 限制性酶切鉴定, 结果与预期大小一致 (见图 4 泳道 1, 2)。

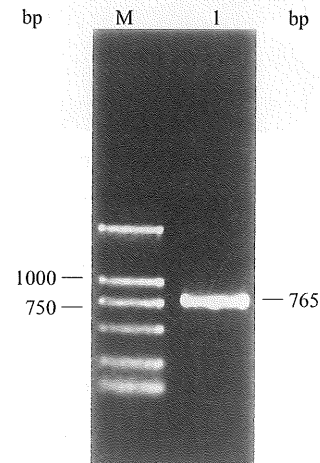


图 2 *aiiA* PCR 产物

Fig. 2 PCR product of *aiiA*

M: DNA Marker DL 2000; 1: *aiiA* 片段

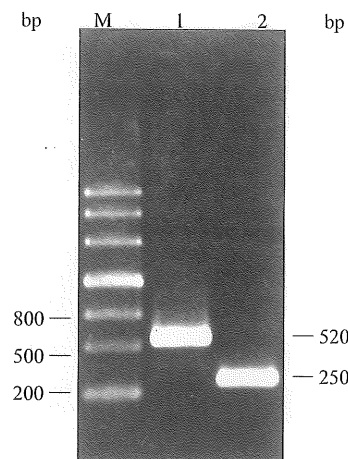


图 3 CaMV35S 启动子和 Nos polyA PCR 产物

Fig. 3 PCR products of CaMV35S promoter and Nos polyA

M: DNA Marker DL 2000; 1: CaMV35S promoter 片段;

2: Nos polyA 片段

2.2 农杆菌转化石斛兰 PLBs 及潮霉素抗性苗的获得

经农杆菌菌液侵染的 PLBs 放至共培养基上, 黑暗下共培养 5 d 后, PLBs 生长状态如图 5A 所示。将转化的 PLBs 及未转化的 PLBs (阴性对照) 转至含潮霉素的选择培养基进行培养, 每隔 20 d 记录 PLBs 生长情况, 并将存活 PLBs 转至新的选择培养基上。PLBs 经过约 2 个月的选择培养后, 未转化的 PLBs (阴性对照) 在潮霉素筛选下已全

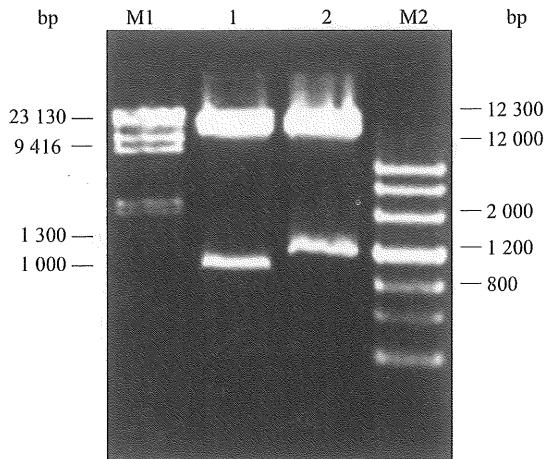


图 4 重组质粒 pSAN 酶切鉴定

Fig. 4 Identification of recombinant plasmid pSAN
M1: λ -Hind III marker; M2: marker III; 1: Hind III 酶切 pSAN; 2: EcoR I 和 Pst I 双酶切 pSAN

部死亡 (图 5: B), 而转化的 PLBs 有部分表现出潮霉素抗性并长出新的 PLBs (图 5: C)。经过了 4 个月的选择培养, 部分潮霉素抗性的 PLBs 再生成带根的小植株 (图 5: D), 可初步判断其为转基因植株。

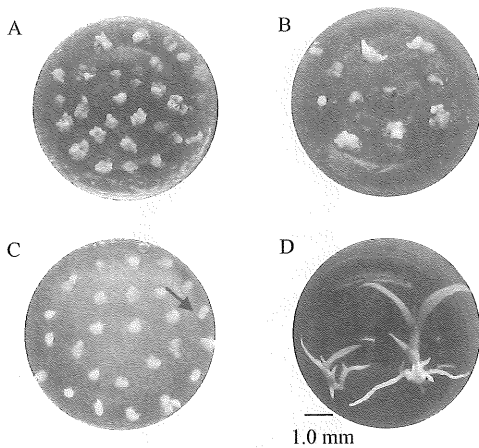


图 5 石斛兰 PLBs 共培养、选择培养和抗性苗再生情况

Fig. 5 Regeneration of hygromycin-resistant shoots from PLBs on selection culture

A: 共培养 5 d 的 PLBs; B: 未转化 PLBs 在选择培养基上的生长情况; C: 转化的 PLBs, 箭头表示新长出的 PLBs; D: 左边转化小苗; 右边为未转化小苗

2.3 潮霉素抗性苗的 GUS 组织化学染色

挑取不同株系的潮霉素抗性类原球茎和抗性苗进行 GUS 组织活性检测。结果如图 6 所示, 抗性类原球茎出现蓝色 (图 6: B), 抗性苗的叶片和新长出的根也出现蓝色或蓝色斑点 (图 6: C), 而对照未出现蓝色或蓝色斑点 (图 6: A)。

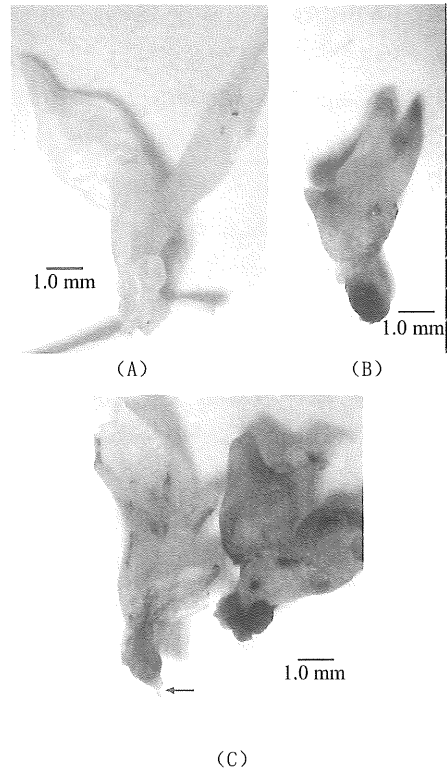


图 6 转基因石斛兰的 GUS 染色

Fig. 6 Histochemical GUS assay of Agrobacterium-transformed Dendrobium

A: 未转化的对照石斛兰植株; B: 转化的潮霉素抗性类原球茎; C: 转化的潮霉素抗性苗; (箭头所示为 GUS 染色阳性的根)

2.4 抗性苗的 PCR 检测

提取 GUS 染色阳性的 3 株抗性苗的叶片基因组 DNA, 利用特异引物对 (A1 和 A2) 和 (HPT1 和 HPT2) 进行 *aiiA* 基因和 *hpt* 基因的 PCR 扩增。

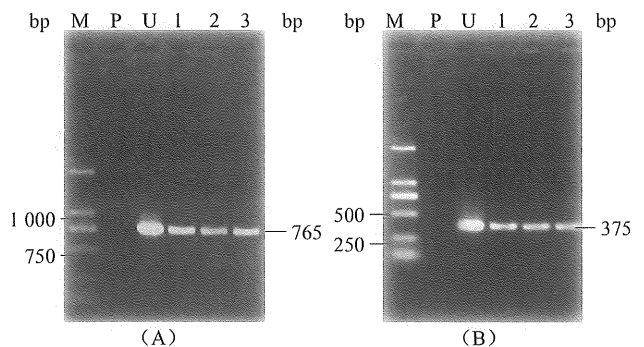


图 7 潮霉素抗性苗 PCR 检测

Fig. 7 PCR amplification of *hpt* gene and *aiiA* gene from hygromycin-resistant shoots

A: 以潮霉素基因的引物进行 PCR 扩增结果; B: 以 *aiiA* 基因的引物进行 PCR 扩增结果;

M: DL 2000 DNA Marker; U: 以未转化植株 DNA 为模板; P: 以质粒 pSAN 为模板; T1 ~ T3: 以抗性苗 DNA 为模板

图 7A 可以看到 3 株抗性苗均扩增出 765 bp 大小的片段, B 可以看到 3 株抗性苗扩增出 375 bp 大小的片段, 与预期 *aiiA* 和 *hpt* 的扩增片段大小一致, 而未转化对照植株没有扩增出相应条带。

从抗性苗的 GUS 组织化学染色结果以及外源基因 *hpt* 和 *aiiA* 的 PCR 结果可证实这些抗性苗为转基因苗。

3 讨 论

植物软腐病是一种严重的世界性流行病害, 在全球范围内广泛分布。软腐病由欧文氏菌属的细菌引起, 兰花各种属易受细菌性软腐病侵害, 植株和切花品质因此大为下降。在一些植物的转基因研究中已证实苏云金芽孢杆菌中含有的 *aiiA* 基因具有抵抗细菌性软腐病的作用, 在兰花的病虫害防治和育种研究中尚未见相关报道。本文从苏云金芽孢杆菌 (*Bt*) 中克隆出 *aiiA* 基因, 并将其装载入植物表达载体, 利用根瘤农杆菌 EHA105 将该基因介导转入石斛兰。目前, 已经获得了含 *aiiA* 的转基因苗, 这将进一步为利用转基因手段创造抗病力强的石斛兰品种以及兰花的病虫害防治打下基础。由于石斛兰转基因苗生长缓慢, 至今还不足以进行下一步的功能验证。待转基因植株可移栽至温室并生长稳定以后, 将对其进行软腐病病原菌的接种, 以验证该 *aiiA* 对转基因石斛兰植株表现出软腐病抗性。

参考文献:

- [1] 李杰. 几种名贵洋兰转基因受体系统的建立及遗传转化[D]. 南京: 南京林业大学, 2005: 63.
LI Jie. High efficient plantlets regeneration system and genetic transformation in *Phalaenopsis*, *Oncidium* and *Cymbidium* [D]. Nanjing: Nanjing Forest University, 2005: 63.
- [2] DONG Y H, XU J L, LI X Z, et al. *AiiA*, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97 (7): 3526 - 3531.
- [3] DONG Y H, WANG L H, XU J L, et al. Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase [J]. Nature, 2001, 411: 813 - 817.
- [4] LEE S J, PARK S Y, LEE J J, et al. Genes encoding the N-acyl homoserine lactone-degrading enzyme is widespread in many subspecies of *Bacillus thuringiensis* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68 (8): 3919 - 3924.
- [5] 柴鑫莉, 周盈, 林拥军, 等. 苏云金芽孢杆菌抗软腐病 *aiiA* 基因转化魔芋研究 [J]. 分子植物育种, 2007, 5 (5): 613 - 618.
CHAI Xinli, ZHOU Ying, LIN Yongjun, et al. Regeneration of transgenic *Amorphophallus konjac* expressing synthesized acyl-homoserine lactonase (*aiiA*) gene from *Bacillus thuringiensis* [J]. Molecular Plant Breeding, 2007, 5(5): 613 - 618.
- [6] 周斌, 孙明, 喻子牛. 苏云金芽孢杆菌 *AiiA* 蛋白对魔芋软腐病菌的抗病活性 [J]. 武汉大学学报: 理学版, 2004, 50(6): 761 - 764.
ZHOU Yi, SUN Ming, YU Ziniu. Activity of *Bacillus thuringiensis* *AiiA* protein against soft rot disease for *Amorphophallus konjac* cause by *Erwinia carotovora* pv. *carotovora* [J]. Journal of Wuhan University: Natural Science Edition, 2004, 50(6): 761 - 764.
- [7] 张霞, 胡玉琴, 贾振华, 等. 含苏云金芽孢杆菌 *aiiA* 基因的重组荧光假单胞菌的构建及对软腐病的抗病活性 [J]. 华北农学报, 2006, 21(4): 13 - 16.
ZHANG Xia, HU Yuqin, JIA Zhenhua, et al. Construction of genetic modified pseudomonas fluorescens which harbouring *aiiA* gene from *Bacillus thuringiensis* and its activity against soft rot disease [J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2006, 21(4): 13 - 16.
- [8] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. Molecular cloning: A laboratory manual [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [9] 张秒彬, 梁擎中, 肖浩, 等. 农杆菌介导石斛兰遗传转化的研究 [J]. 园艺学报, 2008, 35(4): 565 - 570.
ZHANG Miaobin, LIANG Qingzhong, XIAO Hao, et al. Study on *Agrobacterium*-mediated transformation of *Dendrobium* [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2008, 35(4): 565 - 570.
- [10] JEFFERSON R A, KAVANAGH T A, BEVAN M W. GUS fusion; β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants [J]. EMBO Journal, 1987, 6: 3901 - 3907.