

# 双价抗真菌基因表达载体的构建 及转基因西瓜的研究

张志忠, 吴菁华, 吕柳新\*, 何承坤

(福建农林大学园艺学院, 福州 350002)

**摘要:** 构建了同时含有番茄几丁质酶基因 (*Chi3*) 和  $\beta$ -1,3- 葡聚糖酶基因 (*Glu-Ac*) 的双价抗真菌基因植物表达载体, 以西瓜 (*Citrullus lanatus*) 子叶块为外植体, 采用根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 介导法, 将 *Chi3* 和 *Glu-Ac* 同时导入西瓜栽培种“中育一号”, 共获得 46 株抗性再生植株。经 PCR、Southern blot 和 RT-PCR 检测, 表明外源基因已成功整合到西瓜基因组中, 并在转录水平得到表达。利用尖孢镰刀菌西瓜专化型 (*Fusarium oxysporum*) 对转基因植株进行离体叶片抗病性检测, 表明转基因植株对枯萎病的抗性均有不同程度的增强。

**关键词:** 几丁质酶基因;  $\beta$ -1,3- 葡聚糖酶基因; 西瓜; 遗传转化; 抗病性

中图分类号: Q782

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2005)05-0369-06

## Construction of a Plant Expression Vector Carrying Two Antifungal Genes and Its Transfer to Watermelon

ZHANG Zhi-zhong, WU Jing-hua, Lü Liu-xin\*, HE Cheng-kun

(College of Horticulture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

**Abstract:** Using plant bivalent expression vector pCAMBIA1300 and pBI121 as basic components, a new binary vector harboring tomato chitinase gene *Chi3* and tomato  $\beta$ -1,3-glucanase gene *Glu-Ac*, was constructed through sequential restriction digests and ligations recombination. The two genes driven by CaMV35s promoter were successfully transferred into watermelon cultivars “ZhongYuYiHao” via *Agrobacterium*-mediated transformation. Successful integration and expression of *Chi3* and *Glu-Ac* were confirmed by PCR, Southern blot analysis and RT-PCR. The reaction of detached leaves of transgenic plants to infection *Fusarium oxysporum* infection was examined. The results indicated that transgenic plants gained certain resistance.

**Key words:** Chitinase gene;  $\beta$ -1,3-glucanase gene; Watermelon; Genetic transformation; Disease resistance

西瓜 (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Mansfeld) 是重要的经济水果, 但生产中病害种类繁多, 主要有枯萎病、炭疽病、蔓枯病、白粉病、霜霉病、疫霉病及病毒病等, 其中枯萎病是西瓜生产上危害最严重的病害之一, 由尖孢镰刀菌西瓜专化型 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveurn* (E. F. Smith) Synder & Hansen) 侵染所致<sup>[1]</sup>。该病属土传病害, 病菌在土壤

中可长期存活, 防治十分困难, 并且由于长期连作及使用农药, 客观上筛选了致病力更强的病原突变体, 致使病害日益猖獗。野生西瓜材料 PI296341 是目前国际上公认的唯一 1 份抗枯萎病 3 个生理小种的抗源, 但农艺与品质性状极差, 属饲料西瓜变种, 不能直接作为育种材料来使用<sup>[2]</sup>, 所以通过常规育种方法获得稳定抗病的品种较为困难。近年来,

收稿日期: 2005-03-11 接受日期: 2005-06-20

基金项目: 福建省自然科学基金项目(B0510017)资助

\* 通讯作者 Corresponding author

植物抗真菌病害基因工程的迅速发展为解决这一问题带来了希望。目前最常用的目的基因是几丁质酶基因和  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶基因。几丁质酶是一种以几丁质为底物的水解酶,它可以降解病原真菌细胞壁的重要成分—几丁质,从而破坏细胞致使病原体死亡。但大多病原真菌细胞壁最外层均覆盖有葡聚糖层<sup>[1]</sup>, $\beta$ -1,3-葡聚糖酶可将这些表层的多糖水解,使内层的几丁质暴露出来,以便几丁质酶发挥作用。体外抑菌实验<sup>[2]</sup>表明  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶能够抑制某些真菌的生长,且与几丁质酶共同作用时,其抑菌作用会大大增强。Jayasankar 等<sup>[3]</sup>的研究表明几丁质酶可以明显抑制西瓜枯萎病原菌的生长。但迄今为止未见此类相关基因转化的报道。本研究构建了含几丁质酶- $\beta$ -1,3-葡聚糖酶双价抗病基因的植物表达载体,利用它们之间的协同作用,采用农杆

菌介导法导入西瓜,成功获得了一批抗病性增强的转基因植株,为西瓜抗病育种提供科学依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 植物材料

西瓜(*Citrullus lanatus* (Thunb.) Mansfeld)栽培品种“中育一号”,由农业部农作物种子质检中心郑戈文同志提供。

### 1.2 菌株和质粒

大肠杆菌 DH5 $\alpha$  和根癌农杆菌 EHA105 由本实验室保存,尖孢镰刀菌西瓜专化型(*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveurn* (E. F. Smith) Synder & Hansen) 由浙江大学王玲平博士提供;所用质粒 pCAMBIA1300、pBI121、pSKChi3 和 pSKGlu-Ac

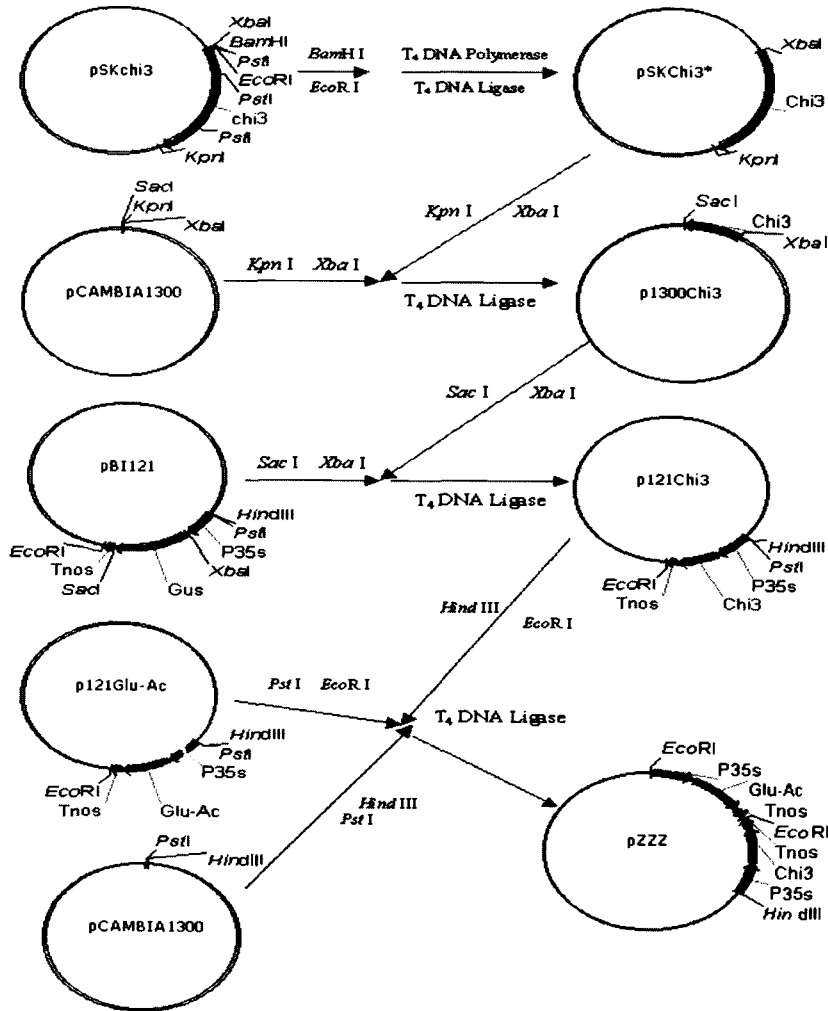


图 1 pZZZ 的构建流程示意图

Fig. 1 Schematic outline of the construction of pZZZ

(后两种质粒分别为含有番茄几丁质酶基因(*Chi3*)和 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶基因(*Glu-Ac*)的 cDNA 片段的克隆载体),均由 Cornell 大学何承坤博士提供。

### 1.3 酶与试剂

各种限制性内切酶、工具酶均为宝生物(大连)有限公司产品;RNA 提取用 Trizol 试剂盒购自 Invitrogen 公司;RT-PCR 试剂盒购自 Promega 公司, DIG DNA Labeling and Detection Kit 购自 Roche 公司;其它常规试剂、DNA 回收试剂盒和 PCR 引物等均购于上海生工生物技术服务有限公司。

### 1.4 双价抗真菌基因植物表达载体(pZZZ)的构建

酶切、连接和重组质粒转化大肠杆菌和重组克隆的筛选均按《分子克隆实验指南》<sup>[6]</sup>操作;pZZZ 的构建按图 1 所示流程进行。

### 1.5 转基因植株的获得和分子检测

以西瓜子叶块为外植体,采用叶盘法转化西瓜,不同阶段采用的培养基为:基本培养基 MS, 预培养和共培养培养基 MS + 6-BA 1.0 mg L<sup>-1</sup> + IBA 0.2 mg L<sup>-1</sup>, 筛选培养基 MS - 6-BA 1.0 mg L<sup>-1</sup> + IBA 0.2 mg L<sup>-1</sup> + Hyg 15 mg L<sup>-1</sup> + Carb 500 mg L<sup>-1</sup>, 生根培养基 MS + IAA 0.2 mg L<sup>-1</sup> + Hyg 10 mg L<sup>-1</sup> + Cef 500 mg L<sup>-1</sup> (其中 Hyg, Carb 和 Cef 分别代表潮霉素、羧苄青霉素和头孢霉素)。

DNA 提取参照张志忠<sup>[7]</sup>方法进行;植物总 RNA 微量提取采用 Trizol 法<sup>[8]</sup>;PCR 检测和 RT-PCR 检测均参照王美林<sup>[9]</sup>方法进行,其中 *Chi3* 基因特异引物为 P1: (5' -CCTGCCAAAGGATTCTACAC-3'), P2: (5' -CCACAATACCTCTGTAAAATCCAA-3'), *Glu-Ac* 基因特异引物为 P3: (5' -TTTACT-TGTTGGGCTTCT-3'), P4: (5' -TTCTGGTT-TCTTTGGTG-3');Southern blot 检测参照《分子克隆试验指南》<sup>[6]</sup>,以地高辛标记的质粒 pZZZ 为探针。

### 1.6 转基因植株抗病性检测

病原菌液准备:挑取尖孢镰刀菌菌丝,接种于液体马铃薯培养基中,25℃震荡培养 1-2 d。将培养后的菌液转至 1.5 ml EP 管中,离心收集菌体。用适量液体马铃薯培养基或液体 MS 培养基重悬菌体至浓度为 5×10<sup>5</sup> 孢子 ml<sup>-1</sup>,备用。

检测:随机选取 PCR 检测呈阳性的转化株,剪

取第四叶位带柄幼叶。叶背向下将叶柄插入含有 MS 固体培养基的培养皿中。用微量注射器在叶片中央的叶脉部位注射 10 μl 枯萎病原菌液,用封口膜封口,25℃暗培养 25 h,之后转移至光照培养,光照 12 h d<sup>-1</sup>,培养 2-3 d,观察叶片受害情况。

## 2 结果和分析

### 2.1 双价抗真菌基因表达载体的构建

采用 *Hind* III 和 *Eco* R I 对构建好的植物双元表达载体 pZZZ 进行双酶切鉴定,结果显示 pZZZ 可以切出大小约为 2.1 kb 和 2.3 kb 的片段,前者符合 35s 启动子 (865 bp)-*Chi3* (941 bp)-*Nos* 终止子 (267 bp) 的大小,后者则与 35s 启动子 (865 bp)-*Glu-Ac* (1 185 bp)-*Nos* 终止子 (267 bp) 一致,说明表达载体构建成功(图 2)。利用冻融法将构建好的表达载体导入农杆菌 EHA105 中,菌液 PCR 鉴定结果显示利用 *Chi3* 引物和 *Glu-Ac* 引物可分别扩增出预期大小的 550 bp 和 850 bp 的目的条带,用引物 P2 和引物 P3 可扩增出大小为 1 850 bp 左右的条带,含上述两段及两个 *Nos* 终止子,进一步证明表达载体构建成功,并已导入农杆菌中(图 3)。

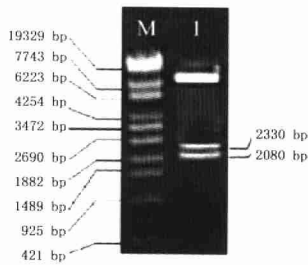


图 2 重组质粒酶切鉴定图

Fig. 2 Restriction endonuclease analysis of recombinant plasmid pZZZ  
M. 分子量标准 DNA Marker; I. 质粒 pZZZ 的 *Hind* III 和 *Eco* R I 双酶切 pZZZ/*Hind* III-*Eco* R I

### 2.2 转基因植株的分子检测

通过潮霉素直接筛选共获得 46 株抗性再生植株,提取各株总 DNA(图 4 所示为随机选择的 6 株扩增结果),分别利用 P1/P2 和 P3/P4 引物对转化

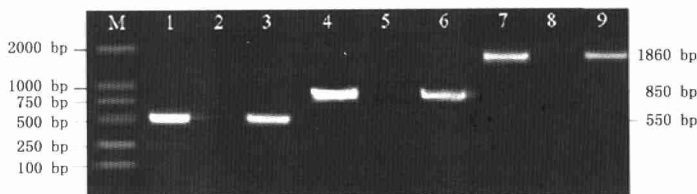


图 3 农杆菌转化子 PCR 鉴定

Fig. 3 PCR analysis of transformed *Agrobacterium tumefaciens*

M. 分子量标准 DNA Marker; 1. 质粒 pSKChi3, pSKChi3 plasmid; 4. 质粒 pSKGlu-Ac, pSKGlu-Ac plasmid;  
7. 质粒 pZZZ, pZZZ plasmid; 2, 5, 8. 农杆菌 EHA105; 3, 6, 9. 含 pZZZ 的 EHA105 pZZZ/EHA105

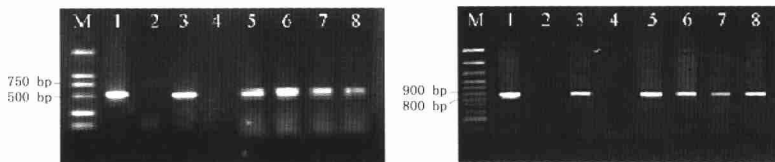


图 4 转化植株的 PCR 鉴定

Fig. 4 PCR analysis of putative transformants and untransformed plants

左 (Left): *Chi3* 扩增 PCR analysis using *Chi3* primer sets; 右 (Right): *Glu-Ac* 扩增 PCR analysis using *Glu-Ac* primer sets;  
M. 分子量标准 DNA Marker; 1. pZZZ 质粒, pZZZ plasmid; 2. 非转化株 Untransformed plant; 3-8. 转化株 Putative transformants.

株进行 PCR 扩增, 其中 38 株转化株均可以扩增出预期大小的 550 bp (*Chi3* 扩增产物) 和 850 bp (*Glu-Ac* 扩增产物) 的片断, 初步说明目的基因已经整合到西瓜基因组中。此外有 6 株无任何扩增产物, 其余 2 株则只具有单一扩增产物, 这一情况表明在利用双价基因表达载体 pZZZ 进行转化的过程中发生了部分基因的丢失情况, 但这一比例只占约 4.35% (2/46)。

### 2.3 转基因植株的 Southern blot 检测

为了获得更多的外源基因整合信息, 对 PCR 检测呈阳性的转基因植株进行了 Southern blot 检测。用 *Bgl* II 限制性内切酶完全酶解基因组 DNA (质粒 pZZZ 的 T-Border 之间不含该酶的酶切位点)。以未经酶切的质粒 pZZZ 为阳性对照, 非转化植株 DNA 酶切产物为阴性对照, 结果见图 5。可见转化株均出现杂交信号, 说明目的基因已成功整合到西瓜基因组中, 同时可以看出目的基因在不同转化个体中的拷贝数不同, 同时存在单拷贝和多拷贝现象。

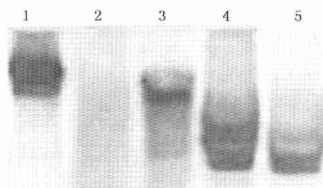


图 5 转基因植株 Southern blot 分析

Fig. 5 Southern blot analysis of transgenic watermelon plants

1. pZZZ 质粒 pZZZ plasmid; 2. 非转化株 Untransformed plant; 3-5. 转化株 Transformants.

### 2.4 转基因植株的 RT-PCR 检测

提取 Southern blot 检测阳性的转基因植株总 RNA 用于 RT-PCR 检测, 分别利用 *Chi3* 特异引物和 *Glu-Ac* 特异引物对转基因植株进行扩增, 得到了预期大小的 550 bp 和 850 bp 片断, 分别为 *Chi3* 和 *Glu-Ac* 的特异片断, 说明目的基因在转录水平上得到了表达 (图 6)。

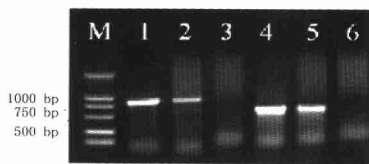


图6 转基因植株 RT-PCR 检测

Fig. 6 RT-PCR analysis of transgenic plants

M. 分子量标准 DNA Marker; 1, 2, 3. *Chi3* 特异引物扩增 Using *Chi3* primer sets; 4, 5, 6. *Glu-Ac* 特异引物扩增 Using *Glu-Ac* primer sets; 1, 4. pZZZ 质粒 pZZZ plasmid; 2, 5. 转基因植株 TTransformants; 3, 6. 非转化株 Untransformed plant.

### 2.5 转基因植株离体叶片抗病性鉴定

为了检测转基因植株的抗病性, 随机选择数株 PCR 检测呈阳性的转基因植株进行离体叶片抗病性鉴定。由图 7 可见, 未接种病原菌的非转化植株叶片 (A) 生长正常, 接种病原菌的所有叶片均表现出一定程度的枯萎病症状。接种病原菌的非转化株叶片 (D) 表现出明显的症状: 叶片大部分布满白色絮状菌丝, 病原菌几乎由接种点蔓延至整个叶片, 叶片大部分呈水渍状, 部分变为褐色, 叶片顶部及周边叶缘已明显枯萎, 叶柄呈褐色, 已枯萎。接种病原菌的转基因植株叶片局部发生卷曲、变黄, 个别叶缘发生枯萎, 病原菌有少量生长。其中两株转基因植株的叶片 (B、F) 在接种点附近病原菌有一定

程度的生长, 但其扩展范围远较非转化株小, 另外两株 (C、E) 则未见病原菌的明显扩展。由此可见转基因植株对枯萎病的抗性有一定程度的提高。对 38 株 PCR 检测阳性株的抗病性检测中有 26 株表现出不同程度的增强, 另外 12 株对病原菌的抵抗能力没有发生明显变化, 这一结果表明通过导入几丁质酶- $\beta$ -1,3-葡聚糖酶双价抗病基因来提高西瓜对枯萎病病原菌的抵抗能力是可行的, 同时也说明在部分转基因植株中导入的外源目的基因可能发生了沉默或表达量较低, 不足以抵抗病原菌的侵袭。

### 3 讨论

目前常用的多基因转化策略主要包括多次转化、共转化和利用同时含多个目的基因的表达载体进行一次转化。多次转化工作量大、耗时长, 对筛选基因的选择较为困难, 并且转基因植株后代分离复杂、稳定性差, 获得同时含多个目的基因的转基因纯合系比较困难。采用共转化除存在上述类似问题外, 共转化频率很低也是一个不容忽视的问题, 当基因转化载体的数目增加时, 获得多基因转化体的频率就会下降<sup>[4]</sup>。本试验将几丁质酶基因与  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶基因构建在同一载体中, 通过一次转化事件就可同时导入多个目的基因, 由于只进行一次基因转化, 多个基因同时整合在受体染色体的一个遗传位点上, 转化后根据其连锁的标记基因进行筛

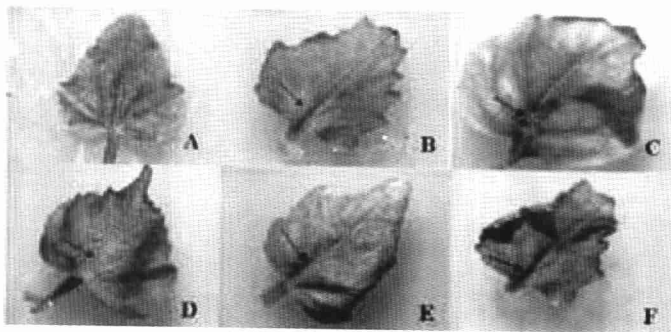


图7 转基因植株离体叶片对尖孢镰刀菌抗性鉴定

Fig. 7 The reaction of detached leaves of transformants to *Fusarium oxysporum* infection

A: 未经侵染的非转化叶片 Leaf of untransformed plant without infection; D: 经侵染的非转化叶片 Leaf of untransformed plant with infection; B, C, E, F: 经侵染的转基因植株叶片 Leaves of transformants with infection.

选也很简单和方便,比较容易获得能稳定遗传的转多基因植物。

不同病程相关蛋白的抑菌机制不同,因而所起的作用也不同。据报道转菜豆几丁质酶基因的烟草植株对真菌抗性的增加主要是因为降解了真菌的细胞壁,使真菌不能进一步侵染<sup>[1]</sup>;而转  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶基因的烟草植株表现出对真菌的抗性,主要是因为释放了有生物活性的  $\beta$ -1,3-葡聚糖片段从而激活其防卫基因的表达<sup>[2]</sup>,由此可见植物成功抵御病原的侵染需要多种相关基因的共同参与、协同作用。在植物抗病基因工程中,转多个基因的策略将会逐渐取代转单个基因的策略,进而使植物通过采取一系列不同的防御机制来抵抗病原入侵,综合这些防御机制将会培育出抗性更持久更广泛的优良作物品种。本试验构建了同时含有这两种基因的植物表达载体,对西瓜进行转化,以期利用双价基因产物协同作用,克服单基因产物难以实现育种目标的缺点,从而达到抗性更强、抗菌谱更广的目的。从已有的报道<sup>[13-15]</sup>来看,几丁质酶基因和  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶基因的联合使用可以产生很好的协同作用,转基因植株大多表现出较强的抗病性。本试验中离体抗病性检测结果也表明转基因植株的抗病性有不同程度的提高,从而有望获得抗病性增强的品种或供进一步研究的材料。

### 参考文献

- [1] Xu Y(许勇), Ouyang X X(欧阳新星), Zhang H Y(张海英), et al. Identification of a RAPD marker linked to *Fusarium* wilt resistant gene in wild watermelon germplasm (*Citrullus lanatus* var. *citroides*) [J]. Acta Bot Sin(植物学报), 1999, 41(9):952-955.(in Chinese)
- [2] Martyn R D, Netzer D. Resistance to races 0, 1, and 2 of *Fusarium* wilt of watermelon in *Citrullus* sp. PI 296341- FR [J]. Hort Sci, 1991, 26(4):429-432.
- [3] Wessels J G, Sietsma J H. Fungal cell wall: a survey [A]. In: Encyclopedia of Plant Physiology [M]. Berlin: Springer Verlag, 1981. 352-394.
- [4] Selabunrlage M B. Only specific tobacco (*Nicotiana tabacum*) chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanases exhibit antifungal activity [J]. Plant Physiol, 1993, 101:857-863.
- [5] Jayasankar S, Li Z J, Gray D J, et al. *In-vitro* selection of *Vitis vinifera* 'Chardonnay' with *Elsinoe ampelina* culture filtrate is accompanied by fungal resistance and enhanced secretion of chitinase [J]. Planta, 2000, 211(2):200-208.
- [6] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual [M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 34-57, 474-490.
- [7] Zhang Z Z(张志忠), Wu J H(吴菁华), Lü L X(吕柳新), et al. A rapid and efficient mini-isolation of DNA for PCR analysis [J]. Subtrop Plant Sci(亚热带植物科学), 2004, 31(1):19-21.(in Chinese)
- [8] Zhang W M(张维铭). A Laboratory Manual of Modern Molecular Biology [M]. Beijing: Science Press, 2003. 186.(in Chinese)
- [9] Wang G L(王关林), Fang H J(方宏筠). Plant Gene Engineering [M]. 2nd ed. Beijing: Science Press, 2002. 344-347.(in Chinese)
- [10] Christon P, Sawain W. Co-transformation frequency of foreign genes in soybean cell culture [J]. Thero Appl Genet, 1990, 79:337-341.
- [11] Benhamou N. Cytology of infection of 35S-bean chitinase transgenic canola plants by *Rhizoctonia solani*: cytochemical aspects of chitin breakdown *in vivo* [J]. Plant J, 1993, 4:295-305.
- [12] Yoshikawa M, Tsuda M, Takeuchi Y. Resistance to fungal disease in transgenic tobacco plants expressing the phytoalexin elicitor-releasing factor, beta-1,3-glucanase from soybean [J]. Naturwissenschaften, 1993, 80:417-420.
- [13] Feng D R(冯道荣), Xu X P(许新萍), Fan Q(范钦), et al. Rice plants of multiple transgenes for resistance to rice blast and sheath blight diseases [J]. Acta Agro Sin(作物学报), 2001, 27(3):293-301.(in Chinese)
- [14] Lan H Y(蓝海燕), Zhang L H(张丽华), Wang L L(王兰岚), et al. Studies of transgenic tobacco plants expressing  $\beta$ -1,3-Glucanase and chitinase genes and their potential for fungal resistance [J]. Acta Genet Sin(遗传学报), 2000, 27(1):70-77.(in Chinese)
- [15] Xu M H(许明辉), Tang X S(唐祚舜), Tan Y L(谭亚玲), et al. A study on introduction of chitinase gene and  $\beta$ -1,3-Glucanase gene into restorer line of dian-type hybrid rice (*Oryza sativa* L.) and enhanced resistance to blast (*Magnaporthe grisea*) [J]. Acta Genet Sin(遗传学报), 2003, 30(4):330-334.(in Chinese)