

王西成, 吴伟民, 巫建华, 等. 葡萄 β -1,3-葡聚糖酶基因的克隆、序列分析及表达[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(4): 899-905.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2015.04.030

葡萄 β -1,3-葡聚糖酶基因的克隆、序列分析及表达

王西成^{1,2}, 吴伟民^{1,2}, 巫建华³, 赵密珍^{1,2}, 王壮伟^{1,2}, 钱亚明^{1,2}, 解振强³

(1. 江苏省农业科学院园艺研究所, 江苏 南京 210014; 2. 江苏省高效园艺作物遗传改良重点实验室, 江苏 南京 210014;
3. 江苏现代园艺工程技术中心, 江苏 句容 212400)

摘要: 为验证葡萄 β -1,3-葡聚糖酶基因在葡萄抗病防御机制中的作用, 本研究以金星无核葡萄叶片为试验材料, 采用 RT-PCR 技术克隆得到 1 个长度为 1 244 bp 的葡萄 β -1,3-葡聚糖酶基因。采用生物信息学方法对其开放阅读框和理化性质进行分析, 结果显示, 该基因包含 1 个长度为 1 083 bp 的完整开放阅读框, 编码的蛋白质含 360 个氨基酸, 分子量为 89 440, 理论等电点为 4.83。系统进化分析结果显示, β -1,3-葡聚糖酶基因所编码的氨基酸序列与桃、豌豆和水稻的同源性分别为 62.1%、60.8% 和 33.1%。定量 PCR 分析结果显示, 在霜霉病菌侵染后的 72 h 内均可诱导该基因的表达, 且表达量均高于对照, 表明 β -1,3-葡聚糖酶基因在葡萄应答霜霉病菌侵染过程中可能发挥一定作用。

关键词: 葡萄; 霜霉病; β -1,3-葡聚糖酶基因; 基因克隆; 基因表达

中图分类号: S663.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2015)04-0899-07

Cloning, characterization and expression analysis of beta-1,3-glucanase gene in grapevine

WANG Xi-cheng^{1,2}, WU Wei-min^{1,2}, WU Jian-hua³, ZHAO Mi-zhen^{1,2}, WANG Zhuang-wei^{1,2},
QIAN Ya-ming^{1,2}, XIE Zhen-qiang³

(1. Institute of Horticulture, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 2. Jiangsu Key Laboratory for Horticultural Crop Genetic Improvement, Nanjing 210014, China; 3. Jiangsu Modern Horticultural Engineering Center, Jurong 212400, China)

Abstract: To identify the role of beta-1,3-glucanase gene in grape disease resistance, a beta-1,3-glucanase gene fragment with a length of 1 244 bp was cloned from grapevine Venus seedless leaves by RT-PCR method. Bioinformatics analysis revealed that the gene contained a complete open reading frame of 1 083 bp in length encoding 360 amino acids. The molecular weight of deduced protein was 89 440, and the theoretical isoelectric point was 4.83. Phylogenetic analysis showed that amino acid sequence encoded by beta-1,3-glucanase gene shared 62.1%, 60.8% and 33.1% similarities with those in *Prunus persica*, *Pisum sativum* and *Oryza sativa*. Quantitative RT-PCR analysis revealed that the expressions of beta-1,3-glucanase gene was up-regulated within 72 h after the inoculation of *Plasmopara viticola*, and the level were much higher than that of control. It was suggested that beta-1,3-glucanase gene might play a certain role in response to grapevine downy mildew infection.

Key words: grapevine; downy mildew; beta-1,3-glucanase gene; gene cloning; gene expression

收稿日期: 2015-01-28

基金项目: 江苏省农业科技自主创新基金项目[CX(12)2013]

作者简介: 王西成(1982-), 男, 安徽亳州人, 博士, 助理研究员, 主要从事葡萄种质资源收集、评价与利用以及葡萄分子生物学研究。(Tel)18652905096; (E-mail) wxcown@163.com

通讯作者: 吴伟民, (E-mail) 5wm@163.com

葡萄是中国栽培最广泛的果树树种之一, 截止到 2011 年底, 中国葡萄栽培面积为 $5.68 \times 10^5 \text{ hm}^2$, 总产量达 $9.17 \times 10^6 \text{ t}$, 分别占世界葡萄栽培总面积和总产量的 8.02% 和 13.17%, 其中鲜食葡萄的栽培面积和产量已连续多年居世界第一位, 并且继续呈现逐年上升趋势^[1]。葡萄霜霉病是由葡萄霜霉病菌引起的真

菌性病害,多雨季节易发生,生长早期发病可导致新梢、花穗枯死,中后期发病可引起提早落叶或叶片大面积枯斑而严重削弱树势,进而影响翌年的产量,是严重危害葡萄生产的四大病害之一^[2]。

近年来,植物抗真菌病害基因工程研究日益受到重视,已陆续发现一些抗真菌蛋白质, β -1,3-葡聚糖酶是研究最多、应用最为广泛的抗真菌蛋白质之一,其对于真菌的抗性具有广谱性和持久性特点。该酶能够降解以 β -1,3-葡萄糖链连接的葡聚糖酶系(大多数病原真菌细胞壁的主要成分之一),从而使细胞内含物外溢,导致病原菌死亡^[3]。高等植物中普遍存在着 β -1,3-葡聚糖酶,在正常环境条件下该酶含量较少,活性较低,但当植物受到外界因素刺激时(如病原菌侵染、水杨酸处理等), β -1,3-葡聚糖酶即可被诱导产生并积累^[4]。已有研究结果表明,植物体内有多个编码 β -1,3-葡聚糖酶的基因,其产物有酸性和碱性之分,分别定位于胞间和液泡内,但只有定位在液泡内的碱性 β -1,3-葡聚糖酶才能够降解真菌菌丝壁,从而抑制其生长,而定位于胞间的酸性 β -1,3-葡聚糖酶则没有抑菌活性^[5]。目前,对于 β -1,3-葡聚糖酶基因的研究较为深入,已从大豆^[6]、毛竹^[7]、白菜^[8-9]、青花菜^[10]、指天蕉^[11]、甘蔗^[12]等多种植物中分离到该基因序列,并且完成了部分基因的功能验证工作^[13]。在葡萄上,尽管已有关于 β -1,3-葡聚糖酶活性及其编码基因研究的报道^[14-17],但对于该基因在霜霉病菌诱导下的表达模式仍知之甚少。有鉴于此,本研究在完成葡萄 β -1,3-葡聚糖酶基因克隆的基础上,进一步对该基因在响应霜霉病菌诱导过程中的表达水平进行分析,以期为该基因在葡萄抗病育种基因工程中的应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料与处理

试验于2014年9月在江苏省农业科学院溧水植物科学基地内进行,供试材料为抗病性较强的8年生鲜食葡萄品种金星无核。葡萄霜霉病病原菌(*Plasmopara viticola*)于江苏省农业科学院院内葡萄资源圃病叶上分离获得。

试验所用 M-MLV 逆转录酶、*Ex-Taq*、*DNase I*、dNTP、pMD19-T 载体、荧光染料 SYBR Green I 均购自宝生物工程(大连)有限公司;T4 DNA 连接酶购自 Promega 公司;DL2000 Marker 和 DNA 回收试剂盒购自上海生物工程技术服务有限公司;DH5 α 感

受态大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株由作者所在的国家农业科技华东(江苏)创新中心高效园艺作物遗传改良实验室保存。

1.2 病原菌制备及接种

参考王西成等^[18]的方法,从田间采回新鲜的葡萄霜霉病叶,流水冲洗干净,经蒸馏水冲洗后置于17~20℃黑暗环境中保湿(相对湿度为95%)24h,诱发新的孢子囊。用湿棉球将新产生的孢子囊剥落于无菌水中,配成1ml 8×10^4 个霜霉病菌孢子囊悬浮液,并加入标定体积0.1%的吐温。接种前用载玻片萌芽法测定孢子囊的活性,萌发率高于85.0%为有效接种液。采用喷雾法对金星无核幼嫩叶片进行接种,然后套袋并放入湿棉球保湿。分别于接种后0h、4h、12h、24h、48h和72h进行6次取样,叶片采集后液氮速冻,并于-70℃冰箱中保存备用。

1.3 总 RNA 提取与 cDNA 合成

葡萄叶片总 RNA 的提取参考北京华越洋生物科技有限公司生产的植物 RNA 提取试剂盒说明书进行。以总 RNA 为模板,根据北京百泰克生物技术有限公司生产的 Bio Teke supermo III RT Kit 试剂盒说明,利用引物 P01 反转录合成 cDNA 第一链,反转录条件为:50℃保温45min,70℃保温10min,冰上冷却后,-70℃保存备用。

1.4 葡萄 β -1,3-葡聚糖酶基因 cDNA 克隆

根据 GenBank 中已登录的葡萄 β -1,3-葡聚糖酶基因(NM_001280967.1)和 *UBI* 基因(XM_002266714)序列设计引物,并由上海英潍捷基贸易有限公司(<http://www.invitrogen.com>)合成,引物序列详见表1。以 cDNA 为模板,分别利用引物 P02/P03、P04/P05 和 P06/P07 进行 PCR 扩增获得葡萄 β -1,3-葡聚糖酶基因的开放阅读框(ORF)及5'和3'非编码区(UTR)序列。反应体系均为25.00 μ l:上、下游引物各1.00 μ l(10 μ mol/L),*Ex-Taq* (5U/ μ l) 0.25 μ l, 10 \times PCR buffer (含 Mg^{2+}) 2.50 μ l, dNTP 混合溶液(10mmol/L) 2.00 μ l, cDNA 2.00 μ l, ddH₂O 补至25.00 μ l。反应条件:94℃预变性5min;94℃变性40s,退火40s,72℃延伸1min,共35个循环;72℃延伸10min,4℃保存。扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,目的片段利用 DNA 凝胶回收试剂盒进行回收,最后将目标片段连接到 pMD-19T simple 载体上进行 T/A 克隆,DNA 测序由上海美吉生物医药科技有限公司(<http://www.majorbio.com>)完成。

表 1 引物序列及片段大小

Table 1 Sequence of primers and size of amplified product

引物	序列 (5'→3')	片段大小 (bp)	用途
P01	GCAGGACTGCAGCTGACTGACTACT30VN		cDNA 合成
P02	ATGGCTGCCATGGTCTTCTT	1 083	ORF 扩增
P03	TTATATGTCACCTTTGAGGGATTCTTC	1 083	ORF 扩增
P04	ACACTTGCTCTTAGAACTAGTAGAAGTTC	691	5'端扩增
P05	TGAACAAAGCGTAGGGAAGAGA	691	5'端扩增
P06	GTTTGATGAGAACAAAGAAGGAGCC	325	3'端扩增
P07	GGTGGTAGAGCTCGCAGGACTGCAGCTGACTG	325	3'端扩增
P08	GCTCGCTGTTTTGCAGTTCTAC	150	UBI 扩增
P09	AACATAGGTGAGGCCGCACTT	150	UBI 扩增
P10	GGGAGATGTGAGGGTTAT	204	定量 RT-PCR
P11	CTAGCATGGCATCGAACAGA	204	定量 RT-PCR

1.5 葡萄 β -1,3-葡聚糖酶基因序列分析

首先利用 DNAMAN 5.22 软件对 ORF、5'末端和 3'末端 3 个序列进行拼接分析。核苷酸和氨基酸序列分别利用 NCBI 的 BLASTn 和 BLASTp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行相似性分析,用 DNAMAN 5.22 软件分析葡萄 β -1,3-葡聚糖酶氨基酸序列与其他植物的关系。

1.6 葡萄 β -1,3-葡聚糖酶基因表达分析

分别提取金星无核葡萄接种霜霉病菌后不同时期的叶片总 RNA,经 *DNase I* 消化后分别取 2 μ g,并以 P01 引物进行反转录合成 cDNA。利用 Primer 3 引物设计软件 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) 进行相关引物的设计,研究该基因在金星无核葡萄中的时空表达情况。以葡萄看家基因 *UBI* 作为内标基因进行 qRT-PCR 分析,目的基因相关引物序列见表 1。qRT-PCR 见文献 [19],利用 Bio-Rad My-IQ2 荧光定量 PCR 仪,对目的基因的表达情况进行实时荧光定量分析。反应体系按照 SYBR Green I (TOYOBO) 的说明书进行,反应条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 10 s;95 $^{\circ}$ C 变性 10 s, T_m 退火 20 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,40 个循环,试验共设置 3 次重复,反应结束后采用 $\Delta\Delta C_t$ 法对荧光定量 PCR 扩增数据进行处理,目的基因的相对表达量通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值来确定。

2 结果与分析

2.1 葡萄 β -1,3-葡聚糖酶基因的 cDNA 克隆及序列分析

根据 GenBank 中已登录的酿酒葡萄 β -1,3-葡聚糖酶基因序列设计特异引物,以金星无核葡萄叶片的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,分别获得了 1 083 bp、691 bp 和 325 bp 的 3 条片段。将上述 3 条片段进行克隆、测序,以及拼接组装,最终获得 1 条总长为 1 244 bp 的 cDNA 序列。该序列包括 1 个 1 083 bp 的完整开放阅读框(ORF),33 bp 的 5'非编码区和 128 bp 的 3'非编码区(图 1)。该基因 ORF 区包含一个含有 360 个氨基酸的蛋白质,BioXM 2.6 预测该鲜食葡萄 β -1,3-葡聚糖酶基因所编码蛋白质的分子量为 89 440,理论等电点为 4.83。再将获得的 ORF 序列与 GenBank 中已登录的酿酒葡萄 β -1,3-葡聚糖酶基因序列进行同源性比对发现,在编码的 360 个氨基酸中,仅第 204、234、249 和 306 位上的氨基酸存在差异,两者相似度高达 98.9% (图 2)。

2.2 葡萄 β -1,3-葡聚糖酶基因所推导的氨基酸序列及其系统发育关系分析

为了解不同物种 β -1,3-葡聚糖酶基因的进化关系,本研究从 NCBI 公共数据库中下载了油棕、姜、百合、玉米、豌豆、桃和水稻共 7 个物种的 β -1,3-葡聚糖酶氨基酸序列,用 DNAMAN 5.22 软件进行序列比对和系统进化树的构建。结果显示,8 条蛋白质序列含 334~377 个氨基酸残基,序列之间相似性均较低,说明不同物种 β -1,3-葡聚糖酶基因在进化过程中发生了较大变化(图 3)。

图1 葡萄 β -1,3-葡聚糖酶基因的核苷酸序列及其推导的氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of grape beta-1,3-glucanase gene

图2 鲜食与酿酒葡萄 β -1,3-葡聚糖酶氨基酸序列比对

Fig.2 The alignment of beta-1,3-glucanase amino acid sequences in table and wine grapes

油棕 93 NANSKVS. RAVALLI GLIYAI P. TGKVSII GCGGNGNNLPQPSAVNI YKSNII NAMRI DPNCALCALKCSNI CLTLDVNPTRIGSLASS
 百水 93 NAAOHI I.S. NAAVALI VLSAIP. RGVESI GCGAGNDGNDPQADAVNI YKSNII AGRIU RPDGATII CALKCSNI YLLIDVNPNDLONI ASD
 水稻 93 NALPGGLRALI LAVALPLFLSASEAGTII GTIN GRVADLPDPAVNI KKOGL AOVKII DTEPTVIRAIATG KVAIIPNEQLAAASR
 豌豆 67 NAKSSSVGRCPNSI SIVFLGLIVASFETIG. ACI GICGNGNNLPANEMADYKANNI KRRIU DPNCALALKCSYI ELILGIPNSDCTLATN
 桃 99 NAROGVVASHALALLGAFAP. TGWCSI GCGGNGNLPPSEVIALYKONNI RRRIU DPNCALALKCSYI ELMGVPNDLGLASS
 玉米 94 NATRKAFF. VITAI IISII VAVP. TRACSI GCGGNGNLPPASDVOL CSNGI NLARI MEPEANALISGTSI CLINDVNPNTLASD
 姜 93 NAAVVI IJIGTII IATIOTI TGKVSII GCGGNGNLPPASDVOL YRSNGI DRRIU DPNCALALKCSNI CLINTVPRTHGSI ASN
 鲜食葡萄 87 NAAVVI IJIGTII IATIOTI TGKVSII GCGGNGNLPPASDVOL YKSRNI DRRIU DPNCALALKCSNI CLMCGVPSDLCGLATN
 酿酒葡萄 87 NAAVLLGLFLATLQI TGKVSII GCGGNGNLPPASDVOL YKSRNI DRRIU DPNCALALKCSNI CLMCGVPSDLCGLATN
 完全一致氨基酸

油棕 187 PSANNNVCGNII KAYSSEGVSEKVI AVGNEVI PG. AEACYII PAIRNI NSALSSAGLCNQI KYSTAVATISVLKSFPPSCAFSSAA. NTVLSPI VO
 百水 185 CSATINWGTIN GAY. PNAIFRMI AVGNEVI PG. GCACYII PAIRNI OSALSSAGLCN. I KYSTSVFSGVAGTISYPSPSAGS FSSDA. SSTI GPLI O
 水稻 190 PSYALAWIRRII AAYPATOI CCI AVGNEVFAS. AKNLTACI VPATNI VHAALARSII LTKPI VSSPI ALTAL ACSYPSPSAGS FEREDLACAVAKPND
 豌豆 166 OLSAROWGRNI LNFIYSVKI KYI AVGNEVSPV. GSSSVILACYII PATONVYQAI RACGLHQI KITTAL DNTLI CNSFPSPSKSFRSDV. RSYLDPII G
 桃 191 CANANTWGNIRNYG. NVREKVI AVGNEVKS. ETSYACFLI PAQNI ONALSSAGLG. I KYSTAVDTGVLGNSFPSPSKSEY. GALLNPII R
 玉米 182 PSAAAAWGSIN GAF. PSVSFRMI AVGNEVSG. ETGSI LPANIKI NAALANAGLCNSI KYSTAVGSDVT. CGFPSPSCFTES. CCYVAPI AO
 姜 188 PSAAANWGAN VAFWPSVSFRMI AVGNELI PGD. AAACYII PAIRNI VOTLSSAGLCNQI KSTAVDTGVI CGSFPPSNGAFESAAA. CAYLAPI LO
 鲜食葡萄 186 PSQACSWGRNI RNYWPGVSFRMI AVGNEVSPVNGGTSRFAFVLPARNI RAALASAGLCDRV KYSTAI DLTLGNSYPSPSCAFERCEV. RGYLDPII R
 酿酒葡萄 186 PSQACSWGRNI RNYWPGVSFRMI AVGNEVSPVNGGTSRFAFVLPARNI RAALASAGLCDRV KYSTAI DLTLGNSYPSPSCAFERCEV. RGYLDPII R
 完全一致氨基酸

油棕 282 FLASNGAPLII VNPYFSYVNPNCII NI EYALFISPQTVITGCG. YKCN LFEAI VDAI YAALEKVG. GSNVAVSSEGWPSAG. ... CTAATI NNKITY
 百水 280 FLASNGAPLII VNPYLSYAGSGSII DLSVALFTASCTVWCGS. YAKNI LFEAMDALYSALLESAG. GPNVPVAVSSEGWPSAG. ... CTAATVSNACTY
 水稻 290 FLACTGSYII VNPYFEANSCTDI. SLIDVALFRPNACVLBSGSLKNSYI LLEACIDAVETI VSKLI GKNYNAVRVSEI GWPSKCTAKETIGAAANAAV
 豌豆 260 VLYAGAPLII VNPYFSYHI GPRDI. SLIPVALFTSPGVVGLGP. NGYCN LFEANLDSVHAALDNIG. I GWNVAVSSEGWPSDGC. ... GSATSYDNNRILY
 桃 286 FIVNRSPII VNPYFSYSSNTHI. RI DYALFTAPSVVVGCG. ROYCN LFEAI L DAVAAI FRAG. CGSIFVIVSSEGWPSAG. ... CTAATTI NNRTY
 玉米 277 MLCSTGAPLII VNPYFSYI GNPACI. DI SVALFTSPQTVWCGS. NAVCN LFEAI LDFTVSALFENAG. AGNPVAVSSEGWPSAG. ... CTAATTI NNRTY
 姜 283 FIRGNAPII VNPYFSYATNPSCI. SI AVALETACGVVVGCG. FGYN LFEACVDAVVALEKAG. SCNVAVSSEGWPSAG. ... GFAAASVSNACTY
 鲜食葡萄 281 FIVDNKSPILII VNPYFSYSCGPKDI. STIPVALFTANSYVWVGCG. ROYCN LFEANL DLYSAL FRAG. CASIFVIVSSEGWPSAG. ... GFCTTVNNRITY
 酿酒葡萄 281 FIVDNKSPILII VNPYFSYSCGPKDI. SLIPVALFTANSYVWVGCG. ROYCN LFEANL DLYSAL GRAG. CASLEVAVSSEGWPSAG. ... GFCTTVNNRITY
 完全一致氨基酸

油棕 339 NCNII NHVCCG. TPRRSKAI EAYI FEMFNENIRSS. GIEONFGIFVPMCPWPI NFI.
 百水 337 NCNII NHVCCG. TPRKPG. AI ETYI FANFENEDKQCPGII ENNFQIFVPMCPWPI NFI.
 水稻 339 NCNII NHVCCG. TPRRP. VATEAVLFANFENEDKQCP. ENNFQIFVPMCPWPI NFI.
 豌豆 339 LENTII RHVKG. TPRRP. VATEAVLFANFENEDKQCP. ENNFQIFVPMCPWPI NFI.
 桃 343 NCNII CHVKG. TPRKPG. PI ETYI FANFENEDKQCP. ENNFQIFVPMCPWPI NFI.
 玉米 334 NCNII NHVCCG. TPRKPG. PI ETYI FANFENEDKQCP. ENNFQIFVPMCPWPI NFI.
 姜 339 NCNII RHVKG. TPRKPG. PI ETYI FANFENEDKQCP. ENNFQIFVPMCPWPI NFI.
 鲜食葡萄 360 NSNII RHVKG. TPRKPG. PI ETYI FANFENEDKQCP. ENNFQIFVPMCPWPI NFI.
 酿酒葡萄 360 NSNII RHVKG. TPRKPG. PI ETYI FANFENEDKQCP. ENNFQIFVPMCPWPI NFI.
 完全一致氨基酸

系统进化分析结果显示,葡萄 β -1,3-葡聚糖酶氨基酸序列与其他物种之间遗传距离均较远,在全部比较的 8 个物种中,除与酿酒葡萄同源性较高(98.9%)外,与桃、豌豆、姜、油棕、百合、玉米的同源性为50.9%~62.1%,而与水稻的同源性最低,仅为33.1%(图4)。

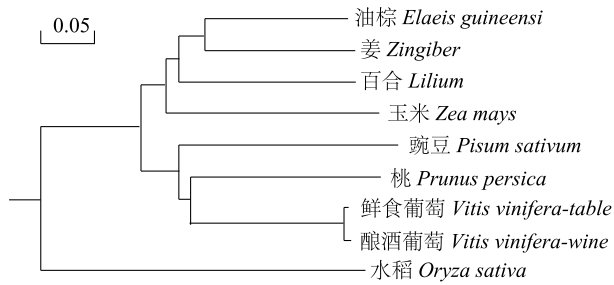


图4 葡萄与其他植物 β -1,3-葡聚糖酶系统进化分析

Fig. 4 Phylogenetic tree of beta-1,3-glucanase among grape and other plants based on amino acid sequence

2.3 葡萄 β -1,3-葡聚糖酶基因的表达

为了解葡萄 β -1,3-葡聚糖酶基因在葡萄叶片接种霜霉病菌后不同时期的表达情况,本研究以 *UBI* 作为内参基因,利用 qRT-PCR 技术对该基因在葡萄叶片接种霜霉病菌后不同时期的表达情况进行了对比分析。结果显示,在接种霜霉病菌后的 72 h 内,葡萄 β -1,3-葡聚糖酶基因的相对表达水平平均高于处理 0 h (对照),且呈现出先升后降的变化趋势,尤其在处理后 24 h 时,该基因的相对表达量达到最高,约为对照的 5.6 倍,之后出现较大幅度下降(图5)。上述结果表明,霜霉病菌侵染可诱导葡萄 β -1,3-葡聚糖酶基因表达。

3 讨论

葡萄霜霉病遍及世界各个葡萄产区,是葡萄生产上重要的真菌性病害之一^[20-23],当前对于该病害的防治主要依赖于杀菌剂,过度及不适当地使用杀菌剂不仅会危及食品安全,还会对环境造成严重危害,因此培育抗病品种已成为解决这一病害的有效途径。传统的育种方法需要通过对杂交后代表型进行初步筛选,此过程不仅费时耗财,且不易选育出理想的优质抗病葡萄新品种^[24]。自 20 世纪后期以来分子生物学技术取得了快速发展,这为缩短葡萄育种周期,加

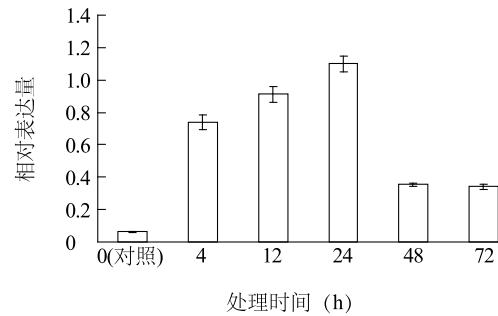


图5 霜霉病菌侵染后 β -1,3-葡聚糖酶基因的表达

Fig. 5 Expression of beta-1,3-glucanase gene infected by *Plasmopara viticola*

快抗病新品种的选育进程带来了新的契机。将分子生物学技术充分应用到葡萄育种过程之中不仅可以大幅缩短葡萄育种年限,同时还可以有效提高定向育种效率,已引起葡萄育种工作者的高度重视。

早在 1992 年,Keen^[25] 就指出植物的抗病性是植物为了抵抗病原物的侵染、扩展和危害而在形态结构和生理生化,以及时间和空间上的综合表现,其实质是抗病相关基因表达的结果。分子生物学研究结果同样表明,植物在受到病原菌侵染时,其体内的部分转录因子会被激活,进而调控下游抗病基因的表达,从而达到抗病的目的^[26-27],如中国野生葡萄转录因子 *VpWRKY1* 和 *VpWRKY2* 可显著提高转基因拟南芥对白粉病的抗性^[28]; *VvPRI* 基因的表达会因霜霉菌的诱导而表现为强烈上调^[29];欧洲葡萄 *VST1* 基因瞬时过量表达的叶片对于霜霉病的抗性也会增强^[30]。近年来,有关葡萄转基因抗病育种也取得了一定进展,将中国野生葡萄 *STS* 基因转化欧洲葡萄后,转基因植株中的白藜芦醇含量会显著高于对照,这有助于提高转基因植株的抗病性^[31];而将环形抗菌肽基因转化欧洲葡萄后,不仅可以大幅提高转基因植株对于冠瘿病的抗性,同时也可在一定程度上提高其对葡萄白粉病的抗性^[32-33]。

鉴于 β -1,3-葡聚糖酶在植物抗病过程中所发挥的重要作用,本研究以对霜霉病抗性较强的葡萄品种金星无核为试验材料,采用 RT-PCR 技术成功获得 1 个 1 244 bp 的葡萄 β -1,3-葡聚糖酶基因序列。葡萄霜霉病菌接种试验结果表明,葡萄 β -1,3-葡聚糖酶基因受霜霉病菌诱导上调表达,进而推测该基因能够响应葡萄霜霉病菌的诱导,进而参与葡萄对霜霉病菌的防御反应。

参考文献:

- [1] 王庆莲,吴伟民,赵密珍,等. 秋延后栽培对葡萄生长与果实品质的影响[J]. 江苏农业学报, 2013, 29(6): 1438-1444.
- [2] 李 华,郭明浩. 葡萄霜霉病预测模型及预警技术研究进展[J]. 中国农学通报, 2005, 21(10): 313-316.
- [3] 张晓伟,马 强. 青霉素对苹果树 β -1,3-葡聚糖酶与几丁质酶活性的影响[J]. 内蒙古农业科技, 2010(5): 76-77.
- [4] 王转梅,陈崇顺,王 轶,等. 烟草品种 XanthiNN 碱性 β -1,3-葡聚糖酶基因的克隆与生物信息学分析[J]. 江苏农业科学, 2009(1): 28-31.
- [5] 欧阳波,李汉霞,叶志彪. 植物 β -1,3-葡聚糖酶及其基因[J]. 中国生物工程杂志, 2002, 22(6): 18-23.
- [6] 迟 彦. 大豆 β -1,3-葡聚糖酶基因转化烟草及抗病性的研究[J]. 大连大学学报, 2001, 22(6): 37-41.
- [7] ZHANG Y, GAO J, XU Y M. Cloning and sequencing analysis of β -1,3-glucanase gene from moso bamboo [J]. Molecular Plant Breeding, 2010, 8(3): 533-541.
- [8] 王彦华,侯喜林,申书兴. 不结球白菜 β -1,3-葡聚糖酶基因 cDNA 全长的克隆与表达分析[J]. 农业生物技术学报, 2006, 14(6): 917-921.
- [9] 王彦华,侯喜林,史公军. 白菜 β -103-葡聚糖酶基因 cDNA 的克隆及序列分析[J]. 园艺学报, 2004, 31(5): 670-672.
- [10] 靳敏峰,侯喜林. 青花菜 β -1,3-葡聚糖酶基因的克隆、表达分析及其植物表达载体的构建[J]. 南京农业大学学报, 2008, 31(2): 27-31.
- [11] 翟国会,阮小蕾,吴丽婷,等. 指天蕉 β -1,3-葡聚糖酶基因全长 cDNA 的克隆及序列分析[J]. 中国农业科学, 2011, 44(15): 3134-3141.
- [12] SU Y C, XU L P, XUE B T, et al. Molecular cloning and characterization of two pathogenesis-related β -1, 3-glucanase genes *ScGluA1* and *ScGluD1* from sugarcane infected by *Sporisorium scitamineum*[J]. Plant Cell Rep, 2013, 32(10): 1503-1519.
- [13] YOSHIKAWA M, SUGIMOTO K. A specific binding site on soybean membrane for a phytoalexin elicitor released from fungal cell wall by β -1, 3-endoglucanase [J]. Plant & Cell Physiology, 1993, 34: 1229-1237.
- [14] TROUVELOT S, VARNIER A L, ALLEGRE M, et al. A beta-1,3 glucan sulfate induces resistance in grapevine against *Plasmopara viticola* through priming of defense responses, including HR-like cell death [J]. Mol Plant Microbe Interact, 2008, 21(2): 232-43.
- [15] POLESANI M, DESARIO F, FERRARINI A, et al. cDNA-AFLP analysis of plant and pathogen genes expressed in grapevine infected with *Plasmopara viticola* [J]. BMC Genomics, 2008, 9: 42.
- [16] DELAUNOIS B, COLBY T, BELLOY N, et al. Large-scale proteomic analysis of the grapevine leaf apoplastic fluid reveals mainly stress-related proteins and cell wall modifying enzymes [J]. BMC Plant Biology, 2013, 13: 24.
- [17] HENDERSON S W, BAUMANN U, BLACKMORE D H, et al. Shoot chloride exclusion and salt tolerance in grapevine is associated with differential ion transporter expression in roots [J]. BMC Plant Biology, 2014, 14: 273.
- [18] 王西成,吴伟民,赵密珍,等. 葡萄抗病相关基因 *VvIPK2* 的克隆、序列分析及表达[J]. 江苏农业学报, 2014, 30(4): 738-745.
- [19] 王西成,吴伟民,房经贵,等. 葡萄赤霉素受体基因 *VvGID1A* 的分离、亚细胞定位及表达分析[J]. 园艺学报, 2013, 40(5): 839-848.
- [20] 刘天明,李摇华,张政文. 鲜食葡萄品种对霜霉病的抗性抗病机理研究[J]. 植物保护学报, 2001, 28(2): 118-122.
- [21] 刘会宁,许德秀. 塑料大棚欧亚种葡萄对霜霉病和白粉病的抗性研究[J]. 中外葡萄与葡萄酒, 2004(3): 22-24.
- [22] 付瑞敏,韩鸿鹏,张丽琴,等. 葡萄霜霉病和白粉病拮抗菌的分离、鉴定和 He-Ne 激光诱变[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(8): 122-125.
- [23] 李宝燕,王英姿,刘学卿,等. 3 种杀菌剂对葡萄霜霉病菌的毒力测定和田间药效试验[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(1): 98-99.
- [24] HVARLEVA T, BAKALOVA A, RUSANOV K, et al. Toward marker assisted selection for fungal disease resistance in grapevine [J]. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 2009, 23: 1431-1435.
- [25] KEEN N T. The molecular biology of disease resistance [J]. Plant Molecular Biology, 1992, 19: 109-122.
- [26] CHEN L Q, ZHANG L P, YU D Q. Wounding-induced WRKY8 is involved in basal defense in *Arabidopsis* [J]. Molecular Plant Microbe Interactions, 2010, 23(5): 558-565.
- [27] 张 颖,孙海生,樊秀彩,等. 中国野生葡萄资源抗白腐病鉴定及抗性种质筛选[J]. 果树学报, 2013, 30(2): 191-196.
- [28] LI H, XU Y, XIAO Y, et al. Expression and functional analysis of two genes encoding transcription factors, *VpWRKY1* and *VpWRKY2*, isolated from Chinese wild *Vitis pseudoreticulata* [J]. Planta, 2010, 232: 1325-1337.
- [29] LE HENANFF G, HEITZ T, MESTRE P, et al. Characterization of *Vitis vinifera* NPR1 homologs involved in the regulation of pathogenesis-related gene expression [J]. BMC Plant Biology, 2009, 9: 54.
- [30] SANTOS-ROSA M, POUTARAU A, MERDINOGLU D, et al. Development of a transient expression system in grapevine via agro-infiltration [J]. Plant Cell Reports, 2008, 27: 1053-1063.
- [31] FAN C H, PU N, WANG X P, et al. Agrobacterium-mediated genetic transformation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) with a novel stilbene synthase gene from Chinese wild *Vitis pseudoreticulata* [J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2008, 92: 197-206.
- [32] VIDAL J R, KIKKERT J R, DONZELLI B D, et al. Biolistic transformation of grapevine using minimal gene cassette technology [J]. Plant Cell Reports, 2006, 25: 807-814.
- [33] VIDAL J R, KIKKERT J R, MALNOY M A, et al. Evaluation of transgenic 'Chardonnay' (*Vitis vinifera*) containing magainin genes for resistance to crown gall and powdery mildew [J]. Transgenic Research, 2006, 15: 69-82.

(责任编辑:袁 伟)