

付晓佳, 张 倩, 李 琳, 等. 农杆菌介导烟草抗真菌 β -1,3-葡聚糖酶基因转化洋桔梗[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(1): 44-50.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2016.01.007

农杆菌介导烟草抗真菌 β -1,3-葡聚糖酶基因转化洋桔梗

付晓佳, 张 倩, 李 琳, 乔宁宁, 王转梅, 陈崇顺

(南京师范大学生命科学学院/江苏省生物多样性与生物技术重点实验室, 江苏 南京 210023)

摘要: 为获得洋桔梗抗真菌病害新品种, 本研究将烟草抗真菌 β -1,3-葡聚糖酶基因 (*Glu*) 与质粒 pBI121 重组, 构建了植物表达载体 pBI121-*Glu*, 利用农杆菌介导法转化洋桔梗品种 Double Mariachi Pink 叶块, 共获得 21 个卡那霉素抗性株系。对抗性株系进行 PCR 扩增, 获得 10 个阳性株系。选取其中生长良好的 5 个株系进行 RT-PCR 检测, 鉴定出 3 个株系 (EG6、EG11 和 EG17) 为转基因正常转录株系。EG6、EG11 和 EG17 株系及非转基因对照株系的 β -1,3-葡聚糖酶的平均活力分别为 0.301 U、0.243 U、0.401 U 及 0.236 U, 其中 EG6 和 EG17 株系的平均活力显著高于非转基因对照株系。洋桔梗离体叶片的抗灰霉病鉴定显示, EG17 病斑面积 (0.432 cm²) 显著小于非转基因对照株系 (2.156 cm²)。此外, EG17 对灰霉病的抗性还表现为发病延迟、病斑面积扩大速度减慢等。

关键词: 洋桔梗; β -1,3-葡聚糖酶基因; 农杆菌介导法; 灰霉病抗性

中图分类号: Q789 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2016)01-0044-07

Agrobacterium-mediated transformation of tobacco β -1,3-glucanase gene into *Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn.

FU Xiao-jia, ZHANG Qian, LI Lin, QIAO Ning-ning, WANG Zhuan-mei, CHEN Chong-shun

(College of Life Sciences, Nanjing Normal University/Jiangsu Key Laboratory of Biodiversity and Biotechnology, Nanjing 210023, China)

Abstract: In order to enhance the resistance to fungi diseases, an antifungal β -1,3-glucanase gene from tobacco was transferred into Double Mariachi Pink lisianthus [*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn.] through *Agrobacterium*-mediated transformation by constructing the plant expression vector of pBI121-*Glu*. 21 kanamycin-resistant lines were obtained, and 10 lines carrying the target gene were detected by PCR. RT-PCR analysis confirmed that the β -1,3-glucanase gene was expressed in three lines, EG6, EG11 and EG17, which showed average β -1,3-glucanase activities of 0.301 U, 0.243 U and 0.401 U, higher than that of non-transformed line (0.236 U). Compared with non-transformed plants, resistance to *Botrytis cinerea* in the transgenic line EG17 was improved as smaller lesion area, slower lesion expansion speed and delayed onset of *B.cinerea*.

Key words: *Eustoma grandiflorum*; β -1,3-glucanase gene; *Agrobacterium*-mediated transformation; resistance to *Botrytis cinerea*

收稿日期: 2015-05-29

基金项目: 江苏高校优势学科建设工程资助项目

作者简介: 付晓佳 (1991-), 女, 山东淄博人, 硕士研究生, 主要从事植物生物技术与分子生物学研究。(E-mail) fuxiaojia716@163.com

通讯作者: 陈崇顺, (E-mail) chenchongshun@njnu.edu.cn

洋桔梗 [*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn.], 又名草原龙胆, 是龙胆科草原龙胆属多年生草本植物, 原产于美国中部内布拉斯加州 (Nebraska) 至德

克萨斯州(Texas)一带。其花形美丽、花色丰富、茎秆光滑,具有较高的观赏价值,深受人们的喜爱,是国际上十分流行的切花种类之一^[1],其销量已跻身世界切花市场的前十位^[2]。

然而,自从在全世界范围内大面积引种栽培洋桔梗以来,很多国家和地区都相继发现其易感真菌性、细菌性及病毒性病害^[3-5],其中由灰葡萄孢菌等引起的真菌病害占80%以上^[6-8]。

β -1,3-葡聚糖是绝大多数真菌(灰葡萄孢菌、尖孢镰刀菌、立枯丝核菌等)细胞壁的主要成分^[9]。 β -1,3-葡聚糖酶(EC 3.2.1.39)能够水解 β -1,3-葡聚糖多聚体,有酸性和碱性之分,分别定位于植物细胞间和液泡内。只有液泡内的碱性 β -1,3-葡聚糖酶能够降解上述真菌菌丝壁,从而抑制其生长;细胞间的酸性 β -1,3-葡聚糖酶则无抑菌活性^[10]。Libantova等^[11]将烟草碱性 β -1,3-葡聚糖酶基因置于CaMV35S启动子后,构建植物表达载体,导入马铃薯,该基因在马铃薯中得到了组成型表达,转基因马铃薯对立枯丝核菌和尖孢镰刀菌抗性增强。Sundaresha等^[12]将烟草碱性 β -1,3-葡聚糖酶基因转入花生中,转基因植株酶活力较非转基因植株最高增加5倍多,对褐斑病菌和黄曲霉菌的抗病性增强。

本研究以洋桔梗品种Double Mariachi Pink为试验材料,通过农杆菌介导的叶盘转化法,将烟草碱性 β -1,3-葡聚糖酶基因导入洋桔梗,对再生转化体进行筛选、鉴定、检测,以期为培育抗真菌病的洋桔梗新种质奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

植物试材为南京师范大学陈崇顺老师实验组保存的Double Mariachi Pink洋桔梗无菌苗[培养条件:温度(25±2)℃,光照强度60 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,光周期16 h/8 h]。菌株和质粒:根癌农杆菌LBA4404,大肠杆菌DH5 α , pBI121(T-DNA区含选择标记基因*npt II*和报告基因*gus*), pUC57-*Glu*(pUC57-T载体和烟草碱性 β -1,3-葡聚糖酶基因重组而成^[13])。试剂:限制性内切酶*Bam*H I和*Xba* I以及T4 DNA连接酶购自宝生物工程(大连)有限公司, *Taq* DNA聚合酶为Promega产品,卡那霉素(Kanamycin, Km)为BBI产品,利福平(Rifampicin, Rif)为SCIGENE产品, DNA Logical Ladder购自

GenScript公司, DL2000购自天根(北京)生化有限公司,羧苄青霉素(Cb)购自南京基天生物技术有限公司,引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。植物基因组DNA和RNA提取试剂盒及DNA胶回收试剂盒购于南京华普生物公司。

1.2 植物表达载体的构建

1.2.1 pBI121-*Glu*植物表达载体的构建 利用限制性内切酶*Bam*H I和*Xba* I酶切pUC57-*Glu*和pBI121质粒,将烟草 β -1,3-葡聚糖酶基因和pBI121质粒的大片段相连,构建植物表达载体pBI121-*Glu*。将连接产物转化大肠杆菌DH5 α 感受态细胞,进行酶切鉴定。

1.2.2 pBI121-*Glu*转化农杆菌 从大肠杆菌中提取pBI121-*Glu*,采用电转化法^[14]将pBI121-*Glu*导入根癌农杆菌LBA4404中,将转化产物涂布在LB+Rif+Km培养基上筛选转化体,28℃培养过夜。

1.2.3 重组菌落的鉴定 用牙签从LB+Km+Rif平板上挑取单菌落,在加入适量ddH₂O的离心管中搅动两下,然后在另一新的平板上划线保存。参照王转梅等^[13]的方法,PCR检测阳性菌株,根据NCBI GenBank上公布的烟草Samsun碱性 β -1,3-葡聚糖酶基因序列(登录号:A16121)设计1对特异性引物P1和P2。为方便试验后续操作,在两引物的5'端分别引入*Bam*H I和*Xba* I酶切位点,并外加3个保护碱基,具体序列为(标有下划线的为酶切位点):P1 5'-TGCTCTAGACAACAAGTCTTCCCATCATG-3'; P2 5'-CGCGGATCCCCATCCAAGGAATACGTATG-3'。PCR反应程序为:95℃预变性4 min,94℃变性70 s,60℃复性70 s,72℃延伸2 min,循环34次,72℃延伸10 min,4℃保温。电泳后在紫外分析仪上观察。

1.3 农杆菌介导法转化洋桔梗

1.3.1 叶块预培养 选取洋桔梗无菌苗叶片,采用三刀切法^[15]将叶片切成约5 mm×5 mm大小,将叶块转到MS+1.0 mg/L 6-BA预培养基上,预培养3 d。

1.3.2 农杆菌侵染液的制备 取-70℃保存的农杆菌菌液于碎冰上融化,用接种针蘸取少量菌液,在LB培养基(含50 mg/L Km+50 mg/L Rif)平板上划线培养,28℃暗培养2 d。从平板上挑取单菌落,接种于40 ml LB+50 mg/L Km+50 mg/L Rif液体培养基中,在台式恒温振荡器中培养18 h左右(28℃、200 r/min),至OD₆₀₀约为0.8。以4 000 r/min离

心 5 min, 弃上清液, 加入适量的无菌 1/2 MS 液体培养基重新悬浮菌体, 至 OD_{600} 值约为 0.5。

1.3.3 叶盘转化法转化洋桔梗 将预培养后的叶块在农杆菌侵染液中浸泡 10 min, 取出叶块, 用无菌滤纸吸取多余的菌液后, 放回原预培养基, 在黑暗条件下共培养 4 d。然后将共培养后的叶块转到 MS+1.0 mg/L 6-BA+30.0 mg/L Km+200.0 mg/L Cb 的脱菌培养基上, 在 $(25\pm 2)^\circ\text{C}$, 光照条件下培养 30 d, 统计再生不定芽的数量。当不定芽的高度为 2~3 cm 时, 将其切下转入筛选增殖培养基 MS+0.10 mg/L 6-BA+0.05 mg/L NAA+30.00 mg/L Km+100.00 mg/L Cb 中, 每 30 d 转接一次, 筛选转接两次。

1.3.4 抗性芽的生根筛选培养 将经过 Km 筛选后的株型正常、长势良好的抗性幼苗, 转入 1/2MS+0.1 mg/L NAA+15.0 mg/L Km 的生根培养基中。30 d 后, 筛选正常生根的抗性转化植株。

1.4 转化植株的鉴定

1.4.1 PCR 检测 按照上述扩增烟草 β -1,3-葡聚糖酶基因的反应体系及程序扩增出目的基因片段, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。

1.4.2 RT-PCR 检测 利用植物 RNA 的提取试剂盒提取洋桔梗中总 RNA, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。按照 BioTeKe Supermo III RT Kit 的操作步骤进行 RNA 的反转录, 将得到的 cDNA 于 -20°C 下保存。根据已知的烟草 β -1,3-葡聚糖酶基因的保守序列, 设计 1 对特异性引物。上游引物 Glu-P1: 5'-CCAGCAGCATTGACATAGCA-3'; 下游引物 Glu-P2: 5'-CGAGAGAAGCAGTAGCATTAGT-3'。PCR 扩增体系: 2.5 μl 10 \times PCR 缓冲液, 25 mmol/L MgCl_2 1.0 μl , 1.5 μl cDNA 模板, 25 $\mu\text{mol/L}$ 的引物 1.0 μl , 2.5 mmol/L dNTP 2.0 μl , 5 U/ μl Taq DNA 聚合酶 0.5 μl , 加 ddH₂O 补至 25.0 μl 。反应程序: 94°C 预变性 3 min; 94°C 变性 40 s, 然后 55°C 复性 50 s, 72°C 下延伸 10 min, 循环 34 次; 4°C 保存。扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳检测。

1.5 转化植株的 β -1,3-葡聚糖酶活性及抗真菌性检测

1.5.1 β -1,3-葡聚糖酶活性测定 以从昆布多糖中释放出的还原糖量来测此酶活性。用 DNS 法测定所形成的还原糖量^[16]。参照唐冰等^[17]方法配制 DNS 试剂并制作葡萄糖标准曲线。参照史益敏^[18]

的方法获得 β -1,3-葡聚糖酶粗酶液。酶活力单位定义为 1 ml 粗酶液 1 min 催化昆布多糖产生 1 mg 葡萄糖所需的酶量为 1 个酶活力单位。

1.5.2 转基因洋桔梗离体叶片抗灰霉病鉴定 选择灰葡萄孢菌作为试验菌株, 将灰葡萄孢菌接种在 PDA 培养基上, 在 24°C 黑暗条件下培养 10 d, 使其活化。然后挑取活化的真菌孢子在斜面 PDA 上划线, 24°C 暗培养 3 d, 用无菌水冲洗斜面, 混匀, 用移液枪吸出孢子液, 再用无菌双蒸水稀释, 利用血球计数板计数, 配制成浓度为 1 ml 1×10^5 个真菌孢子悬浮液^[19]。

分别从转化植株和未转化植株中取长势相同的 5 个叶片, 每个植株 3 个重复。将叶片置于含无菌滤纸的培养皿中, 滤纸湿润, 每个叶片接种 1 块含 5 μl 真菌孢子悬浮液 (1 ml 1×10^5 个) 的琼脂块。在湿润的环境下培养 4 d, 培养温度 24°C 。4 d 后, 利用照片扫描仪 (Canon LiDE110) 扫描病斑, 并计算病斑的面积^[7]。

1.6 试验数据的统计分析

利用 SPSS 17.0 软件对试验各项数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 植物表达载体的构建及鉴定

用 BamH I 和 Xba I 双酶切 pBI121-Glu, 得到 2 000 bp 左右片段; 而同样用 BamH I 和 Xba I 双酶切 pBI121 质粒, 则没有该片段。结果表明, 已成功构建了植物表达载体 pBI121-Glu (图 1)。从平板上挑取阳性克隆, 经菌落 PCR 得到 1 条大约 2 000 bp 的条带, 而转入 pBI121 的农杆菌和 ddH₂O 对照组无目的条带 (图 2)。

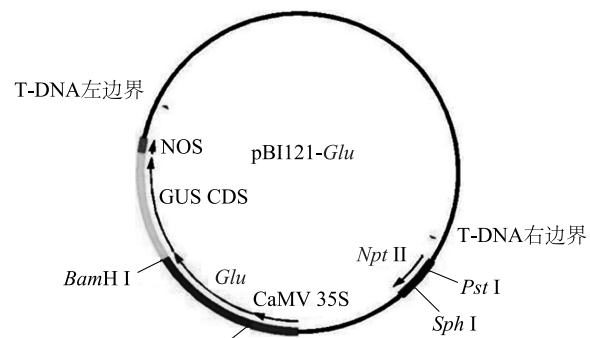
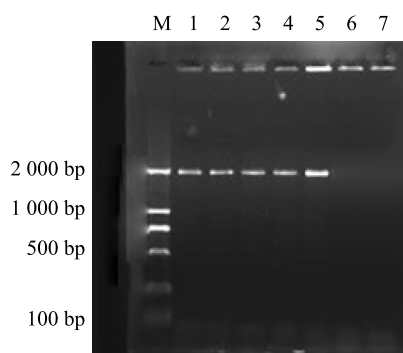


图 1 植物表达载体 pBI121-Glu

Fig.1 The plant expression vector of pBI121-Glu



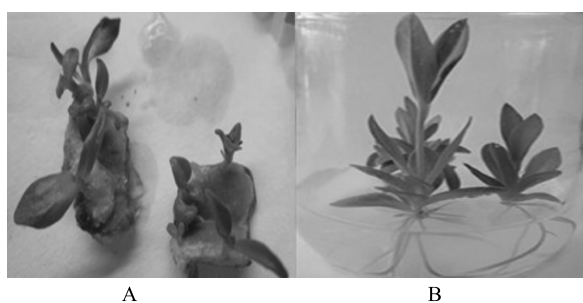
M:分子量标准 DL2000;1~5:含 pBI121-*Glu* 农杆菌的菌落;6:含 pBI121 农杆菌的菌落(对照),7:ddH₂O(对照)。

图2 含 pBI121-*Glu* 农杆菌的菌落 PCR 电泳图

Fig. 2 Colony PCR of *Agrobacterium tumefaciens* with pBI121-*Glu*

2.2 农杆菌介导法转化叶块

将洋桔梗叶块转入脱菌分化培养基中培养 30 d 后,获得 81 个再生芽。将再生芽切下转入筛选增殖培养基中培养,筛选培养 2 次。最终得到 35 个无根抗性苗株系。将其转入生根培养基中生根,有 14 个株系不能正常生根,茎叶逐渐白化而死,其余 21 个株系能正常生根(图 3)。



A:叶盘分化出的再生芽;B:Km 抗性苗根系。

图3 Km 抗性苗

Fig.3 Km-resistant plantlets

2.3 转化洋桔梗抗性植株的鉴定

2.3.1 PCR 检测 经 Km 抗性筛选后,共获得 21 个抗性苗株系,以这 21 株抗性苗 DNA 为模板,分别以 P1 和 P2 为引物进行 PCR 扩增,以质粒 pBI121-*Glu* 为阳性对照,以未转化植株为阴性对照。扩增结果如图 4 所示。图 4 中转基因株系 EG5、EG6、EG11、EG14、EG15、EG17、EG20、EG21 和 EG23 的基因组都扩增出大小约为 2 000 bp 的目的条带,初步确定这 10 个洋桔梗株系中已经转入了烟草碱性 β -1,3-

葡聚糖酶基因。

2.3.2 转化株的 RT-PCR 检测 选取经 PCR 检测呈阳性、长势良好的 5 个转基因株系(EG6、EG11、EG15、EG17 和 EG23)和未转基因植株进行 RT-PCR 检测。结果(图 5)显示,5 个转基因株系中,EG6、EG11 和 EG17 这 3 个株系扩增出大小为 1 000 bp 的目的条带,其余 2 个株系没有扩增出目的条带。

2.4 转化洋桔梗植株 β -1,3-葡聚糖酶的活性及抗真菌性检测

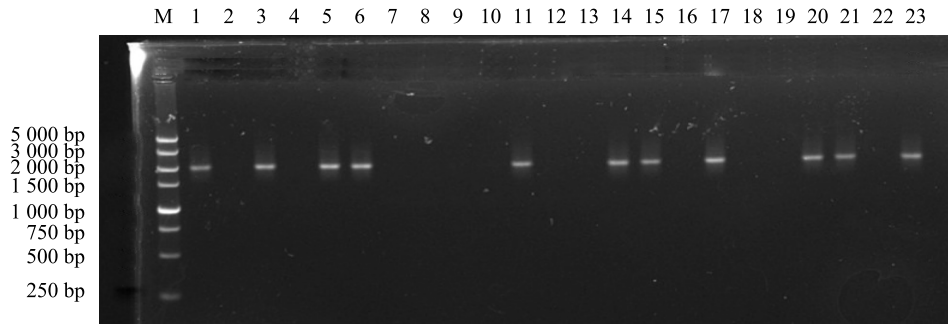
2.4.1 DNS 法测定 β -1,3-葡聚糖酶活性 以葡萄糖浓度(mg/ml)作横坐标,平均 OD_{540} 值作为纵坐标,绘制葡萄糖标准曲线,得线性回归方程为 $Y = 0.821x - 0.070$, $R^2 = 0.986$ 。结果表明,该方法在葡萄糖浓度 0~0.6 mg/ml 有良好的线性关系。

用 DNS 法测定 3 个转化株系的 β -1,3-葡聚糖酶活性。用 SPSS17.0 软件进行方差分析可知,转基因株系 EG6、EG11 和 EG17 的 β -1,3-葡聚糖酶活为 (0.301 ± 0.009) U、 (0.243 ± 0.005) U、 (0.401 ± 0.012) U,分别比未转化株系酶活 $[(0.236 \pm 0.004)$ U]高出了 1.275、1.030 和 1.699 倍。转基因株系 EG6 和 EG17 的酶活与对照存在显著性差异,而转化株 EG11 的酶活与未转化株没有显著性差异。转化株 EG6、EG11 和 EG17 之间的酶活性也有显著差异,其中转化株 EG17 的酶活性最高。结果表明,外源 β -1,3-葡聚糖酶基因在转化植株内表达,但不同转基因株系间表达量不同。

2.4.2 转基因洋桔梗离体叶片抗灰霉病鉴定 离体叶片抗灰霉病试验结果显示,接种 2 d 后,非转基因对照植株接种部位开始有病斑形成,转基因植株无病斑形成;到第 4 d 时,对照植株病斑扩大、变黑甚至腐烂。而转基因植株叶片发病程度较轻,病斑扩大速度慢,病斑面积较小(图 6)。对接种灰葡萄孢菌 4 d 后的转基因植株和非转基因对照植株的病斑面积进行统计,用 SPSS 软件进行方差分析。结果显示,转化株 EG17 的病斑面积 (0.432 cm^2) 明显小于对照 (2.156 cm^2) ,存在显著性差异;而转化株 EG6 (1.911 cm^2) 和 EG11 (2.005 cm^2) 的病斑面积虽小于对照,但没有显著性差异。

3 讨论

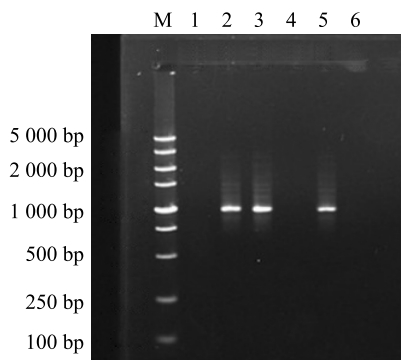
转基因植物的分子检测与鉴定是植物遗传转化中的一项重要环节。吴关庭等^[20]利用 PCR 检测和



M: 分子量标准 DL 5000; 1: 质粒 pBI121-Glu; 2: 未转化株系; 3~23: 转基因株系; 条带 3、5、6、11、14、15、17、20、21、23 分别代表转基因株系 EG5、EG6、EG11、EG14、EG15、EG17、EG20、EG21、EG23。

图 4 引物 P1 和 P2 的扩增结果

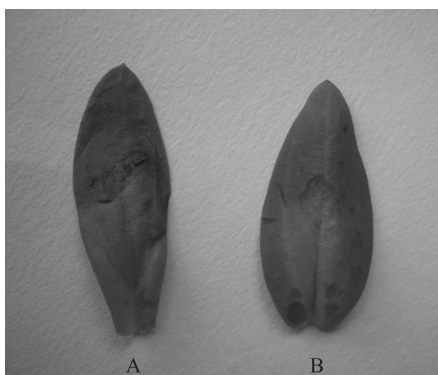
Fig.4 PCR results of primer P1 and P2



M: 分子量标准 DL5000; 1: 未转化植株; 2~6: 转化植株。

图 5 转基因植株的 RT-PCR 检测

Fig.5 RT-PCR analysis of transgenic plants



A: 对照株; B: 转基因株系 EG17。

图 6 接种灰葡萄孢菌的对照株和转基因株系 EG17 的离体叶片

Fig.6 The leaflets of control plant and transgenic line EG17 inoculated with *Botrytis cinerea*

Southern 杂交分析鉴定出转拟南芥 *CBF1* 基因耐逆性水稻; Sundaresha 等^[12] 利用 PCR、Southern 杂交和 Northern 杂交鉴定出烟草 β -1,3-葡聚糖酶基因整合

到花生基因组中并成功转录。在外源基因整合水平方面,PCR 检测快速、易于操作,只需少量材料就可以用来大批量检测抗性苗^[21],是转基因植物鉴定中最简单常用的方法。Southern 杂交可检测外源基因插入的拷贝数和插入方式,精确度高,是目前鉴定外源基因存在于转基因植物中的权威方法,然而该方法程序复杂、成本高,且对试验技术条件要求较高,不适用于大批量检测^[22]。在外源基因的转录水平方面,可用 Northern 杂交和 RT-PCR 检测,前者对 RNA 模板的需求量较大且耗时比较长,相比较而言,RT-PCR 技术操作简单、灵敏和精确^[23]。综合以上因素考虑,本试验通过 PCR 和 RT-PCR 直接确定了目的基因在洋桔梗中能否正常转录。近年来也有相关研究^[24-25] 通过 PCR 和 RT-PCR 检测来鉴定转基因植株。

Nakamura 等^[26] 将大豆 β -1,3-葡聚糖酶基因转入猕猴桃,在对其抗灰霉病鉴定中发现,3 个转基因株系 (T_2 、 T_8 、 T_{10}) 离体叶片有 2 个株系 (T_8 、 T_{10}) 病斑面积显著小于未转基因株系。Qiao 等^[27] 在农杆菌介导法转化花生的研究中,对植株离体叶片进行黑斑病抗病性鉴定,接种病原菌 14 d 后发现,未转基因株系出现严重褐变、坏死症状,而转基因株系叶片仍然保持鲜绿。本研究与以上相关研究结果相似,在对洋桔梗离体叶片进行抗灰霉病试验中发现,转基因株系的发病程度均较对照轻,表现出发病延迟、病斑面积扩大速度变慢等不同程度的抗性。抗病性鉴定结果表明,外源基因在不同受体材料或同一受体材料的不同株系里抗病能力存在较大差异,这种情况在其他一些转基因植物中也可观察

到^[28-29]。差异产生的原因可能是基因插入位点不同、外源基因整合位点的不活跃或整合后被修饰^[30-31]。

随着分子生物学和基因工程的不断发展,利用转基因技术培育新品种已成为花卉育种中一种新型而有效的手段,但国内外在洋桔梗抗真菌基因遗传转化方面未见报道。针对洋桔梗栽培过程中易遭受真菌病害感染问题,在洋桔梗叶片再生体系^[15]和遗传转化体系^[20]的基础上,本研究成功地将烟草碱性 β -1,3-葡聚糖酶基因转入目前市场上较为流行的洋桔梗品种 Double Mariachi Pink 基因组中,获得抗真菌性增强的转基因植株。这一结果为进一步选育洋桔梗抗真菌新品种奠定了重要基础。多项研究结果表明,几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶在抗真菌方面具有协同作用^[32-34]。在今后的研究中,可以考虑将这2种酶的基因共同导入洋桔梗中,提高外源基因在洋桔梗植株中的表达,从而筛选出高抗的转基因洋桔梗植株。

参考文献:

- [1] CHEN Y T, FANG Q S H, CHIANG C H, et al. Transgenic *Eustoma grandiflorum* expressing the bar gene are resistant to the herbicide Basta [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2010, 102(3): 347-356.
- [2] 李军萍,徐峥嵘,师进霖. 1-甲基环丙烯对洋桔梗切花的保鲜效应 [J]. 江苏农业科学, 2013, 41(3): 212-214.
- [3] KURODA T, KATSUBE K, SUZUKI K. Spotted wilt disease of prairie gentian [*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn] caused by tomato spotted wilt [J]. Annals of the Phytopathological Society of Japan, 1999, 65(4): 490-493.
- [4] TRUTER M, WEHNER F C. Crown and root infection of lisianthus caused by *Fusarium solani* in south Africa [J]. Plant Disease, 2004, 88(5): 573.
- [5] WOLCAN S, LORI G, RONCO L. First report of *Fusarium solani* causing stunt on lisianthus [J]. Plant Disease, 2001, 85(4): 443.
- [6] WEGULO S N, VILCHEZ M. Evaluation of lisianthus cultivars for resistance to *Botrytis cinerea* [J]. Plant Disease, 2007, 91(8): 997-1001.
- [7] GENTILE A, DENG Z, MALFA S L, et al. Enhanced resistance to *Phoma tracheiphila* and *Botrytis cinerea* in transgenic lemon plants expressing a *Trichoderma harzianum* chitinase gene [J]. Plant Breeding, 2007, 126: 146-151.
- [8] CHEN S C, LIU A R, AHAMMED G J, et al. Combined over-expression of chitinase and defensin genes in transgenic tomato enhances resistance to *Botrytis cinerea* [J]. African Journal of Biotechnology, 2009, 8(20): 5182-5188.
- [9] BALASUBRAMANIAN V, VASHISHT D, CLETUS J, et al. Plant β -1,3-glucanases: their biological functions and transgenic expression against phytopathogenic fungi [J]. Biotechnology Letters, 2012, 34: 1983-1990.
- [10] ANFOKA G, BUCHENAUER H. Systemic acquired resistance in tomato against *Phytophthora infestans* by pre-inoculation with tobacco necrosis virus [J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 1997, 50: 85-101.
- [11] LIBANTOVA J, BAUER M, MLYNAROVA L, et al. Transgenic tobacco and potato plants expressing basic vacuolar β -1,3-glucanase from *Nicotiana glauca* [J]. Biologia Bratislava, 1998, 53(6): 739-748.
- [12] SUNDARESHA S, MANOJ K A, ROHINI S. Enhanced protection against two major fungal pathogens of groundnut, *Cercospora arachidicola* and *Aspergillus flavus* in transgenic groundnut over-expressing tobacco β -1,3-glucanase [J]. European Journal of Plant Pathology, 2010, 126: 497-508.
- [13] 王转梅,陈崇顺,王 轶,等. 烟草品种 Xanthi NN 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.
- [14] 萨姆布鲁克. 分子克隆实验指南[M]. 金冬雁,译. 3版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [15] 杨燕燕,陈崇顺,瞿大枫,等. 洋桔梗高频再生系统的建立及其卡那霉素敏感性测定 [J]. 江苏农业科学, 2007(2): 98-100.
- [16] 余永廷,谢媛媛,黄丽丽,等. 不同碳、氮源组合对小麦全蚀病菌产生胞外 β -1,3-葡聚糖酶的影响 [J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版, 2007, 35(2): 110-114.
- [17] 唐 冰,夏秋瑜,李从发,等. NAG 含量测定中常见的3种DNS试剂使用效果比较研究 [J]. 热带农业科学, 2006, 26(2): 33-35.
- [18] 史益敏. 现代植物生理学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1999.
- [19] 李建广,李永红,郭徐鹏,等. 葱灰霉病原菌的培养特性及其对油菜的致病性研究 [J]. 陕西农业科学, 2013(3): 3-5.
- [20] 吴关庭,朗春秀,胡张华. 转 *CBF1* 基因增强水稻的耐逆性 [J]. 核农学报, 2006, 20(3): 169-173.
- [21] 阎新甫. 转基因植物[M]. 北京: 科学出版社, 2003.
- [22] 贺熙勇,陈善春,彭爱红. 转基因植物的分子检测与鉴定方法及进展 [J]. 热带农业科技, 2008, 31(1): 39-52.
- [23] DEAN J D, GOODWIN P H, HSIANG T. Comparison of relative RT-PCR and northern blot analyses to measure expression of β -1,3-glucanase in *Nicotiana benthamiana* infected with *Colletotrichum destructivum* [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2002, 20: 347-356.
- [24] 唐立邨,朱延明,才 华,等. *GsZFP1* 基因植物表达载体构建及对苜蓿的遗传转化 [J]. 作物杂志, 2012(4): 41-44.
- [25] 于 森,刘兆磊,陈素梅,等. 转 *PGIP* 基因增强菊花抗病性研究 [J]. 西北植物学报, 2010, 30(6): 1111-1116.
- [26] NAKAMURA Y, SAWADA H, KOBAYASHI S, et al. Expression

- of soybean β -1,3-endoglucanase cDNA and effect on disease tolerance in kiwifruit plants [J]. Plant Cell Reports, 1999, 18: 527-532.
- [27] QIAO L X, DING X, WANG H C, et al. Characterization of the β -1,3-glucanase gene in peanut (*Arachis hypogaea* L.) by cloning and genetic transformation [J]. Genetics and Molecular Research, 2014, 13(1): 1893-1904.
- [28] LI X B, MAO H Z, BAI Y Y. Transgenic plants of rutabaga (*Brassica napobrassica*) tolerant to pest insects [J]. Plant Cell Reports, 1995, 15(1-2): 97-101.
- [29] 毛慧珠, 唐 惕, 曹湘玲. 抗虫转基因甘蓝及其后代的研究 [J]. 中国科学, 1996, 26(4): 339-347.
- [30] 李学宝, 秦明辉, 施荣华. 芥菜型油菜抗虫转基因植株及其后代株系的研究 [J]. 生物工程学报, 1999, 15(4): 482-488.
- [31] 王庆菊, 周 泳, 李 海, 等. 红豆越桔 *VvDREB1* 基因转化烟草的研究 [J]. 西北植物学报, 2010, 30(7): 1309-1315.
- [32] SRIDEVI G, PARAMESWARI C, SABAPATHI N, et al. Combined expression of chitinase and β -1,3-glucanase genes in indica rice (*Oryza sativa* L.) enhances resistance against *Rhizoctonia solani* [J]. Plant Science, 2008, 175: 283-290.
- [33] AMIAN A A, PAPENBROCK J, JACOBSEN H J, et al. Enhancing transgenic pea (*Pisum sativum* L.) resistance against fungal diseases through stacking of two antifungal genes (*Chitinase* and *Glucanase*) [J]. GM Crops, 2011, 2: 104-109.
- [34] NOOKARAJU A, AGRAWAL D C. Enhanced tolerance of transgenic grapevines expressing chitinase and β -1,3-glucanase genes to downy mildew [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2012, 111(1): 15-28.

(责任编辑:袁 伟)