

NPR1 和 *Defensin* 双价抗病基因过量表达载体构建及其对沙田柚的遗传转化

穆一帆¹, 钟广炎^{2*}, 高峰^{1*}, 钟云², 胡敏伦², 闫化学², 姜波², 吴波²

(1. 广东省植物发育生物工程重点实验室, 华南师范大学生命科学学院, 广州 510631; 2. 广东省农业科学院果树研究所, 广州 510640)

摘要:通过 PCR 技术, 从克里曼丁橘和荔枝品种“三月红”叶片中克隆获得了 *NPR1* 和 *Defensin* 基因序列. 以 pBI-121 作为载体骨架, 构建了 *NPR1* 和 *Defensin* 双价抗病基因过量表达载体, 命名为 ND-pBI121. 通过根瘤农杆菌介导的遗传转化, 获得了 6 株 PCR 检测为阳性的双抗沙田柚植株, 为探究 *NPR1* 和 *Defensin* 基因的过量表达对柑橘黄龙病的抗性影响提供试材.

关键词:抗病基因; 过表达载体; 柑橘黄龙病; 遗传转化; 沙田柚

中图分类号: S666.3; Q785

文献标志码: A

文章编号: 1000-5463(2017)06-0060-05

Construction of Bivalent Over-Expression Vector of the *NPR1* and *Defensin* Genes and its Transformation into Shatianyou Pummelo (*Citrus grandis* (L.) Osbeck)

MU Yifan¹, ZHONG Guangyan^{2*}, GAO Feng^{1*}, ZHONG Yun², HU Minlun², YAN Huaxue², JIANG Bo², WU Bo²

(1. Guangdong Provincial Key Laboratory of Biotechnology for Plant Development, School of Life Sciences, South China Normal University, Guangzhou 510631, China; 2. Institute of Fruit Tree Research, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China)

Abstract: To improve the disease resistance of Shatianyou Pummelo (*Citrus grandis* L. Osbeck) to Huanglongbing, the open reading frames of *NPR1* and *Defensin* genes were obtained by PCR from the leaf genomic DNA of *Citrus clementina* and lich cv. “Red March”, respectively, and were cloned into the binary vector pBI 121. The recombinant plasmid harboring both genes of *NPR1* and *Defensin*, named ND-PBI 121, was successfully constructed, and was transformed into Shatianyou Pummelo by the *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation. Six transformed plants were obtained. The results provide the basis for study of the function of *NPR1* and *Defensin* on the resistance of Shatianyou Pummelo to Citrus Huanglongbing.

Key words: disease resistance gene; over-expression vector; citrus huanglongbing; genetic transformation; *Citrus grandis*(L.) osbeck cv. ‘Shatianyou’

柑橘黄龙病(Citrus Huanglongbing, HLB)是一种由革兰氏阴性细菌引起的植物病害,病株果实常表现为青果,果汁味酸、淡,果实中心柱不正^[1]. 此外,病株的种子质量减轻,多败育且萌发率降低^[2]. 随着近年来柑橘黄龙病在全球范围内的爆发,对该病的防治受到了广泛的关注,但目前尚无有效的防治方法^[3]. 黄龙病病原菌不能分离纯化培养的特性对该病的研究和防治造成了严重的阻碍^[4],传统的防治方法:培育无毒苗、铲除病树、防控木虱,无法从根本上解决黄龙病的爆发^[5]. 因此,抗性育种材料的筛选和培育至关

重要^[6],远缘植物中抗性基因的利用可望为黄龙病的防治提供一条新的途径.

病程相关非表达子 1(Nonexpressor of Pathogenesis Related Genes 1, *NPR1*)具有广谱抗性,在植物系统获得抗性(Systemic Acquired Resistance, SAR)、诱导系统抗性(Induced Systemic Resistance, ISR)中起核心调控作用,是多种抗病途径中的关键节点^[7]. CAO 等^[8]发现,缺失 *NPR1* 基因的拟南芥突变植株对各种 SAR 诱导物不能做出应答反应,同时对病原微生物感染的敏感性显著提高. 随后在不同植物物

种中克隆得到了 *NPR1* 基因及其同源基因,并且证实 *NPR1* 基因能增强水稻^[9]和玉米^[10]等作物的抗病能力。

植物防御素(Defensin)是植物体在受到病原体感染时所产生的一种拮抗物质,是一类富含半胱氨酸的小分子多肽,对细菌等微生物具有广谱抗性^[11]。来源不同的植物防御素的抗菌作用机制与抗菌广谱性不尽相同,其抗菌作用机制主要有2种:一种机制是与细胞膜上的脂类相互作用,诱导细胞膜结构和通透性改变的^[12-13],从而导致细胞膜结构的改变,原生质体的泄露和电化学势的失衡;一种机制是与细胞内的复合物结合,该方式的作用机制还有待研究^[14]。

2015年DUTT等^[15]发现,导入拟南芥 *NPR1* 基因的甜橙转基因植株对黄龙病的抗性增强。此外,对已经分离得到的植物防御素(Defensin)进行分类的研究发现,部分 Defensin 能够抑制革兰氏阴性细菌的生长^[16]。有研究^[17]表明,荔枝鲜有革兰氏阴性菌引起的病害发生,据此推测荔枝对细菌侵染性疾病具有一定的抗性。本实验拟采用基因工程技术构建柑橘 *NPR1* 和荔枝 *Defensin* 双价抗病基因过量表达载体并转化柑橘柚类优良品种“沙田柚”,为探究 *NPR1* 和 *Defensin* 基因的过量表达对柑橘黄龙病的抗性影响提供试材及技术基础。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

实验材料:克里曼丁橘(*Citrus reticulata* Blanco cv. Clementine)叶片,取自广东省农业科学院果树研究所;荔枝(*Litchi chinensis* Sonn.),品种“三月红”的叶片,分别作为提取基因组DNA的材料;沙田柚(*Citrus grandis* (L.) Osbeck cv. Shatianyou)果实购自广东梅龙柚果股份有限公司,作为遗传转化受体。

实验试剂:Ex Taq 酶、PrimeSTARMax Premix、PCR 纯化试剂盒、DNA 胶回收试剂盒、质粒提取试

剂盒、DNA Marker、ClonExpressII One Step Cloning Kit 试剂盒、购于 TaKaRa 生物工程有限公司。BamH I、Sac I 限制性内切酶购自 NEB 公司。植物 DNA 提取试剂盒购自东盛生物技术有限公司。用于载体构建的连接载体 pBI-121 和大肠杆菌菌株 DH5 α 的感受态细胞、卡纳霉素(Kanamycin, Kan)、利福平(Rifampin, Rif)、链霉素(Streptomycin, Str)购于北京全式金生物技术有限公司。用于启动子克隆的 pFGC5941 载体购于瑞真生物工程有限公司。

实验仪器:电泳系统(ATTO, AE-6111);PCR 仪(Biometra);凝胶成像系统(UVP, LMS-26E);

1.2 方法

1.2.1 基因组总 DNA 的提取 按照 DNA 快速提取试剂盒的说明书提取柑橘品种“克里曼丁橘”和荔枝品种“三月红”的叶片总 DNA,经过琼脂糖凝胶电泳检测后,保存于-20℃冰箱中备用。

1.2.2 引物的设计与合成 分别从在线网站 <http://citrus.hzau.edu.cn/orange/index.php> 中下载得到甜橙 *NPR1* 基因序列(*ctNPR1*);从 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中下载菠菜 *Defensin* 基因序列,与荔枝品种“三月红”的基因组序列比对,得到一段同源序列并命名为 *DF-1*;从 NCBI 网站中下载 pBI-121 载体编码序列,以及 pFGC5941 载体上的启动子(35S-PR)和终止子(TER-1)序列。利用 Primer 5 设计 *NPR1*、TER-1、35S-PR、DF-1 等4个片段的特异性扩增引物(表1)。根据 ClonExpressII One Step Cloning Kit 试剂盒提供的连接方法,在 *ctNPR1* 的正向引物与 *DF-1* 的反向引物中的5'端分别引入线性化克隆载体酶切位点末端序列,使得插入片段的 PCR 产物5'和3'最末端分别带有和线性化克隆载体两末端对应的完全一致的序列(15~20 bp),再按照上述4个片段的排列顺序分别在各片段正向引物的5'端添加前一个片段的3'端同源序列(15~20 bp),反向引物的5'端添加后一个片段的5'端同源序列,引物序列由生工生物工程有限公司合成。

表1 基因克隆及转基因植株检测所用引物

Table 1 Primers used for gene cloning and detection of transgenic plants

引物名	正向序列(F)	反向序列(R)
<i>ctNPR1</i>	5'-GGAGAGAACACGGGGACTCTAGAGGATCCAT-GGATAACAGAAGTGGGTTCTCG-3'	5'-AGCAGGTCAATGAGGTTTCCACCATAA-3'
TER-1	5'-GCAAACCTCATTGACCTGCTTTAATGAGATAT-GCGAGA-3'	5'-TTGTGGGATTGGATCTGCTGAGCCTCGACATG-3'
35S-PR	5'-AGCAGGATCCAATCCCACAAAAATCTGAGC-3'	5'-CCATCGTGTCTCTCCAAATGAAATGA-3'
DF-1	5'-ATTTGGAGAGGACACGATGGCCAAGACTCTCCT-ATCTGTT-3'	5'-ATGTTTGAACGATCGGGAAATTCGAGCTCTCAA-CCAGATTTCTGATCATTTTTCT-3'

1.2.3 目的片段的扩增及测序 分别以克里曼丁橘总 DNA、pFGC5941 载体、荔枝“三月红”总 DNA 为模板,利用上述引物扩增进行第一轮扩增,得到 *ctNPR1* (1784 bp)、*TER-1* (738 bp)、*35S-PR* (1343 bp) 与 *DF-1* (313 bp) DNA 片段. 反应体系 25 μ L, 其中模板 DNA 1 μ L, 正反扩增引物各 1 μ L, Prime STAR Max Premix 12.5 μ L, 然后加双蒸水补足至 25 μ L, PCR 扩增程序: 94 $^{\circ}$ C 下预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 63 $^{\circ}$ C 退火 10 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 20 s, 循环 34 次; 72 $^{\circ}$ C 延伸 3 min. 反应产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测. 以第 1 轮的 4 段扩增产物为模板, 以 *ctNPR1* F 作为上游引物, *DF-1* R 作为下游引物进行第 2 轮扩增, 利用各片段两端的重复序列连接 4 个 DNA 片段. 反应同样采用 25 μ L 体系, 连接后的目的片段理论长度为 4 119 bp. 在循环仪上进行扩增. 第 2 轮反应产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 选择与目的片段大小一致的条带进行胶回收, 所得 PCR 产物与胶回收产物测序.

1.2.4 *ctNPR1* 和 *DF-1* 双价抗病基因过量表达载体的构建及农杆菌转化 经 *Bam*H I 和 *Sac* I 双酶切的载体 pBI-121 在电泳后将载体骨架从胶中回收、纯化. 连接测序后的目的片段和线性化载体, 获得 *ctNPR1* 和 *DF-1* 双价抗病基因过量表达载体, 命名为 ND-pBI121. 用 ND-pBI121 转化 DH5 α 大肠杆菌感受态细胞, 在含有 Kan 的 LB 平板上培养. 正常生长的阳性克隆菌斑经 PCR 检测后, 在含有 Kan 的液体 LB 培养基中培养过夜, 抽提质粒. 所得质粒经目的基因特异引物 *ctNPR1* (F/R) PCR 鉴定为阳性后, 将重组质粒用化学法转入根癌农杆菌 EHA105, 在含有 Kan、Rif、Str 的 LB 平板上培养, 所得克隆菌斑进行 PCR 阳性鉴定, 用于沙田柚的遗传转化.

1.2.5 ND-pBI121 在沙田柚幼苗中的遗传转化 将沙田柚上胚轴斜切成 1~2 cm 小段的外植体用于农杆菌转染, 农杆菌转染柑橘上胚轴具体的方法步骤参考贝学军^[18]和胡新喜等^[19]的方法. 上胚轴愈伤组织分化出的抗性再生芽长到 2 cm, 并在生根培养基中培养至叶片颜色深绿后用于嫁接. 待嫁接成活的幼芽长出 5~6 片幼叶时, 取新生叶片提取总 DNA, 使用引物 *ctNPR1* F、*DF-1* R 进行 PCR 检测.

2 结果与分析

2.1 目的片段的扩增与连接

以甜橙总 DNA、pFGC5941 载体、三月红荔枝总 DNA 为模板, 通过第 1 轮 PCR 扩增出 *ctNPR1* (1 784 bp)、*TER-1* (738 bp)、*35S-PR* (1 343 bp) 与 *DF-1* (313 bp) DNA 片段, 经凝胶电泳检测, 获得条带大小与预测条带大小一致(图 1A). 以第 1 轮 PCR 扩增产

物为模板, 扩增出一条大小约为 4 000 bp 的条带(图 1B), 目的片段预测为 4 119 bp, 基本符合, 将其进行胶回收并纯化后测序, 测序结果与该片段的预期序列进行比对, 结果基本一致, 仅在 35S 启动子的非保守区域有个别碱基错配发生, 对目的片段的表达并无影响.

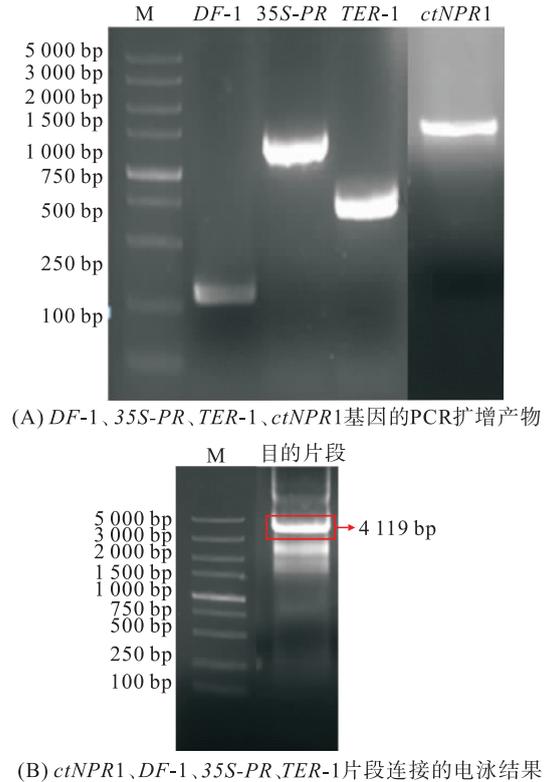


图 1 目的片段扩增及连接产物的电泳结果

Figure 1 Electrophoresis analysis of target fragments (A) amplified from the ligated product (B)

注: M 为 DL5000 DNA marker.

2.2 *ctNPR1* 和 *DF-1* 双价抗病基因过量表达载体的构建

用限制性内切酶 *Bam*H I、*Sac* I 对载体 pBI-121 进行双酶切, 得到 2 个片段, 分别为大小约为 12 000 bp 的载体骨架序列和大小约为 2 000 bp 的小片段(图 2A), 符合预期大小. 将 pBI-121 骨架序列回收后与目的片段根据同源重组的方法连接为重组质粒并转化大肠杆菌. 获得的阳性克隆使用基因特异引物 *ctNPR1* (F/R) PCR 检测验证后进行菌液培养, 提取质粒, 再次进行 PCR 验证, 结果与预期相符(图 2B), 表明已成功获得 *ctNPR1* 和 *DF-1* 双价抗病基因过量表达载体, 命名为 ND-pBI121.

2.3 根癌农杆菌工程菌及拟转基因植株获得

将重组质粒 ND-pBI121 用化学法转入根癌农杆菌 EHA105, 获得过量表达 *ctNPR1* 和 *DF-1* 的农杆菌工程菌, 随机挑选 4~5 个菌斑进行菌液 PCR 检测, 其检测结果均为阳性(图 3A). 表明已成功获

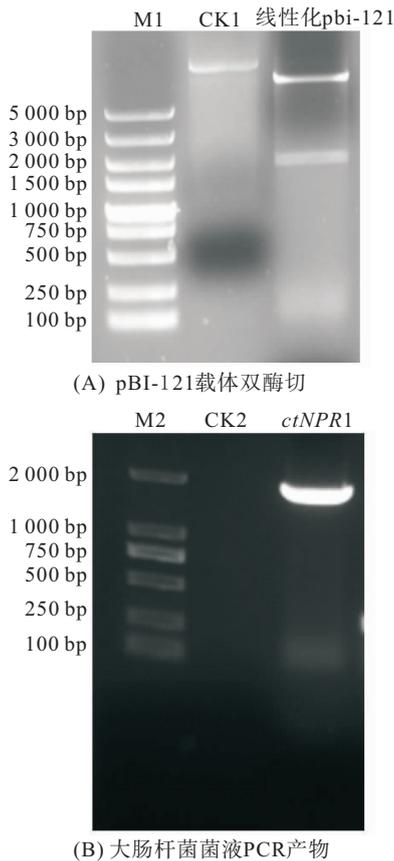


图2 线性化载体与农杆菌阳性鉴定的电泳结果

Figure 2 Linearized pBI 121 vector (A) and identification of positive transformed *Agrobacterium* (B)

注: M1 为 DL5000 DNA marker, M2 为 DL2000 DNA marker, CK1 为未酶切的 pBI-121 载体, CK2 为阴性对照。

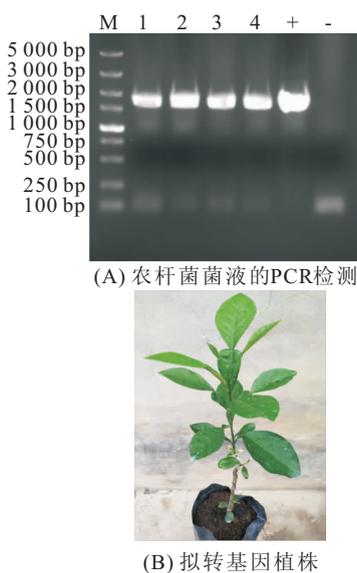


图3 ND-pBI121 农杆菌菌液的 PCR 检测及拟转基因植株
Figure 3 PCR detection of ND-pBI121 *Agrobacterium* liquid and transgenic plant

注: M1 为 DL5000 DNA marker, 1~4 为随机挑选的 EHA105 菌斑菌液 PCR 的结果, “+”为阳性对照, “-”为阴性对照。

得转入 ND-pBI121 表达载体的农杆菌菌株. 将沙田柚幼苗的上胚轴与 PCR 检测结果为阳性的根癌农杆菌共培养, 一共获得了 7 株抗性芽(分别编号为 ND1~ND7). 将抗性芽嫁接至沙田柚的砧木, 成活后获得了拟转基因植株(图 3B).

2.4 沙田柚转基因植株的鉴定

用 7 株拟转基因植株叶片提取总 DNA 进行 PCR 检测, 引物为 *ctNPR1* F、*DF-1* R, 结果显示 ND1~ND5 和 ND7 为阳性(图 4). 说明, 这 6 株为导入了 *ctNPR1* 和 *DF-1* 基因的转基因植株。

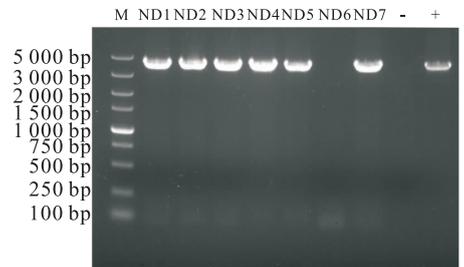


图4 拟转基因沙田柚植株的 PCR 检测

Figure 4 Identification of transgenic plants of Shatianyou
注: M 为 DL5000 DNA marker, “-”为阴性对照, “+”为阳性对照。

3 讨论

笔者成功构建了 *ctNPR1* 和 *DF-1* 双价抗病基因的过量表达载体 ND-pBI121, 并导入大肠杆菌中保存. 经 PCR 检测为阳性后, 转入根癌农杆菌. 通过根癌农杆菌介导的遗传转化, 获得了 6 株经 PCR 检测证实为阳性的沙田柚转基因植株. 本实验的结果将为探究 *ctNPR1* 和 *DF-1* 的过量表达对柑橘黄龙病的抗性影响提供理想试材。

由于单个抗病基因选择性抑菌以及抗病谱窄等原因, 很难获得效果理想的转基因植株, 为提高转基因植物的广谱抗病性和持久性, 更好地抵御不同病害, 就需要同时转入一个以上具有广谱抗性的抗病基因^[20]. 已有实验证明, 拟南芥的 *NPR1* 基因可使柑橘对黄龙病的抗性提高, 但是提高的程度并不显著, 无法起到明显的防治效果^[15], 因此尝试多基因的导入模式对柑橘的抗黄龙病分子育种具有重大意义. 本文选择来源于柑橘的 *NPR1* 基因和来源于抗病性较强的荔枝的 *Defensin* 基因为操作对象, 构建获得了双价抗病基因过量表达载体, 以期获得能够更加有效的抵抗黄龙病的柑橘品种。

后续试验中需要扩大培养, 获得更多转基因植株, 并对获得的转基因植株进行黄龙病抗性评价, 同时与单一转入柑橘 *NPR1* 基因的沙田柚植株进行对比, 以验证多基因导入模式的可行性, 为在分子层面探究如何增强柑橘对黄龙病的抗性提供了更多的可

能. 这在柑橘产业的健康发展受到黄龙病严重影响的大环境下, 对防治黄龙病、加强抗性育种材料的筛选和利用具有重大意义.

参考文献:

- [1] ZHONG Y, JIANG B, GAN J Y et al. Construction and analysis of subtractive cDNA library from ponkan (*Citrus reticulata*) leaves following infection with Honglongbin pathogen[J]. Journal of Fruit Science, 2012, 29 (3): 416-422.
- [2] DAGULO L, DANYLUK M D. Chemical characterization of orange juice from trees infected with citrus greening Huanglongbing[J]. Journal of Food Science, 2010, 75 (2): 199-207.
- [3] ZHONG Y, CHENG C Z, JIANG N H, et al. Comparative transcriptome and iTRAQ proteome analyses of citrus root responses to *Candidatus Liberibacter asiaticus* infection [J]. Plos One, 2015, 10(6): e0126973.
- [4] BOVE J M. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus [J]. Journal of Plant Pathology, 2006, 88(1): 7-37.
- [5] YUN Z, CHENG C, BO J, et al. Digital gene expression analysis of ponkan Mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) in response to Asia Citrus Psyllid-Vectored Huanglongbing infection [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17(7): 1063.
- [6] 程春振, 曾继吾, 钟云, 等. 柑橘黄龙病研究进展[J]. 园艺学报, 2013, 40(9): 1656-1668.
CHENG C Z, ZENG J W, ZHONG Y, et al. Research progress on Citrus Huanglongbing disease [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2013, 40(9): 1656-1668.
- [7] 张红志, 蔡新忠. 病程相关基因非表达子 1 (*NPR1*): 植物抗病信号网络中的关键节点 [J]. 生物工程学报, 2005, 21(4): 511-515.
ZHANG Z H, CAI X Z. Nonexpressor of pathogenesis-related Genes 1 (*NPR1*): a key node of plant disease resistance signalling network [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2005, 21(4): 511-515.
- [8] CAO H, BOWLING S A, GORDON A S, et al. Characterization of an Arabidopsis mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance [J]. Plant Cell, 1994, 6: 1583-1592.
- [9] 罗雪梅, 罗荡平, 曹启龙, 等. 转拟南芥 *NPR1* 基因水稻 253T3 代株系对水稻白叶枯病的抗性及其农艺性状表现 [J]. 南方农业学报, 2012, 43(4): 417-420.
LUO X M, LUO D P, CAO Q L, et al. Agronomic traits and rice bacterial blight disease resistance in T3 generation lines of rice cultivar 253 over-expressing Arabidopsis thaliana *NPR1* gene [J]. Journal of Southern Agriculture, 2012, 43(4): 417-420.
- [10] 李小军. 农杆菌介导 *NPR1* 基因转化祖安花的研究 [D]. 上海: 上海师范大学, 2005.
- [11] 傅荣昭, 李文彬, 孙勇如. 防御素 (Defense) 的研究进展 [J]. 农业生物技术学报, 1996, 4(4): 348-351.
FU R Z, LI W B, SUN Y R. Advances in the research of defensins [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 1996, 4(4): 348-351.
- [12] AERTS A M, FRANCOIS I E, CAMMUE B P, et al. The mode of antifungal action of plant, insect and human defensins [J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2008, 65(13): 2069-2079.
- [13] 张宏, 胡春香, 张德禄, 等. 植物防御素研究进展 [J]. 西北师范大学学报(自然科学版), 2006, 42(5): 112-117.
ZHANG H, HU C, ZHANG D L, et al. The research progress on plant defensins [J]. Journal of Northwest Normal University (Natural Science), 2006, 42(5): 112-117.
- [14] 付蓝宝, 于嘉林. 防御素的生物学特性及其抗病基因工程 [J]. 遗传, 2011, 33(5): 512-519.
FU L B, YU J L. Biological characteristics of defensin and its disease-resistance genetic engineering [J]. Hereditas, 2011, 33(5): 512-519.
- [15] DUTT M, BARTHE G, IREY M, et al. Correction: transgenic citrus expressing an arabidopsis *NPR1* gene exhibit enhanced resistance against Huanglongbing (HLB; Citrus Greening) [J]. Plos One, 2015, 10(9): e0137134.
- [16] 廖乾生, 林福呈, 李德葆. 植物防御素及其研究进展 [J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2003, 29(1): 113-118.
LIAO Q S, LIN F C, LI D B. The research progress of plant defensins [J]. Journal of Zhejiang University (Agriculture and Life Sciences), 2003, 29(1): 113-118.
- [17] 张新春, 高兆银, 肖茜, 等. 中国荔枝病原真菌分离和鉴定 [J]. 广东农业科学, 2014, 41(16): 81-84.
ZHANG X C, GAO Z Y, XIAO Q, et al. Isolation and identification of pathogen fungi species of litchi in China [J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2014, 41(16): 81-84.
- [18] 贝学军. 伏令夏橙伤害诱导蛋白基因功能解析 [D]. 重庆: 西南大学, 2012.
BEI X J. Valencia damage induced protein gene function analysis [D]. Chongqing: Southwestern University, 2012.
- [19] 胡新喜, 敖小平, 邓子牛, 等. 沙田柚遗传转化再生体系的建立 [J]. 中国农学通报, 2010, 26(7): 177-180.
HU X X, AO X P, DENG Z N, et al. Establishment of regeneration system for genetic transformation of *Citrus grandis* Osbeck cv. Shatianyou [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2010, 26(7): 177-180.
- [20] 陈英, 戴咏梅, 黄敏仁, 等. 双价抗病基因植物表达载体构建及在烟草中表达的初步研究 [J]. 林业科学, 2005, 41(5): 81-85.
CHEN Y, DAI Y M, HUANG M R, et al. Vector construction with two disease-resistance genes and their expression in transgenic tobacco [J]. Science Silvia Science, 2005, 41(5): 81-85.