

两个棉花几丁质酶基因的克隆与表达分析

杨郁文, 张保龙, 倪万潮*, 沈新莲, 张香桂, 徐英俊

(江苏省农业科学院农业生物技术研究所, 江苏南京 210014)

摘要:从棉花黄萎病缩减杂交库中得到了分属Ⅲ型和Ⅳ型几丁质酶的两个片段,它们都具有完整的3'末端。通过RACE与RT-PCR结合获得了这2个基因完整的读码框序列。其中Ⅳ型几丁质酶的开放读码框为678 bp,编码长为226个氨基酸的蛋白,命名为*Ghachi1*;Ⅲ型几丁质酶的全长为1390 bp,编码长为298个氨基酸的蛋白,命名为*Ghachi3*。它们与拟南芥同源基因的相似性分别达到65%和71%。利用网上分析软件发现这2个基因都有信号肽序列,并预测编码的蛋白位于胞质体外。半定量RT-PCR发现*Ghachi3*在花、蕾和韧皮部中的表达量较高,而*Ghachi4*在韧皮部表达量最高。*Ghachi4*仅在抗病品种受黄萎病和枯萎病的诱导后表达上调,而*Ghachi3*还在感病品种中受黄萎病的诱导表达。同时,在常抗棉中2个基因的表达都受到ABA的强烈诱导。推测这2个基因可能参与生物胁迫或非生物胁迫的防御反应。

关键词:棉花;几丁质酶;基因表达

中图分类号:S562.035.3;Q785 **文献标识码:**A

文章编号:1002-7807(2008)02-0088-06

Molecular Cloning and Expression Analysis of Two Chitinase in Upland Cotton

YANG Yu-wen, ZHANG Bao-long, NI Wan-chao*, SHEN Xin-lian, ZHANG Xiang-gui, XU Ying-jun

(Institute of Agriculture Biotechnology, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: ESTs encoding class III and class IV chitinase respectively were isolated from the SSH library inoculated with *Verticillium* wilt. Both of them contained full 3' end and their full open reading frame were obtained by RACE and RT-PCR. As a result, the entire coding region of class III and class IV chitinase is 1390 bp and 678 bp respectively and encodes a polypeptide of 298 and 226 amino acids. The polypeptide encoded by these two genes shared 71% and 65% homology to their homologous proteins of *Arabidopsis*. They were designated as *Ghachi3* and *Ghachi4*. All of these two genes have signal peptide and were predicted to be extracellular chitinase. *Ghachi3* were abundant in petals, buds and phloem, whereas *Ghachi4* only showed an extremely high level in phloem by semi-quantitative RT-PCR. The accumulation of *Ghachi4* increased remarkably after treatment of *Verticillium* wilt and *Fusarium* wilt in the disease resistant cultivar exclusively. But *Ghachi3* was also induced by *Verticillium* wilt in the susceptible cultivar. In addition, the expression of both the two genes increased remarkably after treatment of ABA. All the results indicated that these two genes might play roles in response to biotic and abiotic stresses.

Key words: upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.); Chitinase; gene expression

几丁质酶是高等植物中普遍存在的一种与抗真菌病害有关的酶。其表达水平不仅受到病原真菌、真菌细胞壁组分、细菌、病毒的诱导表达,还受

到乙烯、水杨酸、重金属、紫外光、某些盐溶液、臭氧以及伤害等因素的诱导^[1]。围绕几丁质酶的研究一直是植物抗病研究中的热点。目前,从拟

南芥、菜豆、玉米、花生、矮牵牛、马铃薯、油菜、小麦、水稻中已经克隆得到了大量的几丁质酶基因^[2]。另外,利用转几丁质酶基因创建抗病材料已经在多种作物中进行尝试,并取得了一定的效果^[3]。吴家和等将维管束特异启动子启动的几丁质酶和 CaMV35S 启动的 β -1,3-葡聚糖酶嵌合双价基因,导入陆地棉中,发现转化株系均表现出不同程度的抗或耐黄萎病性状^[4-7]。Neuhaus 等根据结构特征将植物中的几丁质酶分为 6 类^[8]。并且不同种类的几丁质酶的表达、在抗病过程中所起的作用以及亚细胞定位是不同的。其中,Ⅰ型和Ⅴ型几丁质酶定位于液泡内,而其它类型的几丁质酶位于胞质体外。目前从陆地棉中获得了 3 类几丁质酶,分别为Ⅰ型、Ⅱ型以及Ⅶ型^[9-11]。其中Ⅶ型几丁质酶的氨基酸序列与Ⅰ和Ⅱ型几丁质酶的相似性仅有 30%,并且其结构特征也不能归属到之前划分的 6 类几丁质酶中去。所以被认为是一个新型的几丁质酶(Ⅶ型)。而关于其它类型的几丁质酶还没有任何报道。本研究从抗病品种常抗棉的黄萎病缩减杂交库中得到了两个分属Ⅲ型和Ⅳ型几丁质酶的片段出发,获得常抗棉中这两个基因的全长序列,并进而分析这两个基因在棉花不同组织中的表达情况,以及它们在受到不同诱导因素后基因的表达情况。

1 材料和方法

1.1 实验材料

抗黄萎病和枯萎病材料常抗棉以及感病材料 2524 (*Gossypium hirsutum* L.)。于常抗棉材料植株上,采集植株的花蕾、花瓣、子房、根、韧皮部、木质部、纤维和种子。用 CTAB 法提取总 RNA^[12]。

1.2 材料处理

将脱绒棉花种子直播于营养土中。待棉苗长到 2~3 片真叶时进行处理。对抗病和感病的两种材料分别进行枯萎和黄萎病诱导处理,诱导方法都为分生孢子悬浮液蘸根法。所用的黄萎病病原菌 T9 是一强致病性落叶型黄萎病菌株^[13]。枯萎病病原菌为江苏地区强致病力菌株^[14]。两种病原菌的诱导时间都为 48 h。另外,盐胁迫处理用 250 mM NaCl 溶液直接浇灌棉株;冷胁迫处理将棉株置于 4℃ 生长;ABA 处理用 15 mg·L⁻¹ 的 ABA 溶液直接喷洒植株;干旱处理用 20% 的 PEG8000 浇灌棉株,所有处理时间都为 12 h,取诱导后和未诱导的植物叶片,迅速置于液氮中,-70℃ 存放备用。

1.3 引物设计和序列比较分析

利用 primer 5.0 进行引物设计,DNA CLUB 进行序列的开放阅读框分析,DNA MAN 进行序列相似性分析。

1.4 全长基因的获取

用黄萎病诱导后 48 h 的常抗棉和未诱导的植株做抑制缩减杂交,得到了两个分属Ⅲ型和Ⅳ型的几丁质酶基因的 EST 序列,它们都具有完整的 3' 末端。根据获得的 EST 序列,设计 5' RACE 引物,其中扩增Ⅲ型几丁质酶所设计的 5' RACE 引物为:Hev265:5' GTCTTTGGTGTTCGCCGAAGCGTAT 3', Hev59 5' CTGACCAGCCTCAATATCAAAATC 3'; 5' RACE 方法参照 CLONTECH 公司的“SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit”的说明书进行。在进行 RACE 时,用反转录产物作为模板,先用外侧引物进行扩增,再用内侧引物进行巢式 PCR 扩增。同时设置单引物对照。然后,根据 5' RACE 获得的序列设计 RT-PCR 引物 Chi150:5' TACGCAGACTTGAGAAGACTTTGGT 3' 与 UPM 引物配对扩增基因的全长序列。RT-PCR 方法参照 CLONTECH 公司的“SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit”的说明书中 3' RACE 方法进行。由于网上 EST 库中有具有完整开放读码框的Ⅳ型几丁质酶 EST 序列,根据它们设计引物 Chi42:5' AGGTATCCTTGAAATGGAGTCCTT 3' 与 UPM 配对从常抗棉中获得该基因的全长序列。割胶回收扩增产物。回收产物连接到 pGEM-T easy 载体上(Promega 公司)。连接产物用 JM109B 感受态细胞进行热激转化。克隆的测序由上海英俊生物工程有限公司进行。

1.5 克隆的生物信息学分析

利用网上数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 进行 BLAST 分析。数据库 ExPASy (<http://cn.expasy.org/>) 进行蛋白等电点以及分子量的相关分析。用 CBS(Center for Biological Sequence analysis)进行蛋白的亚细胞定位及信号肽分析 (<http://genome.cbs.dtu.dk/services/TargetP>, <http://genome.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)。

1.6 半定量 RT-PCR

用 RQ1 DNase(Promega 公司)处理棉花各器官的总 RNA,cDNA 第一链的制备方法如上。用于半定量 RT-PCR 的基因特异引物为:Ⅲ型几丁质酶:Chi150,Chi1200:5' GACCGCGTTAAGGCAGTGTCTTTT 3',Ⅳ型几丁质酶:Chi42,Chi294 5'TGAGGTGAAACAATGGAG-

GCAACTG 3'。根据持家基因组蛋白设计的引物 HF:5'GAAGCCTCATCGATACCGTC 3'和 HR:5'CTACCACTACCATCATGGC 3'作为 cDNA 含量参照以及检测是否有 DNA 污染。

2 结果与分析

2.1 几丁质酶全长基因的分离

通过缩减杂交获得了两个 EST 序列,其中一个 EST 序列长为 584 bp,编码的氨基酸序列与拟南芥的 III 型酸性几丁质酶(登录号: BAA21873)有 71%的相似性。另一个 EST 序列编码的氨基酸序列与拟南芥的 IV 型几丁质酶(登录号: NP191010)有 56%的相似性。搜索网上 EST 库发现有与它们同源的 EST 序列,并且编码 IV 型几丁质酶的 EST 序列具有完整的开放读码框(登录号: DN827689)。根据此 EST 序列设计引物进行 RT-PCR 从常抗棉中直接获取 IV 型几丁质酶的基因序列。结果获得的常抗棉 IV 型几丁质酶的开放读码框为 678 bp,编码长为 226 个氨基酸的蛋白。与已经登陆的 EST 序列相似性达到 99%,所以

没有将此序列登陆,在本研究将该基因被命名为 *Ghachi4*。

根据获得的编码 III 型几丁质酶的 EST 片段设计引物进行 5'RACE,获得了长约 750 bp 的片段,序列分析发现此片段已经包括起始密码子,并且在之前还有长为 275 bp 的片段。根据获得的片段设计引物与 UPM 配对扩增基因的全长序列。结果,获得的 III 型几丁质酶的开放读码框为 1390 bp,编码长为 298 个氨基酸的蛋白,该基因被命名为 *Ghachi3*,并将其登陆到 GenBank 中,登陆号为: EF208897。 *Ghachi3* 和 *Ghachi4* 与棉花之前克隆的 3 个几丁质酶基因的相似性只有 10%左右,是新基因。 *Ghachi3* 与拟南芥(索取号: No. BAA21873)、水稻(索取号: No. BAC55717)、玉米(索取号: No. AAB47176)、葡萄(索取号: No. BAC65326)的同源基因相似性分别达 70%左右(图 1)。 *Ghachi4* 与拟南芥(索取号: No. NP191010)、山羊豆(索取号: No. AAP03085)、葡萄(索取号: No. AAM95447)的同源基因相似性达分别达 65%左右(图 2)。

Ghachi3	...MERKSQAKPI	FFVVLV	SAL	IETSV	AG	DAI	YWG	QNG	37															
Oryza sativa	...MANKSSLQ	LLIAAV	ASQFV	SSQA	GST	AI	YWG	QNG	36															
Vitis vinife	...MARTPQSTEL	LISLS	YLAL	LQT	SYA	GT	AI	YWG	36															
Arabidopsis	MTNMTLRKHVIYF	FFFISCS	LSKPS	DASR	GG	AI	YWG	QNG	40															
Zea mays	...MAANLKWAPV	LALLVV	AA	VGT	TS	AG	AI	YWG	37															
Consensus		l				g	ia	ywgq																
Ghachi3	NECTLSDTCATCR	KYVNI	GF	NTFC	NGAT	GL	ML	ACH	GN	77														
Oryza sativa	GECTLADTCATCN	KYVNI	AF	AA	FNG	Q	PP	V	ML	ACH	GD	76												
Vitis vinife	NECTLTQTCNTGK	YSVNI	AF	NK	FC	NG	Q	TP	E	ML	ACH	GN	76											
Arabidopsis	NECNLSATCATER	KYVNI	AF	VK	FC	NG	Q	TP	E	ML	ACH	GN	80											
Zea mays	NECSLADACNSGL	KYVNI	AF	TT	F	NG	Q	TP	V	ML	ACH	GD	77											
Consensus		eg	l	c	g	y	vn	fl	fgng	p	nl	aghc												
Ghachi3	PASNGCTSLSGE	IKSC	QNG	GR	VML	SL	GG	G	SY	S	L	A	S	QE	117									
Oryza sativa	PTNGGCLASQSD	IKSC	QSR	GR	VML	SL	GG	G	SY	S	L	S	S	SE	116									
Vitis vinife	PASNGCTSVSTG	IRN	QNR	GR	VML	SL	GG	G	SY	S	L	S	S	SM	116									
Arabidopsis	PAANTCTHFGSQ	WRD	QSR	GR	VML	SL	GG	G	SY	S	L	S	S	SE	120									
Zea mays	PGSGCLTQSSDI	QTC	QSL	GR	VML	SL	GG	G	SY	S	L	S	S	TD	117									
Consensus		p	c	q	g	k	ls	gg	g	y	s													
Ghachi3	DAKSWADYLVW	NFL	GGIS	SSR	PL	GA	AV	LD	G	ID	FD	IE	A	C	SG	157								
Oryza sativa	DAKNWATYLVW	NFL	GGQS	SSR	PL	GA	AV	LD	G	ID	FD	IE	G	C	IN	156								
Vitis vinife	DAQNVANVYLVW	NFL	GGQS	SSR	PL	GA	AV	LD	G	ID	FD	IE	L	C	ST	156								
Arabidopsis	DAKVLADYLVW	NFL	GGKS	SSR	PL	GA	AV	LD	G	ID	FD	IE	L	C	SP	160								
Zea mays	DANSWADYLVW	NFL	GGSC	SSR	PL	GA	AV	LD	G	ID	FD	IE	N	C	QS	157								
Consensus		da	a	ylw	nflgg	ssrplg	avldg	idf	ie	g														
Ghachi3	QYHDDLARSIL	SAYSS	QGR	RW	YLT	AAP	QCP	PP	DA	HL	GT	A	L	N		197								
Oryza sativa	QHDDLARSIL	KGYNS	GRR	W	YLT	AAP	QCP	PP	DA	C	I	D	A	L	N		196							
Vitis vinife	LHDDLARAL	SGF	SKR	GRR	W	YLT	AAP	QCP	PP	DR	F	L	G	T	A	L	N	196						
Arabidopsis	QHDDLARSIL	SKF	SHR	GRR	W	YLT	GA	P	Q	CP	PP	DR	L	M	G	S	A	L	N	200				
Zea mays	AHYDDLAWAL	KGKES	...	YLT	AAP	QCP	PP	DA	S	L	CP	A	D	Q						193				
Consensus		ddla	l			w	lt	apqcp	pd		g	a												
Ghachi3	TGLFDYVVI	QFYNNP	LAQ	QYAS	ENT	KD	IL	NS	UN	Q	WT	S								235				
Oryza sativa	TGLFDYVVI	QFYNNP	P	...	QYSS	ENT	SN	L	AD	AW	K	Q	W	L	S					232				
Vitis vinife	TGLFDYVVI	QFYNNP	P	...	QYSS	ENT	SN	L	LN	S	UN	R	WT	S						232				
Arabidopsis	TKRFDYVVI	QFYNNP	P	...	CSYTS	ENT	Q	N	L	FD	S	UN	K	WT	S					237				
Zea mays	TGQFDYVVI	QFYNNP	G	...	CA	YAN	ED	T	N	L	V	N	A	UN	T	WT	S			230				
Consensus		t	fd	vw	qfy	np				c	y	g			w	s								
Ghachi3	INAGSISLGL	PASPE	AAG	SG	FIP	PADD	L	RS	Q	V	L	P	V	I	K	S	S	G	K	275				
Oryza sativa	VPAKQIFLGL	PASPO	AAG	SG	FIP	PADD	L	RS	Q	V	L	P	V	I	K	S	S	G	K	272				
Vitis vinife	SINSQIFLGL	PASSA	AAG	SG	FIP	PANV	L	TS	Q	I	L	P	V	I	K	S	S	P	K	272				
Arabidopsis	IAAQKLFGL	PAAPE	AAG	SG	V	L	P	D	V	L	T	S	Q	I	L	P	I	L	K	S	R	K	277	
Zea mays	ITAGSFYLC	VPASPO	AAG	SG	T	S	T	P	A	L	T	G	T	V	I	P	A	I	R	G	I	C	N	269
Consensus			g	pa		aag	g			l		p												
Ghachi3	YGC	V	M	L	W	S	K	F	D	T	..	G	Y	S	A	A	I	N	S	V	298			
Oryza sativa	YGC	I	M	L	W	S	K	Y	D	D	Q	D	Y	S	S	V	K	S	D	V	297			
Vitis vinife	YGC	V	M	L	W	S	K	Y	D	D	Q	S	Y	S	S	I	K	S	S	V	298			
Arabidopsis	YGC	V	M	L	W	S	K	F	M	D	D	K	Y	S	S	I	L	A	S	V	302			
Zea mays	YGC	I	M	L	W	D	R	F	M	D	V	..	Q	N	Y	S	S	Q	V	K	G	S	V	294
Consensus		y	g	m	w		d					ys			v									

图 1 不同来源的 III 型几丁质酶与 *Ghachi3* 之间的相似性比较

Fig.1 Comparison of class III chitinase of different origins with *Ghachi3*

Ghachi4	MESLANGKKLLTSVLVGLVVASAITQ...TVL...AQMC	33
Vitis vinifeMESKALALIL.LAGILAGALPGSTVAQDC	28
Galega orien	..MTMMGNKLOSIIVGFATAFLIMI...IVPINVSAQMC	35
ArabidopsisMLTPTISKISISLVTL.LVLQ...AFSMTTKAQMC	31
Consensus	aq c	
Ghachi4	GCAPNLCCSQHGYCGQENDYCGTGCKECPFCFSKSPGA.S	72
Vitis vinife	GCS3DQCCSQWGYCGTGDDYCGTGCSQSGPCTSTS..MNVS	66
Galega orien	GCAAGVCCSQYGYCGNEDPYCGTGCKQGPFCYGSTLSS.S	74
Arabidopsis	GCSSELCCSQFGFCGNTSDYCGVGCQQGPPCFAPPPANGVS	71
Consensus	gc ccsq g cg ycg gc gpc s	
Ghachi4	VASIVSPQFFNGIINQARAD CAGKKFYTRQAFLEALDSFP	112
Vitis vinife	VSDVWTQEFFNGIIDQADASCAGKNFYTRAFLEALNSYP	106
Galega orien	VADIVTPAFFNGIINOAGSSCAGKNFYTRDAFLVALNSYN	114
Arabidopsis	VAEIVTQEFFNGIISQAASSCAGMRFYSRGAFLLEALDSYS	111
Consensus	v v ffnngii qa cag fy r afl al s	
Ghachi4	DFGKLGSDVESKREIAAFPAHATHETEFICYDEEDKSN	152
Vitis vinife	GFGTEGPTDSSLREIAAFPGHWTHETGCHFICYICEIDGASN	146
Galega orien	QFGKGGSLDDTKREIAAFAHFTHETGCHFICYICEINGASH	154
Arabidopsis	RGRVCSIDDSRREIAAFPAHATHETGCHFICYICEIDGASK	151
Consensus	fg g reiaa f h thet fcy ee	
Ghachi4	YCEANPKF..PCAPGKSYHGRGPLQLTCNINNYCNAGNALK	190
Vitis vinife	DYCDEONTQYPCVSGKDYVGRGPLQLSNWNYGAAGDSIG	186
Galega orien	DYCDNKTQYPCAPGKGYVGRGPLQLITWNYGPACTDNG	194
Arabidopsis	DYCDE NATQYPCNPNGKYVGRGPLQLSNWNYGPACTAIG	191
Consensus	pc k y grgp q n nyr ag	
Ghachi4	LDLLKNPEWVANDPWWSPFCSDWVLRDHAKEFV	225
Vitis vinife	FDGLNNPEVATDVDISFKTALWYMMTNVHSLDQCGFAT	226
Galega orien	FDGLKSPETVANNAVISFKTALWFMMKNVHSLVWVQCQFAT	234
Arabidopsis	FDGLNAPETVATDPVVISFKTALWYMTNRVQPVISQCGFAT	231
Consensus	d l pe va sfk lw	
Ghachi4	IRAINSI.ECDGGNTAAVNARVEYYTEYCNELGVSTGDNL	265
Vitis vinife	IRAINSI.ECNGGNSNAVQARVNYTQYCSQLGVAPGNL	273
Galega orien	IRAINSI.ECNGGNSNAVQARVNYTQYCSQLGVAPGNL	273
Arabidopsis	IRAINSI.ECNGGNTAAVNARVEYYTEYCNELGVSTGDNL	271
Consensus		
Ghachi4	TC	267
Vitis vinife	KClis	275
Galega orien	KClis	275
Arabidopsis	TClis	273
Consensus		

图 2 不同来源的 IV 型几丁质酶与 Ghachi4 之间的相似性比较

Fig. 2 Comparison of class IV chitinase of different origins with Ghachi4

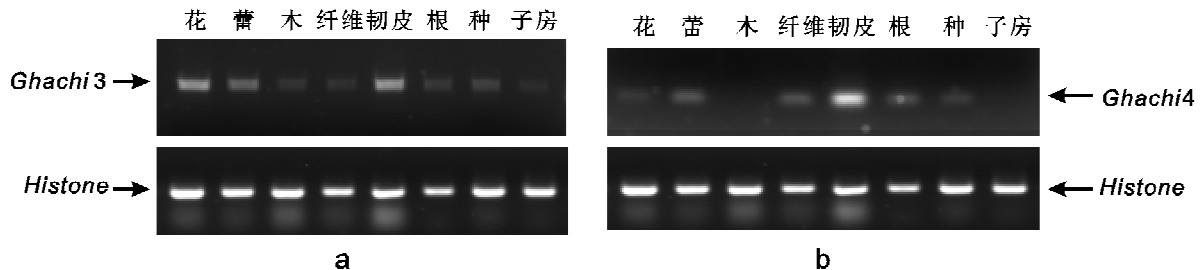
2.2 几丁质酶的结构分析

利用网上分析软件预测这两个几丁质酶都属于胞质体外分泌型蛋白,这与之前关于 I 型和 V 型几丁质酶位于液泡内,而其它几丁质酶位于胞质体外的定论是一致的。另外,这两个几丁质酶在 N 端 20~30 个氨基酸的位置具有明显的信号肽序列。

2.3 几丁质酶的表达分析

以棉花组蛋白作为参照,通过半定量 RT-PCR 分析发现,Ghachi3 在花、蕾和韧皮部中表达量较高,在木质部、纤维、根、种子和子房中表达量较低(图 3a)。Ghachi4 在韧皮部中的表达量最

高,在蕾、纤维和根中的表达量较高,而在木质部和子房中表达量很低(图 3b)。另外,Ghachi3 在受到黄萎病诱导后,在抗病品种常抗棉和感病品种 2524 中的表达量都上升,但是在枯萎病诱导后,仅在抗病品种中表达量稍有增加(图 4a);而 Ghachi4 在两种病原菌诱导后仅在抗病品种中表达量上升,而在感病品种 2524 中表达没有变化(图 4b)。在外界诱导因素作用下,常抗棉中的两种几丁质酶表达也发生一定的变化,ABA 诱导后,两种几丁质酶的表达量都有较大幅度的上升,而 Ghachi3 在盐诱导后也有一定程度的上调表达,Ghachi4 在干旱诱导后表达量上升。

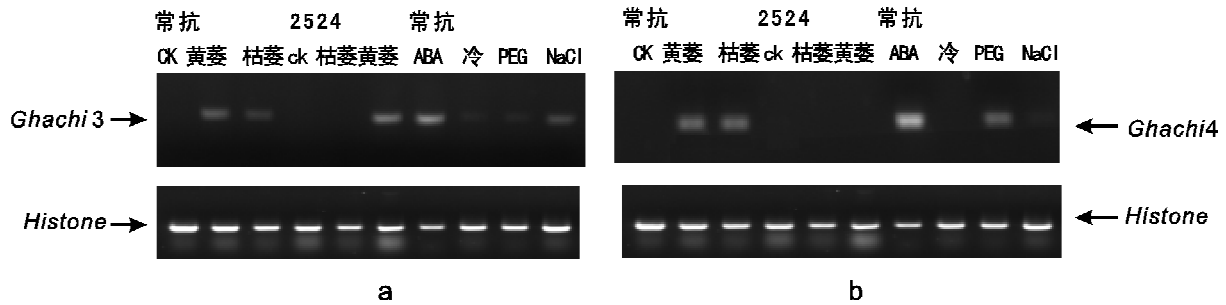


a: Ghachi3 在不同组织中的表达情况; b: Ghachi4 在不同组织中的表达情况。

a: Analysis of Ghachi3 expressing in different tissues. b: Analysis of Ghachi4 expressing in different tissues.

图 3 Ghachi3 和 Ghachi4 在不同组织以及的表达差异,组蛋白作为参照

Fig. 3 RT-PCR of Ghachi3 and Ghachi4 in different tissues. Histone amplification was used as the control



a: *Ghachi3* 在不同因素诱导后的表达; b: *Ghachi4* 在不同因素诱导后的表达。

a: Analysis of *Ghachi3* expressing after treatment of various factors.

b: Analysis of *Ghachi4* expressing after treatment of various factors.

图4 *Ghachi3* 和 *Ghachi4* 在不同因素诱导后的表达, 组蛋白作为参照

Fig. 4 Expression analysis of *Ghachi3* and *Ghachi4* after treatment of various factors. Histone amplification was used as the control

3 结论和讨论

本研究从抗病品种常抗棉中获得了分属Ⅲ型和Ⅳ型的两个几丁质酶基因。这是首次从棉花中获得的这两类几丁质酶。并通过表达分析发现这两个基因在病原菌诱导后表达量明显增加,特别是 *Ghachi1* 的表达量只在抗病品种中增加,说明这两个基因可能参与植物病原诱导反应。这之前报道的其它来源的同源基因是相似的。如苹果中的Ⅲ型酸性几丁质酶在遭受梨火疫病侵染后表达迅速上升^[15]。小麦中的同源基因 Xip-I 是白粉病病原菌以及茉莉酸甲酯诱导表达的^[16]。甘蔗中的同源基因受褐斑病病原菌诱导表达^[17]。而油菜中的Ⅳ型几丁质酶在受到病原菌诱导后在抗病品种中的表达量是感病品种的3倍^[18]。不同类型的几丁质酶,不光是相似性很低,表达模式也差异较大,本研究中 *Ghachi3* 在抗病材料以及感病材料中,黄萎病原菌诱导后表达都提高,但是枯萎病诱导后仅在抗病品种中表达量上升。而 *Ghachi4* 只有抗病材料受到黄萎病以及枯萎病诱导后,其表达量才明显提高。所以植物体内不同类型几丁质酶的诱导可能存在着极其复杂的机理,如 Salzer 等报道在苜蓿根形成过程中:病原侵染导致Ⅰ、Ⅱ、Ⅳ类几丁质酶基因被诱导,但它们被诱导时期不同,Ⅰ、Ⅱ类几丁质酶基因在成瘤的早期被诱导,Ⅳ类几丁质酶基因在瘤成熟阶段被诱导^[19]。另外,这两个基因在脱落酸诱导后表达量迅速增加。脱落酸是一种重要的植物激素,在植物的胁迫耐受性和抗性中发挥着重要作用。Yu L X 等从番茄中获得的一个受 ABA 以及干旱诱导表达的几丁质酶^[20]。胡椒中的一个Ⅱ型几丁质酶在受到 ABA、盐和干旱诱导后上调表达^[21]。这些结果说明 ABA 调控网络可能与抗病调控通路以及逆境调控存在某种关联性。

利用网上分析软件发现这两个基因都有信号肽序列,并预测基因定位于胞质体外。一般认为多数病原菌对植物的侵染从细胞间隙开始,主要是以体外寄生的方式摄取所需要的营养物质,破坏植物组织。因此,为了使植株能抵抗真菌侵染,抗真菌蛋白最好在胞间表达。Kishimoto 等指出,转基因水稻中外源几丁质酶基因的高效表达和在胞间的表达是转基因水稻表现出较高抗病性的重要原因^[22]。*Ghachi3* 和 *Ghachi4* 的表达具有组织特异性。两个基因在韧皮部表达量都很高。而植物受坏死型病原物侵染后,侵染部位迅速产生系统性信号,经韧皮部传导到未侵染部位。所以韧皮部是与抗病相关的一个很重要的部位^[23]。为了进一步了解这两个基因在抗病过程中的作用,下一步将试图将这两个基因的启动子序列克隆出来,了解它们的表达元件以及精确的表达调控。

参考文献:

- [1] 张志忠, 吴菁华, 吕柳新, 等. 植物几丁质酶及其应用研究进展[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2005, 34(4): 494-499.
- [2] 周森平, 陆维忠. 植物几丁质酶及其在抗真菌基因工程中的应用[J]. 江苏农业学报, 1998, 14(3): 183-187.
- [3] BROGLIE K E, Chet I, Holliday M, et al. Transgenic plant with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*[J]. Science, 1991, 254: 1194-1197.
- [4] 吴家和, 张献龙, 罗晓丽, 等. 转几丁质酶和葡聚糖酶基因棉花的获得及其对黄萎病的抗性[J]. 遗传学报, 2004, 31(2): 183-188.
- [5] 张志刚, 邱德文, 杨秀芬, 等. 细极链格孢菌蛋白激发子诱导棉苗基因表达差减文库的构建及 EST 分析[J]. 棉花学报, 2007, 19(4): 248-254.

- [6] 王 雪, 马 骏, 张柱寅, 等. 黄萎病菌胁迫条件下棉花叶片的蛋白质组分析[J]. 棉花学报, 2007, 19(4): 273-278.
- [7] 李付广, 刘传亮. 生物技术在棉花育种中的应用[J]. 棉花学报, 2007, 19(5): 362-368.
- [8] NEUHAUS J M, Fritig B, Linthorst H J M, et al. A revised nomenclature for chitinase genes [J]. Plant Mol Biol Rep, 1996, 14: 102-104.
- [9] CHLAN C A, Bourgeois R P. Class I chitinases in cotton (*Gossypium hirsutum*): characterization, expression and purification [J]. Plant Sci, 2001, 161: 143-154.
- [10] HUDSPETH R L, Hobbs S L, Anderson D M, et al. Characterization and expression of chitinase and 1,3-beta-glucanase genes in cotton [J]. Plant Mol Biol, 1996, 31: 911-916.
- [11] 李 骥, 刘进元. 一个新型的棉花几丁质酶基因 [J]. 植物学报, 2003, 45(12): 1489-1496.
- [12] 骆 萍, 王国栋, 陈晓亚. 亚洲棉 C4H 同源 cDNA 的分离和表达特征分析[J]. 植物学报, 2001, 43(1): 77-81.
- [13] 林 玲, 张爱香, 金中时, 等. 生防细菌与黄腐酸绿源宝促进棉花生长及防治黄萎病的效果[J]. 江苏农业学报, 2006, 22(2): 122-126.
- [14] 潘群斌, 周步海, 蔡立旺, 等. 抗枯萎病棉花新品种—苏棉 15 号[J]. 江苏农业科学, 1999, 4: 35-37.
- [15] ANO A, Takayanagi T, Uchibori T, et al. Characterization of a class III chitinase from *Vitis vinifera* cv. Koshu[J]. J Biosci Bioeng, 2003, 95(6): 645-647.
- [16] IGAWA T, Tokai T, Kudo T, et al. A wheat xylanase inhibitor gene, Xip-I, but not Taxi-I, is significantly induced by biotic and abiotic signals that trigger plant defense [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2005, 69(5): 1058-1063.
- [17] NIELSEN K K, Mikkelsen J D, Kragh K M, et al. An acidic class III chitinase in sugar beet; induction by *Cercospora beticola*, characterization, and expression in transgenic tobacco plants [J]. Mol Plant Microbe Interact, 1993, 6(4): 495-506.
- [18] RASMUSSEN U, Bojsen K, Collinge D B. Cloning and characterization of a pathogen-induced chitinase in *Brassica napus* [J]. Plant Mol Biol, 1992, 20(2): 277-287.
- [19] SALZER P, Bonanomi I A, Beyer K, et al. Differential expression of eight chitinase genes in *Medicago truncatula* roots during mycorrhiza formation, nodulation, and pathogen infection [J]. Molecular Plant Microbe Interactions, 2000, 13(7): 763-777.
- [20] YU L X, Djebroun M, Chamberland H, et al. Chitinase; Differential induction of gene expression and enzyme activity by drought stress in the wild (*Lycopersicon chilense* Dun.) and cultivated (*L. esculentum* Mill.) tomatoes [J]. Journal of plant physiology, 1998(153): 745-753.
- [21] HONG J K, Hwang B K. Induction by pathogen, salt and drought of a basic class II chitinase mRNA and its in situ localization in pepper (*Capsicum annuum*) [J]. Physiologia Plantarum, 2002, 114(4): 549-558.
- [22] KISHIMOTO K, Nishizawa Y, Tabei Y, et al. Detailed analysis of rice chitinase gene expression in transgenic cucumber plants showing different levels of disease resistance to gray mold (*Botrytis cinerea*) [J]. Plant Science, 2002, 162(5): 655-662.
- [23] 蔡新忠, 郑 重. 植物系统性获得抗病性的产生机理和途径[J]. 植物保护学报, 1999, 26(1): 83-90.
-