

拟南芥 *AZII* 基因对酿酒酵母细胞生长和蒜薹灰霉菌侵染的抑制作用

张欣¹, 徐之艳¹, Michael Schläppi², 徐子勤^{1,*}

¹西北大学生命科学学院, 西部资源与现代生物技术省部共建教育部重点实验室, 陕西省生物技术重点实验室, 西安 710069;

²美国马凯大学生物科学系, 密尔沃基 WI 53233

摘要: 本工作采用酿酒酵母细胞表达载体 pESC 和植物细胞表达载体 pPZP211 分析了拟南芥 *AZII* 基因对真菌的抗性功能。半乳糖诱导产生的 *AZII* 蛋白可以使酵母细胞的生长能力明显降低。DAB 和台酚蓝染色结果显示用蒜薹灰霉菌孢子处理 Col-0 野生型植株叶片后被侵染部位只能产生少量 H₂O₂, 病原体可以扩散, 而 *AZII* 基因过表达植株叶片在侵染部位有大量 H₂O₂ 产生, 着色较深, 表明转化体能够以局部细胞的死亡来阻止病原体侵染周围的细胞。在 Col-0 野生型植株中, *AZII* 基因的表达受外源水杨酸诱导, 24 h 后达到峰值。以上结果说明 *AZII* 基因在拟南芥对生物胁迫因素的应答过程中具有重要作用。

关键词: *AZII* 基因; 过表达; 酿酒酵母; 蒜薹灰霉菌; 水杨酸; H₂O₂

Inhibition of *Arabidopsis AZII* to the Growth of *Saccharomyces cerevisiae* and Infection of *Botrytis cinerea* Pers. ex of Garlic Sprout

ZHANG Xin¹, XU Zhi-Yan¹, Michael Schläppi², XU Zi-Qin^{1,*}

¹Provincial Key Laboratory of Biotechnology of Shaanxi, Key Laboratory of Resource Biology and Biotechnology in Western China, Ministry of Education, College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710069, China; ²Department of Biological Sciences, Marquette University, Milwaukee, WI 53233, USA

Abstract: Resistance of *Arabidopsis AZII* to fungus was analyzed with *Saccharomyces cerevisiae* expression vector pESC and plant expression vector pPZP211. Synthesis of *AZII* after induction with galactose resulted in remarkable decrease of the growth ability of yeast cells. DAB and trypan blue staining showed that only small amounts of H₂O₂ were produced at the infection sites of *Botrytis cinerea* spores and the pathogens could spread to surrounding cells in leaves of wild-type Col-0 plants. In contrast to this, the infection sites on leaves of *AZII* overexpression Col-0 plants accumulated large amounts of H₂O₂ and were stained intensively by DAB, indicating the transformants could prevent the spread of pathogen by the death of local cells around the infection sites. In wild-type Col-0 plants, the expression of *AZII* could be induced by salicylic acid and peaked after 24 h. All these results suggested that *AZII* play an important role in defense system of *Arabidopsis* against biotic stresses.

Key words: *AZII*; overexpression; *Saccharomyces cerevisiae*; *Botrytis cinerea* Pers. ex of garlic sprout; salicylic acid; H₂O₂

AZII (*AZELAIC ACID INDUCED*) 基因属于 HyPRP (hybrid proline-rich protein) 家族, 编码产物由 N 端的信号肽、中间的富含脯氨酸结构域和 C 端的八半胱氨酸结构域构成。由于具有疏水性 C 末端, *AZII* 蛋白也被划分到蛋白酶抑制剂/种子储藏蛋白/脂转运蛋白家族中 (Jose-Estanyol 等 2004)。对 GENEVESTIGATOR 数据库中的拟南芥基因芯片信息进行分析 (www.genevestigator.ethz.ch/gv/index.jsp), 发现 *AZII* (*At4g12470*) 和其他 3 个 HyPRP 基因 *EARLII* (*At4g12480*)、*At4g12490* 和 *At4g12500* 具有共表达特征, 受低温、盐和干旱等

环境胁迫因素的调节。由于核苷酸序列和氨基酸序列存在很高的相似性, 一般将 *EARLII*、*AZII*、*At4g12490* 和 *At4g12500* 归类为 HyPRP 家族 EARLII 亚家族。

AZII 基因受壬二酸诱导, *azil* 突变体在受到病

收稿 2010-08-16 修定 2010-10-22

资助 国家自然科学基金(30870194)、陕西省重点实验室研究计划(08JZ70; 2010JS090)和陕西省科学技术研究发展计划(攻关计划 2010K16-04-01)。

* 通讯作者(E-mail: ziqinxu@nwu.edu.cn; Tel: 029-88303484)。

原体、壬二酸或者水杨酸处理时,不能表现出由水杨酸介导的获得性系统免疫抗性(Jung等2009)。作为分泌性蛋白,AZII对拟南芥植株产生可以抵抗病原体的维管束渗出液也十分关键(程世亚等2008)。已有的报道显示,AZII基因对葡萄灰霉菌具有一定的抗性(Chassot等2007),它还可以在低温条件下维持细胞膜和细胞壁的稳定(Bubier和Schläppi 2004; Wilkosz和Schläppi 2000)。

水杨酸(salicylic acid, SA)能够促进开花、气孔关闭和种子萌发过程,也可以增加膜通透性和植物细胞对离子的吸收能力,但它最受关注的作用是可以诱导多种植物对病毒、真菌及细菌病原体产生抗性。对花生、黄瓜和马铃薯等作物施用外源水杨酸,能够诱导产生抗病性(王媛等2007)。对于水杨酸是否能够诱导AZII基因以及AZII基因是否具有蒜薹灰霉菌抗性尚无研究报道。本实验利用转AZII基因酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)和AZII过表达拟南芥植株研究了该基因对真菌的抗性特征。

材料与方 法

以拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)生态型 Columbia-0 (Col-0)野生型植株为起始材料。拟南芥种子首先在4℃处理2d以打破休眠状态,然后用75%酒精溶液浸泡1min,无菌水清洗1次,0.1% HgCl₂浸泡3~4min,无菌水清洗4~6次。将种子均匀点播在附加0.8%琼脂的MS (Murashige和Skoog 1962)固体培养基表面,置于光照培养箱。将种子苗移栽到珍珠岩:蛭石:营养土(1:1:1)中,在人工气候室中于22℃、65%湿度、短日照(8h光照/16h黑暗)条件下生长。

以Col-0野生型拟南芥基因组DNA为模板扩增AZII基因编码序列,连接至酵母表达载体pESC-URA (Stratagene, La Jolla, CA, USA)中的GALI启动子之后,在酿酒酵母受体细胞W303-1A MATa (*leu2-3,112; trp1-1; can1-100; ura3-1; ade2-1; his3-11,15*) (Veal等2003)中表达AZII-myc融合蛋白。酵母细胞在含有2%蔗糖的SC-URA培养基[1.45 g·L⁻¹无氨基酸酵母氮源; 5 g·L⁻¹硫酸铵; 2 g·L⁻¹缺少尿嘧啶的氨基酸混合物(-URA)]上生长,在含有2%半乳糖的SC-URA培养基中诱导表达。在分析

AZII对酵母细胞生长的影响时,从SC-URA培养基上挑取酵母单菌落,接种于含有2%蔗糖的液体培养基中,28℃培养至菌液的OD₆₀₀=1。用液体培养基将菌液稀释10⁻¹、10⁻²、10⁻³倍,分别取5μL接种到含有2%蔗糖的SC-URA培养基上,生长48h和72h后拍照。同时将稀释不同倍数的酵母细胞接种到只含有2%半乳糖的SC-URA培养基上,48h和144h后拍照。

分别挑取转空载和转AZII酵母单菌落,接种于附加2%蔗糖的SC-URA培养基中,28℃培养至OD₆₀₀=1,然后转接到含有2%半乳糖的SC-URA液体培养基中进行诱导。收集酵母细胞,用玻璃珠涡旋处理后加入10% TCA沉淀蛋白质,再经SDS-PAGE分离后转移到PVDF膜上。免疫印迹分析采用兔抗myc多克隆抗体(GenScript)和带有碱性磷酸酶的二抗(羊抗兔, BIOS),最后加入NBT/BCIP显色(Sangon)。

从Col-0野生型拟南芥植株中扩增AZII基因编码序列,上下游引物分别为5' CTAGGATCCTA-TAAATACCAA 3' (下划线处为BamHI酶切位点)和5' ATCGAATTCATAATGGATATT 3' (下划线处为EcoRI酶切位点)。PCR产物经BamHI和EcoRI酶切后用于构建植物表达载体pPZP211-AZII, AZII由MAC启动子和mas终止子控制(Comai等1990; Gleave 1992)。将二元载体导入农杆菌ABI菌株,采用浸花法转化野生型Col-0植株(Clough和Bent 1998),收获种子,并在含有50 μg·mL⁻¹卡那霉素的1/2MS固体培养基上筛选T₁代转基因个体。

蒜薹灰霉菌(*Botrytis cinerea* Pers. ex of garlic sprout)由本实验室保存。菌株在马铃薯培养基上于28℃培养4d后,在无菌水中悬浮孢子,经玻璃棉过滤除去菌丝,用1/4马铃薯培养基配制成5×10⁴个(孢子)·mL⁻¹的悬浮液待用。将5μL孢子悬浮液接种于Col-0和AZII过表达植株叶片的表面,侵染24h后用0.4%台酚蓝于37℃染色1h,在85%乙醇中煮10min脱去叶绿素,用80%甘油封片,在显微镜下观察侵染情况。为了检测侵染部位H₂O₂的积累水平,侵染24h后的叶片用0.5% DAB在37℃染色过夜,经80%乙醇脱色后用80%甘油封片,在显微镜下观察侵染情况。

用0.1 mmol·L⁻¹ SA喷洒拟南芥Col-0野生型和

AZII 过表达植株, 在处理不同时间取样, 用 TRIzol 试剂(Invitrogen)提取总 RNA。RNA 经紫外定量和甲醛变性胶分离后, 采用毛细管方法转移到尼龙膜上。Northern 印迹分析过程参照 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I (Roche)说明书进行。

结果与讨论

1 *AZII* 对酿酒酵母细胞生长的抑制作用

与转移有空载体 pESC-URA 的对照组酵母细胞相比, 包含 pESC-*AZII* 的酵母细胞在 SC-URA 平板上的生长能力明显下降(图 1)。稀释 10 倍的酵母菌液在附加 2% 蔗糖的 SC-URA 培养基上生长 48 h 后, 对照组和转 *AZII* 基因酵母生长情况看不出明显差异。但当菌液被稀释 100 倍时, 可以清楚地观察到转 *AZII* 基因酵母的生长较对照组差。当菌液被稀释 1 000 倍时, 转 *AZII* 基因酵母生长速度很慢, 可以分辨出单个克隆, 并且菌落稀疏(图 1-A)。72 h 以后, 菌斑生长趋势与 48 h 相同(图 1-C)。在本实验中, *AZII* 基因由酵母 *GAL1* 启动子控制, 表达受半乳糖诱导。转空载酵母和转 *AZII* 基因酵母在只含有 2% 半乳糖的 SC-URA 培养基上生长 48 h 后只能观察到对照酵母生长, 而转 *AZII* 基因酵母未见生长(图 1-B)。144 h 以后, 可以观察到稀释 10 倍

和 100 倍的转 *AZII* 基因酵母生长形成菌斑, 但菌斑明显小于对照组。这说明 *AZII* 基因可以抑制酵母细胞的生长, 该基因被半乳糖诱导表达以后, 在 144 h 才出现较小的菌斑。

氨基酸序列比对结果显示 *AZII* 蛋白属于脂转运蛋白(lipid transfer protein, LTP)家族。LTP 参与角质的合成, 在植物抵抗病菌侵染过程中具有重要作用(Arondel 等 2000)。Chassot 等(2007)的研究结果表明过表达 *AZII*、*EARL11* 和 *At4g12500* 可以显著提高拟南芥对葡萄灰霉菌的抗性, 其中以 *AZII* 过表达个体的抗性最强。本研究发现 *AZII* 蛋白对酿酒酵母的生长有明显的抑制作用。转 *AZII* 酵母在以蔗糖为碳源的培养基上生长速度比转空载体酵母稍慢, 而在培养基中加入 2% 半乳糖后, 转基因酵母相对于转空载对照生长速度明显下降。其原因可能是由于酵母本身也是一种真菌, 半乳糖诱导转基因酵母表达产生的 *AZII* 蛋白抑制了酵母细胞的生长。

本工作采用 Western 免疫印迹技术分析了酵母细胞中 *AZII* 基因的表达情况。*AZII* 蛋白大小约为 16 kDa。*AZII* 蛋白在酵母细胞中可以被半乳糖诱导表达(图 2)。与对照组相比, 转 *AZII* 基因酵母在 16 kDa 左右有明显的条带。同时, 在 30 kDa 左右有一条带的亮度是 16 kDa 条带的 2 倍, 可能是 *AZII*

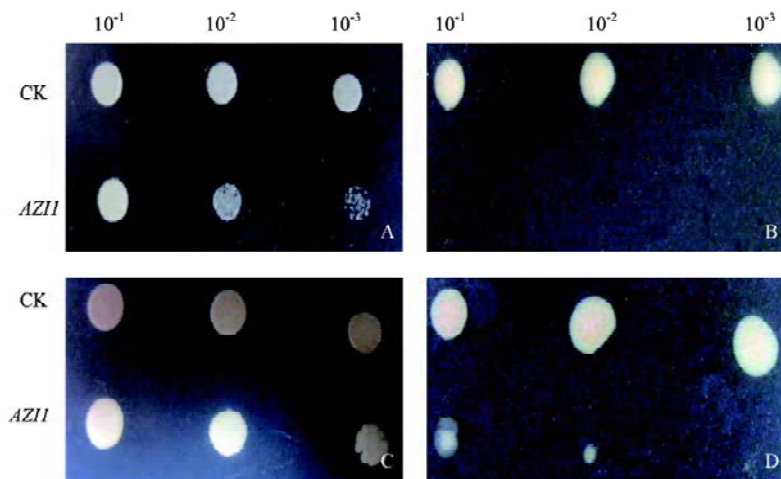


图 1 *AZII* 基因对酵母生长的影响

Fig.1 Influence of *AZII* on the growth of *S. cerevisiae*

A: 在含有 2% 蔗糖的 SC-URA 培养基上生长 48 h; B: 在含有 2% 半乳糖的 SC-URA 培养基上生长 48 h; C: 在含有 2% 蔗糖的 SC-URA 培养基上生长 72 h; D: 在含有 2% 半乳糖的 SC-URA 培养基上生长 144 h。CK: 转空载酵母细胞; *AZII*: 含有 pESC-*AZII* 的酵母细胞。

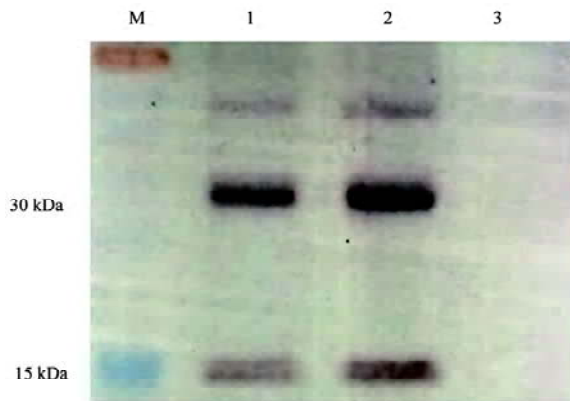


图2 AZII 蛋白在酵母细胞中表达的免疫印迹分析

Fig.2 Immunoblot analysis of AZII protein expressed in yeast cells

M: 分子量标准; 1 和 2: 含有 pESC-AZII 的酵母细胞; 3: 转空载酵母细胞。

蛋白的二聚体。这说明酵母生长受到的影响确实是由于 AZII 基因在酵母细胞内的表达而产生的。

2 AZII 对蒜薹灰霉菌侵染的抗性

为了分析 AZII 基因对病原体真菌的抗性, 本工作通过农杆菌转化方法获得了组成性表达 AZII 的转基因拟南芥植株。Northern 印迹实验结果显示, 转基因个体可以组成性表达 AZII 基因; 经水杨酸诱导 8 h 后, 由于内源 AZII 基因受到诱导, 杂交信号进一步加强(图 3)。蒜薹灰霉菌侵染 4 d 后, AZII 过表达植株和 Col-0 野生型植株的表现基本相同。首先可以看到在叶片的被侵染位点周围有黄色病斑形成, 病变组织与健康组织之间有明显的界限。在侵染 8 d 后, Col-0 野生型植株叶片上的病

斑逐渐扩大, 最后整个叶片开始褪绿变黄, 逐渐软化成为湿腐状, 最终遍及整片叶子。而 AZII 过表达植株只有少数叶片出现整片湿腐现象, 在大部分侵染位点能看到黄色的斑点, 但是病变组织与健康组织之间仍有明显的界限。侵染 3 周以后, Col-0 野生型植株几乎全部死亡, 叶片枯萎。而 AZII 过表达植株仍有少数存活, 并且在部分被侵染的叶片上只能看到侵染位点, 叶片其余部位仍然保持绿色(图 4)。这说明与 Col-0 野生型植株相比, AZII 基因过表达植株对灰霉菌具有明显的抗性。

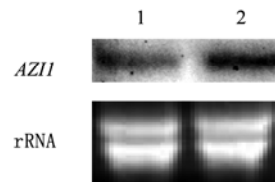


图3 AZII 转基因拟南芥植株的 Northern 印迹分析

Fig.3 Northern blot analysis of AZII overexpression *Arabidopsis* plant

1: AZII 转基因植株; 2: SA 处理 8 h 的 AZII 转基因植株。

植物在受到真菌侵染时, 会发生超敏反应(hypersensitive response, HR)。HR 指侵染位点产生的活性氧(reactive oxygen species, ROS, 包括 H_2O_2 、 O^2 和 OH 等)会引起细胞死亡, 限制病原体的扩散。DAB 可以和 H_2O_2 反应而显示出红褐色(Wang 等 2008)。在蒜薹灰霉菌侵染 24 h 后, Col-0 野生型叶片经过 DAB 染色可以观察到有大片着色较浅的区域, 显示灰霉菌侵染可引起较低水平的

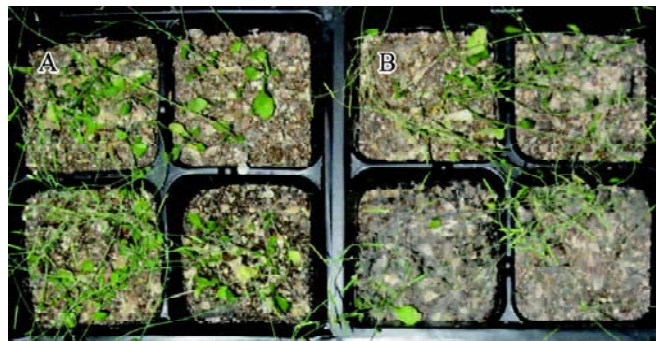


图4 蒜薹灰霉菌侵染 3 周后拟南芥的生长状况

Fig.4 Symptoms of AZII overexpression and wild type Col-0 plants 3 weeks after inoculation with *Botrytis cinerea* Pers. ex of garlic sprout

A: AZII 过表达植株; B: Col-0 野生型植株。

H_2O_2 积累, 不能引发超敏反应, 病原体可以扩散, 菌丝的生长最终会使整个叶片枯萎(图 5-A)。而在 *AZII* 过表达植株叶片上可以观察到分散的染色较深的红褐色斑点, 由于高水平 H_2O_2 积累引发了 HR 反应, 灰霉菌不能继续侵染周围的细胞(图 5-B), 说明 *AZII* 基因过表达以后可以明显提高拟南芥的抗真菌能力。

台酚蓝可以将死亡细胞染成蓝色, 而活细胞则不被着色。经台酚蓝染色后, Col-0 野生型植株叶片被侵染位点周围大部分细胞呈蓝色, 说明细胞已经坏死(图 6-A)。在 *AZII* 过表达植株中, 有一些蓝色的斑点, 大部分细胞不能被染成蓝色, 细胞完整, 坏死现象明显减轻(图 6-B), 这与 DAB 染色结果一致。说明灰霉菌菌丝在 *AZII* 过表达植株的叶片上

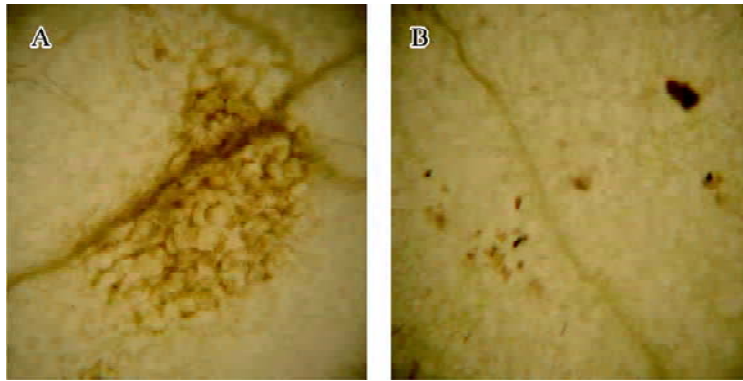


图 5 采用 DAB 染色观察侵染位点的 H_2O_2 积累水平

Fig.5 Detection of H_2O_2 level in *B. cinerea* infected leaves of *AZII* overexpression and wild type Col-0 plants by DAB staining

A: Col-0 野生型植株叶片; B: *AZII* 过表达植株叶片。图 6 同。

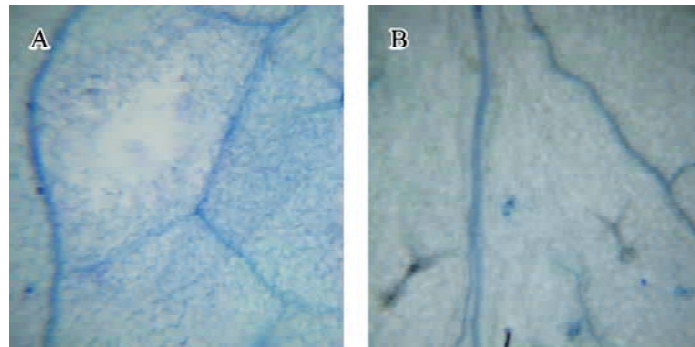


图 6 被侵染拟南芥叶片的台酚蓝染色

Fig.6 Detection of cell death in *B. cinerea* infected leaves of *AZII* overexpression and wild type Col-0 plants by trypan blue staining

生长缓慢, 不能扩散。

3 SA 对 *AZII* 基因表达的诱导作用

用水杨酸喷洒拟南芥 Col-0 野生型植株 8、24、36 和 48 h 后, 提取总 RNA 进行 Northern 印迹杂交检测, 分析 *AZII* 基因在受到水杨酸诱导后的表达情况, 结果表明外施水杨酸 8 h 到 24 h 后 *AZII* mRNA 的表达量明显上升, 诱导 24 h 后达到峰值。

诱导 36 h 以后, mRNA 丰度开始降低, 48 h 后恢复到诱导 8 h 后的水平(图 7)。

植物的抗病性是建立在一系列的物质代谢基础上的, SA 虽然不是诱导抗性产生的最初系统信号, 但却是诱导抗性产生的重要因素(李淑菊等 2000)。很多研究表明外施 SA 后, 植物体内的 SA 水平会明显上升, SA 与其受体蛋白(SA-binding

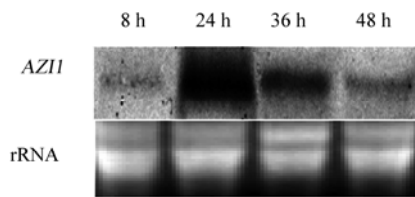


图7 SA诱导AZII基因表达分析

Fig.7 RNA gel blot analysis of AZII transcript abundance induced by SA

protein, SABP)结合后能够抑制过氧化氢酶的活性及自由基的产生,激活POD的合成及其他防卫反应(丁秀英等2001)。SA可以作为SAR反应中的一种内源性信号分子,使植物获得局部和系统免疫能力,以抵抗丁香假单胞菌等病原体的侵染。组成性表达*nahG*的转基因烟草能够产生大量的水杨酸羟化酶,催化SA转化为儿茶酚;这种转基因植株在受到病原体侵染时无法积累SA,不能表现出系统获得性抗性(systemic acquired resistance, SAR)(Gaffney等2008; Song等2008)。AZII因受壬二酸诱导而得名,壬二酸能够诱导植物积累防御信号分子SA。*azil*突变体在受到致病菌或壬二酸诱导时,也不能产生由水杨酸积累引起的特异性的系统免疫反应(Jung等2009),说明AZII基因与植物的抗菌防御机制有关。GENEVESTIGATOR数据库中的基因芯片分析结果显示,AZII基因在拟南芥生长发育的幼苗阶段表达量很高,在长角果中表达量最低;且AZII基因表达受到多种真菌病原体、机械损伤和低温等胁迫因素的诱导。在本工作中,外施一定浓度的SA可以诱导AZII基因的表达,说明AZII基因可能通过参与SA信号途径使植物表现出对病原体侵染的抗性。

参考文献

程世亚,袁澍,席德慧,林宏辉(2008).植物系统获得性抗性的分子机理.生命的化学,28:256~259
丁秀英,张军,苏宝林,徐惠凤(2001).水杨酸在植物抗病中的作用.植物学通报,18:163~168
李淑菊,马德华,庞金安,霍振荣(2000).水杨酸对黄瓜几种酶活性及抗病性的诱导作用.华北农学报,15:118~122
王媛,杨红玉,程在全(2007).SA诱导拟南芥对灰霉病的抗性与

木质素含量的关系.植物保护,33:50~53

- Arondel V, Vergnolle C, Cantrel C, Kader JC (2000). Lipid transfer proteins are encoded by a small multigene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci*, 157: 1~12
Bubier J, Schläppi M (2004). Cold induction of *EARL11*, a putative *Arabidopsis* lipid transfer protein, is light and calcium dependent. *Plant Cell Environ*, 27: 929~936
Chassot C, Nawrath C, Metraux JP (2007). Cuticular defects lead to full immunity to a major plant pathogen. *Plant J*, 49: 972~980
Clough SJ, Bent AF (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 16: 735~743
Comai L, Moran P, Maslyar D (1990). Novel and useful properties of a chimeric plant promoter combining CaMV 35S and MAS elements. *Plant Mol Biol*, 15: 373~381
Gaffney T, Friedrich L, Vernooij B, Negrotto D, Nye G, Uknes S, Ward E, Kessmann H, Ryals JA (1993). Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science*, 261: 754~756
Gleave AP (1992). A versatile binary vector system with a T-DNA organisational structure conducive to efficient integration of cloned DNA into the plant genome. *Plant Mol Biol*, 20: 1203~1207
Jose-Estanyol M, Gomis-Ruth FX, Puigdomenech P (2004). The eight-cysteine motif, a versatile structure in plant proteins. *Plant Physiol Bioch*, 42: 355~365
Jung HW, Tschaplinski TJ, Wang L, Glazebrook J, Greenberg JT (2009). Priming in systemic plant immunity. *Science*, 324: 89~91
Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plantarum*, 15: 473~497
Song JT, Koo YJ, Seo HS, Kim MC, Choi YD, Kim JH (2008). Overexpression of AtSGT1, an *Arabidopsis* salicylic acid glucosyltransferase, leads to increased susceptibility to *Pseudomonas syringae*. *Phytochemistry*, 69: 1128~1134
Veal EA, Ross SJ, Malakasi P, Peacock E, Morgan BA (2003). Ybp1 is required for the hydrogen peroxide-induced oxidation of the Yap1 transcription factor. *J Biol Chem*, 278: 30896~30904
Wang CF, Huang LL, Buchenauer H, Han QM, Zhang HC, Kang ZS (2008). Histochemical studies on the accumulation of reactive oxygen species (O_2^- and H_2O_2) in the incompatible and compatible interaction of wheat—*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *Physiol Mol Plant P*, 71: 230~239
Wilkosz R, Schläppi M (2000). A gene expression screen identifies *EARL11* as a novel vernalization-responsive gene in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*, 44: 777~787