

拟南芥果胶甲酯化酶基因 *PME17* 在抵御丁香假单胞杆菌番茄致病变种 DC3000 株中的功能

张倩, 鲍依群, 谭小云*

南京农业大学生命科学院, 南京210095

摘要: 细胞壁是植物抵御病原菌入侵的第一道屏障, 果胶是细胞壁初生壁的主要组分。果胶甲酯化酶(PME)是修饰果胶的主要酶之一, 它在合成细胞壁、调节其弹性和通透性等过程中发挥重要作用。拟南芥基因表达数据库显示, *PME17* 等多个果胶甲酯化酶基因在病原菌侵染情况下强烈表达。本文研究了 *PME17* 的组织表达及其在丁香假单胞杆菌番茄致病变种 DC3000 株 (*Pst* DC3000) 侵染过程中的功能。结果表明, 在未受 *Pst* DC3000 侵染的条件下, *PME17* 基因在主根、根毛、子叶、叶毛、花粉等部位表达; 在受 *Pst* DC3000 感染时, *PME17* 表达显著增强。和野生型相比, *pme17* 突变体对 *Pst* DC3000 侵染更加敏感, 说明拟南芥 *PME17* 基因的表达受 *Pst* DC3000 的诱导, 并在防御 *Pst* DC3000 侵染中起积极作用。

关键词: 植物抗病; 细胞壁; 果胶甲酯化酶; 丁香假单胞杆菌番茄致病变种 DC3000 株

Functional Analysis of *Arabidopsis thaliana* Pectin Methylesterase Gene *PME17* in Immunity against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000

ZHANG Qian, BAO Yi-Qun, TAN Xiao-Yun*

College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

Abstract: In plants, cell walls act as structural barriers against pathogen entry. Pectin, a major component of plant cell wall, is critical for cell wall integrity. Pectin methylesterases (PMEs), which deesterify newly synthesized pectins, is important for cell wall rigidity and elasticity. In *Arabidopsis thaliana*, published microarray data indicated that expression of some pectin methylesterase genes (include *PME17* gene) was up-regulated during infection with various pathogens, suggesting that PMEs play important roles during pathogens infection. In this study, we investigated expression pattern of *PME17* gene and its function during infection by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* DC3000). We found that in normal conditions, *PME17* gene was highly expressed in root hairs, trichomes, and floral organs. Its expression level was obviously up-regulated under infection of pathogen *Pst* DC3000. Furthermore, compared to wild type plants, *pme17-2* mutant was more sensitive to *Pst* DC3000 infection, indicating that *PME17* gene plays a positive role in immunity against *Pst* DC3000 infection.

Key words: plant immunity; cell wall; pectin methylesterase; *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000

病原菌侵害是植物经常遭受的生物胁迫之一, 细胞壁是植物抵御病原菌侵害的第一道屏障。高等植物初生细胞壁主要由多糖组成, 包括纤维素、半纤维素和果胶等(Caffall和Mohnen 2009)。果胶是一种重要的起粘合作用的复杂多糖, 重量占细胞壁干重的30%~35% (Smith和Harris 1999; Novosel'skaya等2000), 主要由同型半乳糖醛酸聚糖(homogalacturonan, HG)、鼠李半乳糖醛酸聚糖I (rhamngalacturonan I, RGI)、鼠李半乳糖醛酸聚糖II (rhamngalacturonan II, RGII)和木糖半乳糖醛酸聚糖(xylogalacturonan, XG)几种成分构成(Smith和Harris 1999; Novosel'skaya等2000)。其中, 最重要

的是HG, 它影响着细胞间的粘连和组织的硬度, 也参与细胞间的信号传递, 并且与RGI、RGII等其他多糖通过共价键交联来维持细胞壁结构的稳定(Moustacas等1991; Pelloux等2007)。

果胶最初在高尔基体中合成, 其中初合成的HG中70%~80%的半乳糖醛酸残基的C₆是甲酯化的(Moustacas等1991; Caffall和Mohnen 2009)。当

收稿 2015-01-04 修定 2015-07-06

资助 国家自然科学基金(31200236)和中国博士后科学基金面上资助(2013M541683)。

* 通讯作者(E-mail: tanxiaoyun@njau.edu.cn; Tel: 025-84395044)。

HG运输到细胞壁后,半乳糖醛酸残基C₆的甲酯基团将在果胶甲酯化酶(pectin methylesterase, PME; EC 3.1.1.11)的催化下去甲酯化。HG去甲酯化的方式至少有两种:一种是连续、线性的,通过这种方式去甲酯化的HG结合环境中的钙离子,形成钙桥互相联结,使得细胞壁更加坚硬;另一种是不连续、随机的,通过这种方式去甲酯化的HG不会通过钙桥互相联结,而是导致细胞壁酸化,激活多种果胶降解酶来降解部分果胶,使得细胞壁变软,有利于细胞生长(Pelloux等2007; Shen等2005)。因此, PME在合成细胞壁及调节其通透性和弹性等方面起着灵活而重要的作用。

模式植物拟南芥含有66个PME,根据其蛋白结构分为I和II两大类。I类只含一个PME结构域,II类除了含一个PME结构域之外,还有一个PMEI (pectin methylesterase inhibitor)结构域(Bosch和Hepler 2005)。不同的PME在拟南芥的不同器官、组织或不同的生长阶段表达,调节细胞壁的力度、弹性和通透性,以满足植物在不同条件下的生长需要(Micheli 2007)。

前人的研究表明,在病原菌侵染下,拟南芥PME的活性显著增强(Bethke等2014)。拟南芥基因芯片数据库也表明多个PME基因(如PME3、PME17、PME41)在病原菌侵染下加强表达(Zimmermann等2004),暗示PME可能在植物抗病过程中发挥重要功能。为了了解PME在植物抗病中的功能,我们选择了PME17基因(*At2g45220*)作为研究对象。PME17基因编码了一个II类的PME,基因表达数据库显示,它的表达在多种病原菌侵染的条件下都显著增强,但它在抗病中的功能并不清楚。因此,本文从PME17基因及*pme17-2*突变体入手,研究PME17的组织表达情况以及其在丁香假单胞杆菌番茄致病变种DC3000株侵染过程中的功能,旨在探索果胶甲酯化酶在植物抗病过程中发挥的作用。

材料与方法

1 实验材料

拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)野生型Col-0和T-DNA插入突变体*pme17-2* (*SALK_059908*)种子购自*Arabidopsis* Resource Center。

丁香假单胞杆菌番茄致病变种DC3000株(*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, *Pst* DC3000)来自中国科学院遗传与发育生物学研究所谢旗研究员实验室。

2 实验方法

2.1 克隆构建以及拟南芥转化

将PCR扩增的PME17基因启动子序列(引物见表1)连接到pCAMBIA1300221载体的GUS报告基因前,构建*P_{PME17}::GUS*克隆,用农杆菌转化法转化拟南芥野生型Col-0植株。利用含有潮霉素的固体MS培养基来筛选转基因阳性植株。

2.2 GUS染色

按照Tan等(2010)的配方配制GUS染液,将植物材料放入GUS染液中,于37℃下染色4 h,然后吸出GUS染液,用脱色液(无水乙醇:冰醋酸=3:1)进行脱色,待材料脱色充分后进行观察照相。

2.3 RT-PCR

提取不同组织的RNA,利用反转录酶(TaKaRa)反转录出cDNA第一链。选取PME17基因外显子上两段序列为引物P1和P2(表1),*TUB8*基因为内参。以野生型和*pme17-2*突变体的cDNA为模板,扩增出相应的基因片段。

2.4 *Pst* DC3000侵染拟南芥

将*Pst* DC3000接种在10 mL含有60 mg·L⁻¹利福平的液体KB培养基中,28℃下培养过夜;菌液于1 800×g离心5 min,弃上清;用10 mmol·L⁻¹ MgCl₂洗涤菌体沉淀一次,之后用10 mmol·L⁻¹ MgCl₂再次重悬菌体;用10 mmol·L⁻¹ MgCl₂分别稀释菌液至OD₆₀₀值为0.002和0.0002,备用。

选择萌发后生长5周植株中健康成熟的叶片,用1 mL的不带针头的针管向叶片中接种菌液,直到菌液覆盖整个叶片为止,每个植株接种3~4个叶片,每个基因型选取5~8个植株。

2.5 *Pst* DC3000侵染诱导PME17基因表达检测以及*pme17-2*的致病表型观察

为检测*Pst* DC3000侵染对PME17基因表达的影响,将OD₆₀₀值为0.002的*Pst* DC3000菌液侵染*P_{PME17}::GUS*转基因植株叶片,24 h后进行GUS染色实验并拍照;以未经处理的叶片作为对照。另外,将同样浓度的菌液侵染野生型植株叶片,24 h后提取RNA并进行RT-PCR;以未经处理的叶片作为对照。

表1 PCR引物列表

Table 1 PCR primers used in this study

用途	引物名称	引物序列(5'→3')
扩增 <i>PME17</i> 基因启动子	Promoter P1	GCTGCAGCTAGTATTACGTTAATTAGTTATGA
	Promoter P2	GCTCTAGAGCAAGCCATCATAAGACCAAATG
验证 <i>pme17-2</i> 纯合体	P1	ATGATGGCTTTTCGAGCTTAT
	P2	GGGTTTATTTCAGAAACACC
	P3	CAGAGACCAGAAGTGAACGG
扩增 <i>TUB8</i> 基因	TUB8 P1	CTTCGTATTTGGTCAATCCGGTGC
	TUB8 P2	GAACATGGCTGAGGCTGTCAAGTA

为观察*Pst* DC3000侵染植株后的致病表型, 将OD₆₀₀值为0.002的*Pst* DC3000菌液侵染野生型和*pme17-2*植株叶片, 4 d后观察叶片致病表型并记录。

2.6 接种部位*Pst* DC3000菌落密度分析

将OD₆₀₀值为0.0002的*Pst* DC3000菌液侵染野生型和*pme17-2*植株叶片, 使用直径为0.4 cm的打孔器从接种0和4 d的叶片上取圆片, 每个叶片上取1片, 每个植株取3~4片; 将收集好的圆片放入2 mL的离心管中, 每管加入1 mL的10 mmol·L⁻¹ MgCl₂进行破碎; 破碎后, 用10 mmol·L⁻¹ MgCl₂稀释至原浓度的10⁻⁵倍。从稀释的菌液中吸取200 μL, 涂布在含有60 mg·L⁻¹利福平的KB培养基上, 25 °C培养箱培养1~2 d; 至培养皿上的菌落清晰可见时记录菌落数目。根据菌落数目和叶片面积, 计算出单位面积(cm²)叶片上*Pst* DC3000菌落形成单位(colony-forming units, CFU)的数量。实验独立重复3次, 用*t*检验来验证野生型和突变体CFU密度差异的显著性。

实验结果

1 正常生长条件下*PME17*基因的组织表达分析

扩增*PME17*基因起始密码子前1 500 bp片段, 连接于*GUS*报告基因前, 构建*P_{PME17}::GUS*克隆并转化野生型植株, 获得31株转基因植株, 其中21株的染色情况高度一致, 选取具有代表性的植株进行进一步观察。

观察*PME17*基因在萌发后7 d幼苗中的表达, 结果显示, *PME17*在根中表达较强(图1-A), 主要表达在根的伸长区、成熟区和根毛细胞中(图1-B), 在分生区几乎没有表达。在幼苗的下胚轴部位, *PME17*基因几乎没有表达, 而在子叶边缘表达较强。在萌发后3周植株中, *PME17*基因在叶肉细胞

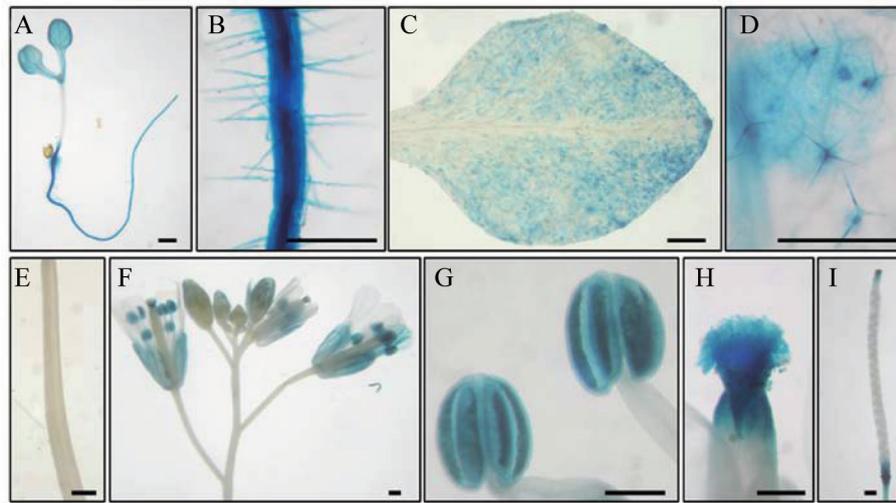
中表达很弱, 但在叶毛中有较强的表达(图1-C和D), 在茎中基本检测不到*PME17*基因的表达(图1-E)。另外, *PME17*在花药、花粉、柱头上表达强烈(图1-F~H), 在角果的顶端和底部与果柄连接处表达强烈, 在其他部位表达很弱(图1-I)。表明*PME17*在一些极性生长的细胞(如根毛、叶毛)和细胞快速生长的组织(如根的伸长区、花药等)中强烈表达, 暗示在正常的生长发育过程中, *PME17*基因可能在细胞快速生长过程中大量表达, 参与新生细胞壁的合成过程。

2 *Pst* DC3000侵染诱导*PME17*基因表达

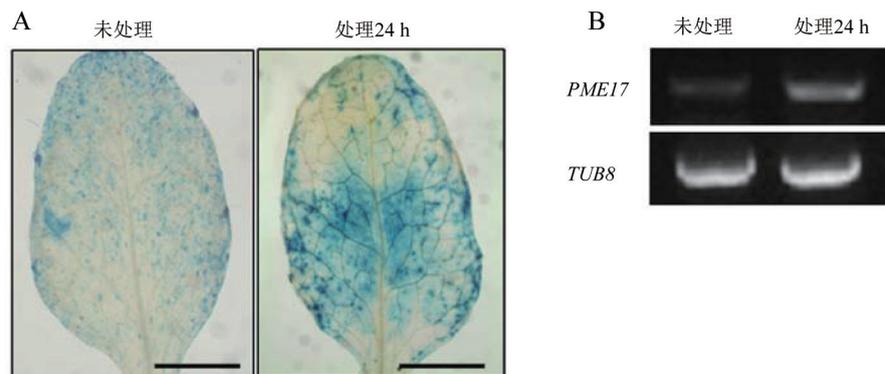
用*Pst* DC3000侵染*P_{PME17}::GUS*转基因植株, 然后进行GUS染色观察。图2-A显示, 在未经处理的叶片中, 叶肉细胞基本无染色, 只有叶毛部位能够染上蓝色; 而经*Pst* DC3000侵染的叶片中, 在叶片的大片面积能够染上蓝色, 其颜色明显深于未经处理的叶片, 说明*P_{PME17}::GUS*的表达确实是受*Pst* DC3000侵染的诱导。同时用*Pst* DC3000侵染野生型植株后进行RT-PCR, 结果表明, *PME17*基因表达确实显著增强(图2-B), 说明病原菌*Pst* DC3000侵染能够诱导*PME17*基因的表达, 暗示*PME17*在病原菌*Pst* DC3000侵染过程中发挥一定的功能。

3 *pme17-2*突变体的鉴定

*PME17*基因的T-DNA插入突变体*SALK_059908*中, T-DNA插入在*PME17*基因的唯一内含子上, 位于起始密码子ATG下游1 195碱基处(图3-A), 此前, Senechal等(2014)已经将其命名为*pme17-2*, 本文即沿用这个名称。基因组PCR确认这是一个纯合突变体(图3-B)。RT-PCR确定这个突变体中*PME17*基因还有微弱表达, 但是其表达量和野生型相比显著下降, 因此它是一个*PME17* 因表达下调突变

图1 *PME17*基因的组织表达情况Fig.1 *PME17* gene expression pattern

A: 幼苗; B: 主根成熟区; C: 真叶; D: 叶毛; E: 茎; F: 花序; G: 花药; H: 柱头; I: 角果。标尺=1 mm。

图2 病原菌*Pst* DC3000诱导*PME17*基因表达Fig.2 Expression of *PME17* gene was induced by pathogen *Pst* DC3000 infection

A: *Pst* DC3000未处理的和处理24 h的*P_{pME17}::GUS*转基因植株叶片的GUS染色照片; 标尺=5 mm。B: *Pst* DC3000未处理的和处理24 h的野生型植株叶片中*PME17*基因的RT-PCR结果。

体(图3-C)。在正常生长条件下, *pme17-2*突变体并未表现出明显的发育缺陷表型。

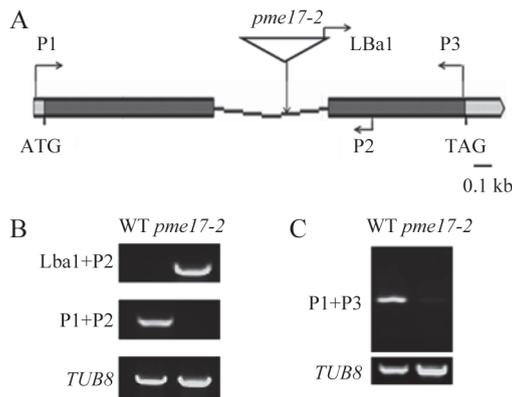
4 *pme17-2*突变体对*Pst* DC3000侵染更敏感

将*Pst* DC3000菌液分别侵染野生型和*pme17-2*突变体真叶, 侵染后4 d观察叶片致病表型, 发现*pme17-2*的叶片几乎全部变成黄色, 且比野生型更严重(图4-A)。另外, 我们还检测了*pst* DC3000侵染后野生型和*pme17-2*突变体真叶菌落生长情况, 统计结果显示: 在接种后0 d, 野生型和*pme17-2*叶片的菌落密度分别是 $10^{(2.83\pm 0.08)}$ 和 $10^{(2.75\pm 0.06)}$ CFU·cm⁻², 二者并没有显著差异(*t*检验,

$P<0.01$); 而在接种后4 d, 野生型和*pme17-2*叶片的菌落密度分别是 $10^{(6.71\pm 0.09)}$ 和 $10^{(7.23\pm 0.12)}$ CFU·cm⁻², 后者显著高于前者(*t*检验, $P<0.01$)。可见, *pme17-2*突变体对病原菌*Pst* DC3000侵染更加敏感, 也说明*PME17*基因在防御病原菌*Pst* DC3000侵染过程中发挥了积极作用。

讨 论

植物细胞壁在抗病和抗其他逆境胁迫中发挥屏障作用(刘清泉等2014)。PME在细胞壁合成以及调节其弹性、通透性等方面发挥重要作用。本

图3 *pme17-2*突变体的鉴定Fig.3 Identification of *pme17-2* mutant

A: *PME17*基因结构图以及*pme17-2*突变体T-DNA插入位点; B: 基因组DNA PCR鉴定*pme17-2*纯合体; C: RT-PCR显示*pme17-2*纯合体是*PME17*基因的表达下调突变体。

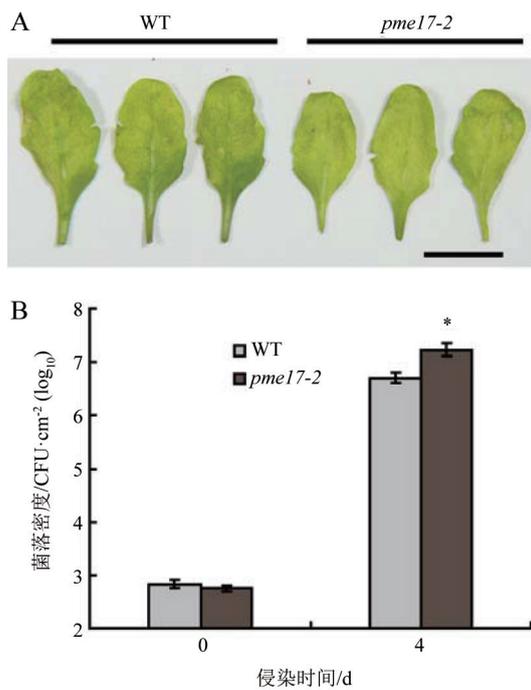


图4 *pme17-2*突变体对*Pst* DC3000侵染比野生型更加敏感
Fig.4 *pme17-2* mutant is more sensitive than wild-type plant to *Pst* DC3000 infection

A: *Pst* DC3000菌液侵染4 d后的野生型和*pme17-2*突变体叶片, 标尺=1 cm; B: *Pst* DC3000菌液侵染后的叶片菌落密度, \log_{10} 表示纵坐标为菌落密度对10取对数后的数值。*表示差异显著, 经*t*检验, $P < 0.01$ 。

文以一个拟南芥PME基因*PME17*为对象, 研究其在植株中的表达情况, 并且初步研究了*pme17-2*突变体在抵抗*Pst* DC3000中的功能。结果表明, 在正常

生长条件下, *PME17*基因在一些极性生长的细胞如根毛、叶毛中强烈表达, 也在主根和花器官里强烈表达; 这与Senechal等(2014)发现*PME17*基因在主根分生区和伸长区强烈表达的结果一致。我们发现在子叶部分也有较弱的GUS染色, 染色部位主要在子叶边缘, 而Senechal等的GUS染色结果显示*PME17*基因并不在子叶表达, 这可能是由于不同转基因植株GUS报告基因插入位点不同而导致的差异, 但我们在大多数(19/31)转基因植株中观察到子叶能够被GUS染液染色的现象, 因此本实验结果可能更合理。总之, 本文数据暗示*PME17*基因参与主根、叶毛、子叶、花器官的细胞壁合成过程。我们也观察了*pme17-2*突变体的结实状况并与野生型作比较, 发现*pme17-2*突变体结实率为 $93.3\% \pm 2.4\%$ ($n=485$), 和野生型($95.1\% \pm 3.7\%$, $n=363$)相比并没有显著差异。突变体的种子形态正常且能够正常萌发, 说明*pme17-2*突变体的育性以及种子发育是正常的, 这可能是因为拟南芥中有多个PME, 功能冗余所致。

在*Pst* DC3000的侵染下, *PME17*基因加强表达, 说明*PME17*的表达受*Pst* DC3000侵染诱导。和野生型植株相比, *pme17-2*突变体对*Pst* DC3000侵染更加敏感, 说明PME17发挥了抵御*Pst* DC3000侵染的功能。其作用机制可能是在病菌侵染过程中, PME17通过对新合成的果胶进行线性催化的方法去甲酯化(Ezaki等2005), 使得细胞壁更加坚硬, 以此来抵抗病原菌入侵。植物抗病的过程可能与水杨酸信号途径和茉莉酸信号途径有关(冯汉青等2014), *Pst* DC3000侵染诱导*PME17*基因表达可能与茉莉酸信号途径有关。Bethke等(2014)在研究病原菌对PME活性的诱导机制时发现, 利用芸苔生交链格孢(*Alternaria brassicicola*)侵染拟南芥野生型以及不同信号途径突变体, 包括*dde2*突变体(阻断茉莉酸信号途径)、*ein2*突变体(阻断乙烯信号途径)、*sid2*和*pad4*突变体(阻断水杨酸信号途径), 发现只有在*dde2*突变体中, PME的活性不因病原菌侵染而增强, 而野生型和其他突变体中的PME的活性都受芸苔生交链格孢侵染诱导而显著增强, 说明茉莉酸信号途径介导了病原菌激活拟南芥PME活性的过程。总之, 病原菌侵染植株引起植物体内茉莉酸水平升高, 从而诱导PME基因*PME17*强烈表达, 提高细胞PME的活性, 加固细胞壁, 可能是植物抵抗病原菌侵染的一种防御机制。

参考文献

- 冯汉青, 白晶月, 管冬冬, 贾凌云, 孙坤(2014). 细胞外ATP通过刺激NADPH氧化酶缓解水杨酸诱导的细胞死亡. 植物生理学报, 50 (11): 1639~1644
- 刘清泉, 陈亚华, 沈振国, 郑录庆(2014). 细胞壁在植物重金属耐受性中的作用. 植物生理学报, 50 (5): 605~611
- Bethke G, Grundman RE, Sreekanta S, Truman W, Katagiri F, Glazebrook J (2014). *Arabidopsis* pectin methylesterases contribute to immunity against *Pseudomonas syringae*. *Plant Physiol*, 164 (2): 1093~1107
- Bosch M, Hepler PK (2005). Pectin methylesterases and pectin dynamics in pollen tubes. *Plant Cell*, 17 (12): 3219~3226
- Caffall KH, Mohnen D (2009). The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydr Res*, 344 (14): 1879~1900
- Ezaki N, Kido N, Takahashi K (2005). The role of wall Ca^{2+} in the regulation of wall extensibility during the acid-induced extension of soybean hypocotyl cell walls. *Plant Cell Physiol*, 46 (11): 1831~1838
- Micheli F (2007). Pectin methylesterases: cell wall enzymes with important roles in plant physiology. *Trends Plant Sci*, 6 (9): 414~419
- Moustacas AM, Nari J, Borel M (1991). Pectin methylesterase, metal ions and plant cell-wall extension. *Biochem J*, 279 (Pt 2): 351~354
- Novosel'skaya IL, Voropaeva NL, Semenova LN, Rashidova SS (2000). Trends in the science and applications of pectins. *Chem Nat Compd*, 36 (1): 1~10
- Pelloux J, Rusterucci C, Mellerowicz EJ (2007). New insights into pectin methylesterase structure and function. *Trends Plant Sci*, 12 (6): 267~277
- Senechal F, Graff L, Surcouf O, Marcelo P, Rayon C, Bouton S, Mareck A, Mouille G, Stintzi A, Hofte H et al (2014). *Arabidopsis* PECTIN METHYLESTERASE17 is co-expressed with and processed by SBT3.5, a subtilisin-like serine protease. *Ann Bot*, 144 (6): 1161~1175
- Shen Z, Pappan K, Mutti NS, He QJ, Denton M, Zhang Y, Kanost MR, Reese JC, Reeck GR (2005). Pectin methylesterase from the rice weevil, *Sitophilus oryzae*: cDNA isolation and sequencing, genetic origin, and expression of the recombinant enzyme. *J Insect Sci*, 5: 21~30
- Smith BG, Harris PJ (1999). The polysaccharide composition of Poales cell walls: Poaceae cell walls are not unique. *Biochem Syst Ecol*, 27 (1): 33~53
- Tan XY, Liu XL, Wang W, Jia DJ, Chen LQ, Zhang XQ, Ye D (2010). Mutations in *Arabidopsis* nuclear-encoded mitochondrial phage-type RNA polymerase gene *RPOTm* led to defects in pollen tube growth, female gametogenesis and embryogenesis. *Plant Cell Physiol*, 51 (4): 635~649
- Zimmermann P, Hirsch-Hoffmann M, Henning L, Gruissem W (2004). GENEVESTIGATOR. *Arabidopsis* microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiol*, 136 (1): 2621~2632