

超表达岷江百合类萌发素蛋白基因*LrGLP2*增强烟草对几种病原真菌的抗性

韩青, 杨野, 陈瑞, 葛锋, 陈朝银, 刘迪秋*

昆明理工大学生命科学与技术学院, 昆明650500

摘要: 类萌发素蛋白(germin-like proteins, GLPs)是普遍存在于植物体内的具有多种功能的糖蛋白, 属于cupins蛋白家族。岷江百合类萌发素蛋白基因*LrGLP2*响应病原真菌尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)的入侵。为了验证该基因的功能, 本文构建了*LrGLP2*的植物超表达载体并转入烟草中, PCR筛选获得了35棵阳性转基因烟草。Southern杂交和qRT-PCR分析显示, *LrGLP2*基因已成功整合到转基因烟草基因组中并稳定表达。体外抑菌实验表明*LrGLP2*转基因烟草叶片粗蛋白能够不同程度地抑制葡萄座腔菌(*Botryosphaeria dothidea*)、尖孢镰刀菌和灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)菌丝的生长。活体接种结果显示, 转基因烟草具有很强的抗尖孢镰刀菌和灰葡萄孢侵染的能力。此外, 尖孢镰刀菌侵染前后, 与野生型烟草相比, T₂代转基因烟草中超氧化物歧化酶、谷胱甘肽硫转移酶和草酸氧化酶酶活性均显著增强。本文的研究结果表明岷江百合类萌发素蛋白基因*LrGLP2*是一个抗真菌功能基因, 在烟草中超表达增强了T₂代转基因烟草对几种病原真菌的抗性。

关键词: 岷江百合; 类萌发素蛋白; 尖孢镰刀菌; 病原真菌抗性

Overexpression of Germin-Like Protein Gene from *Lilium regale* Enhance Resistance to Several Pathogenic Fungi in Transgenic Tobacco Plants

HAN Qing, YANG Ye, CHEN Rui, GE Feng, CHEN Chao-Yin, LIU Di-Qiu*

Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China

Abstract: Germin-like proteins (GLPs) are ubiquitous plant glycoproteins and belong to the cupin super family. The GLPs possess diverse functional roles in plants. Previously, a *GLP* gene from *Lilium regale* Wilson, *LrGLP2*, responded to the infection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lilii*. In order to verify the function of *LrGLP2*, the constitutive plant expression vector of *LrGLP2* was constructed and transferred into tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv Xanthi). Totally, there were 35 positive transgenic tobacco screened out through the polymerase chain reaction (PCR) analysis. The *LrGLP2* gene was successfully integrated into the genome of the transgenic tobacco lines and expressed as expected in the transformants through Southern blotting and quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR) analysis. The antifungal activity of *LrGLP2* was detected *in vitro* plates, and the crude protein extract of transgenic tobacco lines inhibited the hyphal growth of the *B. dothidea*, *F. oxysporum*, and *B. cinerea*, respectively. Furthermore, *in vivo* inoculation assay indicated that the transgenic tobacco lines showed strong resistance to the infection of *F. oxysporum* and *B. cinerea* stress, respectively. Simultaneously, the SOD, GST and OXO showed significantly higher activities in the T₂ transgenic lines than in wild type under normal conditions or after inoculation with *F. oxysporum*. In conclusion, overexpression of *LrGLP2* from *L. regale* enhanced resistance to several pathogenic fungi in the T₂ transgenic tobacco plants.

Key words: *Lilium regale*; germin-like protein; *Fusarium oxysporum*; resistance to fungal pathogen

植物类萌发素蛋白(germin-like proteins, GLPs)是在植物中普遍存在的一类与小麦(*Triticum aestivum*)萌发素(germin)序列高度相似的蛋白家族, 它们以糖蛋白的形式通过离子键结合存在于细胞外基质中, 绝大多数GLPs为稳定的低聚物(Druka等2002)。GLPs含有β-桶状结构, 与萌发素同属于cupin蛋白家族。Cupin家族主要包括环化酶、异

构酶、双加氧酶、脱羧酶、糖或生长素结合蛋白、单体或者二聚体球蛋白以及种子贮藏蛋白(Druka等2002)。GLPs在植物生长发育过程中发挥

收稿 2015-05-15 修定 2015-10-09

资助 国家自然科学基金(31160401)。

* 通讯作者(E-mail: diqiuliu@126.com; Tel: 0871-65920621)。

重要的生物学功能,同时也参与植物对生物及非生物胁迫的防卫反应。

一些GLPs具有酶学活性,如草酸盐氧化酶(oxalate oxidase, OXO) (Lane等1993)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD) (Christensen等2004)。OXO催化草酸盐产生 H_2O_2 , SOD催化活性氧(reactive oxygen species, ROS)产生 H_2O_2 。植物受到病原菌感染后, GLPs催化产生的 H_2O_2 可在细胞壁修复时的部分交联中起作用, 延缓并阻止病原菌的侵入与扩散(Christensen等2004)。同时, H_2O_2 作为植物体内的一种信号分子, 能够诱导防御基因表达, 进而提高植物的抗病性(Dunwell等2008)。在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中超表达甜菜(*Beta vulgaris*) *BvGLP-1*, 转基因植株不仅产生的 H_2O_2 增加, 而且明显增强了对*Verticillium longisporum*和*Rhizoctonia solani*两种病原真菌的抗性(Knecht等2010)。通过RNA干涉使水稻(*Oryza sativa*)类萌发素蛋白基因*OsGLP1*沉默, *OsGLP1*功能缺失植株的高度只有大约正常植株的一半, 谷粒也不饱满, 同时转基因植株对真菌病害的敏感度增加, 如纹枯病和稻瘟病(Banerjee和Maiti 2010)。

岷江百合(*Lilium regale*)又名王百合, 多年生草本植物, 是中国特有的野生百合, 仅分布于四川西部岷江流域海拔800~2 700 m的河谷到山腰的岩石缝中, 具有极强的抗病性(Lim等2003)。在前期研究中, 对岷江百合中一个GLP基因*LrGLP2*的全长cDNA进行了克隆和表达特性分析, qRT-PCR分析结果显示, 岷江百合接种尖孢镰刀菌2 h后, *LrGLP2*的表达迅速上调, 12 h表达量急剧上升, 至24 h表达量达到最大值, 可见*LrGLP2*参与岷江百合对尖孢镰刀菌的防卫反应(刘亚龙等2013)。本研究构建*LrGLP2*的超表达载体, 转入烟草中过表达, 通过对转基因烟草进行体内体外抑菌实验及几种抗病相关酶活的检测以探讨*LrGLP2*参与植物抗病反应的生物学功能, 为深入认识岷江百合抗尖孢镰刀菌的分子机制奠定基础。

材料与方 法

1 材料

植物材料为本实验室通过组织培养获得的烟草(*Nicotiana tabacum* L. cv Xanthi)无菌苗。将烟草种子用75%乙醇浸泡30 s, 无菌水洗涤后用0.1% $HgCl_2$ 浸泡8~10 min, 然后再用无菌水洗涤若干次, 播种于1/2 MS培养基上, 28 °C暗培养5~8 d, 待种子发芽后转至光照培养箱(25 °C, 16 h·d⁻¹光照), 以后每月继代一次。

所用LBA4404根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)、尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)、葡萄座腔菌(*Botryosphaeria dothidea*)和灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)由本实验室保存。

2 方法

2.1 *LrGLP2*超表达载体构建

本研究采用的植物超表达载体是pCAM-BIA2300S, 其T-DNA区含有2个花椰菜花叶病毒(CaMV) 35S启动子, 具有卡那霉素抗性基因*NPTII*。在扩增*LrGLP2* ORF的特异引物上游分别添加限制性内切酶*Bam*HI和*Eco*RI的识别位点(正向引物5' GGATCCGCAGTGGTATCAACGCA-GAGTACA 3'和反向引物5' GAATTCATCCAT-CAGAACTTAGCCTGGAGC 3'), 扩增产物最初连接至pMD-18T载体(Takara, 日本)中。用*Bam*HI和*Eco*RI双酶切pMD-18T-*LrGLP2*载体得到*LrGLP2*的全长ORF, 用同样的限制性内切酶消化pCAM-BIA2300S空载体后, 对*LrGLP2*的ORF以及pCAM-BIA2300S空载体进行连接。并将连接产物转化到大肠杆菌DH5 α 菌株中, 通过PCR筛选得到重组质粒pCAMBIA2300s-*LrGLP2* (图1)。

2.2 阳性转基因烟草筛选

采用CTAB法提取转基因烟草植株叶片的基因组DNA, 取1 μ L提取的基因组DNA进行琼脂糖凝胶电泳检测其完整性和浓度。以转基因植株的基因组DNA为模板用扩增*LrGLP2*的特异引物进



图1 岷江百合*LrGLP2*的表达框示意图

Fig.1 Expression cassette of *LrGLP2* from *L. regale*

行PCR反应。PCR结束后,取8 μL 产物进行琼脂糖凝胶电泳以检测阳性转基因植株。

2.3 Southern杂交

为明确*LrGLP2*基因在烟草基因组中的拷贝数,我们随机挑选了5个T₀代阳性转基因烟草株系及野生型烟草进行Southern杂交分析。取10 μg DNA样品,用*EcoRI*进行酶切反应16 h。酶切结束后,将酶切产物在1%琼脂糖凝胶上进行电泳分离并转移至尼龙膜(Hybond N⁺, Amersham, 英国)。以pCAMBIA2300s T-DNA的新霉素磷酸转移酶基因(*NPTII*)片段(460 bp)作为特异性探针并用同位素³²P (Prime-a-Gene Labeling System Kit, Promega)标记。杂交及放射自显影方法参照Liu等(2006)反向Northern杂交的方法。

2.4 qRT-PCR

采用异硫氰酸胍法提取正常生长的5个*LrGLP2*转基因烟草株系的总RNA,逆转录合成第一链cDNA后进行real-time PCR以分析*LrGLP2*在转录水平的表达。以烟草*NiACT*基因(GenBank登录号AB158612.1)为内参基因,扩增内参基因*NiACT*的特异引物序列为5' TCCCATTGAGCATG-GAATAGTAAGC 3'和5' TACATGGCAGGTA-CATTGAAAGTCT 3'。扩增*LrGLP2*基因的特异引物序列为5' CTTCTCCCTGACTTCCGTCTC 3'和5' CCGTCAACTGTCTTCTTGTCCTCAACT 3'。qRT-PCR的反应条件为:50 $^{\circ}\text{C}$ 2 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,40个循环;之后是熔解曲线分析。qRT-PCR每个反应均设置3次重复,以相对表达量最低的转基因T₂代株系中*LrGLP2*的表达量为对照,用2^{- $\Delta\Delta\text{CT}$} 法计算*LrGLP2*在其他样品中的表达水平。

2.5 转基因烟草体外平板抑菌实验

提取5个转基因株系和野生型烟草植株的叶片总蛋白,蛋白提取方法参照Liu等(2013a)方法。将尖孢镰刀菌、葡萄座腔菌、灰葡萄孢3种真菌接种于PDA固体培养基中央,28 $^{\circ}\text{C}$ 倒置培养2 d左右,待菌落直径约为3 cm时,在菌落周围均匀放置无菌滤纸片(直径为6 mm),并进行编号。将所提取的总蛋白浓度稀释到5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,按编号分别取20 μL 蛋白溶液滴于各滤纸片上,同时添加等体积的空白对照(蛋白提取缓冲液),置于28 $^{\circ}\text{C}$ 培养,培养

期间不断观察转基因烟草叶片总蛋白对真菌生长的抑制情况,并据此来评价转基因株系的体外抗真菌活性。

2.6 转基因烟草活体接种实验

选取体外抑菌效果较好的3个转基因株系G2-1、G2-2和G2-3进行后续实验。

2.6.1 叶片接种

选取完全展开且大小均一的转基因烟草和野生型烟草叶片,用无菌枪头形成大小一致的伤口,分别接种200 μL 尖孢镰刀菌和灰葡萄孢孢子悬液(10^6 孢子 $\text{m}\cdot\text{L}^{-1}$),用保鲜膜包裹所接种叶片以保湿。接种7 d后收集接种叶片以观察受病菌侵染情况。同时,参照Jayaraj和Punja (2007)的方法计算病斑面积。

2.6.2 根部接种

为验证*LrGLP2*转基因烟草对尖孢镰刀菌侵染的抗性,挑选大小和生长状态一致的转基因和野生型烟草组培苗,洗去培养基后将根部完全浸入尖孢镰刀菌孢子悬液30 min,之后将接种的烟草置于无菌水中培养,10 d后记录发病情况。

2.7 转基因烟草抗病反应相关酶活的测定

取0.2 g烟草叶片加液氮研成粉末,加入2 mL预冷的提取液充分研磨,于4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 \times g离心20 min,所得上清液即为粗酶液,用于检测接种尖孢镰刀菌前后转基因及野生型烟草中3种抗病反应相关酶活性。

2.7.1 SOD酶活性测定

SOD酶活性测定参照Gay和Tuzun (2000)的方法。反应体系含有100 μL 粗酶液、0.8 mL磷酸钠缓冲液(pH 7.8, 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)、1.5 mL L-蛋氨酸(Met, 26 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)、0.3 mL 0.75 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NBT溶液和0.3 mL核黄素(0.2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,含有1.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA)。于25 $^{\circ}\text{C}$ 、光照强度为3 650 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 的光照培养箱内反应15 min后,立即取出,终止反应。于560 nm波长处测定OD值。以将NBT的还原抑制到对照一半(50%)时所需的酶量为一个SOD酶活性单位。

2.7.2 谷胱甘肽硫转移酶(glutathione S-transferase, GST)酶活性测定

GST酶活性测定参照Liu等(2013b)的方法。反应体系含有1.5 mL磷酸钠缓冲液(pH 7.0, 50

mmol·L⁻¹), 75 μL 100 mmol·L⁻¹的GSH, 15 μL GST粗酶液。加入75 μL 100 mmol·L⁻¹的CDNB启动反应, 以不加CDNB的为空白对照管, 测定在OD₃₄₀的变化。以每分钟催化1 μmol CDNB结合GSH的酶量为1个酶活性单位(1 U)。

2.7.3 OXO酶活性测定

OXO酶活性测定参照Zhang等(1996)的方法。取100 μL粗酶液加入到3.5 mL OXO显色液(50 mmol·L⁻¹丁二酸/NaOH缓冲液, pH 3.8, 60%乙醇, 5 U·mL⁻¹辣根过氧化物酶, 250 μL·L⁻¹ N,N-二甲基苯胺, 80 mg·L⁻¹ 4-氨基安替比林), 37 °C水浴5 min后加入0.4 mL草酸(50 mmol·L⁻¹, pH 4.0)溶液, 混匀, 37 °C水浴10 min, 加入20 μL NaOH (1 mol·L⁻¹)溶液终止反应, 测定反应液在555 nm处的OD值。每分钟催化产生1 μmol H₂O₂为1个酶活性单位(1 U)。

2.8 统计分析

*LrGLP2*的相对表达水平、病斑面积和酶活测定结果用均值和标准差进行表示。用SPSS统计分析软件对所得数据进行分析 and 处理。野生型和转基因植株之间的统计差异采用*t*检验进行分析。

实验结果

1 *LrGLP2*转基因烟草的产生及筛选

将携带有*LrGLP2*表达框的农杆菌*Agrobacterium tumefaciens* LBA4404分8次侵染150多个烟草叶盘, 经卡那霉素筛选出46棵T₀代植株。通过基因组DNA的PCR扩增筛选出35个*LrGLP2*阳性转基因烟草单株, 部分烟草转基因植株的DNA扩增结果如图2所示。观察*LrGLP2*转基因烟草阳性株与野生型烟草的生长过程, 没有发现两者形态上的差异。

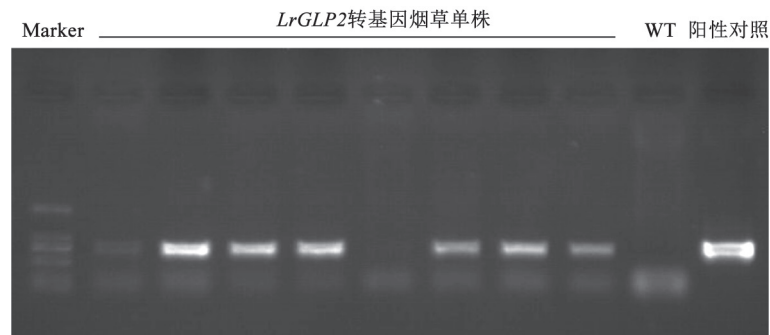


图2 *LrGLP2*转基因烟草的PCR检测

Fig.2 PCR analysis of *LrGLP2* transgenic tobacco plantlets

阳性对照: pCAMBIA2300S-*LrGLP2*质粒; WT: 野生型烟草; Marker: DL2000 DNA Marker.

2 Southern杂交分析

随机选择5个阳性转基因烟草株系G2-1、G2-2、G2-3、G2-8和G2-12, 以它们为材料进行Southern杂交分析, 结果如图3所示。5个*LrGLP2*转基因烟草株系中均出现特异杂交条带, 而在野生型烟草植株中未检测到*NPTII*, 表明*LrGLP2*已成功整合到转基因烟草的基因组中。至于*LrGLP2*插入的最低拷贝数, G2-3中为1个, G2-1中为2个, G2-2以及G2-8中为3个, G2-12中为4个。随后通过共分离分析, 获得了上述5个阳性转基因株系的T₂代植株。

3 转基因烟草中*LrGLP2*的表达水平分析

为了确定外源基因是否正常表达, 本文通过qRT-PCR检测*LrGLP2*在转基因T₂代烟草中的表达

水平。从图4可见, *LrGLP2*在所选的5个转基因烟草T₂代株系中均有表达, 且在G2-1株系中表达量最高, 而在野生型烟草植株中没有检测到*LrGLP2*的转录产物。表明*LrGLP2*基因与CaMV 35S启动子构成的表达框在转基因烟草中稳定表达。

4 *LrGLP2*转基因烟草体外抑菌活性

提取5个转基因T₂代烟草株系及野生型叶片总蛋白进行体外抑菌实验。结果如图5所示, 与野生型相比, 5个*LrGLP2*转基因烟草叶片粗蛋白对葡萄座腔菌、尖孢镰刀菌和灰葡萄孢有不同程度的抑制作用, 然而5个转基因株系对同一种病原真菌的抑制程度不尽相同。选取抑菌效果较好的3个转基因株系G2-1、G2-2和G2-3进行酶活性测定和活体抑菌实验。

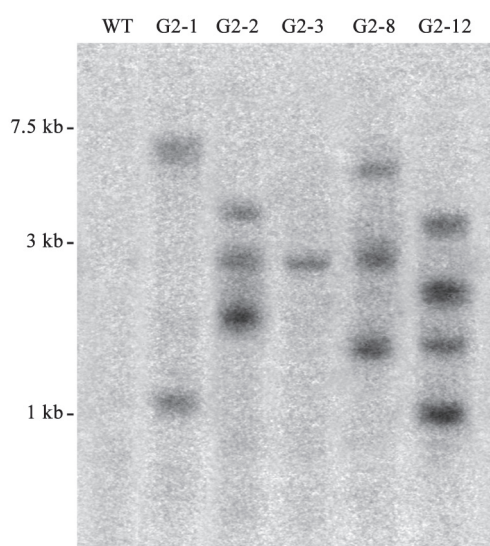


图3 *LrGLP2*转基因烟草的Southern blotting分析
Fig.3 Southern blot profile of *LrGLP2* transgenic tobacco lines
WT: 野生型烟草; G2-1、G2-2、G2-3、G2-8和G2-12: *LrGLP2*转基因 T_0 代株系。

5 *LrGLP2*转基因烟草的活体接种

由于葡萄座腔菌不是烟草的致病菌,因此选择尖孢镰刀菌和灰葡萄孢进行烟草叶片活体接种实验。用尖孢镰刀菌、灰葡萄孢孢子悬液接种转基因和野生型烟草叶片7 d后,野生型叶片形成较大的病斑,叶片出现黄化及腐烂现象,而*LrGLP2*转基因植株G2-1、G2-2和G2-3形成的病斑较小,黄化及腐烂发生的程度较野生型明显减轻。从图6可以看出,转基因株系的病斑面积约是野生型的1/3,这表明转基因烟草具有很强的抗尖孢镰刀菌和灰葡萄孢侵染的能力。

为验证叶片接种结果,将生长一致的*LrGLP2*

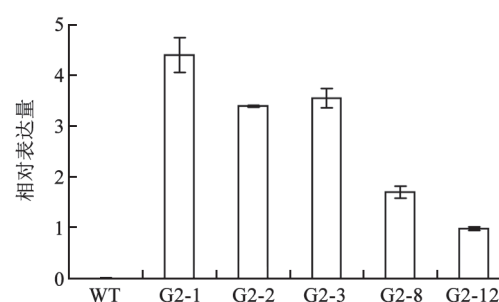


图4 转基因 T_2 代烟草植株中*LrGLP2*的表达水平
Fig.4 Expression analysis of *LrGLP2* in the T_2 transgenic tobacco lines

WT: 野生型烟草; G2-1、G2-2、G2-3、G2-8和G2-12: *LrGLP2*转基因 T_2 代株系。

转基因烟草和野生型烟草组培苗根部接种尖孢镰刀菌。水培10 d后,野生型烟草与转基因烟草的生长状态出现明显的差异(图7)。野生型烟草叶片枯萎,大部分根组织腐烂变黑并脱落。而*LrGLP2*转基因烟草虽然也有部分根变黑,但整体生长较为正常。毫无疑问,*LrGLP2*转基因烟草对尖孢镰刀菌侵染具有很强的抗性。

6 *LrGLP2*转基因烟草酶活性分析

植物遭受环境胁迫后,体内细胞中会积累大量的ROS。当ROS的积累量超出机体的活性氧清除能力时,植物体内蛋白质、膜脂以及其他细胞组分会受到氧化损伤,从而使植物产生多种不良生理反应,甚至死亡。GST是活性氧清除系统的重要组成部分,GST能催化有害物质的亲电子基团与还原型GSH的巯基偶联,使之极性增强,水溶性增加,易于被机体清除,从而保护DNA及一些蛋白质免受损伤。GLPs通常以酶、受体和结构蛋白的形

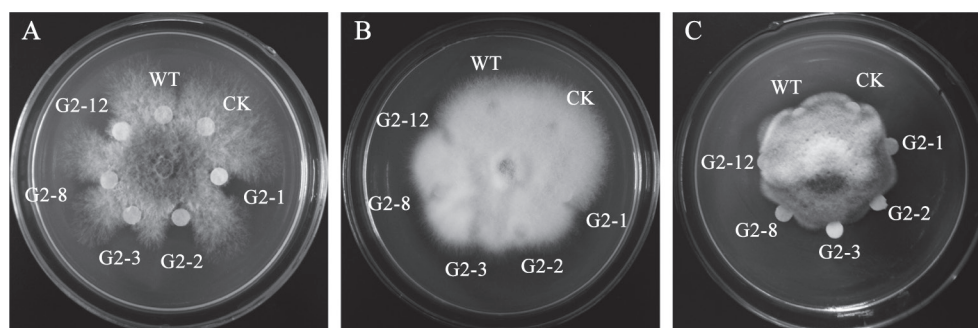


图5 *LrGLP2*转基因烟草株系蛋白提取液的体外抗真菌活性

Fig.5 Antifungal activity of the crude protein extract of *LrGLP2* transgenic tobacco lines

A: 葡萄座腔菌; B: 尖孢镰刀菌; C: 灰葡萄孢。CK: 蛋白提取缓冲液; G2-1、G2-2、G2-3、G2-8和G2-12: *LrGLP2*转基因 T_2 代株系。

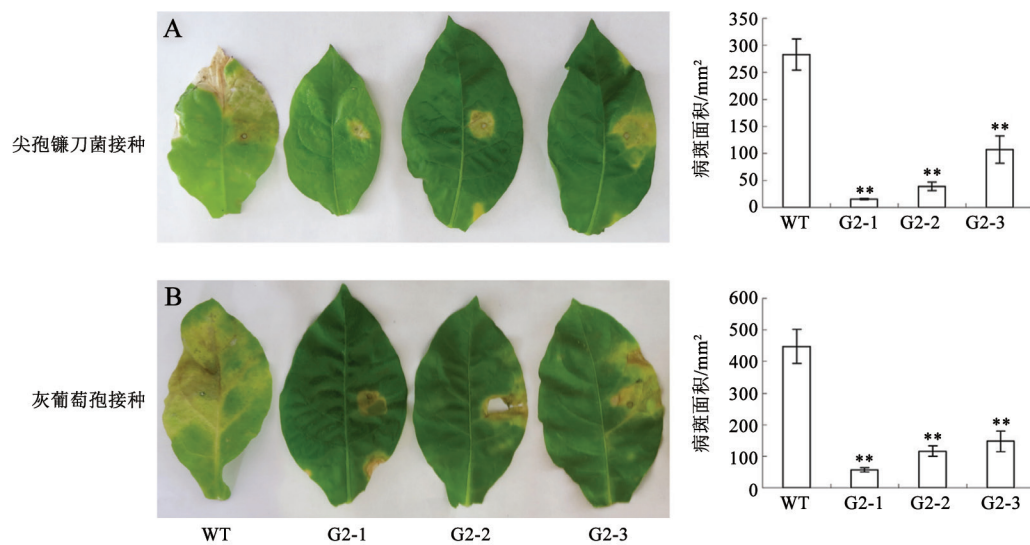


图6 *LrGLP2*转基因株系及野生型烟草叶片接种尖孢镰刀菌和灰葡萄孢后病斑面积测定
Fig.6 Measurement of lesion in the leaves of *LrGLP2* transgenic tobacco lines and wild type caused by the inoculation of *F. oxysporum* and *B. cinerea*
**表示与野生型差异显著($P < 0.01$)。



图7 *LrGLP2*转基因烟草对尖孢镰刀菌的抗性增强
Fig.7 Enhanced resistance of *LrGLP2* transgenic tobacco seedlings against *F. oxysporum* by immersing the roots in the spores suspension.
WT: 野生型烟草; G2-1、G2-2和G2-3: *LrGLP2*转基因 T_2 代株系。

式发挥功能。一些GLPs具有OXO活性,一些GLPs则具有SOD活性,它们在植物体内均能催化ROS产生 H_2O_2 。为了研究这些抗病反应相关酶活在转基因株系中是否受到*LrGLP2*超表达的影响,测定了尖孢镰刀菌接种前后转基因株系G2-1、G2-2、G2-3和野生型烟草中的SOD、GST和OXO酶活性。

正常生长条件下,与野生型相比,*LrGLP2*转基因株系的SOD、GST和OXO活性分别提高了35.07%~46.62%、24.15%~29.85%和31.59%~39.77%。尖孢镰刀菌侵染后,野生型烟草和*LrGLP2*转基因烟草的SOD、GST和OXO活性均有增强,但*LrGLP2*转基因烟草的3种酶活均显著高于野生型烟草(图8)。上述结果表明,转基因烟草株系中SOD、GST和OXO活性的提高与*LrGLP2*的超表达以及对几种病原真菌的抗性密不可分。

讨 论

GLPs是普遍存在于植物中的一类与Germin序列高度同源的、位于细胞外基质的可溶性糖蛋白,在植物生长发育和逆境胁迫应答中起重要作用。岷江百合是具有极强抗病性的一种珍稀野生百合,在前期的研究中,基于岷江百合受尖孢镰刀菌侵染过程的SSH cDNA文库,克隆获得了一个GLP基因*LrGLP2*,并发现*LrGLP2*参与岷江百合对尖孢镰刀菌的防卫反应(刘亚龙等2013)。为了证实*LrGLP2*是否具有抗真菌胁迫的功能,本研究构建了*LrGLP2*超表达载体并转化烟草。Southern blotting及qRT-PCR分析结果显示,*LrGLP2*成功整合至转基因烟草基因组中,并在 T_2 代转基因烟草中稳定表达(图3和图4)。

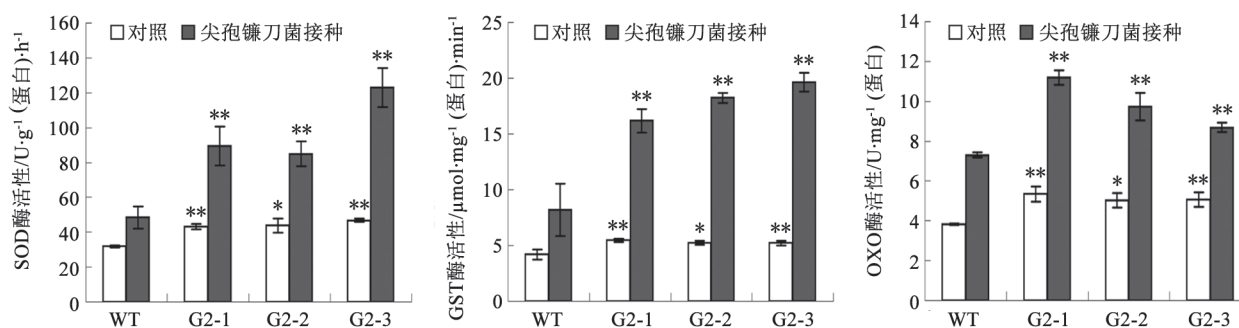
图8 尖孢镰刀菌侵染对*LrGLP2*转基因烟草及野生型烟草中SOD、GST和OXO酶活性的影响

Fig.8 Effects of infection of *F. oxysporum* on enzymatic assay for SOD, GST, and OXO in the *LrGLP2* transgenic lines and wild type
WT: 野生型烟草; G2-1、G2-2和G2-3: *LrGLP2*转基因 T_2 代株系; *表示 $P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$ 。

作为病程相关蛋白家族的一员, GLPs与植物抵御外源物质(如病原菌等)伤害密切相关。*GLP*基因的超表达增强植株对病原菌及盐胁迫的抗性(Knecht等2010; Lu等2010; Wang等2013), 另外, Rietz等提出GLPs参与欧洲油菜(*Brassica napus*)对核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)侵染后氧爆发过程中的防御反应(Rietz等2012)。Jøhnik等发现受*Rhizoctonia* sp.侵染后, 欧洲云杉(*Picea abies*)根部的2个*GLP*基因上调表达(Jøhnik等2005)。为了进一步研究*LrGLP2*抗真菌胁迫的能力, 本文选择了5个*LrGLP2*转基因株系对葡萄座腔菌、尖孢镰刀菌和灰葡萄孢3种病原真菌进行体外平板抑菌实验, 虽然5个转基因株系抑制3种真菌菌丝生长的程度不尽相同, 但明显高于野生型植株(图5)。随后选择抗性较强的3个株系进行活体接种实验, 分别接种尖孢镰刀菌和灰葡萄孢孢子悬液后, 野生型叶片形成较大的病斑, 而*LrGLP2*转基因株系G2-1、G2-2和G2-3形成的病斑很小(图6)。此外, *LrGLP2*转基因烟草与野生型烟草组培苗根部接种尖孢镰刀菌后*LrGLP2*转基因烟草组培苗正常生长, 而野生型烟草根部腐烂脱落, 叶片枯萎(图7)。显然, *LrGLP2*的过表达显著增强了转基因烟草对尖孢镰刀菌和灰葡萄孢的抗性。

GLPs普遍存在于植物各发育阶段的多个组织器官中, 在植物生长发育及防御系统中起重要作用。研究者指出, GLPs通过三种形式起多种生物学功能: 一些GLPs具有酶活性, 如OXO和SOD等(Lane等1993; Nakata等2002); 一些GLPs作为受体参与信号传导, 如Rhicadhesins受体、ABP19/20激素受体(Swart等1994; Ohmiya等1998); 还有一些

GLPs作为结构蛋白参与多种生理生化反应(Christensen等2004; Banerjee和Maiti 2010)。值得一提的是, OXO和SOD都能产生 H_2O_2 : OXO酶能将草酸分解为 H_2O_2 和 CO_2 (Breen和Bellgard 2010), 降解草酸, 进而消除其毒性; SOD可以将有害的ROS转变成 H_2O_2 和 O_2 (Knecht等2010)。适量浓度的 H_2O_2 既能在植物防御氧化胁迫反应中起重要作用, 又能在许多生物和非生物胁迫应答过程中作为第二信使调控相关抗氧化酶(如GSTs等)的表达(Manosalva等2009; Sakamoto等2015)。Banerjee等人用真菌和氧化剂处理超表达水稻(*O. sativa*) *GLP*基因的转基因烟草, 发现烟草中 H_2O_2 大量积累(Banerjee等2010)。本研究中, 尖孢镰刀菌侵染后, 野生型烟草和*LrGLP2*转基因烟草的SOD、GST和OXO活性都明显上升, 但*LrGLP2*转基因烟草的3种酶活均显著高于野生型烟草(图8), 这表明*LrGLP2*转基因烟草株系中, *LrGLP2*基因的超表达提高了SOD、GST和OXO这3种酶的酶活性, 且*LrGLP2*转基因株系可能通过提高相关防卫酶的活性增强对不良外界条件的防御能力。

GLPs与小麦萌发素蛋白一样, 是单cupin结构域的糖蛋白。GLPs普遍存在于植物体内, 参与植物的多种生理过程, 包括植物早期发育和抵御外界不良环境等(Sasaki等2014)。本研究发现岷江百合类萌发素蛋白基因*LrGLP2*在烟草中超表达可以增强 T_2 代转基因烟草对几种病原真菌的抗性。但是*LrGLP2*基因提高转基因烟草抗病性的具体作用机理并不十分清楚。为此, 拟在下一步研究中利用酵母双杂交技术, 分离*LrGLP2*蛋白的互作蛋白。此外, *LrGLP2*是岷江百合GLPs基因家族的成

员之一,在抗病防卫反应过程中,*LrGLP2*是否独立行使其功能或是协同其他家族成员还需要进一步深入研究。

参考文献

- 刘亚龙,李红丽,刘迪秋,张南南,何华,葛锋,陈朝银(2013). 岷江百合类萌发素蛋白基因*LrGLP2*的克隆及表达特性分析. 植物生理学报, 49 (10): 1063~1070
- Banerjee J, Das N, Dey P, Maiti MK (2010). Transgenically expressed rice germin-like protein1 in tobacco causes hyper-accumulation of H₂O₂ and reinforcement of the cell wall components. Biochem Bioph Res Co, 402: 637~643
- Banerjee J, Maiti MK (2010). Functional role of rice germin-like protein1 in regulation of plant height and disease resistance. Biochem Bioph Res Co, 394: 178~183
- Breen J, Bellgard M (2010). Germin-like proteins (GLPs) in cereal genomes: gene clustering and dynamic roles in plant defence. Funct Integr Genomic, 10: 463~476
- Christensen AB, Thordal-Christensen H, Zimmermann G, Gjetting T, Lyngkjær MF, Dudler R, Schweizer P (2004). The germinlike protein GLP4 exhibits superoxide dismutase activity and is an important component of quantitative resistance in wheat and barley. Mol Plant Microbe In, 17: 109~117
- Druka A, Kudrna D, Kannangara CG, Wettstein D, Kleinhofs A (2002). Physical and genetic mapping of barley (*Hordeum vulgare*) germin-like cDNAs. Proc Natl Acad Sci USA, 99: 850~855
- Dunwell JM, Gibbings JG, Mahmood T, Saqlan Naqvi SM (2008). Germin and germin-like proteins: evolution, structure, and function. Crit Rev Plant Sci, 27: 342~375
- Gay PA, Tuzun S (2000). Temporal and spatial assessment of defense responses in resistant and susceptible cabbage varieties during infection with *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Physiol Mol Plant P, 57: 201~210
- Jayaraj J, Punja ZK (2007). Combined expression of chitinase and lipid transfer protein genes in transgenic carrot plants enhances resistance to foliar fungal pathogens. Plant Cell Rep, 26: 1539~1546
- Jøhnk N, Hietala AM, Fossdal CG, Collinge DB, Newman M (2005). Defense-related genes expressed in Norway spruce roots after infection with the root rot pathogen *Ceratobasidium bicorne* (anamorph: *Rhizoctonia* sp.). Tree Physiol, 25: 1533~1543
- Knecht K, Seyffarth M, Desel C, Thurau T, Sheremeti I, Lou B, Oelmüller R, Cai D (2010). Expression of *BvGLP-1* encoding a germin-like protein from sugar beet in *Arabidopsis thaliana* leads to resistance against phytopathogenic fungi. Mol Plant Microbe In, 23: 446~457
- Lane BG, Dunwell JM, Ray JA, Schmitt MR, Cuming AC (1993). Germin, a protein marker of early plant development, is an oxalate oxidase. J Biol Chem, 268: 12239~12242
- Lim JH, Rhee HK, Kim YJ, Lim KB, van Tuyl JM (2003). Resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lilii* in *Lilium*. Acta Hort, 620: 311~318
- Liu D, He X, Li W, Chen C, Ge F (2013a). A β -1, 3-glucanase gene expressed in fruit of *Pyrus pyrifolia* enhances resistance to several pathogenic fungi in transgenic tobacco. Eur J Plant Pathol, 135: 265~277
- Liu D, Liu Y, Rao J, Wang G, Li H, Ge F, Chen C (2013b). Overexpression of the glutathione S-transferase gene from *Pyrus pyrifolia* fruit improves tolerance to abiotic stress in transgenic tobacco plants. Mol Biol, 47 (4): 515~523
- Liu D, Zhang X, Tu L, Zhu L, Guo X (2006). Isolation by suppressionsubtractive hybridization of genes preferentially expressed during early and late fiber development stages in cotton. Mol Biol, 40 (5): 741~749
- Lu M, Han YP, Gao JG, Wang XJ, Li WB (2010). Identification and analysis of the germin-like gene family in soybean. BMC genomics, 11: 620
- Manosalva PM, Davidson RM, Liu B, Zhu X, Hulbert SH, Leung H, Leach JE (2009). A germin-like protein gene family functions as a complex quantitative trait locus conferring broad-spectrum disease resistance in rice. Plant Physiol, 149 (1): 286~296
- Nakata M, Shiono T, Watanabe Y, Satoh T (2002). Salt stress-induced dissociation from cells of a germin-like protein with Mn-SOD activity and an increase in its mRNA in a moss, *Barbula unguiculata*. Plant Cell Physiol, 43 (12): 1568~1574
- Ohmiya A, Tanaka Y, Kadowaki K, Hayashi T (1998). Cloning of genes encoding auxin-binding proteins (ABP19/20) from peach: significant peptide sequence similarity with germin-like proteins. Plant Cell Physiol, 39 (5): 492~499
- Rietz S, Bernsdorff FEM, Cai D (2012). Members of the germin-like protein family in *Brassica napus* are candidates for the initiation of an oxidative burst that impedes pathogenesis of *Sclerotinia sclerotiorum*. J Exp Bot
- Sakamoto A, Nishimura T, Miyaki Y, Watanabe S, Takagi H, Izumi S, Shimada H (2015). *In vitro* and *in vivo* evidence for oxalate oxidase activity of a germin-like protein from azalea. Biochem Bioph Res Co, 458: 536~542
- Sasaki FT, Bravo JP, González ER, Maia IG (2014). Expression Pattern and Promoter Analysis of a *Eucalyptus grandis* Germin-like Gene. Plant Mol Biol Rep, 33 (1): 12~21
- Swart S, Logman TJ, Smit G, Lugtenberg BJ, Kijne JW (1994). Purification and partial characterization of a glycoprotein from pea (*Pisum sativum*) with receptor activity for rhicadhesin, an attachment protein of Rhizobiaceae. Plant Mol Biol, 24 (1): 171~183
- Wang T, Chen X, Zhu F, Li H, Li L, Yang Q, Chi X, Yu S, Liang X (2013). Characterization of peanut germin-like proteins, *AhGLPs* in plant development and defense. PLoS ONE, 8: e61722
- Zhang Z, Yang J, Collinge DB, Christensen HT (1996). Ethanol increases sensitivity of oxalate oxidase assays and facilitates direct activity staining in SDS gels. Plant Mol Biol Rep, 14: 266~272