

大蒜防御素基因*AsPDF1*的克隆与表达分析

陈东¹, 范海云¹, 高世雯¹, 王广龙^{1*}, 王云鹏¹, 陈伯清¹, 王连臻¹, 熊爱生²

¹淮阴工学院生命科学与食品工程学院, 江苏淮安223003

²南京农业大学园艺学院, 作物遗传与种质创新国家重点实验室, 农业农村部华东地区园艺作物生物学与种质创新重点实验室, 南京210095

摘要: 植物防御素是一类低分子量、富含半胱氨酸的抗菌多肽, 是植物防御生物和非生物侵害的重要物质之一。为了解大蒜中防御素的序列特征和功能, 本研究利用RT-PCR方法从大蒜‘苍山四六瓣’中克隆得到防御素基因*AsPDF1*。序列分析结果表明, 来源于大蒜的防御素基因含有1个246 bp的开放阅读框, 编码81个氨基酸。推测其编码的蛋白质分子量为8.45 kDa, 等电点(pI)为9.36。该蛋白含有8个保守的半胱氨酸, N端有一段23个氨基酸组成的信号肽区域, 空间结构由1个 α 螺旋和3股反向平行的 β 折叠构成。在进化关系上, 大蒜防御素与禾本科的小麦和高粱防御素蛋白最为接近。荧光定量PCR分析表明, *AsPDF1*在根、鳞茎、叶片中均有表达, 在根中表达量最高, 且能响应盐胁迫的诱导。本研究克隆的大蒜防御素基因为进一步鉴定防御素基因的生物学功能和表达调控机制奠定了基础。

关键词: 大蒜; 防御素; 盐胁迫; 基因克隆; 表达分析

植物防御素是一类碱性、富含半胱氨酸的低分子短肽, 是抗菌肽家族的主要成员之一(Carvalho和Gomes 2009)。植物防御素的分子质量约为5 kDa, 由45~54个氨基酸残基组成(Carvalho和Gomes 2011)。在三维结构上, 植物防御素保守性较强, 基本结构由3个反向平行的 β 折叠和1个 α 螺旋构成, 8个极其保守的半胱氨酸残基组成的4对二硫键负责维持空间结构的稳定(Carvalho和Gomes 2011)。前人研究表明植物防御素大多带有信号肽序列, 通过跨膜结构域分泌到胞外空间并作用于病原微生物细胞壁和细胞膜上, 破坏细胞结构, 达到杀死病原微生物的效果(Aerts等2008; Thevissen等2012)。植物防御素广泛存在于植物体内, 参与植物的防卫反应, 在植物免疫调节中起着重要的作用。

防御素最早发现在哺乳动物老鼠和豚鼠中, 之后在昆虫和人体中也发现了各种防御素(Zeya和Spitznagel 1966; Ganz等1985)。与动物和昆虫相比, 植物防御素的发现相对较晚。Mendez等(1990)在小麦与大麦种子中发现了第一个植物防御素, 因其序列特征与哺乳动物和昆虫防御素相似, 将这种小分子物质取名为植物防御素。近年来, 许多国内外研究者对各类植物防御素的抗逆功能和机制进行了大量研究, 并取得了很大的进展。转防御素基因对柑橘黄龙病发生有着较好的防御效果

(Guerra-Lupián等2018)。同样, 在白云杉中鉴定的防御素PgD5可以在不影响菌丝形态的情况下抑制菌丝伸长, 另外该蛋白可以调节真菌细胞膜的渗透性, 有效抵御真菌侵染(Picart等2012)。在小麦中的研究发现, 防御素基因*TaPDF35*的转录水平与植株防御纹枯病的能力有着密切的关系(王敏霞等2017)。目前, 植物中对防御素功能的研究主要集中在抗菌免疫方面, 但关于该蛋白是否参与植物抵御非生物逆境胁迫的报道较少。

大蒜(*Allium sativum* L.)为百合科(Liliaceae)葱属(*Allium*)植物, 既可作为调味品, 也可用来抗病杀菌。我国是世界上最主要的大蒜生产国, 大蒜栽培面积和产量均居全球首位。本试验以大蒜品种‘苍山四六瓣’为研究材料, 克隆获得大蒜防御素基因*AsPDF1*, 对该基因及其编码的蛋白进行了具体的分析, 通过荧光定量PCR技术检测该基因在不同组织和盐胁迫下的表达, 以期为进一步研究和开发利用大蒜防御素提供理论依据。

收稿 2018-10-23 修定 2018-12-29

资助 江苏省自然科学基金(BK20170460)、淮阴工学院博士科研启动基金(Z301B16531)、教育部新世纪优秀人才支持计划项目(NCET-11-0670)和江苏省自然科学基金杰出青年基金(BK20130027)。

* 通讯作者(wanggl89@hyit.edu.cn)。

1 材料与方法

1.1 材料及处理

大肠杆菌菌种DH5 α 由南京农业大学园艺学院伞形科课题组提供;总RNA提取试剂盒(RNAprep pure plant kit)购于北京天根生化科技有限公司;DNA片段回收试剂盒和质粒载体pMD19-T vector购自大连TaKaRa公司;反转录试剂盒(HiScript II Q RT SuperMix for qPCR)、聚合酶*Ex Taq*、DL2000 DNA marker、荧光定量试剂盒(ChamQ SYBR qPCR Master Mix)等均购自南京诺唯赞生物科技有限公司。

试验材料大蒜(*Allium sativum* L.)品种‘苍山四六瓣’播种于蛭石和有机质配成的混合基质中,在淮阴工学院玻璃温室内进行培养,15 d后将大蒜幼苗转移到水培箱,营养液为Hoagland标准营养液配方。缓苗7 d后对大蒜植株进行盐胁迫(200 mmol·L⁻¹ NaCl)处理,处理时间分别为0、1、4和12 h,每个处理3次重复。分别取大蒜叶片、根和鳞茎,用于RNA的提取以及cDNA的合成。

1.2 总RNA的提取及cDNA的合成

将经盐胁迫处理的不同时间的大蒜叶片、根和鳞茎材料利用RNAprep pure plant kit总RNA提取试剂盒提取总RNA,通过HiScript II Q RT SuperMix for qPCR试剂盒将大蒜总RNA反转录为cDNA。

1.3 基因克隆

根据课题组建立的大蒜转录组数据库,检索得到防御素基因序列。设计一对克隆引物PDF-F:(5'-ATGGCATCTACCAAAAGTATTG-3')和PDF-R:(5'-TCAGCAATTTTTAGCACAGAAGCA-3')。设置PCR反应条件:94°C 5 min;94°C 30 s,55°C 30 s,72°C 30 s,共35个循环;72°C 10 min,以‘苍山四六瓣’cDNA为模板扩增。采用1.0%琼脂糖凝胶电泳获得PCR产物,并克隆到pMD19-T载体上,转化大肠杆菌DH5 α ,阳性克隆送至南京金斯瑞生物科技有限公司测序。

1.4 序列分析

在NCBI数据库中获得拟南芥等各类植物的防御素蛋白质序列。采用DNAMAN软件对大蒜和其他植物的PDF序列进行比对,同时进行氨基酸疏水/亲水性预测;利用MEGA5构建进化树和编辑

并生成报告图形(Tamura等2011);相对分子量和等电点预测使用ExPASy蛋白质组分析工具中的ProtParam (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>)软件;跨膜结构域和信号肽预测分别采用TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) (Ikeda等2002)和SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (Bendtsen等2004)软件进行网上运行分析;采用SWISS-MODEL (<http://swiss-model.expasy.org>)预测蛋白质三级结构(Waterhouse等2018)。

1.5 实时定量PCR

实时定量PCR按照ChamQ SYBR qPCR Master Mix试剂盒操作说明在CFX96荧光定量PCR仪(美国Bio-Rad公司)上进行。根据克隆得到的防御素基因序列设计表达检测引物上游引物BD-PDF-F(5'-ATGGGTGGAAGAGGAGGAGGAA-3')和下游引物BD-PDF-R(5'-ACAGAAGCATCTACGGCGGAAG-3'),用大蒜*SAND*基因作为内参基因,其引物为BD-SAND-F(5'-GCGTCAACGAATGTTC-CAATTACCA-3')和BD-SAND-R(5'-TCTCTTCAGTCTCAACTTCATCAGCAT-3'),目标基因与*SAND*基因一起扩增。基因表达量的计算采用 ΔC_T 法,相对表达水平用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 表示(Livak和Schmittgen 2001)。

2 实验结果

2.1 大蒜防御素基因的克隆

以大蒜品种‘苍山四六瓣’的cDNA为模板,分别以PDF-F和PDF-R作为上游和下游引物,PCR扩增后得到一个约250 bp的条带(图1)。测序结果表明,‘苍山四六瓣’的大蒜防御素基因*AsPDF1*含有1个246 bp的开放阅读框,编码81个氨基酸(图2)。预测其蛋白分子量为8.45 kDa,等电点为9.36。通过SignalP 4.1 Server鉴定1~23个氨基酸为信号肽区域,剪切位点在23~24之间,通过NCBI BLAST发现,该蛋白含有典型的 γ -硫素蛋白(γ -thionin)保守结构域。

2.2 大蒜*AsPDF1*的序列特征及理化性质分析

将大蒜*AsPDF1*氨基酸序列进行Blast同源性比对,该蛋白与蔓花生(*Arachis duranensis*)、菜豆

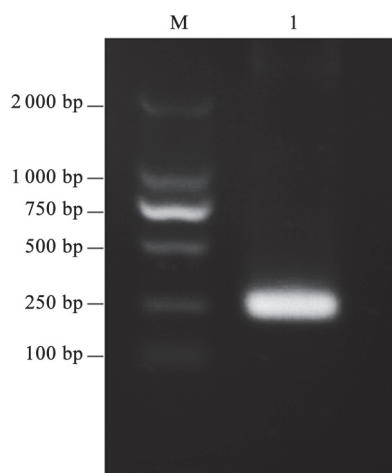


图1 大蒜*AsPDF1*基因的RT-PCR扩增

Fig.1 *AsPDF1* gene amplified by RT-PCR from garlic
M: DNA分子量标准; 1: *AsPDF1*基因。

```

ATGGCATCTACAAAAGTATTGTTTCAGCCATTCTGCTCTGCTTC
1  M A S T K S I V S A I L L C F
  C T T C T A C T G T A C A G A A T G G T G G A A G A G G A G G A A T A T G
16 L L T L T A T G M G G R G G G I M
  G T A G C A G A A G C G A G A G T G T C G C A A G C C A C A G G C T C G T G
31 V A E A R V C L S Q S H R L V
  G G A T C G T G C A T C A G G G C A G C A A C T G C G C C A C G T T T G C A A G A C C
46 G S C I R G S N C A N V C K T
  G A A G G C T T C C C G C G C G A A T G C A A A G G C T T C C G C C G T A G A T G C
61 E G F P G G E C K G F R R R C
  T T C T G T G T A A A A A T T G C T G A
76 F C A K N C *
    
```

图2 大蒜*AsPDF1*基因的核苷酸序列及其预测的氨基酸序列
Fig.2 Nucleotide sequences and predicted amino acid sequences of *AsPDF1* gene from garlic

大蒜 <i>Allium sativum</i>	..M A S T K S I V S A I L L C F L L T A T G M G R G G G I M V A D A R	V L S C S H R I V E S C I R G S N C A N V C K T E C F P G G E C O R G F F R R C F C A K N G . 81
花生 <i>Arachis duranensis</i>	..M A R S L P L L S T I F V L L L L L V A T E . . M . . G P I M V A D A R	H C A S C S H R F R G C V L S D I N C A S V C K T E C F P S G E C O R G F F R R C F C T K R C A 79
菜豆 <i>Phaseolus vulgaris</i>	..M A R S V S F V S T I F V L L L L L A T E . . M . . G P R M V A D A R	H C E S C S H R F R G C V L S D I N C A S V C R T E R F S G G E O R G F F R R C F C T K E C . 78
莲 <i>Nelumbo nucifera</i>	..M A R S M R L F S I L F V V L F L L T A T G . . M . . G P . K V P A D A R	H C E S C S H R F R G C I V R K S N C A A V C Q T E C F H G G C O R G F F R R C F C T K E A 78
葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	..M R G S Q R L F S A F L L V L L F M A T E . . M . . G P . M V A D A R	H C E S C S H R F R G C I V R Q S N C A A V C Q T E C F H G G C O R G F F R R C F C T K E C . 77
苹果 <i>Malus domestica</i>	..M E R S M R L F S T A F L F L L L V A T G . . M M . . G P . M V A D A R	H C D S C S H R F R G C S V S K S N C A T V C Q T E C F R G G C O R G F F R R C F C T K E C . 77
桃 <i>Prunus persica</i>	..M E R S M R L F S T A F V F L L L A A G M M . . G P . M V A D A R	H C E S C S N R F R G C I V S T S N C A S V C Q T E C F P G G C O R G F F R R C F C T K E C . 79
油棕 <i>Elaeis guineensis</i>	..M E R S R R M L F A I L L L V L I V V A S . . E . . M A T M V A D A R	H C E S C S H R F R G C I R A S N C A N V C K T E C F H G G C O R G F F R R C F C T K E C . 77
萝卜 <i>Raphanus sativus</i>	..M R L S M R L I S A V L L L F M I F V A T G M G F V I V A D A R	H C E S K S H R F R G C I V S T I N C A N V C H N C E F P G G C O R G F F R R C F C T K E C . 77
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	..M K F S M R L I S A V L F L V M I F V A T G M G F V I V A D A R	H C A S C S Q R F R G C V L S D I N C A N V C H N C E F P G G C O R G F F R R C F C T R N C . 77
烟草 <i>Nicotiana tabacum</i>	..M A N S M R F F A T V L L I A L L V A T E . . M . . G P M T I A D A R	H C E S C S H R F R G C F S R D S N C A T V L T E C F S G G I O R G F F R R C F C T R E C . 78
黄灯笼辣椒 <i>Capsicum chinense</i>	..M A H S M R F F A T I L L L A M L V M A T E . . M . . G P M R I A D A R	H C E S C S Q R F R G C F V R R K N C A A V C E T E C F P G G C O R G F F R R C F C T R E C . 78
苦瓜 <i>Momordica charantia</i>	..M K . F S A A I F L L L I F G T G M A P M V A D A R	V C E S C S H N F R G C I F S G I N C A S V C K T E C F H G G C O R G F F R R C F C T K E C V 73
笋瓜 <i>Cucurbita maxima</i>	..M K F F S A A I F L L L I F G T G M A P M V S A G A F G G T G M G P I V A E A R V	C E S C S H N F R G C V F S D I N C G S V C K T E C F D G G C O R G F F R R C F C T K E C V 89
西葫芦 <i>Cucurbita pepo</i>	..M K F F S A A I F L L L I F G T G M A P M V S A G A F G G T G M G P I V A E A R V	C E S C S H N F R G C I F S D I N C G S V C K T E C F D G G C O R G F F R R C F C T K E C A 89
胡杨 <i>Populus euphratica</i>	..M E K K C Y G L F L L L I A L A S Q E M M V P T A R	V L S C S H N F R G C F V R G H N C A N V C K T E C F P G G C O R G F F R R C F C A K E G . 74
毛果杨 <i>Populus trichocarpa</i>	..M E K K C Y G L F L L L I A L A S Q E M M V P A D A R	V L S C S H S F R G C F V R G H N C A S V C K T E C F P G G C O R G F F R R C F C A K E C . 74
高粱 <i>Sorghum bicolor</i>	..M E L S R R L F T A V V L V M L L V A T G T Q I . . G A V A V A D A R	H C Q S C S H R F R G C F V R R E N C A N V C R T E C F P D G C O R G F F R R C F C T K E C R 81
小麦 <i>Triticum aestivum</i>	M S M E A S R R L L S A A L L V L L L A A T G E M G . . G P V A V A D A R	H C E A K S H R F R G C F V R R R N C A N V C K T E C F P G G C O R G F F R R C F C T K E C R 83

图3 大蒜防御素与其他物种防御素氨基酸序列的比对分析

Fig.3 Alignment of defensins from garlic and other plant species

*表示高度保守的8个半胱氨酸所在位置。

(*Phaseolus vulgaris*)、莲(*Nelumbo nucifera*)、葡萄(*Vitis vinifera*)、苹果(*Malus domestica*)、桃(*Prunus persica*)、油棕(*Elaeis guineensis*)、萝卜(*Raphanus sativus*)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、烟草(*Nicotiana tabacum*)、黄灯笼辣椒(*Capsicum chinense*)、苦瓜(*Momordica charantia*)、笋瓜(*Cucurbita maxima*)、西葫芦(*Cucurbita pepo*)、胡杨(*Populus euphratica*)、毛果杨(*Populus trichocarpa*)、高粱(*Sorghum bicolor*)、小麦(*Triticum aestivum*)的防御素蛋白氨基酸序列相似度较高。序列比对分析发现,除信号肽区域外,大蒜的防御素蛋白与其他植物防御素有较高的同源性,在其C端还含有8个保守的半胱氨酸残基(图3)。

对‘苍山四六瓣’和拟南芥等植物的PDF氨基酸序列进行理化性质分析(表1)。这些植物中的防御素氨基酸残基数在73~89范围内,分子量在8~10 kDa,理论等电点在8.51~9.91之间,碱性氨基酸远高于酸性氨基酸,脂肪族氨基酸的比例相对较高,而芳香族氨基酸比例较低。SignalP 4.1分析这几种植物防御素氨基酸序列的信号肽的位置,结果表明不同植物氨基酸序列上信号肽的剪切位点有所差异,但均在整体氨基酸的N端的20~32氨基酸位点范围内(表1)。

2.3 大蒜防御素跨膜结构域的预测和分析

预测和分析植物蛋白质跨膜结构域,对于认识植物蛋白质的分类、结构和功能具有重要的意义。采用TMHMM软件预测大蒜的跨膜结构域,结

表1 不同植物的防御素氨基酸组成及理化性质分析

Table 1 Analysis of amino acid composition and physicochemical properties of defensins from different plants

植物	氨基酸残基数/个	分子量/kDa	信号肽位点	理论等电点(pI)	酸性氨基酸/%	碱性氨基酸/%	脂肪族氨基酸/%	芳香族氨基酸/%
大蒜(<i>Allium sativum</i>)	81	8.45	23~24	9.36	3.7	14.7	74.69	4.9
蔓花生(<i>Arachis duranensis</i>)	79	8.60	23~24	8.75	6.3	15.2	81.52	6.3
菜豆(<i>Phaseolus vulgaris</i>)	78	8.78	20~21	9.37	6.4	19.2	58.72	9.0
莲(<i>Nelumbo nucifera</i>)	78	8.71	30~31	9.91	3.8	21.7	62.56	9.0
葡萄(<i>Vitis vinifera</i>)	77	8.64	30~31	9.33	5.2	18.2	53.25	9.1
苹果(<i>Malus domestica</i>)	77	8.62	30~31	9.54	5.2	19.5	45.58	9.1
桃(<i>Prunus persica</i>)	79	8.75	32~33	9.16	5.1	15.1	43.29	10.1
油棕(<i>Elaeis guineensis</i>)	77	8.69	30~31	9.63	6.5	22.1	67.14	5.2
萝卜(<i>Raphanus sativus</i>)	77	8.56	22~23	9.69	3.9	19.5	63.25	7.8
拟南芥(<i>Arabidopsis thaliana</i>)	77	8.58	22~23	9.14	6.5	15.6	56.88	9.1
烟草(<i>Nicotiana tabacum</i>)	78	8.58	20~21	8.77	7.7	14.1	55.13	7.7
黄灯笼辣椒(<i>Capsicum chinense</i>)	78	8.83	20~21	9.37	7.7	19.3	51.54	7.7
苦瓜(<i>Momordica charantia</i>)	73	8.01	25~26	9.12	4.1	17.8	61.51	11.0
笋瓜(<i>Cucurbita maxima</i>)	89	9.61	20~21	8.73	6.7	14.6	59.21	11.2
西葫芦(<i>Cucurbita pepo</i>)	89	9.52	20~21	8.51	6.7	13.5	62.58	10.1
胡杨(<i>Populus euphratica</i>)	74	8.22	27~28	8.98	6.8	17.6	64.59	8.2
毛果杨(<i>Populus trichocarpa</i>)	74	8.13	27~28	8.98	6.8	17.6	65.96	8.2
高粱(<i>Sorghum bicolor</i>)	82	9.20	22~23	9.87	6.1	19.4	74.88	6.1
小麦(<i>Triticum aestivum</i>)	84	9.16	24~25	9.69	6.0	21.5	66.31	4.8

果表明,大蒜防御素在N端第7~29位氨基酸形成跨膜结构域(图4)。这说明,大蒜防御素成熟肽区域很有可能被信号肽运输至胞外行使功能。

2.4 大蒜防御素AsPDF的进化分析

利用18种不同植物防御素氨基酸序列与大蒜防御素氨基酸序列进行进化分析,构建了防御素系统进化树(图5)。在进化关系上,大蒜防御素与单子叶植物禾本科的小麦和高粱防御素蛋白亲缘为接近,在进化上属于同一个分支。而双子叶植物葫芦科的苦瓜、笋瓜、西葫芦,杨柳科的胡杨和毛果杨的防御素蛋白共同形成了一个独立的分支。

2.5 大蒜防御素三级结构的预测与分析

预测和分析植物蛋白质的三维结构,对于了解植物蛋白质的功能有着十分重要的促进作用。利用ExPASy提供的SWISS-MODEL软件预测大蒜AsPDF的三维结构(图6),大蒜防御素蛋白的三维结构是由1个 α 螺旋和3个 β 折叠构成的 $\beta\alpha\beta\beta$ 结构。

2.6 大蒜防御素基因AsPDF1在盐胁迫下的表达分析

为了分析大蒜防御素基因AsPDF1在盐胁迫下的表达特性,采用荧光定量PCR检测防御素基因As-

PDF1在‘苍山四六瓣’不同组织(鳞茎、叶片和根)和盐胁迫条件下的表达情况(图7)。在正常条件下,大蒜AsPDF1基因在‘苍山四六瓣’根中表达最高,而在叶片和鳞茎中几乎不表达,呈现比较明显的组织特异性。盐胁迫可以显著诱导AsPDF1基因的表达,在鳞茎中,随着盐胁迫时间的延长,AsPDF1基因的表达量逐渐升高,在处理12 h时后达到最大。在根中,盐胁迫处理4 h后AsPDF1基因的表达量达到最高。叶片中AsPDF1基因的表达呈现先下降后升高再下降的趋势,但整个盐胁迫阶段,其表达量仍高于其他组织中该基因的表达量(图7)。

3 讨论

植物在生长发育过程中会受到盐害、极端温度、干旱、病虫害等各种逆境胁迫,严重制约作物产量和品质形成(王忠妮等2018)。在长期的进化和适应过程中,植物逐渐形成一套复杂的反应机制,并产生抗逆性(董蔚等2018)。植物防御素是该抗逆机制中重要的组成部分,它是一类低分子

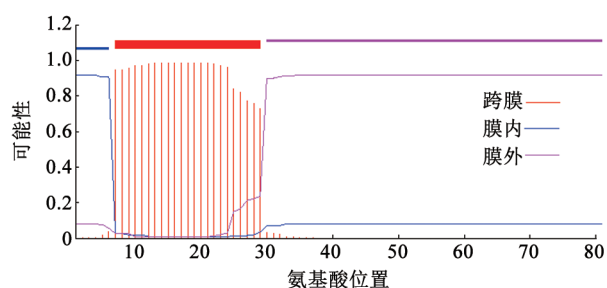


图4 大蒜防御素氨基酸序列的跨膜结构域预测
Fig.4 Transmembrane domain prediction of amino acid sequences of the garlic defensin

量、碱性、富含半胱氨酸且具有抑菌活性的短肽,是植物防御生物和非生物侵害的重要物质之一(Vriens等2014)。虽然植物防御素基因的同源性较高,但不同物种的防御素基因个数和结构等存在差异,不同植物防御素基因的研究将为防御素功能挖掘和生产应用奠定基础。

本研究中分离的大蒜*AsPDF1* N端含有23个氨基酸长度的信号肽和7~29个氨基酸位点的跨膜结构域,这说明这些植物的防御素基因在体内表达的可能是一个前体蛋白,这种蛋白经过翻译和

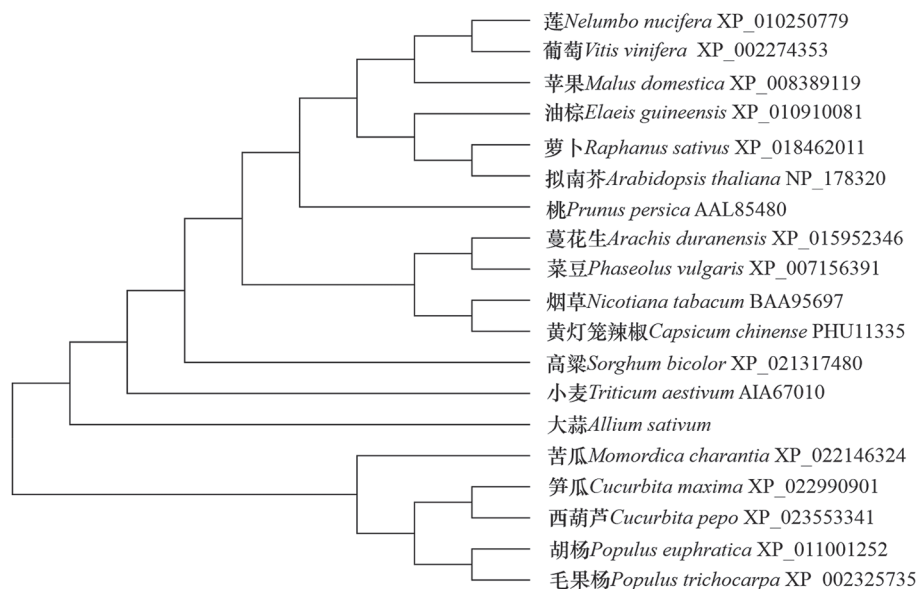


图5 防御素氨基酸序列的系统进化树
Fig.5 Phylogenetic tree of defensin amino acid sequences



图6 大蒜防御素*AsPDF*三级结构的预测
Fig.6 Prediction of the three-dimension structure of the garlic defensin *AsPDF*

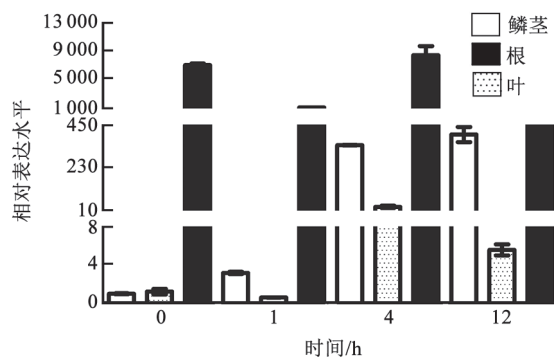


图7 大蒜*AsPDF1*在不同组织和盐胁迫条件下的表达分析
Fig.7 Expression analysis of garlic *AsPDF1* gene in different tissues and under salt stress

加工后,再通过信号肽运输到胞外进行抗菌作用(Carvalho和Gomes 2009)。该蛋白编码81个氨基酸,预测分子量为8.45 kDa,均远高于前人研究的结果,可能也是由于其N端存在信号肽和跨膜结构域的缘故。AsPDF的C端含有特异的 γ -硫素蛋白结构域,该结构域可以编码具有杀菌功能的毒素功能结构,这可能是防御素具有杀菌功能的主要原因(Pelegrini和Franco 2005; Carvalho和Gomes 2009)。同时,该蛋白C端的8个保守半胱氨酸残基组成的4对二硫键,对于稳定其空间结构和功能行使至关重要(Bruix等1993)。

植物防御素广泛分布于植物的各个器官,并参与植物的一系列活动(Lay和Anderson 2005; van der Weerden和Anderson 2013)。大量研究表明,植物防御素能提高植物的抗病能力,且其抗病的主要作用方式是破坏病原微生物的细胞膜(Carvalho和Gomes 2009)。Weerawanich等(2018)发现水稻防御素基因*OsDEF7*和*OsDEF8*对水稻黄单胞菌有着较好的抗菌效果;将萝卜中的防御素基因*RsAFP2*转入小麦中,增强了植株对禾谷镰刀菌和纹枯病菌的耐受性(Li等2011)。除了能受病原菌诱导性表达外,植物防御素还会呈现组织特异性表达(郑小敏等2015)。本研究中也发现了类似的研究结果,即正常条件下,*AsPDF1*基因在根中表达量最高,而在叶片和鳞茎中几乎不表达(图7)。另外,越来越多的研究发现,防御素还可能参与植物发育及应对非生物胁迫的过程中(Do等2004)。例如,小麦中防御素基因可以响应冷信号的诱导(Koike等2002; Sasaki等2016);白菜防御素基因上游调控区域存在大量感知外界环境信号的分子应答的顺式作用元件(Park等2002);在鼠耳芥中还发现植物防御素基因与植物的耐锌性有关(Mirouze等2006; Shahzad等2013);在水稻中还发现防御素与镉的转运和分布有关(Luo等2018)。本研究发现,盐胁迫可以显著诱导大蒜各器官中*AsPDF1*基因的表达。这些结果说明,植物防御素除了具有抗病功能外,可能还具有保护植物抵御非生物逆境的能力。

本试验从大蒜中克隆得到一个防御素基因*AsPDF1*,推测其可能在大蒜抵御逆境胁迫过程中发挥重要的调控作用。本研究结果为进一步鉴定

防御素基因的生物学功能和表达调控机制奠定了基础。

参考文献(References)

- Aerts AM, François IE, Cammue BP, et al (2008). The mode of antifungal action of plant, insect and human defensins. *Cell Mol Life Sci*, 65: 2069–2079
- Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G, et al (2004). Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol*, 340: 783–795
- Bruix M, Jiménez MA, Santoro J, et al (1993). Solution structure of gamma 1-H and gamma 1-P thionins from barley and wheat endosperm determined by 1H-NMR: a structural motif common to toxic arthropod proteins. *Biochemistry*, 32: 715–724
- Carvalho AO, Gomes VM (2009). Plant defensins—Prospects for the biological functions and biotechnological properties. *Peptides*, 30: 1007–1020
- Carvalho AO, Gomes VM (2011). Plant defensins and defensin-like peptides - biological activities and biotechnological applications. *Curr Pharm Des*, 17: 4270–4293
- Do HM, Lee SC, Jung HW, et al (2004). Differential expression and in situ localization of a pepper defensin (*CADEF1*) gene in response to pathogen infection, abiotic elicitors and environmental stresses in *Capsicum annuum*. *Plant Sci*, 166: 1297–1305
- Dong W, Wu PX, Yang N, et al (2018). Cloning and expression analysis of WRKY transcription factor involved in salinity stress in alfalfa. *Plant Physiol J*, 54: 1481–1489 (in Chinese with English abstract) [董蔚, 邬培祥, 杨宁等 (2018). 紫花苜蓿盐胁迫响应WRKY转录因子的克隆及表达特征分析. *植物生理学报*, 54: 1481–1489]
- Ganz T, Selsted ME, Szklarek D, et al (1985). Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J Clin Invest*, 76: 1427–1435
- Guerra-Lupián MA, Ruiz-Medrano R, Ramírez-Pool JA, et al (2018). Localized expression of antimicrobial proteins mitigates huanglongbing symptoms in Mexican lime. *J Biotechnol*, 285: 74–83
- Ikedo M, Arai M, Lao DM, et al (2002). Transmembrane topology prediction methods: a re-assessment and improvement by a consensus method using a dataset of experimentally-characterized transmembrane topologies. *In Silico Biol*, 2: 19–33
- Koike M, Okamoto T, Tsuda S, et al (2002). A novel plant defensin-like gene of winter wheat is specifically induced during cold acclimation. *Biochem Biophys Res Commun*, 298: 46–53
- Lay FT, Anderson MA (2005). Defensins—components of the

- innate immune system in plants. *Curr Protein Pept Sci*, 6: 85–101
- Li Z, Zhou M, Zhang Z, et al (2011). Expression of a radish defensin in transgenic wheat confers increased resistance to *Fusarium graminearum* and *Rhizoctonia cerealis*. *Funct Integr Genomics*, 11: 63–70
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25: 402–408
- Luo JS, Huang J, Zeng DL, et al (2018). A defensin-like protein drives cadmium efflux and allocation in rice. *Nat Commun*, 9: 645
- Mendez E, Moreno A, Colilla F, et al (1990). Primary structure and inhibition of protein synthesis in eukaryotic cell-free system of a novel thionin, gamma-hordothionin, from barley endosperm. *Eur J Biochem*, 194: 533–539
- Mirouze M, Sels J, Richard O, et al (2006). A putative novel role for plant defensins: a defensin from the zinc hyper-accumulating plant, *Arabidopsis halleri*, confers zinc tolerance. *Plant J*, 47: 329–342
- Park HC, Kang YH, Chun HJ, et al (2002). Characterization of a stamen-specific cDNA encoding a novel plant defensin in Chinese cabbage. *Plant Mol Biol*, 50: 59–69
- Pelegriani PB, Franco OL (2005). Plant gamma-thionins: novel insights on the mechanism of action of a multi-functional class of defense proteins. *Int J Biochem Cell Biol*, 37: 2239–2253
- Picart P, Pirttilä AM, Raventos D, et al (2012). Identification of defensin-encoding genes of *Picea glauca*: characterization of PgD5, a conserved spruce defensin with strong antifungal activity. *BMC Plant Biol*, 12: 180
- Sasaki K, Kuwabara C, Umeki N, et al (2016). The cold-induced defensin TAD1 confers resistance against snow mold and *Fusarium* head blight in transgenic wheat. *J Biotechnol*, 228: 3–7
- Shahzad Z, Ranwez V, Fizames C, et al (2013). *Plant Defensin type 1 (PDF1)*: protein promiscuity and expression variation within the *Arabidopsis* genus shed light on zinc tolerance acquisition in *Arabidopsis halleri*. *New Phytol*, 200: 820–833
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol*, 28: 2731–2739
- Thevissen K, de Mello Tavares P, Xu D, et al (2012). The plant defensin RsAFP2 induces cell wall stress, septin mislocalization and accumulation of ceramides in *Candida albicans*. *Mol Microbiol*, 84: 166–180
- van der Weerden NL, Anderson MA (2013). Plant defensins: common fold, multiple functions. *Fungal Biol Rev*, 26: 121–131
- Vriens K, Cammue BP, Thevissen K (2014). Antifungal plant defensins: mechanisms of action and production. *Molecules*, 19: 12280–12303
- Wang MX, Zhu XL, Luo MY, et al (2017). Cloning and defensive functional analysis of a wheat defensin gene *TaPDF35*. *J Plant Genet Res*, 18: 925–932 (in Chinese with English abstract) [王敏霞, 祝秀亮, 罗美英等(2017). 小麦防御素基因*TaPDF35*的克隆与功能分析. 植物遗传资源学报, 18: 925–932]
- Wang ZN, Li LH, Xu RH, et al (2018). Advances in mitochondrial proteins responding to stresses in plants. *Plant Physiol J*, 54: 221–231 (in Chinese with English abstract) [王忠妮, 李鲁华, 徐如宏等(2018). 响应植物逆境胁迫的线粒体蛋白研究进展. 植物生理学报, 54: 221–231]
- Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, et al (2018). SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res*, 46: W296–W303
- Weerawanich K, Webster G, Ma JK, et al (2018). Gene expression analysis, subcellular localization, and in planta antimicrobial activity of rice (*Oryza sativa* L.) defensin 7 and 8. *Plant Physiol Biochem*, 124: 160–166
- Zeya HI, Spitznagel JK (1966). Cationic proteins of polymorphonuclear leukocyte lysosomes. I. Resolution of antibacterial and enzymatic activities. *J Bacteriol*, 91: 750–754
- Zheng XM, Guo N, Gao TS, et al (2015). Cloning and expression analysis of defensin genes from *Brassica napus*. *Acta Agron Sin*, 41: 725–732 (in Chinese with English abstract) [郑小敏, 郭楠, 高天姝等(2015). 甘蓝型油菜防御素基因的克隆与表达分析. 作物学报, 41: 725–732]

Cloning and expression analysis of a defensin gene *AsPDF1* in garlic

CHEN Dong¹, FAN Hai-Yun¹, GAO Shi-Wen¹, WANG Guang-Long^{1,*}, WANG Yun-Peng¹,
CHEN Bo-Qing¹, WANG Lian-Zhen¹, XIONG Ai-Sheng²

¹*School of Life Science and Food Engineering, Huaiyin Institute of Technology, Huaian, Jiangsu 223003, China*

²*State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Ministry of Agriculture and Rural Affairs Key Laboratory of Biology and Germplasm Enhancement of Horticultural Crops in East China, College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China*

Abstract: Plant defensins, one of the important substances for plant defense against biotic and abiotic damage, are a class of low molecular weight, cysteine-rich antimicrobial peptides. To investigate the sequence characteristics and functions of defensins in garlic, a defensin gene *AsPDF1* was cloned from garlic cultivar ‘Cangshan siliuban’ by RT-PCR method. Sequence analysis showed that the open reading frame of garlic defensin gene was 246 bp in length, encoding 81 amino acids. The predicted molecular weight of the garlic defensin was 8.45 kDa, and the isoelectric point pI was 9.36. *AsPDF1* consists of eight conserved cysteine residues with a peptide signal of 27 amino acid length at the N terminal. Analysis on three-dimension structure found that the protein was composed of one α helix and three anti-parallel β sheets. Phylogenetic analysis indicated that garlic defensin *AsPDF1* is close to defensins of wheat and sorghum in the Gramineae family. Quantitative real-time PCR analysis demonstrated that *AsPDF1* was expressed in all tissues examined, with the highest level in garlic roots and lower levels in the cloves and leaves. However, the genes can respond to salt stress in all samples tested. The gene cloned in this study would provide basic information for further studies on the biology function and expression mechanism of garlic defensins.

Key words: garlic; defensin; salt stress; gene cloning; expression analysis

Received 2018-10-23 Accepted 2018-12-29

This study was funded by the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20170460), Scientific Research Foundation for Doctor from Huaiyin Institute of Technology (Z301B16531), New Century Excellent Talent of the Ministry of Education (NCET-11-0670), and Jiangsu Natural Science Foundation for Distinguished Young Scholars (BK20130027).

*Corresponding author (wanggl89@hyit.edu.cn).