DOI: 10.3724/SP.J.1006.2020.94082

费尔干猪毛菜病程相关蛋白 *SfPR1a* 基因的异源表达增强了烟草对干旱、盐及叶斑病的抗性

衡友强 游西龙 王 艳*

新疆大学生命科学与技术学院 / 新疆生物资源与基因工程重点实验室, 新疆乌鲁木齐 830046

摘 要: 为明确一年生草本盐生植物费尔干猪毛菜(*Salsola ferganica* Drob.)病程相关蛋白基因 *SfPR1a* (GenBank 登录号为 JQ670917)是否参与了植物对逆境胁迫的响应, 采用 qRT-PCR 检测了该基因在不同组织部位和脱落酸(ABA)、茉莉酸(JAs)、乙烯合成直接前体(ACC)等相关激素胁迫及 NaCl 处理下的表达规律, 同时对转基因烟草在盐、旱及丁香假单胞菌等胁迫下的抗性进行了鉴定。结果显示, *SfPR1a* 基因在费尔干猪毛菜根中的表达量显著高于茎叶中, 且受到 ABA、JAs、ACC、NaCl 的积极诱导; 干旱胁迫下, 转基因烟草的丙二醛(MDA)含量显著低于野生型烟草, 显示出较强的抗旱表型; 盐胁迫下, 异源表达 *SfPR1a* 的转基因烟草幼苗生长显著优于野生型烟草; 丁香假单胞菌攻毒后的转基因烟草叶片呈现严重的坏死反应, 但植株的整体抗性表型显著优于野生型烟草; 亚细胞定位结果显示该蛋白定位于植物细胞质外体空间。以上结果表明, 费尔干猪毛菜病程相关蛋白 *SfPR1a* 基因参与了植物对非生物及生物胁迫的抗性。

关键词: 病程相关蛋白基因 *SfPR1a*; 表达规律; 转基因烟草; 抗性功能; 亚细胞定位

Pathogenesis-related protein gene *SfPR1a* from *Salsola ferganica* enhances the resistances to drought, salt and leaf spot disease in transgenic tobacco

HENG You-Qiang, YOU Xi-Long, and WANG Yan*

Xinjiang Key Laboratory of Biological resources and Genetic Engineering / College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, Xinjiang, China

Abstract: In order to investigate whether *SfPR1a*, a pathogenesis-related protein gene from an annual halophytic species *Salsola ferganica* Drob., was involved in the response to plant defense, qRT-PCR was employed to detect its expression patterns under abscisic acid (ABA), jasmonic acid (JAs), ethylene synthesis direct precursor (ACC), and NaCl treatments. We also identified resistances to salt, drought and *Pseudomonas syringae* tomato (*Pst*DC3000) of transgenic tobacco were identified. The expression of *SfPR1a* gene in roots was significantly higher than that in shoots, and positively induced by ABA, JAs, ACC, and NaCl treatments. The malondialdehyde (MDA) content of transgenic tobacco was significantly lower than that of wild-type tobacco, showing a strong resistance to drought. The ectopic expression of *SfPR1a* gene improved plant growth under salt stress. After infection of *P. syringae*, transgenic tobacco leaves showed serious necrosis reaction, but the overall resistance phenotype of the plants was significantly better than that of WT. Subcellular localization analysis showed *SfPR1a* was localized in the plant cell apoplastic space. The above results indicated that the *SfPR1a* gene is involved in plant resistance to abiotic and biotic stresses.

Keywords: pathogenesis-related protein gene *SfPR1a*; expression pattern; transgenic tobacco; resistance function; subcellular localization

盐、碱、干旱和病原微生物等外界胁迫已经成 为影响农作物产量的关键因素。为解决日益增长的

本研究由新疆生物资源基因工程重点实验室开放课题(2017D04026)和国家自然科学基金项目(31860061)资助。

This study was supported by the Xinjiang Key Laboratory of Biological Resources Genetic Engineering (2017D04026) and the National Natural Science Foundation of China (31860061).

* 通信作者(Corresponding author): 王艳, E-mail: wangyanxju@126.com

第一作者联系方式: E-mail: hengyouqiang706567@163.com

Received (收稿日期): 2019-06-04; Accepted (接受日期): 2019-12-26; Published online (网络出版日期): 2020-01-15.

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20200115.1140.022.html>

人口与粮食短缺之间的矛盾,通过基因工程手段挖掘并利用抗逆植物的基因资源是改良农作物农艺性状的有效手段之一。当植物感知外界胁迫时会迅速产生次级信号如茉莉酸(JAs)^[1-3]、乙烯(ET)^[4-5]、水杨酸(SA)^[6]、过氧化氢(H₂O₂)^[7]等,从而在体内产生复杂的互作网络,诱导胁迫相关基因的表达进而发挥抗性功能。病程相关蛋白(pathogenesis-related proteins, PRs)是一类被生物和非生物胁迫诱导产生的蛋白总称,在植物的防御体系中发挥重要作用^[8-12]。目前在真菌^[13-14]和动物^[15]中也发现了该蛋白的同源物。依据 PRs 的分子量、空间结构以及血清学关系,病程相关蛋白被分成 17 个亚家族^[16-17],并命名为 PR1~PR17,其中最早发现的是烟草病程相关蛋白 TaPR1^[10]。PR1 亚家族因其序列保守、种类繁多、功能强大等特点成为备受关注的一类病程相关蛋白。编码该蛋白的基因往往受到细菌^[18-19]、病毒^[20]、真菌^[21]等生物胁迫和盐、旱等非生物胁迫^[22-23]的诱导,暗示其可能在应对环境胁迫时发挥重要作用,因而常常作为植物系统获得性抗性(systemic acquired resistance, SAR)的标记基因^[18]。

费尔干猪毛菜(*Salsola ferganica* Drob.)属 C₄ 藜科双子叶一年生草本植物,主要分布在我国新疆北部的盐碱化土壤区域,其整个生长周期处于严重盐渍、干旱等复杂的恶劣生境,是极具生态和研究价值的泌盐盐生植物^[24]。然而,目前对费尔干猪毛菜发挥抗性功能的分子机制仍知之甚少。本课题小组前期从费尔干猪毛菜中克隆获得了一个盐响应的病程相关蛋白基因 *SfPR1a*^[22],本研究拟利用 qRT-PCR 技术探究该基因在费尔干猪毛菜不同组织、不同植物激素及盐胁迫下的表达模式,同时通过对烟草的遗传转化明确其对生物和盐、旱等非生物胁迫的抗性功能,为解析该基因的抗性分子机制及费尔干猪毛菜的抗性机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 植物材料 将采自新疆吉木萨尔县古尔班通古特沙漠的费尔干猪毛菜种子去除种翅后经 0.1% 升汞(氯化汞)表面消毒 8 min,无菌水反复冲洗,直至去除表面残留升汞(约 5~6 次)后备用。于正常 MS 培养基中萌发生长 20 d 后转移至不同胁迫条件的 MS 培养基中处理,取处理不同时间的费尔干猪毛菜互生前四节茎叶和根作为总 RNA 的提取材料。烟

草(*Nicotiana tabacum* L.)品种 W38 由北京林业大学赠送,以 55~60 d 左右的烟草无菌苗叶片为转化受体材料。平均培养温度 25℃,光照时间 16 h d⁻¹,黑暗 8 h d⁻¹,相对湿度 40%。以无菌生长 50 d 再土培 25 d 长势大小基本一致的野生型和转基因烟草进行盐、干旱和生物攻毒处理。

1.1.2 菌种、质粒及试剂 大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 感受态细胞购买于北京全式金生物技术有限公司;丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae* tomato DC3000)由中国科学院新疆生态与地理研究所惠赠;植物总 RNA 提取试剂盒 RNAprep pure Tissue Kit 购于美国 Omega BioTek 公司, RNA-Free DNase I 购自天根生物科技有限公司; Prime Script 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒购自 TaKaRa 公司;实时荧光定量试剂 Power SYBR Green PCR Master Mix 购自 ABI 公司;茉莉酸 JAs、脱落酸 ABA、潮霉素和卡那霉素购自 Sigma-Aldrich 公司;乙烯合成前体 ACC 购自 Calbiochem 公司;PCR 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2 *SfPR1a* 蛋白的同源性比对及保守结构域分析 从 NCBI 数据库中下载其他物种中的 PR1 氨基酸序列,用 DNAMAN 软件进行氨基酸序列同源性分析及保守结构域分析。

1.3 *SfPR1a* 基因的表达

将 MS 培养基中生长 20 d 的费尔干猪毛菜幼苗分别移至含有终浓度为 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ABA、50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ACC、100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ JAs 和 600 mmol L⁻¹ NaCl 的 MS 固体培养基上胁迫处理,分别取处理 1、6、24 h 的茎叶混合样品,依照试剂盒说明书并结合 RNA-Free DNaseI 试剂提取不同组织部位和不同胁迫处理下的总 RNA,采用 Nano Drop ND-1000 分光光度计和琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的浓度及纯度,合成第 1 条 cDNA 链。随后参照说明书进行实时荧光定量 PCR (Applied Biosystems Interface 7500)。以费尔干猪毛菜 β -actin (上游引物 β -actinP1: 5'-AAGATCTGGCACCACACCTTC-3';下游引物 β -actinP2: 5'-CACACCATCACCAGAATCGA-3') 为内参基因, *SfPR1a* 基因(GenBank 登录号为 JQ 670917)特异性引物, *SfPR1a*P1 (5'-CCAACCAA AGGAAGGGCGA-3')和 *SfPR1a*P2 (5'-CACACACC TTATTGGCGGCA-3')。反应体系含 10 μL SYBR Premix、2 μL cDNA 模板、0.5 μL 正/反向引物、0.4 μL Rox、加蒸馏水补足至 25 μL 。PCR 扩增程序为 95

预变性 30 s; 95℃变性 30 s, 58℃退火 30 s, 72℃延伸 30 s, 35 个循环; 72℃延伸 10 min。设每个时间点 3 个生物学重复, 每个生物学重复 3 个技术重复。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法处理数据, 利用 Prism 5.0 软件进行生物统计学分析。

1.4 转基因烟草的获得及分子鉴定

采用反复冻融法将课题组前期构建的植物表达载体 pCAMIA1301-1-SfPR1a^[25] 转化至农杆菌 EHA105, 利用叶盘法转化烟草^[26]。通过终浓度为 20 mg L⁻¹ 潮霉素的两代筛选, 获得 T₂ 代纯系转基因烟草。以烟草 *HSC70-1* 基因为内参基因^[27](上游引物 *HSC70-IP1*: 5'-AGGTGGAGACATGGGTGGTG-3'; 下游引物 *HSC70-IP2*: 5'-TCATTAGGCACACAGATCTCTG-3'), 通过 qRT-PCR 分析转基因烟草中 *SfPR1a* 基因的表达, 具体方法同 1.3。

1.5 转基因烟草的抗旱能力分析

将无菌生长 50 d 的烟草幼苗移至花土: 蛭石: 珍珠岩=3:1:1 的基质中于 16 h 光照/8 h 黑暗光周期下培养 25 d, 对长势基本一致的野生型和转基因烟草进行自然控水干旱处理 2 周。MDA 是膜脂氧化的产物, 其含量可反映植物细胞在干旱胁迫下的受损程度。取第四轮叶片(从下到上)测定丙二醛(MDA)含量^[28], 控水 2 周后复水 1 周, 统计植株存活率。每组实验 3 个生物学重复, 每个生物学重复 5 株苗。

1.6 转基因烟草种苗抗盐能力分析

将表面消毒灭菌的野生型与转基因烟草种子分别播于正常和含有 200 mmol L⁻¹ NaCl 的 MS 固体培养基中, 15 d 后观察烟草种子的萌发和生长情况, 同时测定相对生长量。正常 MS 培养基中生长 15 d 的烟草幼苗重, 记为 W_1 , 200 mmol L⁻¹ NaCl 胁迫处理下生长相同天数的烟草重, 记为 W_2 , 相对生长量(relative growth yield, RGY) 的计算公式为 $(W_1 - W_2) / W_1 \times 100\%$ 。

对无菌生长 50 d 再土培 25 d 长势大小基本一致的野生型和转基因烟草以 50 mmol L⁻¹ NaCl 为浓度梯度每隔 4 h 进行一次盐浇处理, 直至 NaCl 浓度为 200 mmol L⁻¹, 处理 2 周, 测定叶绿素和可溶性蛋白^[29-30]含量。

1.7 转基因烟草抗叶斑病能力的分析

丁香假单胞菌 *PstDC3000* 在含有 50 mg L⁻¹ 利福平的 LB 液体培养基中 28℃ 200 转 min⁻¹ 条件下过夜培养至 OD₆₀₀ 为 0.6~0.8, 离心收集菌体, 用 10 mmol L⁻¹ MgCl₂ 重悬至终浓度为 0.1 备用。按

照 Lee 等^[31]的方法接种丁香假单胞菌, 小心地将叶片翻过来露出背轴面。用不带针头的 1 mL 注射器对准烟草叶背面, 将稀释的菌液通过压力渗透的作用进入叶片间隙, 随后覆上保鲜膜保湿, 于 25℃、70% 相对湿度, 光照 16 h/黑暗 8 h 的温室中培养。分别在 10 d 和 45 d 后对接种的烟草叶片照相记录, 按照 Gao 等^[32]的方法用 ImageJ 软件统计叶面菌斑面积, 观察攻毒 60 d 后烟草的整体生长状况。

1.8 SfPR1a 的亚细胞定位

利用生物信息学网站(<https://psort.hgc.jp/form2.html>)对 SfPR1a 蛋白进行亚细胞定位预测, 随后将目的基因偶联绿色荧光蛋白的亚细胞定位表达载体 pCAMIA1302-SfPR1a-mGFP 和空载对照 pCAMIA1302-mGFP 通过基因枪法轰击洋葱表皮^[33], 18 h 后徒手撕片, 激光扫描共聚焦显微镜(Nikon, JPN)观察。

1.9 统计学分析

利用 Prism 5.0 软件对所记录的数据进行统计学 *t* 检验分析, 每组数据均由 3 个独立的生物学重复计算获得。不同字母表示有显著性差异, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 SfPR1a 蛋白氨基酸序列生物信息学分析

将费尔干猪毛菜 SfPR1a 与水稻、大豆、青稞和橡胶树的 PR1 氨基酸序列比对发现不同物种间 PR1 中相同的氨基酸序列高达 60% 以上, 并且在其 C 端都具有 PR1 蛋白家族所共有的 CAP 保守结构域(CXYXPXXGNXXGXXPY)(图 1), 表明费尔干猪毛菜 *SfPR1a* 基因编码的蛋白属于 PR1 蛋白家族成员。

2.2 SfPR1a 基因的表达规律

SfPR1a 基因在根中的相对表达量比茎叶高约 200 倍(图 2-A)。为明确该基因是否受植物激素和 NaCl 的诱导, 分别用 50 μmol L⁻¹ ABA、50 μmol L⁻¹ ACC、100 μmol L⁻¹ JAs 和 600 mmol L⁻¹ NaCl 处理 20 d 龄的费尔干猪毛菜幼苗, 分别提取处理 0、1、6 和 24 h 幼苗茎叶的总 RNA, 进行 qRT-PCR 分析。结果显示, ABA 胁迫处理 1 h 后 *SfPR1a* 基因的相对表达量显著升高, 尽管处理 6 h 后稍有下降但仍显著高于对照组, 在 24 h 表达量达到峰值, 增长约 250 倍(图 2-B)。费尔干猪毛菜幼苗经乙烯合成前体 ACC 处理后, *SfPR1a* 基因呈现先上升后下降的趋势, 但表达量均显著高于处理前, 其中处理后 6 h 表达

图 1 费尔干猪毛菜 *SfPR1a* 蛋白与其他 PR1 蛋白家族成员的比较

Fig. 1 Alignment of the amino acid sequences of *SfPR1a* with other PR1 proteins

不同物种 PR1 蛋白 GenBank 登录号: 水稻 *OsPR1* (AJR16763.1)、大豆 *GmPR1* (XP003545775.1)、青稞 *HvPR1* (CAA79703.1)、橡胶树 *HbPR1* (ALS87256.1)、费尔干猪毛菜 *SfPR1a* (AFR90191.1)。

GenBank accession numbers of different species: *Oryza sativa indica* Group *OsPR1* (AJR16763.1), *Glycine max* *GmPR1* (XP003545775.1), *Hordeum vulgare* *HvPR1* (CAA79703.1), *Hevea brasiliensis* *HbPR1* (ALS87256.1), and *Salsola ferganica* *SfPR1a* (AFR90191.1).

量最高, 增长约 4500 倍(图 2-C)。*SfPR1a* 基因在 $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ JAs 处理后的表达趋势与 ACC 处理基本一致, 但整体表达差异倍数相对较低(图 2-D)。600 mmol L^{-1} NaCl 处理下, *SfPR1a* 基因呈现早期 1 h 积极应答, 6 h 达到峰值, 表达量增长了约 40 倍, 胁迫 24 h 后与对照无显著差异(图 2-E)。以上结果表明费尔干猪毛菜 *SfPR1a* 基因受到 ACC、JAs 等生物胁迫相关激素和 ABA 等非生物胁迫相关激素的诱导表达, 同时也受到非生物胁迫 NaCl 的诱导表达, 与前期研究结果趋势一致。以上结果为后期进一步研究

SfPR1a 基因的生物和非生物胁迫抗性功能提供了理论基础。

2.3 转基因烟草的获得及鉴定

为明确 *SfPR1a* 基因的功能, 采用叶圆盘法转化模式植物烟草, 用终浓度 20 mg L^{-1} 的潮霉素对再生的转化烟草及种子进行两代的筛选, 获得 3 株 T_2 代纯系转基因烟草。利用 qRT-PCR 技术检测了 *SfPR1a* 基因在转基因烟草 OE4、OE5 和 OE10 不同株系中的表达(图 3), 后期将它们作为 *SfPR1a* 基因功能验证的试验材料。

图 2 *SfPR1a* 基因在费尔干猪毛菜不同组织部位以及不同处理下的表达分析

Fig. 2 Expression of *SfPR1a* gene in different tissues and stress conditions

SfPR1a 基因在茎叶和根中(A)、ABA (B)、ACC (C)、JAs (D)以及 NaCl (E)处理下的相对表达量。每组实验设 3 个生物学重复, 不同字母表示存在显著差异($P < 0.05$)。

The relative expression of *SfPR1a* gene in aerial part and root (A) and under the conditions of ABA (B), ACC (C), JAs (D), and NaCl (E), respectively. Three biological replicates were set for each experiment. Bars labelled with different letters are significantly different at $P < 0.05$.

图3 *SfPR1a* 基因在转基因烟草中的表达分析

Fig. 3 Expression of *SfPR1a* gene in the transgenic tobacco plants

标以不同小写字母的柱值差异显著 ($P < 0.05$)。

Bars labelled with different letters are significantly different at $P < 0.05$.

2.4 转 *SfPR1a* 烟草抗旱性分析

对长势大小一致的烟草进行自然控水处理 2 周, 转基因和野生型烟草叶片均呈现不同程度的萎蔫, 但转基因烟草叶片的萎蔫和失水程度较轻于野生型烟草(图 4-A)。测定结果显示, 干旱胁迫后野生型烟草 MDA 含量显著增加, 而转基因植株中其含量变化差异不大(图 4-B), 表明相同胁迫条件下野生型烟草受到了严重的膜损伤。野生型和转基因型烟草控水 4 周复水 1 周后, 转基因烟草植株的生长状况(图 4-C)及存活率(图 4-D)显著优于野生型烟草。以上结果表明, 费尔干猪毛菜 *SfPR1a* 基因的异源表达显著增强了转基因烟草的抗旱性。

图4 转 *SfPR1a* 基因烟草在干旱胁迫下的抗性

Fig. 4 Drought tolerance of transgenic *SfPR1a* tobacco

A: 干旱胁迫处理 2 周后的烟草生长表型; B: 干旱胁迫处理 2 周后的烟草 MDA 含量变化; C: 干旱胁迫处理 4 周复水 1 周后的烟草生长表型; D: 干旱胁迫处理 4 周复水 1 周后的烟草存活率统计。图中不同小写字母间表示存在显著性差异 ($P < 0.05$)。

A: phenotype of tobacco under drought stress treatment for two weeks; B: MDA content of tobacco under for two weeks drought treatment; C: phenotype of tobaccos under drought stress for four weeks and then re-water for one week. D: survival rate (D) of tobaccos under drought stress for four weeks and then re-water for one week. Bars labelled with different letters are significantly different at $P < 0.05$.

2.5 转 *SfPR1a* 基因烟草抗盐性分析

将表面消毒灭菌的转基因和野生型烟草种子分别播种于正常 MS 培养基和含有 200 mmol L⁻¹ NaCl 的 MS 培养基中生长 15 d。观察发现, 除 OE10 株系外, 在正常培养基上生长的野生型烟草与转基因烟草的种子萌发情况和生长表型没有明显差异(图 5-A 左), 而盐胁迫条件下 3 个转基因株系的生长均显著优于野生型烟草(图 5-A 右), 尤其是萌发势较差的

过表达株系 OE10。同时转基因烟草在盐胁迫下积累的生物量要显著高于野生型烟草(图 5-B)。成苗阶段, 经 200 mmol L⁻¹ NaCl 胁迫处理 2 周后, 野生型烟草出现了一定程度的萎蔫(图 5-C), 而转基因烟草未表现出任何胁迫状态, 但二者的叶绿素含量和可溶性蛋白含量等生理生化指标却无显著性差异(数据未显示)。以上结果表明, *SfPR1a* 基因的异源表达增强了转基因烟草的耐盐性。

图 5 转 *SfPR1a* 基因烟草在盐胁迫下的抗性

Fig. 5 Salt tolerance of transgenic *SfPR1a* tobaccos

200 mmol L⁻¹ NaCl 胁迫下的烟草萌发生长表型(A)及相对生长量(B); 250 mmol L⁻¹ NaCl 胁迫下的烟草成苗抗盐表型(C)。图中标以不同小写字母的柱值差异显著 ($P < 0.05$)。

The phenotypic growth of tobaccos after germination (A) and relative growth in 200 mmol L⁻¹ NaCl medium (B); C: tolerance of tobacco at the adult stage under 250 mmol L⁻¹ NaCl for 2 weeks. Bars labelled with different letters are significantly different at $P < 0.05$.

2.6 转 *SfPR1a* 基因烟草抗叶斑病分析

为明确费尔干猪毛菜病程相关蛋白 *SfPR1a* 基因是否能够提高植株的抗病能力, 对长势和大小基本一致的转基因和野生型烟草叶片注射了丁香假单胞菌 *PstDC3000*。接种 10 d 后, 两者叶片的菌斑面积没有明显差异(图 6-A); 接种 45 d 后, 野生型烟草的菌斑面积没有显著性变化, 而转基因烟草叶片的菌斑面积显著高于野生型烟草(图 6-B 和图 6-C)。接种 60 d 后转基因烟草的整体生长状况显著优于野生型烟草(图 6-D)。以上结果表明 *SfPR1a* 基因提高了转基因烟草对叶斑病的抗性。

2.7 亚细胞定位

生物信息学分析 *SfPR1a* 基因编码的蛋白质具有信号肽序列, 属于分泌型蛋白, 提示该蛋白定位表达在胞外。利用基因枪法将目的基因与绿色荧光蛋白基因偶联的表达质粒和仅含有绿色荧光蛋白基因的空载对照轰击至洋葱表皮中瞬时表达, 转化 18 h 后徒手撕片, 用激光扫描共聚焦显微镜观察绿色荧光以确定目的蛋白在细胞中的分布。转有绿色荧光蛋白空载对照 pCambia1302-*mGFP* 的洋葱表皮中, 整个细胞都有绿色荧光的分布, 无明显的细胞表达特异性(图 7-A)。而在转有融合目的基因

pCambia1302-*SfPR1a-mGFP* 的洋葱表皮中, 绿色荧光包围整个细胞, 胞质及胞内其他细胞器中并无分布(图 7-B~D)。结合理论预测和初步试验结果, 推测 *SfPR1a* 蛋白表达定位于细胞的质外体空间, 这可能与抗性功能的发挥密切相关。

3 讨论

本试验显示, *SfPR1a* 基因在费尔干猪毛菜地上和地下部分均有表达(图 2-A), 与 Linthorst 等^[34]证明烟草和矮牵牛 *PR1* 基因表达结果一致。*SfPR1a* 基因在根中的表达量显著高于在地上部分中, 这可能与根作为最先接触并感知外界土壤刺激的植物器官以应对不利环境有着密切的关系。

早期研究发现, 水稻 *OsPR1a* 和 *OsPR1b* 基因受茉莉酸(JA)、水杨酸(SA)、过氧化氢(H₂O₂)、蛋白酶抑制剂斑螫素和稻瘟病菌(*Magnaporthe grisea*)的显著诱导表达^[35-37]; Wang 等^[38]和 Gao 等^[39]的研究结果也同样显示了百合和小麦 *PR1* 基因受脱落酸(ABA)、茉莉酸甲酯(MeJA)和乙烯(EH)的诱导表达。本研究结果也显示 *SfPR1a* 基因受生物胁迫相关激素 ACC、JAs 及非生物胁迫相关激素 ABA 和盐的胁迫诱导表达, 推测该基因可能是多种信号通路交叉对话的

图 6 转 *SfPR1a* 基因烟草对叶斑病的抗性
Fig. 6 Resistance to leaf spot disease of transgenic *SfPR1a* tobacco
A: 接菌 10 d 后烟草叶片菌斑面积; B: 接菌 45 d 后的烟草叶片; C: 接菌 45 d 后烟草叶片菌斑面积; D: 接菌 60 d 后烟草植株的生长表型。图中标以不同小写字母的柱值差异显著 ($P < 0.05$)。
A: plaque area after inoculation of *Pseudomonas syringae* for 10 d; B: tobacco leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* for 45 d; C: plaque area after inoculation of *Pseudomonas syringae* for 45 d; D: growth phenotype of tobaccos after 60 d of *Pseudomonas syringae* inoculation. Bars labelled with different letters are significantly different at $P < 0.05$.

图 7 *SfPR1a* 的亚细胞定位
Fig. 7 Subcellular localization of *SfPR1a*
A: 空载对照 mGFP 的荧光图; B: 融合蛋白 *SfPR1a*-mGFP 的荧光图; C: 明场下的图 B; D: 荧光图 B 与明场图 C 的叠加效果图。
A: control empty plasmid (GFP) viewed under fluorescence filter; B: *SfPR1a*-mGFP transformed cells viewed under fluorescence filter (B) to show the location of GFP protein; C: *SfPR1a*-mGFP transformed cells shape under bright field; D: merge of B and C. Bar = 50 μm.

下游靶基因, 后期仍需对 *SfPR1a* 基因启动子及调节机制做进一步的深入研究。

SfPR1a 基因提高了烟草对盐和干旱胁迫的抗性, 这与之之前对来自烟草^[40]和拟南芥^[41]PR1 蛋白分别具有抗渗透和干旱胁迫的研究结果一致。值得注意的是, *SfPR1a* 基因的异源表达显著地提高了烟草在种子萌发阶段的生长, 而对具有抗盐表型的成苗进行叶绿素和蛋白含量进行生理生化指标检测时, 转基因烟草和野生型烟草之间没有显著差异(结果未显示), 该蛋白发挥生理功能的机制尚不明确。

烟草^[42]和小麦^[43]PR1基因的异源表达增强了植物对病原微生物的抗性。本研究中, 接种丁香假单胞菌后, 转基因烟草叶片显示出比野生型烟草叶片更加严重的病理反应, 但纵观两者的表型, 转基因烟草的整体生长状况显著优于野生型烟草。有文献报道称^[44], 拟南芥 *NPR1* 基因通过诱导其他 PR 家族成员的表达诱发了植物的 SAR 反应, 从而赋予拟南芥对丁香假单胞菌的抗性。作为 SAR 的具体表现之一, 超敏反应(hypersensitivity)和过敏性坏死反应(chypersensitive necrosis reaction)均会通过感染部位

叶片迅速死亡的植物免疫过程达到抗菌作用。因此,推测转基因烟草可能通过异源表达的 *SfPR1a* 诱发了植株在感染部位的过敏性坏死反应或超敏反应导致感染部位叶片迅速死亡,从而有效抑制病原菌在植物体内的扩散,这可能是提高植物抗病性的有效策略之一。然而, Lincoln 等^[45]研究发现,番茄 PR1 蛋白通过结合 Rac1 复合物以抑制细胞程序性死亡(PCD),从而保护植物在病原体感染后正常生长。Wang 等^[38]的研究表明,PR1 蛋白在 SAR 的过程中通过与 LhSorTGA2 蛋白相互作用以调节其他防御相关 PR 基因的表达,从而提高了植物在病原微生物感染过程中的抗性功能。综上所述,不同来源的植物 PR1 蛋白在植物抗病过程中通过不同的机制发挥了抗生物胁迫功能。此外,有研究显示植物可通过释放 NO 增强 PR1 蛋白的含量从而减少病原菌在叶片中的积累^[47],推测 PR1 基因的表达可能与无机信号分子之间存在普遍的联系; Lu 等^[43]研究发现同一物种中不同的 PR1 蛋白以不同的形式存在,如小麦的 PR1-1 主要以单体存在,而 PR1-5 以二聚体存在,该现象与 PR1 蛋白发挥作用之间的内在联系也值得我们进一步研究;根据 Tosarini 等^[47]的研究发现,可可中发现的 2 种 PR1 蛋白 TcPR-1g 和 TcPR-1f 均具有 23 个疏水性氨基酸形成的受体样激酶保守结构域,暗示 PR1 蛋白生物学功能的发挥可能与激酶信号通路的转导有关。以上研究结果极大丰富了对 PR1 蛋白抗病机理的认识。

结合亚细胞定位预测和本研究结果,初步确定 SfPR1 蛋白可能作为一种分泌型蛋白定位在胞外,这一结果与拟南芥 AtPR1 蛋白的定位结果相一致^[48]。PR1 作为一种受胁迫诱导表达的蛋白质,其亚细胞定位必然与防御功能的发挥密切相关。Gao 等^[37]的研究表明,定位表达在胞外的可可 TcPR1 蛋白具有抑制真菌生长的作用。目前,尽管 PR1 蛋白发挥抗菌作用的分子机制尚不清楚,但可以明确的是来自不同物种的 PR1 蛋白在植物抵御生物胁迫抗性过程中发挥十分重要的作用。

4 结论

费尔干猪毛菜病程相关蛋白 *SfPR1a* 基因在根中的表达高于在地上茎叶中,且该基因受到生物胁迫相关激素 ACC、JAs 以及非生物胁迫相关激素 ABA 和 NaCl 的显著诱导;其异源表达显著提高了转基因烟草对盐、早及丁香假单胞菌的抗性。SfPR1a

可能定位表达在细胞外,属分泌型蛋白。

References

- [1] Balbi V, Devoto A. Jasmonate signalling network in *Arabidopsis thaliana*: Crucial regulatory nodes and new physiological scenarios. *New Phytol*, 2008, 177: 301–318.
- [2] Mahabub A M, Nahar K, Hasanuzzaman M, Fujita M. Exogenous jasmonic acid modulates the physiology, antioxidant defense and glyoxalase systems in imparting drought stress tolerance in different brassica species. *Plant Biotechnol Rep*, 2014, 8: 279–293.
- [3] Wasternack C. Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Ann Bot*, 2007, 100: 681–697.
- [4] Wang L C, Li H, Ecker J R. Wang K L C, Li H, Ecker J R. Ethylene biosynthesis and signaling networks. *Plant Cell*, 2002, 14: S131–S151.
- [5] Guo H, Ecker J R. The ethylene signaling pathway: new insights. *Curr Opin Plant Biol*, 2004, 7: 40–49.
- [6] Ali S, Mir Z A, Bhat J A, Tyagi A, Chandrashekar N, Yadav P, Rawat S, Sultana M, Grover A. Isolation and characterization of systemic acquired resistance marker gene *PR1* and its promoter from *Brassica juncea*. *3Biotech*, 2018, 8: 10–24.
- [7] Mejía-Teniente L, Durán-Flores F de D, Chapa-Oliver A M, Torres-Pacheco I, Cruz-Hernández A, González-Chavira M M, Ocampo-Velázquez R V, Guevara-González R G. Oxidative and molecular responses in *Capsicum annuum* L. after hydrogen peroxide, salicylic acid and chitosan foliar applications. *Int J Mol Sci*, 2013, 14: 10178–10196.
- [8] Bantel Y, Darwiche R, Rupp S, Schneider R, Sohn K. Localization and functional characterization of the pathogenesis-related proteins Rbe1p and Rbt4p in *Candida albicans*. *PLoS One*, 2018, 13: 1371–1385.
- [9] Abraham A, Chandler D E. Tracing the evolutionary history of the CAP superfamily of proteins using amino acid sequence homology and conservation of splice sites. *J Mol Evol*, 2017, 85: 137–157.
- [10] Ohshima M, Matsuoka M, Yamamoto N, Tanaka Y, Kano-Murakami Y, Ozeki Y, Kato A, Harada N, Ohashi Y. Nucleotide sequence of the *PR-1* gene of *Nicotiana tabacum*. *FEBS Lett*, 1987, 225: 246–246.
- [11] Tornero P, José G, Conejero V, Pablo V. Two *PR-1* genes from tomato are differentially regulated and reveal a novel mode of expression for a pathogenesis-related gene during the hypersensitive response and development. *Mol Plant-Microbe Interact*, 1997, 10: 624–634.
- [12] Klaus M, Aaron L, Thomas E, Allen M, Jürg S, Kay A L, Jeffery L D, Robert A D. The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. *Nature*, 2001, 26: 403–410.
- [13] Li Z T, Dhekney S A, Gray D J. *PR-1* gene family of grapevine: a uniquely duplicated *PR-1* gene from a vitisinter specific hybrid confers high level resistance to bacterial disease in transgenic tobacco. *Plant Cell Rep*, 2011, 30: 1–11.
- [14] Ichiro M, Takayoshi I, Shigemi S, Yuki Y, Hiroyuki K, Sakino H, Yasunobu O, Yuko O. Characteristic expression of twelve rice *PR1* family genes in response to pathogen infection, wounding,

- and defense-related signal compounds (121/180). *Mol Genet Genomics*, 2008, 279: 415–427.
- [15] Maria T R G, Carlos E S L, Juana M J V, Cesar V F B, Ernesto O, Lourival D P. Transcriptomic and proteomic analyses reveal the diversity of venom components from the vaejovid scorpion *Ser-radigitus gertschi*. *Toxins*, 2018, 10: 359–384.
- [16] Jung H W, Tschaplinski T J, Wang L, Jane G, Jean T G. Priming in systemic plant immunity. *Science*, 2009, 324: 89–91.
- [17] Fumihiko S, Hisashi K, Yasuyoshi S, Nobuo K, Yasuyuki Y. Synthesis and secretion of tobacco neutral PR-5 protein by transgenic tobacco and yeast. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, 211: 909–913.
- [18] Leendert C V L, Martijn R, Corné P. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu Rev Phytopathol*, 2006, 44: 135–162.
- [19] Sayaka I, Ei'ichi I, Keiichi W, Yukio N. Transcriptome analysis reveals key roles of AT-LBR2 in LPS-induced defense responses in plants. *BMC Genomics*, 2017, 18: 995–1008.
- [20] Antoniow J F, Ritter C E, Pierpoint W S, Vanloon L C. Comparison of three pathogenesis-related proteins from plants of two cultivars of tobacco infected with TMV. *J General Virol*, 1980, 47: 79–87.
- [21] Lu S, Edwards M. Molecular characterization and functional analysis of PR-1-like proteins identified from the wheat head blight fungus fusarium graminearum. *Phytopathology*, 2017, 108: 510–520.
- [22] 王艳, 陈西, 周连洁, 杨中敏. 费尔干猪毛菜病程相关蛋白基因(*SfPR-1*)的克隆及在盐胁迫下的表达分析. 植物科学学报, 2013, 31: 164–170.
Wang Y, Chen X, Zhou L J, Yang Z M. Cloning of pathogen-related protein gene (*SfPR-1*) from *Salsola ferganica* and its expression analysis under salt stress. *Plant Sci J*, 2013, 31: 164–170(in Chinese with English abstract).
- [23] 马立功, 张匀华, 孟庆林, 石凤梅, 刘佳, 李易初, 王志英. 向日葵病程相关蛋白 *HaPR1* 基因的克隆与功能. 作物学报, 2015, 41: 1819–1827.
Ma L G, Zhang Y H, Meng Q L, Shi F M, Liu J, Li Y C, Wang Z Y. Cloning and function analysis of pathogenesis related protein gene *HaPR1* from sunflower (*Helianthus annuus*). *Acta Agron Sin*, 2015, 41: 1819–1827 (in Chinese with English abstract).
- [24] 高海波, 曾幼玲, 张富春. 费尔干猪毛菜愈伤组织的诱导、分化及植株再生体系的建立. 武汉植物学研究, 2008, 26: 634–638.
Gao H B, Zeng Y L, Zhang F C. Callus induction differentiation and establishment of plantlet regeneration system of *Salsola ferganica*. *J Wuhan Bot Res*, 2008, 26: 634–638 (in Chinese with English abstract).
- [25] 王艳, 陈西, 周连洁, 杨中敏. 费尔干猪毛菜病程相关蛋白基因 *SfPR-1* 的表达规律和植物表达载体构建. 生物技术通报, 2014, (1): 116–124.
Wang Y, Chen X, Zhou L J, Yang Z M. Expression profiles of pathogen-related protein gene (*SfPR-1*) from *Salsola ferganica* and construction of plant expression vectors. *Biotechnol Bull*, 2014, (1): 117–124 (in Chinese with English abstract).
- [26] Matsuo K, Fukuzawa N, Matsumura T. A simple agroinfiltration method for transient gene expression in plant leaf discs. *J Biosci Bioeng*, 2016, 122: 351–356.
- [27] 王燃, 许亚龙, 李泽锋, 卢鹏, 孟利军, 曹培健. 基于芯片数据的烟草 qRT-PCR 内参基因鉴定与验证. 烟草科技, 2017, 50(11): 1–8.
Wang R, Xu Y L, Li Z F, Lu P, Meng L J, Cao P J. Identification and validation of tobacco reference genes for qRT-PCR based on microarray data. *Tob Sci Technol*, 2017, 50(11): 1–8 (in Chinese with English abstract).
- [28] Hodges D M, DeLong J M, Forney C F, Prange R K. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*, 1999, 207: 604–611.
- [29] Gitelson A A, Merzlyak M N. Remote estimation of chlorophyll content in higher plant leaves. *Int J Remote Sensing*, 1997, 18: 2691–2697.
- [30] Wang J, Lan X X, Jiang S X, Ma Y L, Zhang S Y, Liu Y, Li X R, Lan H Y. *CaMKK1* from *Chenopodium album* positively regulates salt and drought tolerance in transgenic tobacco. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 2017, 130: 1–17.
- [31] Lee O R, Kim Y J, Balusamy S R D, Khorolragchaa A, Sathiyaraj G, Kim M K, Yang D C. Expression of the ginseng *PgPR10-1* in Arabidopsis confers resistance against fungal and bacterial infection. *Gene*, 2012, 506: 85–92.
- [32] 高建昌, 郭广君, 国艳梅, 王孝宣, 杜永臣. 平台扫描仪结合 ImageJ 软件测定番茄叶面积. 中国蔬菜, 2011, 2(1): 73–77.
Gao J C, Guo G J, Guo Y M, Wang X W, Du Y C. Measuring plant leaf area by scanner and ImageJ software. *China Vegetables*, 2011, 2(1): 73–77 (in Chinese with English abstract).
- [33] Indra K V, Vimla V. Transformation of wheat via particle bombardment. *Methods Mol Biol*, 1999: 111: 349–358.
- [34] Linthorst H J, van Loon L C, van Rossum C M, Mayer A, Bol J F, van Roekel J S, Meulenhoff E J, Cornelissen B J. Analysis of acidic and basic chitinases from tobacco and petunia and their constitutive expression in transgenic tobacco. *Mol Plant Microbe Interact*, 1990, 3: 252–258.
- [35] Ganesh K A, Nam S J, Randeep R. A novel rice (*Oryza sativa* L.) acidic *PR1* gene highly responsive to cut, phytohormones, and protein phosphatase inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 274: 157–165.
- [36] Ganesh K A, Randeep R, Nam S J. Rice (*Oryza sativa* L.) *OsPR1b* gene is phytohormonally regulated in close interaction with light signals. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 278: 290–298.
- [37] Ganesh K A, Randeep R, Nam-Soo J, Vishwanath P A. Signalling molecules and blast pathogen attack activates rice *OsPR1a* and *OsPR1b* genes: a model illustrating components participating during defence/stress response. *Plant Physiol Biochem*, 2001, 39: 1095–1103.
- [38] Wang L, Guo Z H, Zhang Y B, Wang Y J, Wang L, Yang G, Li W M, Wang R Y, Xie Z K. Characterization of LhSorTGA2, a novel TGA2-like protein that interacts with LhSorNPR1 in oriental hybrid lily sorbonne. *Bot Studies*, 2017, 58: 46–57.
- [39] Gao L, Wang S, Li X Y, Wei X J, Zhang Y J, Wang H Y, Liu D Q. Expression and functional analysis of a pathogenesis-related protein 1 gene, *TcLr19PR1*, involved in wheat resistance against leaf rust fungus. *Plant Mol Biol Rep*, 2015, 33: 797–805.

- [40] Stintzi A, Heitz T, Kauffmann S, Legrand M, Fritig B. Identification of a basic pathogenesis-related, thaumatin-like protein of virus-infected tobacco as osmotin. *Physiol Mol Plant Pathol*, 1991, 38: 137–146.
- [41] Liu W X, Zhang F C, Zhang W Z, Song L F, Wu W H, Chen Y F. *Arabidopsis* Di19 functions as a transcription factor and modulates *PR1*, *PR2*, and *PR5* expression in response to drought stress. *Mol Plant*, 2013, 6: 1487–1502.
- [42] Alexander D, Goodman R M, Gut R M, Glascock C, Weymann K, Friedrich L, Maddox D, Ahlgoy P, Luntz T, Ward E. Increased tolerance to two oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis-related protein 1a. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 7327–7331.
- [43] Lu S, Faris J D, Sherwood R, Edwards M C. Dimerization and protease resistance: new insight into the function of *PR-1*. *J Plant Physiol*, 2013, 170: 105–110.
- [44] Cao H, Glazebrook J, Clarke J D, Volko S, Dong X. The *Arabidopsis NPR1* gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell*, 1997, 88: 57–63.
- [45] Lincoln J E, Sanchez J P, Zumstein K, Gilchrist D G. Plant and animal *PR1* family members inhibit programmed cell death and suppress bacterial pathogens in plant tissues. *Mol Plant Pathol*, 2018, 19: 2111–2123.
- [46] Li Z, Liang W S, John P C. Effects of modifying alternative respiration on nitric oxide-induced virus resistance and *PR1* protein accumulation. *J General Virol*, 2014, 95: 2075–2081.
- [47] Tosarini T R, Ramos P Z, Profeta G S, Baroni R M, Massirer K B, Couñago R M, Mondego J M C. Cloning, expression and purification of kinase domains of cacao *PR-1* receptor-like kinases. *Protein Expr Purif*, 2018, 146: 78–84.
- [48] Pečenková T, Pleskot R, Žárský V. Subcellular localization of *Arabidopsis* pathogenesis-related 1(*PR1*) protein. *Int J Mol Sci*, 2017, 18: 825–838.