研 究 报 告
Research Reports

嵌合蛋白 MoSlp1-AtCERK1 作为抗病激发子的研究

陈林枭， 冯华峰， 吴梦琪， 夏 玮， 宋金星， 张文清*

（华东理工大学化学与分子工程学院，上海 200237）

摘要 本研究通过 DNA 体外重组技术，将稻瘟病菌 *MoSlp*1 基因和拟南芥几丁质寡糖受体基因 *AtCERK*1 的跨膜结构域和胞内结构域基因融合，构成嵌合基因 *MoSlp*1-*AtCERK*1。在烟草瞬时表达试验中，MoSlp1-AtCERK1 嵌合蛋白诱导烟草产生以过敏性坏死为表现形式的过敏反应。以带有 MoSlp1-AtCERK1 蛋白的农杆菌注射烟草，可增强烟草对烟草花叶病毒的抗病性。同时提高烟草的 *PR*-1 基因转录表达水平，表明 MoSlp1-AtCERK1 嵌合蛋白基因通过水杨酸信号传导的途径激活烟草系统获得性抗病。

关键词 嵌合基因； 抗病激发子； 诱导途径

中图分类号： S 435.72 **文献标识码：** A **DOI：** 10.16688/j.zwbh.2018424

The chimeric protein MoSlp1-AtCERK1 as a disease-resistant elicitor

CEHN Linxiao， FENG Huafeng， WU Mengqi， XIA Wei， SONG Jinxing， ZHANG Wenqing

（*School of Chemistry and Molecular Engineering*, *East China University of Science and Technology*, *Shanghai* 200237, *China*）

Abstract In this study, DNA recombination technology was used to fuse the *MoSlp*1 gene of *Magnaporthe oryzae* and the transmembrane and intracellular domain of *AtCERK*1 gene, the chitin elicitor receptor gene of *Arabidopsis thaliana*, to construct the chimeric gene *MoSlp*1-*AtCERK*1 as a disease-resistant elicitor. In tobacco transient expression experiments, MoSlp1-AtCERK1 chimeric protein induced tobacco allergic reactions in the form of allergic necrosis. Inoculation of tobacco with *Agrobacterium* carrying the MoSlp1-AtCERK1 protein enhanced tobacco resistance to *Tobacco mosaic virus* and at the same time increased the transcription level of *PR*-1 gene in tobacco, indicating that the MoSlp1-AtCERK1 chimeric protein activated the tobacco to acquire resistance through the salicylic acid signaling pathway.

Key words chimeric gene； disease-resistant elicitor； induction pathway

烟草花叶病是烟草的主要病害之一，严重影响烟草的生长，烟草花叶病毒（TMV）传染性强，可以在不同植物之间传播[1]。研究表明[2]，烟草花叶病毒侵染烟草植株后会破坏植株的组织结构，叶片出现斑点，呈现出黄绿相间的不同区域。对烟草花叶病的主要防治手段有农业防治[3]、化学防治[4-6]和生物防治[7-9]。

通过 DNA 体外重组技术，构建能特异性结合激发子的嵌合受体，是增强植物抗病性的有效方法之一。Kishimoto 等[10]发现将水稻的几丁质寡糖受体 OsCEBiP 与水稻抗白叶枯病的 XA21 受体的跨膜结构域和激酶结构域融合所构成的嵌合受体 CRXA，在几丁质壳寡糖处理下，能激活水稻的过敏性坏死和诱导水稻对稻瘟病菌的有效限制。嵌合基因技术作为一种有效的基因重组技术，所构建的嵌合受体在植物抗病方面值得我们重视。通过 DNA 体外重组技术来增强植物的抗病性，将是一种全新的探索研究。

在水稻与稻瘟病菌亲和互作中，稻瘟病菌的菌丝顶端直接插入水稻细胞质中，大量分泌一种具有 2 个 LysM 结构域的效应蛋白 MoSlp1（secreted LysM protein 1）。MoSlp1 蛋白与水稻的几丁质受体 OsCEBiP（chitin elicitor binding protein）竞争性结合几丁质寡糖，阻碍水稻由几丁质寡糖所激发的免疫反应[11]。效应蛋白 MoSlp1 是稻瘟病菌成功侵染水稻所必需的。

收稿日期： 2018-09-30 **修订日期：** 2018-11-07
基金项目： 山东省蓝色产业领军人才团队支撑计划（鲁发改区域[2015]260 号）
* 通信作者 E-mail：zhwqing@ecust.edu.cn

拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 中几丁质寡糖受体被称为 AtCERK1(chitin elicitor receptor kinase 1),胞外是由 1 个信号肽和 3 个 LysM 结构域所构成,MoSlp1 是由 1 个信号肽和 2 个 LysM 结构域构成,同时 AtCERK1 能够增强烟草对烟草花叶病毒的抗性[12-13]。通过氨基酸序列比对发现,MoSlp1 的 2 个 LysM 功能域 MoSlp1-LysM1、MoSlp1-LysM2 与 AtCERK1-LysM2 的同源性不高,但与几丁质寡糖结合处的氨基酸残基同源性较高[14]。这说明了 MoSlp1-LysM1 和 MoSlp1-LysM2 都有可能结合几丁质寡糖。所以我们以 AtCERK1 为桥梁,将 AtCERK1 胞外部分替换为 MoSlp1,重组成对几丁质寡糖超敏感的 MoSlp1-AtCERK1 嵌合受体,观察 MoSlp1-AtCERK1 嵌合蛋白的抗病激发子活性并研究其诱导抗性的途径。

1　材料与方法

1.1　试验材料与仪器

烟草花叶病毒 *Tobacco mosaic virus*(TMV),扬州大学纪兆林教授馈赠; 稻瘟病菌 *Magnaporthe oryzae*(生理小种 70-15)来自国家南方农药创制中心;克隆载体:零背景(pLB)快速连接试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司; 表达载体: pHB(双 35S 启动子),本实验室保存; 原核表达载体: pET-30a(+),美国 Novagen 生物公司; 真菌 RNA 提取试剂盒: 北京康为世纪生物科技有限公司; 镍柱:美国 GE 医疗器械公司。

罗氏 Cycler 96 荧光定量 PCR 仪,瑞士罗氏仪器公司; 伯乐 S1000 PCR 仪,美国伯乐仪器公司; 雷磁 PHS-3E 型 pH 计,上海仪电科学仪器股份有限公司; 人工光照培养箱,上海一恒科学仪器有限公司。

1.2　试验方法

1.2.1　*MoSlp*1、*AtCERK*1-*ICD*、*AtCERK*1-*ECD* 和 *AtCERK*1 基因克隆

首先在 PDA 固体平板中培养稻瘟病菌,再用 PD 液体培养基培养,之后用真菌 RNA 提取试剂盒提取稻瘟病菌的 RNA,并迅速用 RNA 反转录试剂盒反转录成 cDNA。以此 cDNA 为模板,PCR 扩增得到基因 *MoSlp*1。

使用植物 RNA 提取试剂盒提取拟南芥花蕾 RNA,并迅速用反转录试剂盒将 RNA 反转录成 cDNA。以此 cDNA 为模板,克隆 *AtCERK*1-*ICD*、*AtCERK*1-*ECD* 和 *AtCERK*1 基因。*AtCERK*1-*ICD* 基因包括跨膜结构域和胞内激酶结构域基因;*AtCERK*1-*ECD* 基因只包括信号肽胞外部分基因;*AtCERK*1 则是全长基因(去除终止密码子)。三者两端的酶切位点均设计为 *Hin*d III 和 *Bam* HI。

1.2.2　基因 *MoSlp*1-*AtCERK*1 克隆(overlap 法)

Overlap PCR 反应是以 *MoSlp*1 基因和 *AtCERK*1-*ICD* 基因 DNA 凝胶回收产物为模板。引物 CERK1-ICD-F(overlap)前 20 个碱基序列来自 *MoSlp*1 基因 R 端的 20 个碱基序列,和 CERK1-ICD 基因 F 端的前 20 个碱基序列,共 40 个碱基序列。引物 MoSlp1-R(overlap)为引物 CERK1-ICD-F(overlap)的反向互补序列。主要通过改变反应条件中的退火时间和温度,以及延伸时间和温度来实现两个基因的成功融合[15]。

1.2.3　洋葱细胞转化及亚细胞定位

按照 Biolistic® PDS-1000/He Particle Delivery System 方法金粉包埋质粒 DNA[16]。约 50 mg 金粉中加入 100 μL 无水乙醇,涡旋振荡 30 s,离心去乙醇。依次加入 10 μL 质粒,7 μL 0.1 mol/L 亚精胺和17 μL 2.5 mol/L $CaCl_2$,一起冰上涡旋振荡 15 min(涡旋振荡 1 min,冰浴中放置 1 min,共计 15 min),吸掉上清。再加入 140 μL 75%乙醇涡旋短甩去上清液,最后加入 10～15 μL 无水乙醇混匀金粉。将吸附于金粉表面的质粒 DNA,采用基因枪进行轰击转化洋葱。在被轰击转化前,洋葱片先在 1%琼脂固化的 1/2 MS 培养基上暗室中 22℃培养 48 h。洋葱片被轰击转化后,继续暗室培养 48 h,制片,于激光共聚焦显微镜下观察各个基因所编码蛋白的亚细胞定位。MoSlp1-AtCERK1 蛋白诱导烟草过敏性坏死,无法直接观察荧光信号在烟草细胞中的定位。因此,我们将 *MoSlp*1-*AtCERK*1 基因氨基酸序列的 283 位点的赖氨酸敲除[17],得到了不会引发过敏性坏死的 *MoSlp*1-*AtCERK*1[Δ*K*283] 基因。pHB-*MoSlp*1-*AtCERK*1 和 pHB-*MoSlp*1 质粒通过基因枪法在洋葱表皮细胞中瞬时表达,含有 *GFP* 基因的 pHB 载体为空白对照,激光共聚焦显微镜扫描拍摄。

1.2.4　嵌合蛋白诱导表达及纯化和 SDS-PAGE 鉴定

首先使用重组法构建 pET30-a(+)-MoSlp1-AtCERK1 表达载体,并将其转入到大肠杆菌中。将带有 pET30-a(+)-MoSlp1-AtCERK1 质粒的大肠杆菌划线培养,取单克隆至 2 mL LB(50 mg/L Kan)培养基中,37℃振荡培养 20 h 后取 100 μL 至

50 mL 培养基中，37℃培养至 OD_{600} 为 0.6～1.0。LB 液体培养基中加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L 继续培养 4～6 h。培养结束后，置于冰上 5 min，4℃离心 10 min 收集菌体。重悬于 0.25 倍体积预冷的裂解液：10 mmol/L Tris 和 100 mmol/L NaCl（pH 7.0），再加终浓度分别为 100 μmol/L PMSF 蛋白酶抑制剂和 1 mmol/L EDTA，振荡后，在冰浴中放置 30 min。超声波破碎 1.5 h（每超声 5 s，停止 30 s），菌始终要处于低温（4～5℃）状态。大肠杆菌细胞超声破碎后，4℃ 10 000 g 离心 10 min，取上清液。

在使用镍柱纯化蛋白时，先用 5 倍柱体积 ddH_2O 过柱，然后用 10～20 倍柱体积裂解液平衡镍柱。将上清液全部上柱，在 4℃冰箱中预结合 30～60 min。用 10 倍柱体积的 10 mmol/L Tris 洗脱剂（含 10 mmol/L 咪唑和 100 mmol/L NaCl）洗脱杂蛋白。再依次用体积为 2 mL 浓度分别为 50、100、200 和 300 mmol/L Tris 洗脱剂洗脱，分别收集馏分。每组馏分各取 10 μL，与等体积的 2×SDS 缓冲液混合，沸水煮 3 min，冷却后进行电泳，考马斯亮蓝染色并拍照。最后通过低温透析法除去蛋白溶液中的 Tris 和咪唑，透析液为 20 mmol/L 磷酸缓冲液，pH 为 7.5。

1.2.5 烟草花叶病毒侵染烟草及相关基因定量分析

取 1～2 g 带有烟草花叶病毒的烟草叶片用清水洗净，放入研钵中，加入 1.5 mL 缓冲液（1% K_2HPO_4，0.1% Na_2SO_3 和 50 mmol/L Tris，pH 7.0～8.0）磨碎挤出汁液，用纱布将汁液过滤至 2 mL 离心管中，放置冰水中备用。MoSlp1-AtCERK1 嵌合蛋白和 PBS 缓冲液，分别喷雾处理烟草（生长 7～8 周），24 h 后，再接种烟草花叶病毒。接种时用清水先将叶片冲洗干净，用滤纸吸干后，撒上少许 600 目金刚砂，托起叶片，用毛笔蘸取少量病毒汁液，在叶片上轻轻摩擦。接种后用无菌水洗去叶片上残留的汁液，再用滤纸吸干。烟草放回人工培养箱中，温度控制在 22～25℃，接种 48 h 后，观察发病情况并拍照记录。试验重复 3 次。

为了检测重组表达的 MoSlp1-AtCERK1 嵌合蛋白具有蛋白激发子活性，我们选用本氏烟草为研究对象，分别将带有 GFP、AtCERK1 和 MoSlp1-AtCERK1 蛋白的农杆菌注射烟草，48 h 后用台盼蓝组织染色法检测死细胞，试验重复 5 次。

为检测 MoSlp1-AtCERK1 蛋白诱导烟草抗病所依赖的信号传导途径，以 250 nmol/L 的 MoSlp1-AtCERK1 蛋白喷雾处理整株烟草，48 h 后取少许烟草叶片，提取 RNA，反转录得 cDNA，以 *EF*-1*a* 基因为内参，用荧光定量 PCR 法测定 *PR*-1、*LOX* 和 *ERF*1 的相对表达量，试验重复 3 次。本研究中所用引物序列见表 1。

表 1 试验所用引物列表

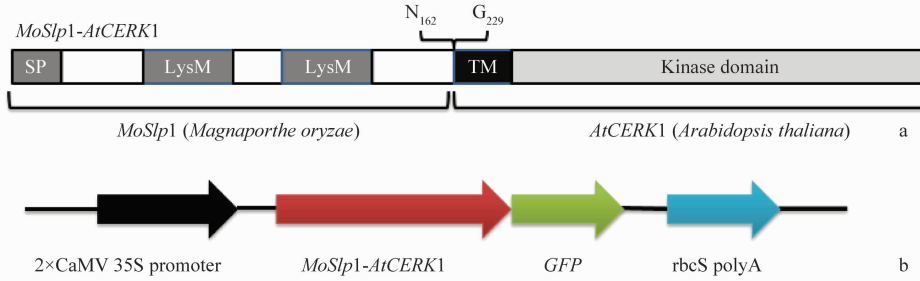
Table 1 Primer list

No.	引物名 Name	序列（5′-3′） Sequence（5′-3′）	备注 Remarks
1	AtCERK1 Forward	ATGAAGCTAA AGATTTCTCTA	用拟南芥的 cDNA 扩增 *ATCERKE*1 基因 1 851 bp 编码基因，用于构建 pHB-*ATCERK*1
2	AtCERK1 Reverse (no stop)	CCGGCCGGACATAAGACTGAC	
3	MoSlp1 Forward	ATGCAGTTCGCTACCATCACCAC	用稻瘟病菌的 cDNA 扩增 *MoSlp*1 基因 486 bp 编码基因，用于构建 pHB-*MoSlp*1
4	MoSlp1 Reverse (no stop)	GTTCTTGCAGATGGGGATGTTGAT	
5	AtCERK1-ECD Forward	ATGAAGCTAAAGATTTCTCTAATC	用 pHB-*ATCERK*1 扩增 *ATCERK*1 基因胞外 684 bp 片段，用于构建 pHB-*ATCERK*1-*ECD*
6	AtCERK1-ECD Reverse	ATCTTGTTTACTTGATTTGAAT	
7	AtCERK1-ICD Forward	GGTGTT GGTGCTGGAGTTATTGC	用 pHB-*ATCERK*1 扩增 *ATCERK*1 基因跨膜和胞内 1 167 bp 片段，用于构建 pHB-*ATCERK*1-*ICD*
8	AtCERK1-ICD Reverse	CCGGCCGGACATAAGACTGACT	
9	MoSlp1-AtCERK1 Forward (overlap)	ACATCCCCATCTGCAAGAACGGTGTTG-GTGCTGGAGTTAT	用 pHB-*ATCERK*1 扩增 *ATCERK*1 基因跨膜和胞内 1 187 bp 片段（与引物 2 结合），用于构建 pHB-*MoSlp*1-*ATCERK*1
10	MoSlp1-AtCERK1 Reverse (overlap)	ATAACTCCAGCACCAACACCGTTCTTGCA-GATGGGGATGT	用 pHB-*MoSlp*1 扩增 *MoSlp*1 基因 506 bp 片段（与引物 3 结合），用于构建 pHB-*MoSlp*1-*ATCERK*1
11	MoSlp1-AtCERK1[ΔK283]-F	CTGAGAGGAGAAAAAGCTGCGATT	用于构建第 283 位赖氨酸敲除的 pHB-*MoSlp*1-*ATCERK* 1[Δ*K*283] 基因
12	MoSlp1-AtCERK1[ΔK283]-R	TGTTTCGATGCCTCCATGTCCATCTT	
13	NtPR-1a fw	TGGATGCCCATAACACAGC	用于 qRT-PCR 检测 *RP*-1*a* 表达量
14	NtPR-1a rev	AATCGCCACTTCCCTCAG	
15	NtPR-1b fw	GATGTGGGTTGATGAGAAGC	用于 qRT-PCR 检测 *RP*-1*b* 表达量
16	NtPR-1b rev	CTCCAATTACCAGGTGGATC	
17	NtLOX fw	CCTTAAGAGGAGATGGAACT	用于 qRT-PCR 检测 *LOX* 表达量
18	NtLOX rev	TCTAAGCTCATAAGCAATGG	
19	NtERF1	GGCGAATTTTCCGGGAGACT	用于 qRT-PCR 检测 *ERF*1 表达量
20	NtERF1	GGCTCCGATTTTACTTCGCC	

2　结果

2.1　*MoSlp1-AtCERK1* 基因构建

如图 1a 所示,本研究将 *MoSlp1* 基因的终止密码子除去,再把整个 *MoSlp1* 基因与 *AtCERK1* 基因的跨膜结构域和胞内激酶结构域相互融合。两个基因在 *AtCERK1* 基因的第 229 位甘氨酸(Gly)与 *MoSlp1* 相融合形成 *MoSlp1-AtCERK1* 嵌合基因。之后再用双酶切法将整个嵌合基因插入到带有双重 CaMV 35S 启动子和绿色荧光蛋白(GFP)标签的 pHB 载体中。



a: *MoSlp1*的两个LysM结构域以及*ATCERKE1*的跨膜区域(TM)分别标记为灰色和黑色。将*MoSlp1*基因的信号肽作为嵌合受体的信号肽并位于N端。N_{162}和G_{229}分别代表结合位置和氨基酸; b: pHB双元载体::*MoSlp1-AtCERK1*::*GFP*。载体在植物中由双重CaMV 35S启动子控制表达

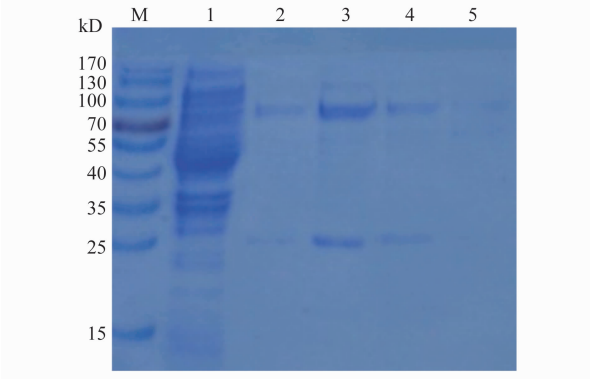
a: The two LysM domains of *MoSlp1* and transmembrane region (TM) of *AtCERK1* are marked in gray and black, respectively. The region corresponding to the signal peptide of *MoSlp1* is shown at the N-termini. N_{162}和G_{229} indicate the junction point in the chimeric receptor; b: Diagram of the T-DNA region of the binary vector pHB::*MoSlp1-AtCERK1*::*GFP*. The construct is expressed in plants under the control of the double CaMV 35S promoter

图 1　嵌合受体结构示意图

Fig. 1　Schematic representation of the chimeric receptor construct

2.2　MoSlp1-AtCERK1 蛋白诱导表达

MoSlp1-AtCERK1 蛋白诱导利用原核表达系统,在 1 mmol/L IPTG 诱导作用下,在大肠杆菌中将重组蛋白 MoSlp1-AtCERK1 成功表达出来。带有 6×His 标签的 MoSlp1-AtCERK1 蛋白的 SDS-PAGE 分析见图 2。从图 2 SDS-PAGE 分析可知,在 80 kD 左右处有单一条带,MoSlp1-AtCERK1 蛋白体外成功表达,为后续试验提供方便。



M: 蛋白分子量Marker; 1: 阴性对照; 2: 50 mmol/L tris洗脱液; 3: 100 mmol/L tris洗脱液; 4: 200 mmol/L tris洗脱液; 5: 300 mmol/L tris洗脱液

M: Molecular weight marker; 1: Negative control; 2: 50 mmol/L tris buffer; 3: 100 mmol/L tris buffer; 4: 200 mmol/L tris buffer; 5: 300 mmol/L tris buffer

图 2　带有 6×His 标签的 MoSlp1-AtCERK1 蛋白 SDS-PAGE 分析

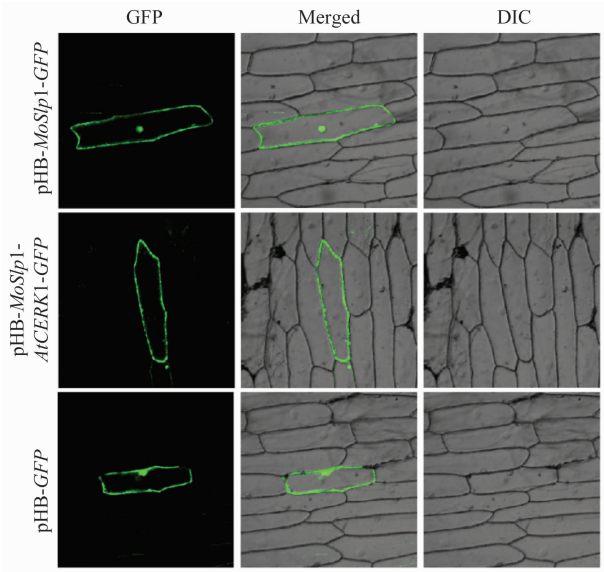
Fig. 2　The SDS-PAGE analysis of His-fused recombinant MoSlp1-AtCERK1

2.3　*MoSlp1-AtCERK1* 基因亚细胞定位

从图 3 可知,*MoSlp1-AtCERK1* 基因定位于细胞质膜上,这与 *AtCERK1* 基因定位一致。这是因为在 *MoSlp1-AtCERK1* 基因的氨基酸序列中,*AtCERK1* 基因的跨膜结构域全部被保留,利用跨膜结构域与膜结合的特性将 *MoSlp1-AtCERK1* 基因锚定于质膜上。*MoSlp1* 基因的 N 端含有信号肽,没有跨膜结构域存在,这是 *MoSlp1* 基因定位于细胞核和细胞质中的主要原因。

2.4　MoSlp1-AtCERK1 蛋白在烟草中瞬时表达及诱导烟草过敏反应

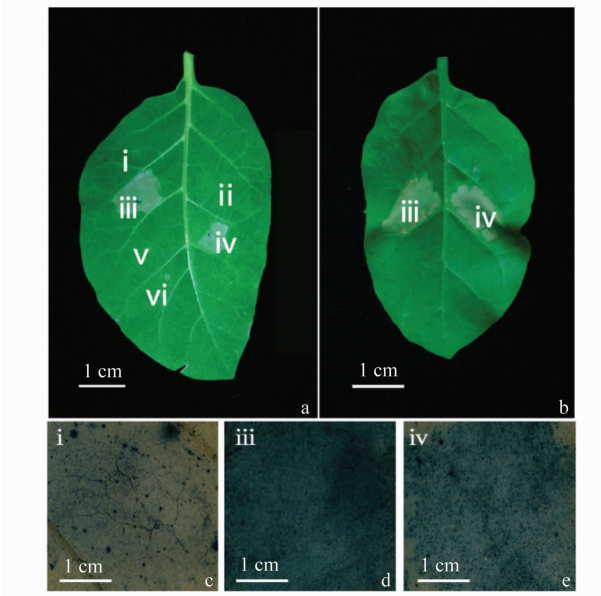
根据 pHB 载体上的酶切位点,本研究在 *MoSlp1-AtCERK1* C 端插入了 GFP 标签,同时构建 pHB-*AtCERK1*,pHB-*AtCERK1-ECD*,pHB-*AtCERK1-ICD* 和 pHB-*MoSlp1* 载体,观察各个基因编码的蛋白在烟草中瞬时表达情况,结果见图 4a～b。*AtCERK1-GFP*(ⅲ)和 *MoSlp1-AtCERK1-GFP*(ⅳ)激发本生烟草的过敏性坏死。由此说明 AtCERK1 和 MoSlp1-AtCERK1 蛋白具有类似于蛋白激发子的活性,而 *MoSlp1-GFP*(ⅱ),*AtCERK1-ECD-GFP*(ⅴ)和 *AtCERK1-ICD-GFP*(ⅵ)没有产生过敏性坏死现象,所以都不具有蛋白激发子活性。从图 4c～e 可知,对照组 GFP(c)中有少量的细胞死亡,可能是由于农杆菌侵染导致。而 AtCERK1(d)和 MoSlp1-AtCERK1(e)蛋白注射烟草后,死亡的细胞明显增多,表明烟草叶片产生过敏性坏死现象。



GFP: GFP荧光下拍摄; DIC: 白光下拍摄; Merged: 两者合成
GFP: shoot with GFP fluorescent light; DIC: shoot with white light; Merged: two pictures merged

图 3 *MoSlp1-AtCERK1* 定位于细胞质膜

Fig. 3 *MoSlp1-AtCERK1* localized at the plasma membrane



a: OD_{600}为0.1的农杆菌注射烟草48 h后; b: OD_{600}为0.4的农杆菌注射烟草72 h后; c~e: OD_{600}为0.4的农杆菌注射烟草48 h后, 台盼蓝染色。 i, *GFP*; ii, *MoSlp1-GFP*; iii, *AtCERK1-GFP*; iv, *MoSlp1-AtCERK1-GFP*; v, *AtCERK1-ECD-GFP*; vi, *AtCERK1-ICD-GFP*

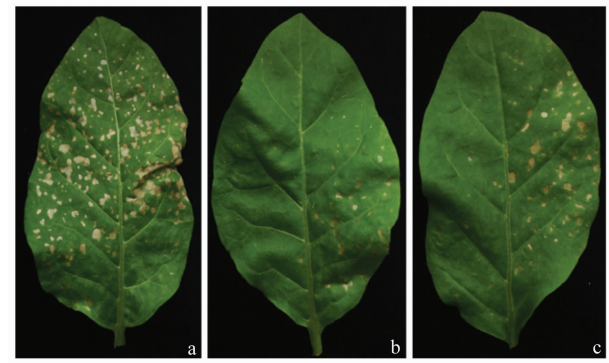
a: *Agrobacterium* infiltrated into tobacco leaf at a final OD_{600} of 0.1; the photograph is taken 48 h after infiltration inoculation; b: *Agrobacterium* infiltrated into tobacco leaf at a final OD_{600} of 0.4; the photograph is taken 72 h after infiltration inoculation; c-e: *Agrobacterium* infiltrated into tobacco leaf at a final OD_{600} of 0.1; the tobacco leaves are stained with trypan blue for detecting cell death at 48 h after infiltration inoculation and photographs are taken. i, *GFP*; ii, *MoSlp1-GFP*; iii, *AtCERK1-GFP*; iv, *MoSlp1-AtCERK1-GFP*; v, *AtCERK1-ECD-GFP*; vi, *AtCERK1-ICD-GFP*

图 4 AtCERK1 和 MoSlp1-AtCERK1 蛋白激发烟草细胞过敏性死亡需要 LysM 结构域存在

Fig. 4 HR-like cell death in tobacco plants induced by CERK1 and MoSlp1-AtCERK1 protein requires LysM domains

2.5 MoSlp1-AtCERK1 蛋白诱导烟草对烟草花叶病毒抗性

MoSlp1-AtCERK1 蛋白诱导烟草对烟草花叶病毒的抗性见图 5。与对照组(a)相比,MoSlp1-AtCERK1(c)诱导的烟草病斑数明显减少,表明 MoSlp1-AtCERK1 蛋白可以诱导烟草对 TMV 抗性。而 AtCERK1(b)诱导的烟草对 TMV 抗性更强,病斑数更少。我们观察到,烟草花叶病毒的病斑大小与对照组相比,没有明显差异,这说明 AtCERK1 和 MoSlp1-AtCERK1 蛋白诱导烟草抵御烟草花叶病毒的抗性仅表现为抑制初侵染,而一旦烟草花叶病毒成功入侵烟草后,对其增殖并没有明显抑制作用。



a: GFP空载体; b: AtCERK1; c: MoSlp1-AtCERK1
a: GFP; b: AtCERK1; c: MoSlp1-AtCERK1

图 5 AtCERK1(b)和 MoSlp1-AtCERK1(c)诱导烟草对 TMV 的抗性

Fig. 5 Systemic acquired resistance to *Tobacco mosaic virus* infection in AtCERK1(b) or MoSlp1-AtCERK1(c)-agroinfiltrated tobacco plants

2.6 MoSlp1-AtCERK1 信号传导途径

MoSlp1-AtCERK1 蛋白诱导烟草相关防卫基因的表达见图 6。从图 6 可知, *PR-1a* 基因相对表达量明显上升了将近 800 倍, *PR-1b* 基因相对表达量上升了约 15 倍。*LOX* 和 *ERF1* 基因的相对表达量略有上升(4.5 倍和 4 倍),与 *PR-1a* 基因相比可以忽略。由此我们可知,外源 MoSlp1-AtCERK1 蛋白处理诱导烟草抗病是依赖于 SA 信号传导途径。

3 结论与讨论

MoSlp1-AtCERK1 基因定位于细胞膜上才能感知在非原生质体间积累的几丁质寡糖。*MoSlp1* 自身发生同源二聚化或同源共聚化,通过 *AtCERK1* 激酶结构域将信号传递至胞内激酶结构域中,激活激酶结构域的磷酸化,将信号传导并放大,诱导植物

产生一系列的免疫反应[18]。所以 *MoSlp1-AtCERK1* 基因定位细胞膜上,是 *MoSlp1-AtCERK1* 嵌合受体能诱导植物产生免疫反应的基础。

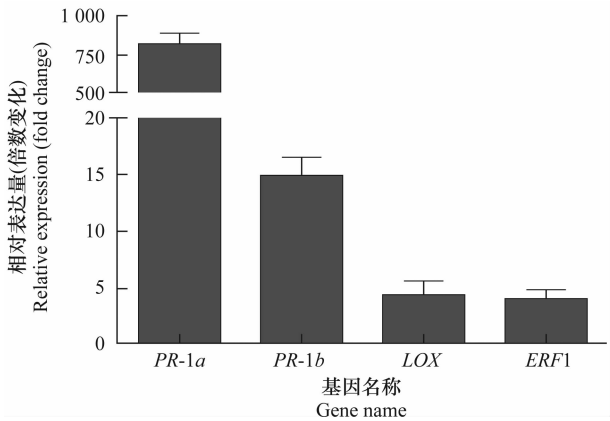


图 6　烟草叶片中 MoSlp1-AtCERK1 蛋白诱导烟草水杨酸途径相关基因表达

Fig. 6　*Agrobacterium*-mediated transient expression of *MoSlp1-AtCERK1* gene leads to activation of salicylic acid-related genes in tobacco plants

Pietraszewska 等[16]认为 AtCERK1 蛋白在烟草中瞬时表达会引起 LysM 结构域的同源二聚化,激活胞内激酶结构域,从而引起烟草的过敏反应。若将 AtCERK1 胞内激酶结构域的关键位点(第 349 位的赖氨酸)突变,过敏反应将不会发生。Mentlak 等[19]在酵母双杂交实验中发现 MoSlp1 能形成同源二聚体或同源共聚体,但我们的试验并没有发现 MoSlp1 引起过敏性坏死现象。MoSlp1 蛋白 LysM 结构域的存在并发生同源二聚化或同源共聚化是 MoSlp1-AtCERK1 蛋白诱导烟草产生过敏反应所必需的,而且更进一步说明 MoSlp1 与 AtCERK1-ICD 融合构建的嵌合受体具有 AtCERK1 相似的功能和活性。植物病原菌分泌的 Harpin 蛋白作为蛋白类激发子在寄主植物上产生致病性,在非寄主植物上可以诱导过敏性坏死,同时可以诱导植物抗病并促进植物生长[18]。我们虽然没有将 MoSlp1-AtCERK1 蛋白与 Harpin 蛋白直接进行对比试验,但是我们预测融合蛋白 MoSlp1-AtCERK1 也可能作为一种蛋白类激发子,可以诱导植物的非寄主抗病和促进植物生长。

目前已知的植物抗病信号传导途径主要依赖于水杨酸(SA)、乙烯(ET)和茉莉酸(JA)介导的途径[20]。植物病程相关基因 *PR*-1 的诱导表达是植物依赖于水杨酸诱发系统获得性抗病产生的分子标志[21]。乙烯响应元件绑定因子 *ERF*1 基因是乙烯信号传导过程中的关键转录因子之一[22],脂氧合酶基因 *LOX* 是茉莉酸合成途径的关键酶编码基因[23]。所以常将 *PR*-1、*ERF*1 和 *LOX* 这 3 个基因作为水杨酸、乙烯和茉莉酸信号通路的标志性基因。在本文中,*PR*-1*a* 基因相对表达量明显上升,说明外源 MoSlp1-AtCERK1 蛋白处理诱导烟草抗病是依赖于 SA 信号传导途径。

我们通过 DNA 体外重组技术克隆 *MoSlp1-AtCERK1* 基因,在烟草系统中测试了 MoSlp1-AtCERK1 作为蛋白激发子的各种生理指标试验,证明 MoSlp1-AtCERK1 具有蛋白激发子活性,可诱导烟草过敏性细胞坏死反应。同时 MoSlp1-AtCERK1 蛋白可以诱导烟草对烟草花叶病毒的抗性,此诱导过程依赖于水杨酸信号传导途径。

参考文献

[1] 马国胜,何博如. 烟草病毒研究现状与展望[J]. 中国生态农业学报,2006,14(2):150-153.

[2] 北京农业大学. 农业植物病理学[M]. 北京:农业出版社,1991:301-302.

[3] 蔡健和,周兴华,黄福新,等. 广西烟草病毒病发生相关因素分析及综合防治研究[J]. 南方农业学报,2009,40(2):159-163.

[4] 李宏光,钟权,张赛,等. 8 种农药防治烟草花叶病的田间药效试验[J]. 江西农业学报,2012,24(4):100-101.

[5] 刘旭,万宣伍,刘国军,等. 3 种药剂对烟草花叶病的控制作用及农艺性状的影响[J]. 西南师范大学学报(自然科学版),2010,35(1):101-104.

[6] XU Xingyang, OUYANG Jin, YANG Ming. Field observation on control of *Tobacco mosaic virus* (TMV) with Chemicals [J]. Tobacco Science & Technology, 2017, 50(12): 90-95.

[7] 申莉莉,王凤龙,钱玉梅. 拮抗细菌对烟草花叶病毒(TMV)的抑制作用研究[J]. 中国烟草科学,2007,28(5):9-11.

[8] 尤升波,游银伟. 草酸青霉菌果胶酶诱导烟草抗 TMV 的研究[J]. 山东农业科学,2014,46(5):102-106.

[9] LIAN Lingli, XIE Liyan, ZHENG Luping, et al. Induction of systemic resistance in tobacco against *Tobacco mosaic virus* by *Bacillus* spp. [J]. Biocontrol Science & Technology, 2011, 21(3): 281-292.

[10] KISHIMOTO K, KOUZAI Y, KAKU H, et al. Enhancement of MAMP signaling by chimeric receptors improves disease resistance in plants [J]. Plant Signaling and Behavior, 2011, 6(3): 449-451.

[11] MENTLAK T A, KOMBRINK A, SHINYA T, et al. Effector-mediated suppression of chitin-triggered immunity by *Magnaporthe oryzae* is necessary for rice blast disease[J]. Plant Cell, 2012, 24(1): 322-335.

[12] MIYA A, ALBERT P, SHINYA T, et al. CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in *Arabidopsis* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007, 104(49): 19613 - 19618.

[13] ZHAO Xiaoming, SHE Xiaoping, DU Yugang, et al. Induction of antiviral resistance and stimulary effect by oligochitosan in tobacco [J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2007, 87(1): 78 - 84.

[14] LIU Tingting, LIU Zixu, SONG Chuanjun et al. Chitin-induced dimerization activates a plant immune receptor [J]. Science, 2012, 336(6085): 1160 - 1164.

[15] HORTON R M, HO S N, PULLEN J K, et al. Gene splicing by overlap extension [J]. Methods in Enzymology, 1993, 217(1): 270.

[16] 安千里, 杨学健, 董越梅, 等. 用共聚焦激光扫描显微镜观测GFP标记的内生固氮菌 *Klebsiella oxytoca* SA2 侵染水稻根 [J]. 植物学报, 2001, 43(6): 558 - 564.

[17] PIETRASZEWSKA-BOGIEL A, LEFEBVRE B, KOINI M A, et al. Interaction of *Medicago truncatula* lysin motif receptor-like kinases, NFP and LYK3, produced in *Nicotiana benthamiana* induces defence-like responses [J/OL]. PLoS ONE, 2013, 8(6): e65055. DOI:10.1371/journal.pone.0065055.

[18] LI Xiaojie, HAN Bing, XU Manyu, et al. Plant growth enhancement and associated physiological responses are coregulated by ethylene and gibberellin in response to harpin protein Hpa1 [J]. Planta, 2014, 239(4): 831 - 846.

[19] MENTLAK A T. Investigating LysM effector function and the biotrophic growth phase of *Magnaporthe oryzae* [D]. Exeter: University of Exeter, 2012.

[20] 汪斌, 李维明. 植物激素的信号转导系统研究进展[J]. 福建农林大学学报, 2001, 30(4): 433 - 438.

[21] UWE C, HERMAN S, KLESSIG D F. Protein dephosphorylation mediates salicylic acid expression of *PR*-1 genes in tobacco [J]. Plant Journal, 2010, 11(4): 747 - 757.

[22] SOLANO R, STEPANOVA A, CHAO Qimin, et al. Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1 [J]. Genes & Development, 1998, 12(23): 3703.

[23] SHI Yanxia, YU Yang, FU Junfan, et al. Relationship between LOX activity and JA accumulations in cucumber leaves induced by pathogen [J]. Acta Phytophylacica Sinica, 2008, 35(6): 486 - 490.

(责任编辑: 田 喆)

(上接 120 页)

[60] KHAJURIA C, WILLIAMS C E, BOUHSSINI M E, et al. Deep sequencing and genome-wide analysis reveals the expansion of MicroRNA genes in the gall midge *Mayetiola destructor* [J]. BMC Genomics, 2013, 14: 187. DOI:10.1186/1471-2164-14-187.

[61] 武强, 吕志创, 张桂芬, 等. 遗传控制技术在实蝇类害虫中的研究进展[J]. 生物安全学报, 2015, 24(2): 161 - 170.

[62] FU Guoliang, CONDON K C, EPTON M J, et al. Female-specific insect lethality engineered using alternative splicing [J]. Nature Biotechnology, 2007, 25(3): 353 - 357.

[63] ISASAWIN S, AKETARAWONG N, THANAPHUM S. Characterization and evaluation of microsatellite markers in a strain of the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae), with a genetic sexing character used in sterile insect population control [J]. European Journal of Entomology, 2012, 109(3): 331 - 338.

[64] MCINNIS D O, TAM S, LIM R, et al. Development of a pupal color-based genetic sexing strain of the melon fly, *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) (Diptera: Tephritidae) [J]. Annals of the Entomological Society of America, 2004, 97(5): 1026 - 1033.

[65] SIM S B, GEIB S M. A chromosome-scale assembly of the *Bactrocera cucurbitae* genome provides insight to the genetic basis of white pupae [J]. G3: Genes | Genomes | Genetics, 2017, 7(6): 1927 - 1940.

[66] KANDUL N P, LIU Junru, SANCHEZ C H, et al. Transforming insect population control with precision guided sterile males with demonstration in flies [J/OL]. Nature Communications, 2019, 10(1): 84. DOI:10.1038/s41467-018-07964-7.

[67] ZHANG Ruibin, WANG Bing, GROSSI G, et al. Molecular basis of alarm pheromone detection in aphids [J]. Current Biology, 2017, 27(1): 55 - 61.

[68] JAYANTHI K P, KEMPRAJ V, AURADE R M, et al. Computational reverse chemical ecology: virtual screening and predicting behaviorally active semiochemicals for *Bactrocera dorsalis* [J/OL]. BMC Genomics, 2014, 15: 209. DOI:10.1186/1471-2164-15-209.

[69] LEAL W S, BARBOSA R M, XU Wei, et al. Reverse and conventional chemical ecology approaches for the development of oviposition attractants for *Culex* mosquitoes [J/OL]. PLoS ONE, 2008, 3(8): e3045. DOI:10.1371/journal.pone.0003045.

[70] 万方浩, 严盈, 王瑞, 等. 中国入侵生物学学科的构建与发展[J]. 生物安全学报, 2011, 20(1): 1 - 19.

[71] RICHARDSON D M, PYŠEK P. Fifty years of invasion ecology-the legacy of Charles Elton [J]. Diversity and Distributions, 2008, 14(2): 161 - 168.

[72] 罗嘉鹏. 利用组学数据检测昆虫的抗药性和入侵性[D]. 南京: 南京师范大学, 2018.

[73] QIAN Wanqiang, WAN Fanghao. China launches the "IAS1000 Project" [J]. Journal of Integrative Agriculture, 2018, 17(12): 2840 - 2841.

(责任编辑: 田 喆)