

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2020.02011

水稻多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白家族 OsPGIP 结构及基因表达特征分析

陈夕军^{1,2,*} 唐滔¹ 李丽丽¹ 陈宸¹ 陈煜文¹ 张亚芳²
左示敏²

¹ 扬州大学园艺与植物保护学院, 江苏扬州 225009; ² 江苏省作物遗传生理重点实验室 / 教育部功能基因组学重点实验室 / 扬州大学, 江苏扬州 225009

摘要: 植物多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白(polygalacturonase-inhibiting protein, PGIP)可特异性识别病原菌 PG (polygalacturonase), 从而提高植物的抗病能力。研究表明水稻中共存在 7 个 *OsPGIP* 基因, 为明确 OsPGIP 家族的蛋白质结构及基因表达特征, 从水稻 cDNA 中扩增各 *OsPGIP* 基因序列, 经克隆、测序后进行生物信息学分析与蛋白质结构模拟, 并测定其在生物逆境与非生物逆境胁迫下的表达量变化。经多序列比较与系统发育进化分析发现, 相同或相近物种 PGIP 往往具有较高的相似性, 虽然多数 OsPGIP 亲缘关系较近, 但它们并不能完全聚类在一起。7 个 OsPGIP 蛋白均具有一个信号肽和 9~11 个 LRR 片段, 各 LRR 片段中均含有 PGIP 的特征结构域 $xxLxLxx$ 。二级结构由 α -螺旋、 β -折叠和随机卷曲组成, 且多以随机卷曲为主, 这些二级结构以重复的随机卷曲— α -螺旋—随机卷曲— β -折叠组成线圈状结构, 并按右手螺旋规则形成一个特定的凹面, 负责 OsPGIP 与有害生物 PG 的互作。7 个 OsPGIP 蛋白多较稳定, 且均为疏水蛋白、脂溶性好、具有跨膜结构、定位于细胞外、有 1 到多个 N-糖基化位点、在大肠杆菌中原核表达后基本不溶。经生物和非生物逆境处理后, 水稻中不同 *OsPGIP* 基因的表达量上下调差异较大, 但表达量总和明显上调, 说明在逆境条件下水稻可通过调节自身 *OsPGIP* 基因的表达量, 从而提高其抗逆性。

关键词: 表达特征; 蛋白结构; 分析; 多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白; 水稻

Analysis on the structures of polygalacturonase-inhibiting proteins and the expression profile of its encoding genes in rice

CHEN Xi-Jun^{1,2,*}, TANG Tao¹, LI Li-Li¹, CHEN Chen¹, CHEN Yu-Wen¹, ZHANG Ya-Fang², and ZUO Shi-Min²

¹ Horticulture and Plant Protection College, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu, China; ² Key Laboratory of Crop Genetics and Physiology of Jiangsu Province / Key Laboratory of Plant Functional Genomics of the Ministry of Education / College of Agriculture, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu, China

Abstract: Polygalacturonase-inhibiting protein, the extracellular leucine-rich repeat protein, specially recognizing and inhibiting polygalacturonase (PG) from pathogenic organism, can improve the resistance of plant against the pathogen. In order to clarify the structures of OsPGIPs and the expression profile of its encoding genes in rice, seven *OsPGIP* (polygalacturonase-inhibiting protein) genes were amplified from rice cDNA by PCR. Bioinformatics analysis and structural prediction of OsPGIPs were performed and expression profile of its encoding genes under biotic and abiotic stresses was determined after these genes being cloned and sequenced. The results showed that PGIPs from the same or similar species had high similarity. Through multi-sequence alignment and phylogenetic analysis, it was found that most OsPGIPs had closer genetic relationship, but all of them could not be grouped in one group. All OsPGIPs had a signal peptide and 9 to 11 LRR fragments included the typical PGIP's

本研究由国家重点研发计划项目(2018YFD0300800)和国家转基因生物新品种培育重大专项(2016ZX08001002)资助。

This study was supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFD0300800) and the National Major Project for Developing New GM Crops (2016ZX08001002).

* 通信作者(Corresponding author): 陈夕军, E-mail: xjchen@yzu.edu.cn

第一作者联系方式: E-mail: xjchen@yzu.edu.cn

Received (收稿日期): 2020-02-16; Accepted (接受日期): 2020-07-02; Published online (网络出版日期): 2020-07-17.

URL: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20200717.1449.002.html>

motif of xxLxLxx. Secondary structure prediction indicated that all OsPGIPs consist of α -helix (H), extended strand (ES) and random coil (RC), which construct repeated RC-H-RC-ES- and form a typical concave coinciding with the right-hand helix rule. The concave might be responsible for the interaction between OsPGIPs and PGs from different agents. Most of the seven OsPGIPs were stable, and they all were hydrophobic proteins, good lipid solubility, with transmembrane structure, extracellular localization, one or more N-glycosylation sites, and basically insoluble after expression in *E. coli*. After being treated with biotic and abiotic stress factors, the expression levels of different OsPGIP genes in rice were significantly up-regulated or down-regulated, but the total expression levels were significantly up-regulated, which indicated that rice could improve its own ability against stresses by regulating the expression levels of OsPGIP genes under stress conditions.

Keywords: expression profile; protein structure; analysis; PGIP; rice

果胶和纤维素是构成植物细胞壁骨架的基本物质,也是病原菌侵入寄主的首道屏障。在病原菌侵入寄主过程中,PG是其产生的第一个胞壁降解酶^[1]。PGIP是植物细胞壁的重要组成部分,除了可以与胞壁果胶形成复合物加固细胞壁外,还能特异性结合病菌PG,减轻PG对寄主细胞的破坏作用,帮助寄主维护细胞的完整性,从而阻碍病菌侵入,降低病害严重度^[2-3]。同时,由于病原菌PG活性被抑制,其进一步分解果胶裂解产物寡聚半乳糖醛酸苷(oligalacuturonides, OG)的能力下降,从而引起OG在寄主体内富集,这些具有激发子活性的OG又可激活寄主的防卫反应,进一步提高寄主抗病性^[4-7]。

要明确某个PGIP对病菌PG活性的抑制作用,最直接的方法是用纯化的PGIP蛋白进行测定,但以往研究多为从植物组织中提取PGIP,这些蛋白可能包含着多个高度相似的PGIP异构体,所得结果也是这些PGIP共同的作用,而不是单个个体^[8]。因此,要研究某一个PGIP的作用,利用外源表达的方法获得纯PGIP蛋白是较好的途径。但至目前为止,已克隆的170个PGIP基因中仅有少数基因被研究,因为在许多表达系统中PGIP基因不能表达,或形成包涵体,或表达条件要求苛刻,或表达产物根本没有活性^[9-12]。因此,在研究这些PGIP之前,对其相关性质进行生物信息学预测,为进一步研究提供理论支持非常重要。

在植物体中,PGIP基因多以家族形式存在,虽然这些基因在遗传上具有高度的相似性,但其应对不同病原物或其他逆境因子时,表达水平有显著差异;即使是相同的基因,在植物生长的不同发育阶段,其表达量亦有不同^[13-15]。如菜豆中有4个PvPGIP,在其生长发育过程中,仅PvPGIP2在所有组织中表达,而PvPGIP3和PvPGIP4只在根部微弱表达,PvPGIP1则在幼叶、下胚轴、根和豆荚中均不表达^[16]。在受到病菌侵染和机械损伤等逆境或OG、水杨酸和植物激素等具有诱导作用的因子处理后,

多个PvPGIP基因均有不同的应答,只有PvPGIP4在所有处理条件下表达量均无明显变化^[17-18]。据目前已有报道,水稻中共存在7个OsPGIP基因^[19-21]。Lu等^[19]研究发现,在粳稻品种中花11中,7个OsPGIP基因启动子区顺式调控元件组成多样,其对种植物激素处理的反应也各不相同。为了更加明确各OsPGIP基因的表达特征,本研究选用抗、感纹枯病水稻品种并通过低温、遮光和接种病原菌等逆境处理,以研究不同条件下各OsPGIP基因的表达水平,为进一步将这些基因应用于水稻抗病育种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试菌株:水稻纹枯病菌YN-7,由本实验室分离自江苏水稻纹枯病病株。供试水稻:YSBR1(抗)、徐稻3号(中感)和Lemont(高感)均由扬州大学农学院水稻抗病分子遗传与育种研究组提供。

1.2 OsPGIP基因的克隆与测序

水稻基因组DNA提取参照Khanuja等^[22]的方法。RNA提取采用赛默飞世尔科技公司(中国)植物RNA提取试剂盒,反转录cDNA使用天根生化科技(北京)有限公司FastKing RT试剂盒。根据NCBI和参考文献中各基因相关序列,使用Primer V5.0软件设计本研究所需引物(表1)。所有引物由宝生物工程有限公司(大连TaKaRa公司)合成。分别以水稻基因组DNA和cDNA为底物进行PCR扩增,扩增产物连接至克隆载体pMD19-T,阳性克隆子送上海生工生物工程有限公司测序。

1.3 系统发育树的构建

以“Polygalacturonase inhibiting protein”为关键词从NCBI中搜索相关蛋白序列,去除非PGIP或未明确释意为PGIP的序列,将这些序列与本实验中克隆基因的翻译产物进行系统进化分析,利用MEGA 5.1软件构建系统发育进化树。

表 1 扩增各 *OsPGIP* 基因所用引物Table 1 Primers used to amplify *OsPGIP* genes

基因 Gene	正向引物 Forward primer (5'-3')	反向引物 Reverse primer (5'-3')
<i>OsPGIP1</i>	TGACTCGCTATTGCATGCG	TGGGAGCTTAATTGCAGGGA
<i>OsPGIP2</i>	ATACACGGCATTGCATGCAC	CTTACACTCGTTCTCCGTAC
<i>OsPGIP3</i>	TAGAAGAGAGGAAGCACGCA	TTGGTGGCCTGAGATAGGT
<i>OsPGIP4</i>	TGTCGTGCACTTGTGTTCAA	GCATTAGCTGGTTGCTTC
<i>OsFOR1</i>	TTCAGGTAGATACAATGGCG	ATGGATGGATGGATGCTC
<i>OsPGIP6</i>	GAGCCGAGACGAGACGA	ATATGTACCCAAGCCCAA
<i>OsPGIP7</i>	TCCTGCACGGATTTGAGC	TAACAACAGCCAGTCAGCAAT

1.4 *OsPGIP* 结构预测

蛋白质一级结构分析与信号肽预测分析分别使用网站 (<https://www.predictprotein.org/>) 和 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 进行在线分析, 二级结构预测使用网站 (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=NPSA/npsa_hnn.html) 和 (http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.htm) 在线服务, 三级结构预测则分别使用网站 (<http://swissmodel.expasy.org/>) 的 SWISS-MODEL、(<http://www.cbs.dtu.dk/services/>) 的 CPHmodels 和 (<http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/>) 的 SCRATCH 等软件。所有三级结构模拟结果均经网站 (<https://swissmodel.expasy.org/assess>) 进行修改和评价, 然后用 PyMOL V2.3 软件进行图像处理。

1.5 *OsPGIP* 性质与功能预测

蛋白质的分子量、等电点、稳定性、脂溶性、疏水性、跨膜结构域、亚细胞定位、N-糖基化位点以及大肠杆菌中表达产物的溶解性等性质与功能分别通过网站 (<https://www.expasy.org/proteomics>)、(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>)、(https://embnet.vital-it.ch/cgi-bin/TMPRED_form_parser) 和 (<http://www.biotech.ou.edu/>) 进行预测。*OsPGIP* 与 *RsPG* 的蛋白对接则由网站 (<https://cluspro.bu.edu/login.php?redir=/home.php>) 进行模拟, 选择结合自由能最低的对接模型进行进一步分析。

1.6 水稻苗处理与组织取样

不同生育期取样: 选择正常育苗的抗、感纹枯病水稻品种 YSBR1、徐稻 3 号和 Lemont 不同生育期 (四至五叶期、成株期和穗期) 的植株, 取中部叶鞘组织。

遮光处理: 取各品种水稻种子经浸种、催芽后, 选取芽长较一致的种子置于平铺在培养皿 (150 mm) 底部的湿纱布上, 26 °C 光照培养箱中光暗交替 (14 h/10 h) 培养 14 d 后, 遮光黑暗条件下培养至水稻五

到六叶期, 取植株中部叶鞘组织, 以正常生长条件下的苗为对照。

低温处理: 将上述培养 14 d 的水稻苗 4 °C 低温条件下培养 4 d, 取植株中部叶鞘组织, 以正常光暗条件下生长苗为对照。

病原菌接种处理: 用灭菌牙签接种的方法^[40], 接种纹枯病菌至水稻叶鞘中, 以不接菌作对照, 48 h 后取植株中部叶鞘组织。

以上组织取样后立即置于液氮中, -80 °C 保存, 用于植物总 RNA 提取。

1.7 qRT-PCR 分析

提取各水稻组织样品总 RNA, 反转录成 cDNA 后, 采用 CFX96 Real-time 检测系统 (Bio-Rad) 进行检测。20 μL 反应体系: AceQqPCR SYBR Green Master Mix 10 μL、Forward Primer 0.4 μL、Reverse Primer 0.4 μL、ROX Reference Dye 1 0.4 μL、模板 cDNA 2 μL、ddH₂O 6.8 μL。反应过程如下: 95 °C 5 min; 95 °C 15 s, 60 °C 20 s, 40 个循环; 95 °C 15 s。以 *OsACTIN1* (NCBI 序列号为 X16280) 为内参基因, 扩增引物为 *OsACTIN-F/OsACTIN-R* (5'-CAGCATGAAGATCAAGGTGG-3' / 5'-TTCCTGTGCACAATGGATGG-3'), 扩增各 *OsPGIP* 基因的引物序列参见文献[19]。每个样品设 3 次生物学重复, 每实验重复 3 次。

1.8 数据统计与分析

所有数据采用 SPSS 12.05 软件进行方差分析, 以 Tukey 测验进行多重比较, 当 $P < 0.05$ 时, 则表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 *OsPGIP* 系统进化分析

从水稻 cDNA 中扩增出 7 个 *OsPGIP* 基因序列并送上海生工生物工程有限公司测序, 经 NCBI 比对确认扩增产物序列正确。以“Polygalacturonase inhibiting

protein”为关键词从 NCBI 网站中共搜索到蛋白序列 333 条，其中明确注明物种来源并释意为 PGIP 的共 258 条。将这些蛋白序列与各 OsPGIP 一起经多序列比对与系统进化分析。结果发现，大多数相同或相近物种的 PGIP 相似性较高，聚集在 1 到 2 个分支(群)内，如十字花科、豆科、禾本科等植物的 PGIP (图 1-A); 但在这些聚集群中也有例外，如归为其他类的螺旋狸藻 PGIP (NCBI 序列号为 EPS70789)与水稻的几个 PGIP 序列高度相似，而辣椒的 PGIP (NCBI 序列号为 AEX34755)与豆科 PGIP 归在一起; 同样，来源于水稻的 7 个 OsPGIP 除 OsPGIP2、OsPGIP4、OsPGIP6 和 OsPGIP7 序列相似性较高，被聚在同一分枝，其他几个 OsPGIP 分别位于进化树不同的分枝(图 1-B)。这些分析结果表明，尽管同一物种中的 PGIP 可能是源自 1 个或少数几个经编码子重排、点突变、小片段

插入或缺失的基因编码的产物，但不同物种中的 PGIP 也有可能源自同一祖先。

2.2 OsPGIP 空间结构预测

一级结构分析表明，7 个 *OsPGIP* 基因可分别编码含有 309~380 个氨基酸的 OsPGIP 蛋白，每个蛋白均含有一个信号肽，长度在 17~31 个氨基酸; 除信号肽外，各 OsPGIP 还具有 N-端、9~11 个 LRR (Leucine-rich repeat)片段和 C-端等典型的 PGIP 结构域; 在这些 LRR 片段中，均存在保守的 xxLxLxx 序列，L 为亮氨酸或脂肪族氨基酸残基，x 为任意氨基酸(图 2)。OsPGIP 的二级结构主要由 α -螺旋、 β -折叠和随机卷曲组成，且多以随机卷曲为主; OsPGIP 的 N-端和 C-端分别有 8~13 个半胱氨酸，可形成 3~5 个二硫键，这些二硫键对稳定 OsPGIP 的特定空间结构起重要作用(表 2)。

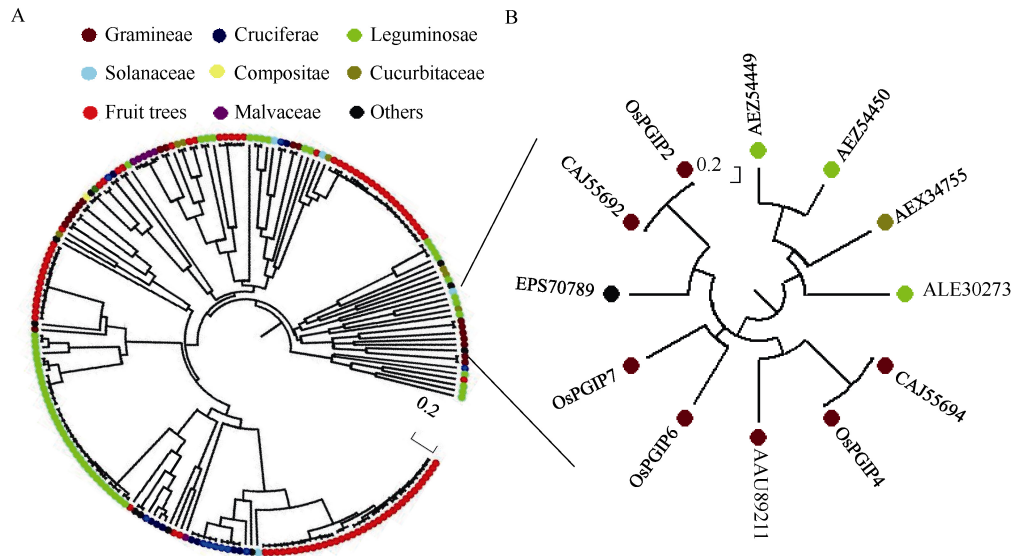


图 1 OsPGIP 和其他物种来源的 PGIP 系统发育树
Fig. 1 Phylogenetic relationship among OsPGIPs and PGIPs from other plant species
图中除 OsPGIP 为名称缩写外，其他均为对应 PGIP 的 NCBI 序列号。A: 总进化树; B: 子树。
OsPGIPs is the abbreviations of polygalacturonase-inhibiting protein from *Oryza sativa*, the others are the NCBI accession numbers of the corresponding sequences. A: phylogenetic tree; B: subtree.

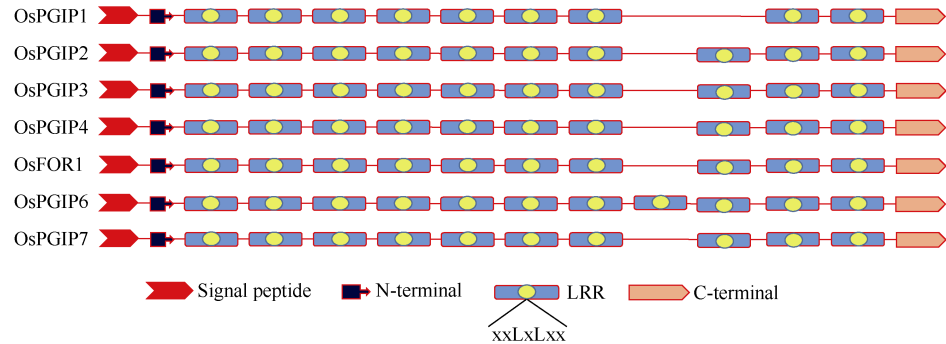


图 2 7 个 OsPGIP 一级结构
Fig. 2 Primary structure of OsPGIPs

表 2 OsPGIP 二级结构预测结果
Table 2 Secondary structure of OsPGIPs predicted by HNN method

蛋白 Protein	α -螺旋 α -helix	延伸链 Extended strand	随机卷曲 Random coil	半胱氨酸数 Number of cysteine	二硫键位置 Position of disulfide bond
OsPGIP1	36.25	10.68	53.07	8	56–63, 278–298, 300–308
OsPGIP2	46.20	10.23	43.57	9	34–64, 65–72, 310–323, 331–339
OsPGIP3	32.74	13.86	53.39	10	17–27, 56–64, 322–328, 330–337
OsPGIP4	44.70	9.74	45.56	9	33–63, 64–71, 333–339, 341–348
OsFOR1	30.12	10.24	59.64	10	27–58, 59–66, 312–320
OsPGIP6	49.21	4.47	46.32	10	64–73, 114–137, 348–370, 372–379
OsPGIP7	27.19	10.82	61.99	13	16–65, 25–34, 66–73, 322–328, 330–337

利用同源建模的方法预测 OsPGIP 的三级结构, 结果表明, 利用 SWISS-MODEL 和 CPHmodels 预测的所有 OsPGIP 的三维空间结构均比较相似, 它们由多个随机卷曲- α -螺旋-随机卷曲- β -折叠区组成的线圈状结构按右手螺旋规则形成一个特定的凹面(图 3-A)。但不同预测软件得到的同一 OsPGIP 三维空间结构并不完全相同, 有的甚至差异较大, 特别是 SCRATCH 的模拟结果与其他两种方法所得结果几乎完全不同。分别以 SWISS-MODEL 和 CPHmodels 模拟 OsPGIP6 的空间结构, 结果显示, 尽管它们参与预测的氨基酸数(34~369、39~354)、氨基酸覆盖率(88.4%、83.2%)及与模板的相似性(30.1%、33.6%)差

异均不大, 但其预测结果仍有差异, 以两种方法预测的 OsPGIP6 空间结构中, 其 LRR 区分别存在 13 个和 10 个 β -折叠, 而以 SCRATCH 模拟的则无典型的 PGIP 空间结构特征, LRR 区亦不存在 β -折叠; 同样的方法应用于预测 OsPGIP7 的空间结构得到的结果相似(图 3-B)。以上述 3 种方式模拟的 OsPGIP7 结构与水稻纹枯病菌的 RsPG2 进行蛋白质对接发现, 尽管获得的对接示意图并不完全一致, 但均显示为 OsPGIP7 的凹面与 RsPG2 的裂隙区部位进行紧密结合, 说明该部位是两者的互作区域, 这与我们前期研究 OsPGIP1、OsPGIP2 与 RsPG1 对接的结果不一致^[12], 说明不同 PGIP 与不同 PG 的互作方式是多种多样的(图 3-C)。

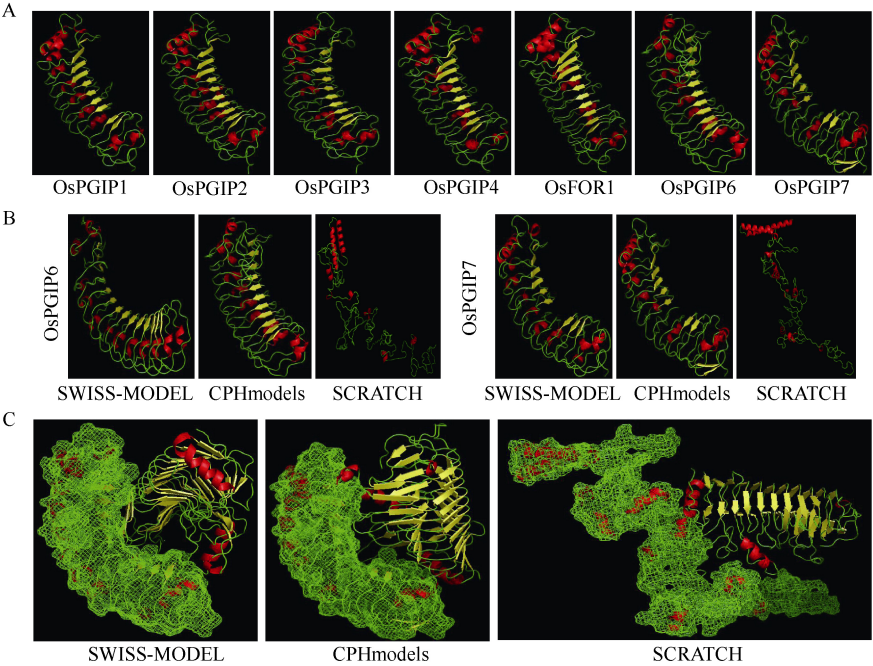


图 3 OsPGIP 蛋白质 3D 结构模拟图

Fig. 3 3D structure of OsPGIPs

卡通图中红色、黄色和绿色分别表示 α -螺旋、 β -折叠和随机卷曲。A: 具有典型 PGIP 空间结构的各 OsPGIP3D 模型; B: 分别采用 SWISS-MODEL、CPHmodels 和 SCRATCH 方法模拟的 OsPGIP6 和 OsPGIP7 空间结构模型; C: OsPGIP7 与 RsPG2 的蛋白质对接, 网眼图为 OsPGIP7, 卡通图为 RsPG2。

Red, yellow, and green in the cartoon figures mean α -helix, β -sheet, and random coil, respectively. A: 3D structure of OsPGIPs with typical spatial structure of PGIP. B: 3D structures of OsPGIP6 and OsPGIP7 constructed with homologous modeling methods of SWISS-MODEL, CPH model and SCRATCH. C: Protein docking of OsPGIP7 and RsPG2. Mesh and cartoon figures mean OsPGIP7 and RsPG2, respectively.

2.3 OsPGIP 性质与功能预测

根据前人报道, 7 个 OsPGIP 的编码基因分别位于 3 条染色体上, 其中 *OsPGIP1~OsPGIP4* 位于水稻 5 号染色体, *OsFOR1* 和 *OsPGIP6* 位于 8 号染色体, *OsPGIP7* 位于 9 号染色体^[19-21]。经预测, 7 个 OsPGIP 的分子量均在 35 kD 左右(32.75~38.79 kD), 等电点为 4.73~8.37。其中, 已报道能抑制病菌 PG 活性或

过表达能提高植物抗性的 *OsPGIP1*、*OsPGIP4* 和 *OsFOR1*^[20,23-24]其等电点均近中性或偏碱性。预测的表达产物除 *OsPGIP2* 不稳定外, 其他均稳定; 而且所有预测蛋白均为疏水蛋白、脂溶性好、具有跨膜结构、定位于细胞外, 且均存在 1 到多个 N-糖基化位点。另外, 这些蛋白在大肠杆菌中原核表达后均溶解度极低或完全不溶(表 3)。

表 3 在线软件预测的 OsPGIP 蛋白性质与功能
Table 3 Functions and Characteristics of OsPGIPs predicted by online software

蛋白 Protein	染色体 位置 Location	分子量 Molecular weight (kD)	等电点 pI	不稳定 指数 Instability index	脂溶性 指数 Aliphatic index	总平均 亲水性 Grand average of hydropathicity	跨膜域 Trans- membrane	亚细胞定位 Subcellular localization	N-糖基化 位点数 Number of N-glycosylation sites	大肠杆菌中表 达的溶解性 Chance of solubility expressed in <i>E. coli</i> (%)
OsPGIP1	Chr. 5	32.75	6.98	31.82	98.58	0.183	Yes	Extracellular	4	0
OsPGIP2	Chr. 5	36.97	4.73	40.16	103.33	0.080	Yes	Extracellular	8	0
OsPGIP3	Chr. 5	36.14	5.94	34.36	95.63	0.181	Yes	Extracellular	5	0
OsPGIP4	Chr. 5	37.22	8.37	33.98	101.58	0.203	Yes	Extracellular	4	0
OsFOR1	Chr. 8	35.46	7.09	36.08	99.94	0.041	Yes	Extracellular	1	0
OsPGIP6	Chr. 8	38.79	5.86	35.69	106.42	0.286	Yes	Extracellular	1	0
OsPGIP7	Chr. 9	35.88	5.90	33.26	101.87	0.265	Yes	Extracellular	3	0.7

N-glycosylation sites: OsPGIP1 ⁸⁰NLTG, ¹⁹¹NTTQ, ²⁰⁶NLTG, ²⁷¹NVSY; OsPGIP2 ⁸⁹NLTG, ¹⁰⁰NLTH, ¹⁴⁹NLTS, ¹⁷⁶NLSA, ¹⁸¹NLSR, ²¹⁶NLSG, ²⁹⁵NLTN, ³⁰³NVSY; OsPGIP3 ⁸⁵NITG, ¹²²NISG, ²⁰⁹NLTG, ²⁹¹NMTD, ²⁹⁹NVSY; OsPGIP4 ⁵⁰NASY, ⁹⁶NVTG, ²²⁰NLSG, ³¹⁰NVSY; OsFOR1 ¹³¹NVSG; OsPGIP6 ²⁹³NLSR; OsPGIP7 ³NATV, ¹²⁶NLSL, ²⁹⁹NVSD.

2.4 OsPGIP 基因的表达特征

分别取不同生育期抗、感和高感纹枯病水稻品种 YSBR1、徐稻 3 号和 Lemont 的叶鞘组织, 提取总 RNA, qRT-PCR 检测各 *OsPGIP* 基因的表达量。数据分析结果表明, 苗期各 *OsPGIP* 基因均以在抗性品种 YSBR1 中表达量最高, 而成株期和穗期则各基因表达规律不明显。但相较于其他基因, *OsFOR1* 和 *OsPGIP7* 在成株期水稻叶鞘中表达量较高, 而 *OsPGIP2*、*OsPGIP4* 和 *OsFOR1* 则在穗期叶鞘中表达量较高; 以 *OsPGIP* 基因的总表达量来比较, 则以高感品种 Lemont 最高(图 4)。此结果与作者前期研究 *OsPGIP1* 基因表达特征时的结果亦不一致^[25]。

分别以接种水稻纹枯病菌、低温和遮光处理等造成生物逆境和非生物逆境, 检测各 *OsPGIP* 基因在不同逆境条件下在不同水稻品种植株叶鞘中的表达水平。结果表明, 在低温条件下, 高感品种 Lemont 中的 *OsPGIP2*、*OsPGIP3* 基因和抗性品种 YSBR1 中的 *OsPGIP6* 基因的表达量均明显下调, 其他各品种中的所有基因均上调表达, 以 YSBR1 中的

OsPGIP4 和 *OsFOR1* 基因表达量最高(相对表达量分别为 8.55 和 14.53), 且各基因的总体平均上调倍数以抗性品种 YSBR1 中的为最大; 遮光处理后, 除 *OsPGIP2* 基因在 Lemont 和徐稻 3 号中表达量无明显变化外(相对表达量分别为 0.97 和 1.10), 其他各 *OsPGIP* 基因在各品种中均显著上调表达, 尤以抗性品种 YSBR1 中的表达量上调倍数最大, 平均为 9.09, *OsPGIP2* 的表达量是对照的 18.11 倍; 接种纹枯病菌后, 不同基因的表达水平亦有上调或下调, 但总体相比对照来说, 有明显上调趋势, 特别是 *OsFOR1* 基因和 *OsPGIP6* 基因, 最高上调倍数为 9.53 和 6.66。这些结果与作者前期研究 *OsPGIP1* 基因表达特征的结果一致, 即在逆境条件下大多数 *OsPGIP* 基因可通过提高自身的表达水平来帮助植物增加抗逆性。

3 讨论

PGIP 作为植物细胞壁的重要组成部分, 其编码基因并不存在大规模的扩张, 只是少数几个或十几

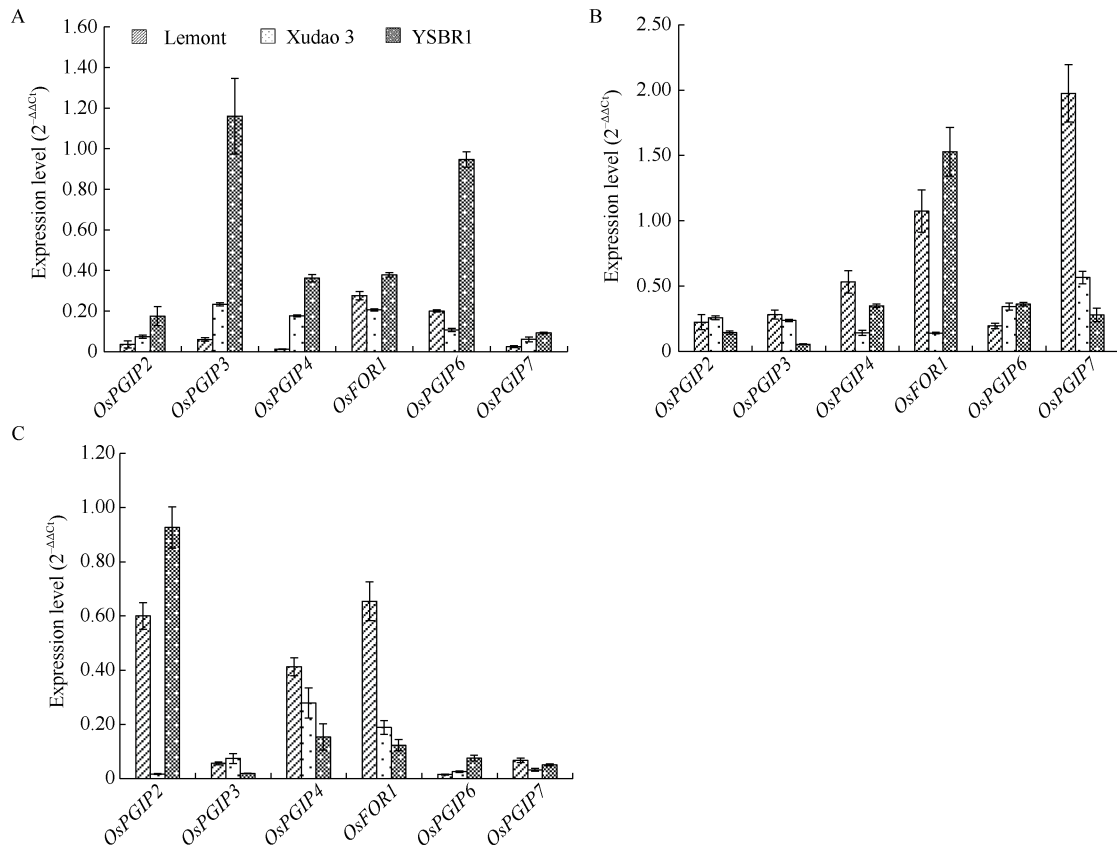


图 4 不同生育期抗、感纹枯病水稻品种叶鞘中各 *OsPGIP* 基因的表达量

Fig. 4 Expression levels of *OsPGIP* genes in rice cultivars with different resistance to sheath blight at different growth stages

A: 苗期; B: 成株期; C: 穗期。A: seedling stage; B: adult-plant stage; C: spike stage.

个基因以家族的形式存在, 一般为 2~16 个^[26-28]。在这些基因中, 除拟南芥 2 个 *AtPGIP* 基因外, 其他均未见有内含子的报道, 但他们可因转座子的插入而导致基因失活^[26,28]。水稻中目前共存在 7 个 *PGIP* 基因, 经对 DNA 和 cDNA 测序后发现, 7 个 *OsPGIP* 基因均无内含子, 也不存在转座子插入现象。尽管在这 7 个 *OsPGIP* 中, 有些相似度较高或与其他禾本科植物 *PGIP* 在系统发育进化分析时归于同一群组, 但有些 *OsPGIP* 的遗传差异较大, 可能来自于不同的祖先基因。Liu 等^[10]曾对水稻 *PGIP* 与其他植物来源的 *PGIP* 做过系统发育分析, 认为所有禾本科、豆科、十字花科和林木果树可各自被单独归为一组, 水稻中的 7 个 *OsPGIP* 与小麦、玉米、高粱等的 *PGIP* 高度相似。但上述研究仅选用了来自少数几个物种来源的 51 个 *PGIP*, 如十字花科仅选择了油菜和拟南芥, 豆科也仅选择了大豆和同属不同种的两种菜豆。当将样本量放大, 对 NCBI 中所有明确释意为 *PGIP* 的蛋白序列进行多序列比对与系统进化发育分析时, 我们发现, 尽管相同或相近物种来源的

PGIP 有归为一类的趋势, 但亦有少数 *PGIP* 与其他物种的 *PGIP* 反而有着更高的相似性。这些结果说明, 即使是相同或相近物种的 *PGIP* 也有可能是来自不同的祖先, 而不同物种中的 *PGIP* 亦有来自共同祖先的可能性, 尽管这一比例相对较小。

植物细胞壁是高度动态的胞外结构, 在植物生长发育与受到逆境胁迫时, 其可不断被重构, 作为细胞壁的一部分, *PGIP* 被向胞外分泌的能力与其 N-端和 LRR 区有关^[29]。而多个 LRR 片段构成的凹面, 带有大量的负电荷, 负责着与病菌 PG 的互作^[30-32]。但不同物种 *PGIP*、甚至同一物种的不同 *PGIP* 对不同病原菌或同一病原菌不同 PG 的抑制能力差异较大, 除因互作方式多样(如竞争性抑制、非竞争性抑制和混合型等)外, 蛋白质本身氨基酸序列、折叠方式、表面电荷和空间结构等都对互作亦有影响^[11,33-35]。只是至目前为止, 由于对 *PGIP* 晶体结构的研究还非常少, 关于 *PGIP*-PG 互作的晶体结构模型更是还未见报道, 因此对于 *PGIP* 功能及其与 PG 互作的研究多还停留在借助生物信息学分析的结果上。目前进行

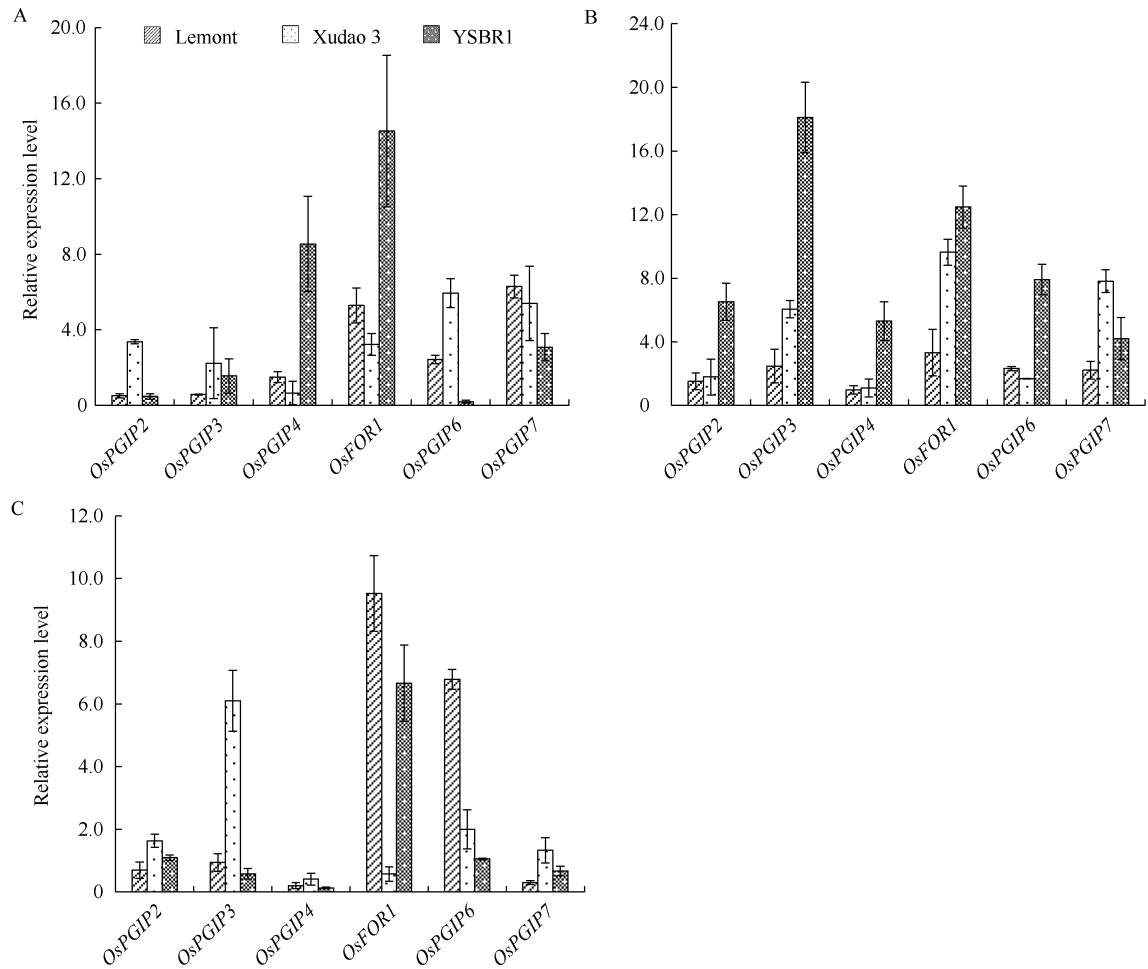


图 5 不同逆境条件下抗、感纹枯病水稻品种叶鞘中各 *OsPGIP* 基因的表达量

Fig. 5 Expression levels of *OsPGIP* genes in rice cultivars with different resistance to sheath blight under different stress condition.

A: 低温; B: 遮光; C: 接种。A: low temperature; B: dark; C: inoculation.

蛋白结构预测的在线软件很多, 如 SWISS- MODEL、CHPmodels、SCRATCH、Modeller、3D-JIGSAW、EsyPred3D、RaptorX、Hhpred 等。尽管不同方法预测的结果并不完全相同, 如利用酰胺交换质谱法和小角度 X 衍射法预测 PvPGIP2 与 FpPG 的互作时, 两种方法得到的结果分别是 PvPGIP2 的凹面与 FvPG 的 N-端外侧的 β -折叠区或 C-端及活性裂隙区互作, 但这些结果可以通过单氨基酸的定点突变加以验证^[31,36-37]。所以, 进行蛋白质空间结构、功能、性质, 以及配体与配基间的对接预测分析等是研究蛋白功能及互作机制的基础, 只是在预测分析时要进行多种方法的比较, 并对预测模型加以修饰和评价。如本研究中分别采用 SWISS-MODEL、CHPmodels 和 SCRATCH 在线软件预测了 OsPGIP 的空间结构, SCRATCH 预测的模型显然不符合研究者对植物 PGIP 空间结构的认知, 因此也不宜用之来进一步研究 OsPGIP 的结构、性质、功能及与 PG 的

互作等。

PGIP 基因除可以组成型表达以外, 还可以受到多种外源因素的诱导表达, 如植物激素、机械损伤、生物和非生物逆境等。菜豆中的 4 个 *PvPGIP* 基因分布在其 B2 连锁群一个 50 kb 的区间内, 这些基因在核苷酸水平上的相似性大于 80%, 说明其来源于共同的祖先基因, 但它们的表达却差异极大, 如在幼叶、下胚轴、根和荚中 *PvPGIP1* 基因均不表达, 而 *PvPGIP2* 却在所有器官中表达, *PvPGIP3* 和 *PvPGIP4* 则只在根中微量表达^[16,18]。受病原菌感染后, 病菌与寄主的亲和性互作和非亲和性互作则会分别导致 *PGIP* 基因的转录产物提早或延迟在寄主特定部位局部积累^[16,38-39]。灰霉病菌的侵染可引起拟南芥中两个 *AtPGIP* 基因上调表达, 但却是通过不同的信号传导途径^[26]。这些结果均表明, 植物中 *PGIP* 基因的表达水平受其自身生育期、部位和诸多外源环境的影响。水稻中的 7 个 *OsPGIP* 基因在不

同组织器官中的表达水平亦不同;在赤霉素、激动素和萘乙酸处理后,籼稻品种明恢 63 中除 *OsPGIP2* 基因在激动素处理后表达量下调外,其他基因的表达量均略有上调;而在粳稻品种中花 11 中,使用脱落酸、芸薹素内酯、赤霉素、生长素、激动素、茉莉酸和水杨酸处理后,随着时间的推移,绝大多数 *OsPGIP* 基因的表达量均有上调^[19]。除不同类型水稻外,本研究发现,对纹枯病具不同抗性的水稻品种在遇到生物与非生物逆境时,其体内 *OsPGIP* 基因的表达亦是显著差异的。如果能阐明这些基因的表达调控及与病原菌 PG 互作的机制,将为其在水稻抗病育种中的应用奠定基础。

4 结论

克隆了水稻 *OsPGIP* 基因家族除 *OsPGIP1* 外的剩余 6 个基因,对它们进行了系统进化分析,预测了其编码产物的一、二、三级结构和生物学功能,分析了各基因在水稻不同生育期和逆境下的表达特征,为揭示 *OsPGIP* 基因家族不同成员在不同逆境条件下的潜在功能 and 在水稻抗病育种中的应用奠定了基础。

References

- [1] Copper R M, Wood R K S. Regulation of synthesis of cell wall degrading enzymes by *Verticillium albo-atrum* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Plant Pathol*, 1975, 5: 135–156.
- [2] Protsenko M A, Buza N L, Krinitsyna A A, Bulantseva E A, Korobleva N P. Polygalacturonase-inhibiting protein is a structural component of plant cell wall. *Biochemistry*, 2008, 73: 1053–1062.
- [3] Spinelli F, Mariotti L, Mattei B, Salvi G, Cervone F, Caprari C. Three aspartic acid residues of polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) from *Phaseolus vulgaris* are critical for inhibition of *Fusarium phyllophilum* PG. *Plant Biol*, 2009, 11: 738–743.
- [4] Osorio S, Castillejo C, Quesada M A, Medina-Escobar N, Brownsey G J, Suau R, Heredia A, Botella M A, Valpuesta V. Partial demethylation of oligogalacturonides by pectin methyl esterase 1 is required for eliciting defence responses in wild strawberry (*Fragaria vesca*). *Plant J*, 2008, 54: 43–55.
- [5] Ferrari S, Savatin D V, Sicilia F, Gramegna G, Cervone F, De Lorenzo G. Oligogalacturonides: plant damage-associated molecular patterns and regulators of growth and development. *Front Plant Sci*, 2013, 4: 30–38.
- [6] Davidsson P, Brogerg M, Kariola T, Sipari N, Pirhonen M, Palva E T. Short oligogalacturonides induce pathogen resistance-associated gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol*, 2017, 17: 19.
- [7] Doares S H, Syrovets T, Weiler E W, Ryan C A. Oligogalacturonides and chitosan activate plant defensive genes through the octadecanoid pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 4095–4098.
- [8] De Lorenzo G, D'Ovidio R, Cervone F. The role of polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) in defence against pathogenic fungi. *Annu Rev Phytopathol*, 2001, 39: 313–335.
- [9] Machinandiarena M F, Olivieri F P, Daleo G R, Oliva C R. Isolation and characterization of a polygalacturonase-inhibiting protein from potato leaves. Accumulation in response to salicylic acid, wounding and infection. *Plant Physiol Bioch*, 2001, 39: 129–136.
- [10] Liu N N, Zhang X Y, Sun Y, Wang P, Li X C, Pei Y K, Li F G, Hou Y X. Molecular evidence for the involvement of a polygalacturonase-inhibiting protein, GhPGIP1, in enhanced resistance to *Verticillium* and *Fusarium* wilt in cotton. *Sci Rep*, 2017, 7: 39840.
- [11] Kalunke R M, Tundo S, Benedetti M, Cervone F, De Lorenzo G, D'Ovidio R. An update on polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP), a leucine-rich repeat protein that protects crop plants against pathogens. *Front Plant Sci*, 2015, 6: 146.
- [12] Chen X J, Chen Y W, Zhang L N, He Z, Huang B L, Chen C, Zhang Q X, Zuo S M. Amino acid substitutions in a polygalacturonase inhibiting protein (*OsPGIP2*) increase sheath blight resistance in rice. *Rice*, 2019, 12: 56.
- [13] Joubert D A, De Lorenzo G, Vivier M A. Regulation of the grapevine polygalacturonase-inhibiting protein encoding gene: expression pattern, induction profile and promoter analysis. *J Plant Res*, 2013, 126: 267–281.
- [14] Kalunke R M, Cenci A, Volpi C, O'Sullivan D M, Sella L, Favaron F, Cervone F, De Lorenzo G, D'Ovidio R. The *pgip* family in soybean and three other legume species: evidence for a birth-and-death model of evolution. *BMC Plant Biol*, 2014, 14: 189.
- [15] Li R G, Rimmer R, Yu M, Sharpe A G, Seguin-Swartz G, Lydiat D, Hegedus D D. Two *Brassica napus* polygalacturonase inhibitory protein genes are expressed at different levels in response to biotic and abiotic stresses. *Plant*, 2003, 217: 299–308.
- [16] Kalunke R M, Janni M, Sella L, David P, Geffroy V, Favaron F, D'Ovidio R. Transcript analysis of the bean polygalacturonase inhibiting protein gene family reveals that *PvPGIP2* is expressed in the whole plant and is strongly induced by pathogen infection. *J Plant Pathol*, 2011, 93: 141–148.
- [17] Devoto A, Leckie F, Lupotto E, Cervone F, De Lorenzo G. The promoter of a gene encoding a polygalacturonase-inhibiting protein of *Phaseolus vulgaris* L. is activated by wounding but not by elicitors or pathogen infection. *Planta*, 1998, 205: 165–174.
- [18] D'Ovidio R, Raiola A, Capodicasa C, Devoto A, Pontiggia D, Roberti S, Galletti R, Conti E, O'Sullivan D, De Lorenzo G. Characterization of the complex locus of bean encoding polygalacturonase-inhibiting proteins reveals subfunctionalization for defense against fungi and insects. *Plant Physiol*, 2004, 135: 2424–2435.
- [19] Lu L X, Zhou Y, Zhou Y, Fan X L, Ye S F, Wang L, Chen H, Lin Y J. Expression profile analysis of the polygalacturonase-inhibiting protein genes in rice and their responses to phytohormones and fungal infection. *Plant Cell Rep*, 2012, 31: 1173–1187.
- [20] Jang S H, Lee B H, Kim C H, Kim S J, Yim J U, Han J J, Lee S Y, Kim S R, An G H. The *OsFOR1* gene encodes a polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) that regulates floral organ number in rice. *Plant Mol Biol*, 2003, 53: 357–369.

- [21] Janni M, Di Giovanni M, Roberti S, Capodicasa C, D'Ovidio R. Characterization of expressed *Pgip* genes in rice and wheat reveals similar extent of sequence variation to dicot PGIPs and identifies an active PGIP lacking an entire LRR repeat. *Theor Appl Genet*, 2006, 113: 1233–1245.
- [22] Khanuja S P S, Shasany A K, Darokar M P, Kumar S. Rapid isolation of DNA from dry and fresh samples of plants producing large amounts of secondary metabolites and essential oils. *Plant Mol Biol Rep*, 1999, 17: 1–7.
- [23] Chen X J, Chen Y, Zhang L N, Xu B, Zhang J H, Chen Z X, Tong Y H, Zuo S M, Xu J Y. Overexpression of *OsPGIP1* enhances rice resistance to sheath blight. *Plant Dis*, 2016, 100: 388–395.
- [24] Feng C S, Zhang X, Wu T, Yuan B, Ding X H, Yao F Y, Chu Z H. The polygalacturonase-inhibiting protein 4 (*OsPGIP4*), a potential component of the *qBlSr5a* locus, confers resistance to bacterial leaf streak in rice. *Planta*, 2016, 243: 1297–1308.
- [25] 陈夕军, 刘晓维, 左示敏, 童蕴慧, 潘学彪, 徐敬友. 水稻抗感纹枯病品种 *Ospgip1* 基因的表达特征. 中国水稻科学, 2012, 26: 629–632.
Chen X J, Liu X W, Zuo S M, Tong Y H, Pan X B, Xu J Y. Expression characteristics of the *Ospgip1* gene in rice cultivars with resistance or susceptibility to sheath blight. *Chin J Rice Sci*, 2012, 26: 629–632 (in Chinese with English abstract).
- [26] Ferrari S, Vairo D, Ausubel F M, Cervone F, De Lorenzo G. Tandemly duplicated *Arabidopsis* genes that encode polygalacturonase-inhibiting proteins are regulated coordinately by different signal transduction pathways in response to fungal infection. *Plant Cell*, 2003, 15: 93–106.
- [27] Hegedus D D, Li R, Buchwaldt L, Parkin I, Whitwill S, Coutu C, Bekkaoui D, Rimmer S R. *Brassica napus* possesses an expanded set of polygalacturonase inhibitor protein genes that are differentially regulated in response to *Sclerotinia sclerotiorum* infection, wounding and defense hormone treatment. *Planta*, 2008, 228: 241–253.
- [28] Di Giovanni M, Cenci A, Janni M, D'Ovidio R. A LTR *copia* retrotransposon and *Mutator* transposons interrupt *Pgip* genes in cultivated and wild wheats. *Theor Appl Genet*, 2008, 116: 859–867.
- [29] De Caroli M, Lenucci M S, Manuadi F, Dalessandro G, De Lorenzo G, Piro G. Molecular dissection of *Phaseolus vulgaris* polygalacturonase-inhibiting protein 2 reveals the presence of hold/release domains affecting protein trafficking toward the cell wall. *Front Plant Sci*, 2015, 6: 660.
- [30] Mettei B, Bernalda M S, Federici L, Roepstorff P, Cervone F, Boffi A. Secondary structure and post-translational modifications of the leucine-rich repeat protein PGIP (polygalacturonase-inhibiting protein) from *Phaseolus vulgaris*. *Biochemistry*, 2001, 40: 569–576.
- [31] Benedetti M, Andreani F, Leggio C, Galantini L, Di Matteo A, Pavel N V, De Lorenzo G, Cervone F, Federici L, Sicilia F. A single amino-acid substitution allows endo-polygalacturonase of *Fusarium verticillioides* to acquire recognition by PGIP2 from *Phaseolus vulgaris*. *PLoS One*, 2013, 8: e80610.
- [32] Benedetti M, Bastianelli E, Salvi G, De Lorenzo G, Caprari C. Artificial evolution corrects a pulsive amino acid in polygalacturonase inhibiting proteins (PGIPs). *J Plant Pathol*, 2011, 93: 89–95.
- [33] D'Ovidio R, Mattei B, Roberti S, Bellincampi D. Polygalacturonase, polygalacturonase-inhibiting proteins and pectin oligomers in plant-pathogen interactions. *BBA-Proteins Proteom*, 2004, 1696: 237–244.
- [34] Sicilia F, Fernandez-Recio J, Caprari C, De Lorenzo G, Tsernoglou D, Cervone F, Federici L. The polygalacturonase-inhibiting protein PGIP2 of *Phaseolus vulgaris* has evolved a mixed mode of inhibition of endopolygalacturonase PG1 of *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol*, 2005, 139: 1380–1388.
- [35] Spinelli F, Mariotti L, Mattei B, Salvi G, Cervone F, Caprari C. Three aspartic acid residues of polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) from *Phaseolus vulgaris* are critical for inhibition of *Fusarium phyllophilum* PG. *Plant Biol*, 2009, 11: 738–743.
- [36] Gutierrez-Sanchez G, King D, Kemp G, Bergmann C. SPR and differential proteolysis/MS provide further insight into the interaction between PGIP2 and EPGs. *Fungal Biol*, 2012, 116: 737–746.
- [37] Benedetti M, Leggio C, Federici L, De Lorenzo G, Pavel N V, Cervone F. Structural resolution of the complex between a fungal polygalacturonase and a plant polygalacturonase-inhibiting protein by small-angle X-ray scattering. *Plant Physiol*, 2011, 157: 599–607.
- [38] Devoto A, Clark A J, Nuss L, Cervone F, De Lorenzo G. Developmental and pathogen-induced accumulation of transcripts of polygalacturonase-inhibiting protein in *Phaseolus vulgaris* L. *Planta*, 1997, 202: 284–292.
- [39] Nuss L, Mahe A, Clark A J, Grisvard J, Dron M, Cervone F, De Lorenzo G. Differential accumulation of PGIP (polygalacturonase inhibiting protein) mRNA in two near-isogenic lines of *Phaseolus vulgaris* L. upon infection with *Colletotrichum lindemuthianum*. *Physiol Mol Plant Pathol*, 1996, 48: 83–89.
- [40] 潘学彪, 陈宗祥, 徐敬友, 童蕴慧, 王子斌, 潘兴元. 不同接种方法对抗水稻纹枯病遗传研究的影响. 江苏农学院学报, 1997, 18(3): 27–32.
Pan X B, Chen Z X, Xu J Y, Tong Y H, Wang Z B, Pan X Y. The effects of different methods of inoculation and investigation on genetic research of resistance to rice sheath blight. *J Jiangsu Agric Coll*, 1997, 18(3): 27–32 (in Chinese with English abstract).