

文章编号: 1674-7054(2023)04-0380-09



橡胶树 HbLFG2 蛋白对植物免疫防卫的调控机理

聂雪纯, 李思鹏, 刘玉涵, 缪卫国, 李 潇

(海南大学 植物保护学院/热带农林生物灾害绿色防控教育部重点实验室, 海口 570228)

摘要: 为探究 *HbLFG2* 基因对免疫反应的功能, 增强感病蛋白对橡胶树白粉菌 (*Erysiphe quercicola*) 抗性影响的认识, 以进一步了解橡胶树 (*Hevea brasiliensis*) LFG(LIFEGUARD) 蛋白调控的植物免疫机制, 将含有 *HbLFG2* 基因的质粒转化到农杆菌中, 利用农杆菌分别在烟草和拟南芥中进行瞬时转染和永久转染。结果表明, 在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 和本氏烟草 (*Nicotiana benthamiana*) 上组成型表达 *HbLFG2* 抑制了细菌 flg22(flagellin domain of a synthetic 22-amino-acid peptide) 诱导的活性氧迸发和胼胝质积累等免疫反应, 作用类似 *HbLFG1* 基因。但与 *HbLFG1* 不同的是, *HbLFG2* 不能抑制疫霉激发子 INF1 和药物 DTT (dithiothreitol) 激发的过敏性反应, 却能抑制细胞坏死诱导蛋白 (Bax) 激发的过敏性反应。综上, 基因 *HbLFG1* 和 *HbLFG2* 都具有负调控植物免疫防卫反应的功能, 但两者作用的机理不完全一致。

关键词: 橡胶树; 白粉菌; 植物免疫; LFG 蛋白

中图分类号: Q 789 **文献标志码:** A

引用格式: 聂雪纯, 李思鹏, 刘玉涵, 等. 橡胶树 HbLFG2 蛋白对植物免疫防卫的调控机理 [J]. 热带生物学报, 2023, 14(4): 380-388. DOI: 10.15886/j.cnki.rds wxb.2023.04.005

我国是天然橡胶消费大国。天然橡胶 90% 以上的产量都是产自于橡胶树 (*Hevea brasiliensis*)。该树是重要的经济作物, 在我国云南、广东和海南均有大面积种植, 在东南亚和南美等地区也广泛种植。在全球的植胶区, 白粉病是危害橡胶树较严重的一个病害^[1]。橡胶树白粉菌 (*Erysiphe quercicola*) 是橡胶树白粉病的病原物, 在分类上属于子囊菌门白粉菌目 (Erysiphes), 白粉病发病初期在幼嫩组织以及叶表面会产生由菌丝产生的白色粉状物, 粉状物下的叶片会有病斑出现。发病严重时会导致橡胶树的花序和叶片畸形, 叶片大量脱落^[2]。每年橡胶树白粉病都造成天然橡胶严重的损失^[3]。对植物免疫系统的研究有助于人类利用该机制来对抗植物病害。植物免疫系统产生的防卫反应包括活性氧水平提高、胼胝质积累和超敏反应 (一种植物组织上局部发生的细胞程序性死亡) 等。这些防卫反应可被植物识别到病原相关分子模式

(Pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) 或病原效应子 (effectors) 而激发。目前, 可激发植物防卫反应的病原因子有细菌鞭毛蛋白的 flg22 (flagellin domain of a synthetic 22-amino-acid peptide)、几丁质 (chitin) 和卵菌激发素 INF1 等^[4]。蛋白 MLO (Mildew resistance locus o) 在大麦 (*Hordeum vulgare*) 上被用作对抗白粉菌等子囊菌侵染的武器^[5]。MLO 基因被缺失突变后, 大麦获得了广谱的白粉菌抗性, 表明 MLO 是一类感病蛋白^[5]。BI-1 (BAX INHIBITOR-1) 和 LFG (LIFEGUARD) 也被认为属于感病蛋白, 具有类似 MLO 的作用。敲除突变 *BI-1* 基因抑制了白粉菌的侵染, 而过表达 *BI-1* 能加速侵染^[6]。在哺乳动物和植物中, LFG 蛋白也被称为 GAAP 蛋白 (Golgi antiapoptotic proteins), 属于 BI-1 蛋白亚家族, 含有 BI-1 蛋白功能域。大麦和拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中各含有 5 个 LFG。已证明大麦的 LFG 蛋白 HvLFGa

收稿日期: 2022-02-25

修回日期: 2022-05-10

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31960518); 海南省财政科技计划资助项目 (YSPTZX202018)

第一作者: 聂雪纯 (1997-), 女, 海南大学植物保护学院 2019 级硕士研究生. E-mail: 791345719@qq.com

通信作者: 缪卫国 (1969-), 男, 博士, 教授. 研究方向: 分子植物病理学研究. E-mail: miao@hainanu.edu.cn; 李潇 (1989-), 男, 博士, 讲师. 研究方向: 分子植物病理学研究. E-mail: 993773@hainanu.edu.cn

和拟南芥的 2 个 LFG 蛋白 AtLFG1 和 AtLFG2 都参与了影响植物和白粉菌的互作, 具有负调控植物抗白粉病的作用^[7]。对于这些 LFG 蛋白编码基因, 过表达会促进白粉菌侵染, 而沉默会抑制白粉菌侵染。BI-1 具有抗细胞凋亡活性, 而 LFG 和 BI-1 之间可能发生互作, 具有协同抗凋亡活性^[8]。AtLBI-1 和 AtLFG2 在拟南芥中可发生共表达^[7], 为此可以推测 BI-1 和 LFG 蛋白可能共同调节细胞死亡信号通路。

在橡胶树中, 前期已通过生物信息学方法, 鉴定了 2 个 LFG, 包括 *HbLFG1* 和 *HbLFG2*^[9]。这 2 个 LFG 蛋白编码基因 *HbLFG1* 和 *HbLFG2* 的转录水平在白粉菌侵染前期发生明显上调, 尤其 *HbLFG1* 上调更显著, 并且这 2 个 LFG 基因转录水平与病害发生程度呈正相关。在本氏烟草 (*Nicotiana benthamiana*) 表达 *HbLFG1* 可抑制疫霉激发子 INF1 和内质网胁迫药剂 DTT、TM 诱导细胞坏死, 但不能像 BI-1 一样抑制细胞坏死诱导蛋白 (Bax) 诱导的细胞坏死^[10]。在拟南芥 Col-0 表达 *HbLFG1* 可抑制几丁质 (chitin) 和细菌 flg22 诱导的植物免疫反应, 并促进橡胶树白粉菌侵染拟南芥 Col-0, 而野生型的 Col-0 是不能被该菌侵染的^[10]。以上结果表明, *HbLFG1* 在橡胶树中是潜在的感病蛋白, 影响了植物免疫的激发水平, 但是, 目前对 *HbLFG2* 仍缺乏研究和了解。

本研究利用本氏烟草瞬时转染和拟南芥转化系统, 探究 *HbLFG2* 在植物免疫中的作用, 以增加对感病蛋白影响橡胶树白粉病抗性的认识, 进一步了解橡胶树 LFG 蛋白调控的植物免疫机制, 为橡胶树的抗白粉病育种和白粉病新农药研发靶点提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种和质粒 实验使用大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 来进行实验载体的构建, 使用根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) GV3101 作为转化介导体。载体 pCAMBIA-35S-FLAG, 携带 *INF1* 基因、*Bax* 基因、pBIN 空载体 (可表达 *GFP* 基因) 的根癌农杆菌均由笔者所在的实验室提供; 含 pBIN 空载体的拟南芥转化子为实验室原有植物材料。

1.1.2 实验植物培养 实验中的植物为本氏烟草和 Col-0 野生型拟南芥。植物养育条件: 温度 24 $^{\circ}\text{C}$, 光照 16 h/黑暗 8 h。

1.1.3 试剂 限制性内切酶 *Bam*HI (南京, Vazyme); DNA 片段回收试剂盒 (上海, TaKaRa); 质粒小量提取试剂盒 (美国, Omega); RNA 提取试剂盒 (北京, Solarbio)。

1.1.4 自配试剂 LB 培养基: Tryptone 10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、Yeast extract 5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、NaCl 10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 调 pH 为 7 (制备固体培养基需要另外加入 Agar 15 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)。0.5 g 庆大霉素硫酸盐, 5 mL 去离子水 (已除菌), 振荡混匀制成庆大霉素溶液, 将该溶液进行过滤除菌, 储存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。0.25 g 卡那霉素, 5 mL 去离子水 (已除菌), 振荡混匀制成卡那霉素溶液, 将该溶液进行过滤除菌, 储存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。0.5 g 利福平, 5 mL DMSO (二甲基亚砷), 振荡混匀制成利福平溶液, 将该溶液进行过滤除菌, 遮光, 储存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 中。拟南芥转化悬浮液: 蔗糖 2.5 g、Silwet L-77 12.5 mL、ddH $_2$ O 50 mL。脱色液: 3 : 1 体积比例的无水乙醇和冰醋酸混液。苯胺蓝染色液: 0.1 g 水溶性苯胺蓝、0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ K $_2$ HPO $_4$ 10 mL。DAB 染液: 吐温 -20 25 mL、NaHPO $_4$ 0.2 g、ddH $_2$ O 50 mL、DAB (diaminobezidin-3, 3-二氨基联苯胺) 0.05 g。20 $\times 10^{-6}$ $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ flg22: 0.000 45 g flg22、10 mL ddH $_2$ O。

1.2 农杆菌介导的本氏烟草瞬时转染转化

1.2.1 *HbLFG2* 基因的克隆, 重组载体的构建以及 DH5 α 转化 以橡胶树总 RNA 为模板, 用反转录试剂盒进行反转录合成橡胶树的 cDNA 序列, 并以此为模板, 用引物对 cDNA 进行 *HbLFG2* 基因 PCR 扩增。反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 40 s (30 个循环), 4 $^{\circ}\text{C}$, 冷却 10 min。将 PCR 扩增得到的 DNA 片段进行试剂盒回收, 随后, 用 *Bam*HI 将载体 pCAMBIA-35S-FLAG 切开, 再将片段和切开的载体进行连接。37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min, 再将连接好的质粒进行大肠杆菌质粒转化, 涂板点板验证菌落。最后用相同的引物对菌落进行 PCR 扩增和琼脂糖凝胶电泳来验证是否转化成功。同理, 使用同样的方法, 将烟草坏死实验对照基因 *HbLFG1* 进行克隆和载体构建。本实验所用的引物见表 1。

表1 本实验所用引物

引物名称	引物序列(5'-3')
GFP-F/R	F ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG R TCAAAGATCTACCATGTACAGCTCGT
<i>AtAct2</i> -F/R	F ACTACGAGCAGGAGATGGAA; R TTAATCTTCATGCTGCTTGG
HbLFG2-FLAG-F/R	F: gctcgtaccgggatcc-ATGTGGGGTCAGCCGTACAG; R: atagctgcactctagagg-GGTATCAGCAGCCCTGAAGA
HbLFG1-FLAG-F/R	F: gctcgtaccgggatcc-ATGTGGGGCCAACCGTACCG; R: atagctgcactctagagg-GCTATCAGCAGCCCTGAAGAC

1.2.2 农杆菌介导的本氏烟草瞬时转染转化

将含有 HbLFG2-FLAG 质粒的大肠杆菌进行扩增培养,用试剂盒提取质粒,进行 GV3101 农杆菌转化,得到含有 HbLFG2-FLAG 质粒的农杆菌。把庆大霉素、卡那霉素、利福平这 3 种抗生素加到用于培养农杆菌的液体 LB 培养基中,备用。将含有目的基因的农杆菌,加入 5 mL 的含 3 种抗生素的 LB 培养基进行扩增,将扩增的菌液转到 2 mL 离心管中,4 700 r·min⁻¹ 离心 2 min,弃上清,用移液枪取 2 mL 0.01 mol·L⁻¹ 氯化镁对农杆菌进行吸打悬浮,4 700 r·min⁻¹ 离心 2 min,保留菌块。再次悬浮农杆菌,稀释菌液到 OD₆₀₀=0.6。向本氏烟的叶片中注射稀释后的农杆菌缓冲液,标记注射区域,遮光处理 48 h,随后进行蛋白表达验证或进行形态观察^[10]。

1.2.3 蛋白提取和表达验证

将含有目的基因的农杆菌注射到烟草叶片上之后,用马克笔对注射区域进行标记。遮光过后,剪下标记区域进行蛋白提取。将剪下的叶片组织用液氮进行研磨。研磨成粉后,加入到含有植物裂解液的 1.5 mL 离心管中,在 30 min 内对样品进行多次振荡混匀,随后 4 °C,11 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,将上清收集到新的离心管中,再次低温离心,然后再次收集上清。将 100 μL 的植物蛋白上清加入蛋白上样液 20 μL,100 °C 处理 10 min,此时的蛋白样品可以进行 SDS-PAGE 凝胶电泳。将处理好的蛋白样加入到 SDS-PAGE 凝胶电泳的胶孔中,电泳完成后切下蛋白胶,蛋白胶经过转膜后,获得含有目的蛋白条带的 PVDF 膜。然后对该膜依次进行封闭牛奶,一抗,二抗处理。处理完成后用扫膜仪器进行扫描,观察扫膜结果。

1.2.4 拟南芥转化子制备

将含有目的基因的农杆菌保菌液加到含 3 种抗性的 LB 培养基扩增。4 700 r·min⁻¹ 离心 10 min 富集菌体。将富集好的

菌体使用转化悬浮液重悬,并稀释到 OD₆₀₀=0.8。4 周龄的拟南芥需要将果荚去除干净,再将花浸泡在菌悬液处理 20 s~30 s,随后进行保湿遮光处理 24 h。直至培养处理过的拟南芥长出叶片,待苗长出叶片后提取 RNA,通过 RT-PCR 得到 cDNA,再用引物进行转化子的 PCR 验证,标记 PCR 验证结果为阳性的拟南芥转化子植株。对转化成功的拟南芥进行标记,等到其果荚成熟,获得拟南芥转化子 T1 代的种子。再将收集到的种子催化成苗,待苗长出叶片后提取 RNA,再次进行引物验证,并对验证得到的拟南芥做标记,收集果荚成熟后的种子 T2 代。此时的拟南芥转化子种子经过了 2 代的筛选,能稳定遗传,可以开展相关实验^[10]。

1.2.5 胼胝质积累实验

苯胺蓝荧光染料可标记病原菌 PAMPs 诱导而积累的胼胝质,使其在植物中能被清晰地观察到。在本氏烟的实验中,注射 pbin-GFP、HbLFG2-FLAG 农杆菌于叶片,标记好区域,遮光处理 24 h,然后用 20×10⁻⁶ mol·L⁻¹ flg22 处理叶片。flg22 处理叶片 36 h 后,先用脱色液对对照及处理的叶片进行 8 h 脱色,接着用苯胺蓝溶液染色 8 h 染色。把染好色的叶片放在荧光显微镜(OLYMPUS CX21,发射波长:461 nm)下观察,选择 DAPI 滤光片拍照。照片用 ImageJ 软件来测定胼胝质积累量。每个处理使用至少 3 片叶,并从每个叶片上随机选取 3 个区域进行拍照,统计照片中每 1 mm² 面积胼胝质累积个数。在拟南芥的实验中,先用 20×10⁻⁶ mol·L⁻¹ flg22 处理 4 周龄的拟南芥植株叶片 36 h^[10],然后用乙醇乙酸脱色液对拟南芥叶片进行脱色,再将拟南芥叶片放入苯胺蓝溶液中进行 8 h 染色。荧光显微镜下观察,选择 DAPI 滤光片,拍照^[11-12]。最后用 ImageJ 软件测定胼胝质积累量。每个处理使用至少 3 片叶,并从每个叶片上随机选取 3 个区域进行拍照,统计照片中 1 mm² 面积胼胝质累积个数。

1.2.6 ROS 活性氧积累实验 DAB 能与叶片中含有的过氧化氢反应, 表现为棕色, 观察到的棕色小块即积累的活性氧。用水和 $20 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ flg22 分别处理 Col-0 野生型拟南芥、GFP 拟南芥转化子和 HbLFG2 拟南芥转化子的叶片表面 36 h, 2 d 后取下叶片放于 DAB 溶液中避光处理 10 h 进行染色。配置乙醇乙酸脱色液, 常温脱色 2 h, 再对样品进行拍照, 用 ImageJ 软件计算照片中活性氧积累面积。样本重复叶片数为 9, 统计照片中每片叶子活性氧面积占比。

1.2.7 植物细胞坏死实验技术 对 4 周龄的本氏烟叶片的表皮用注射器针头划出小伤后, 用去除针头的注射器在叶片伤口处注入农杆菌稀释液或者药液, 遮光处理 24 ~ 72 h, 观察叶片坏死情况并进行明场和紫外光下拍照。药物 DTT 的共注射处理是在注射完农杆菌 48 h 后进行药剂注射^[10]。

1.2.8 数据处理 采用软件 SPSS20.0 对数据进行 *F* 检验, 利用 Excel 对统计结果进行作图^[10-11]。

2 结果与分析

2.1 HbLFG2 对植物免疫反应的影响 western blot 结果显示, HbLFG2, GFP 蛋白在烟草上均有表达(图 1-A)。之后, 为测定 HbLFG2 是否能影响

flg22 诱导的植物免疫。用水和 flg22 分别处理空白对照烟草组织、表达绿色荧光蛋白(GFP)的组织 and 表达 HbLFG2-FLAG 的烟草组织。水处理组为阴性对照; flg22 处理空白对照烟草组织和表达 GFP 的组织为阳性对照。结果(图 1-B, 1-C)显示, 在阳性对照的叶片组织中出现大量的胼胝质积累, 而 HbLFG2-FLAG 表达能显著降低本氏烟上胼胝质积累量。说明 HbLFG2 能抑制烟草中 flg22 诱导的胼胝质产生。

2.2 HbLFG2 对植物防卫反应的影响 图 2-A 的结果显示 HbLFG2 拟南芥转化子 T2 代的基因组中存在 HbLFG2, 说明 HbLFG2 拟南芥转化子制备成功。对野生型拟南芥、GFP 拟南芥转化子、HbLFG2-FLAG 拟南芥转化子进行水处理为阴性对照。flg22 处理下, 阳性对照 Col-0 拟南芥和 GFP 拟南芥转化子的叶片激发了大量胼胝质。在 flg22 处理下的 HbLFG2-FLAG 拟南芥转化子叶片中则只有少量的胼胝质积累(图 2-B)。在 flg22 处理下的胼胝质积累量(图 2-C)表明, HbLFG2-FLAG 拟南芥转化子与 Col-0 拟南芥、GFP 拟南芥转化子存在显著差异。这表明 HbLFG2 可抑制拟南芥中激发的胼胝质产生。

2.3 HbLFG2 对植物防御反应的影响 对 Col-0

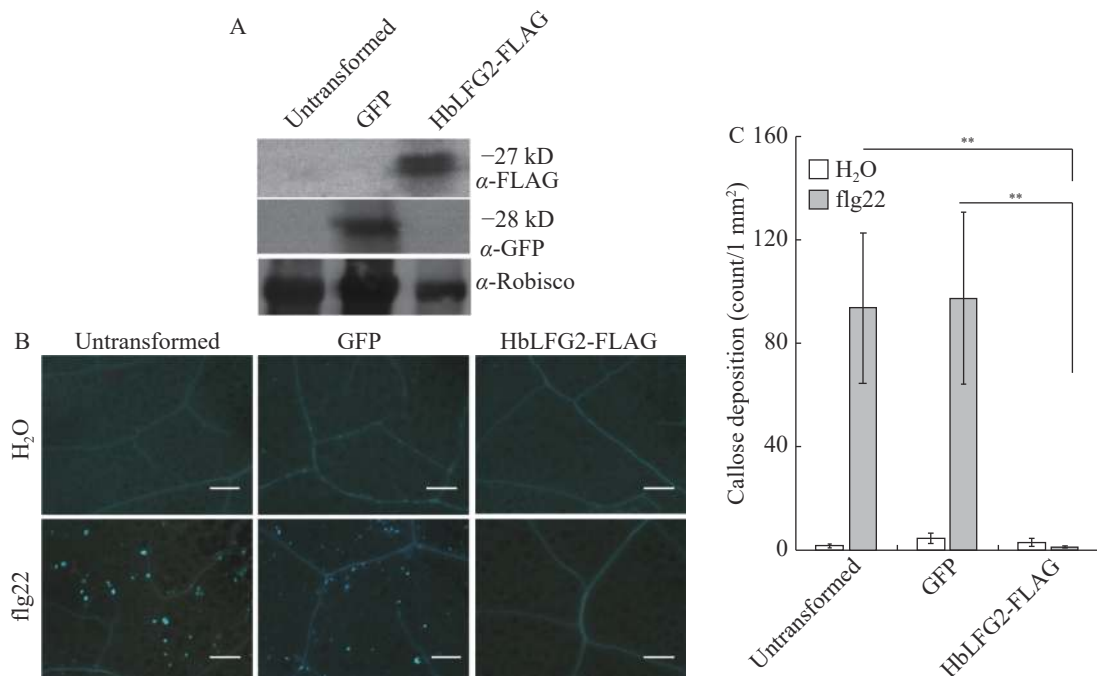


图 1 在本氏烟草中, HbLFG2-FLAG 对 flg22 诱导产生的胼胝质积累的影响

A: HbLFG2-FLAG 蛋白和 GFP 蛋白的 western blot 表达验证, Robisco 为内参蛋白; B: 不同处理下烟草组织的胼胝质积累示意图, Bars=100 μm 。C: 计算胼胝质积累个数的平均数和标准差($n=9$)。**表示样本均数之间存在极显著性差异($P < 0.01$)。

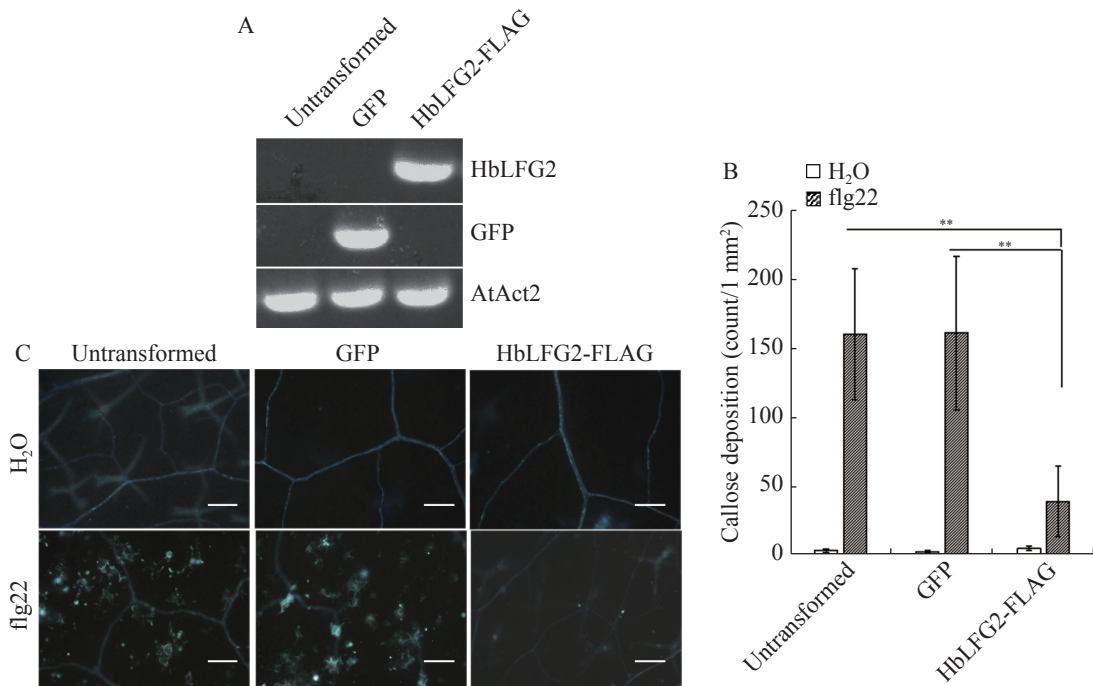


图2 在拟南芥中, HbLFG2-FLAG 对 flg22 诱导产生的胼胝质积累的影响

A: *HbLFG2*、*GFP* 和 *AtAct2* 基因的引物对拟南芥转化子进行基因表达验证; *AtAct2* 为内参基因。B: 不同处理下拟南芥组织的胼胝质积累示意图 Bars=100 μ m。C: 计算平均数和标准差($n=9$)。**表示样本均数间存在极显著性差异 ($P < 0.01$)。

野生型拟南芥、GFP 拟南芥转化子和验证过的 HbLFG2 转化子进行水处理为对照。经过活性氧染色可知, 作为阴性对照的水处理, 该处理下的野生型拟南芥、GFP 转化子和 HbLFG2 转化子叶片有少量的活性氧积累。作为阳性对照的 flg22 处理下的未经过转化的拟南芥和 GFP 转化子叶片,

有大面积的活性氧被激发, 而 flg22 处理下, HbLFG2 转化子活性氧积累面积与前两者相比较小(图 3-A)。由统计数据可知, 在 flg22 处理组中, 野生型拟南芥和 GFP 转化子活性氧积累面积占比情况, 与 HbLFG2-FLAG 转化子相比存在显著差异, 这表明 HbLFG2 减弱了拟南芥中 flg22 诱导产

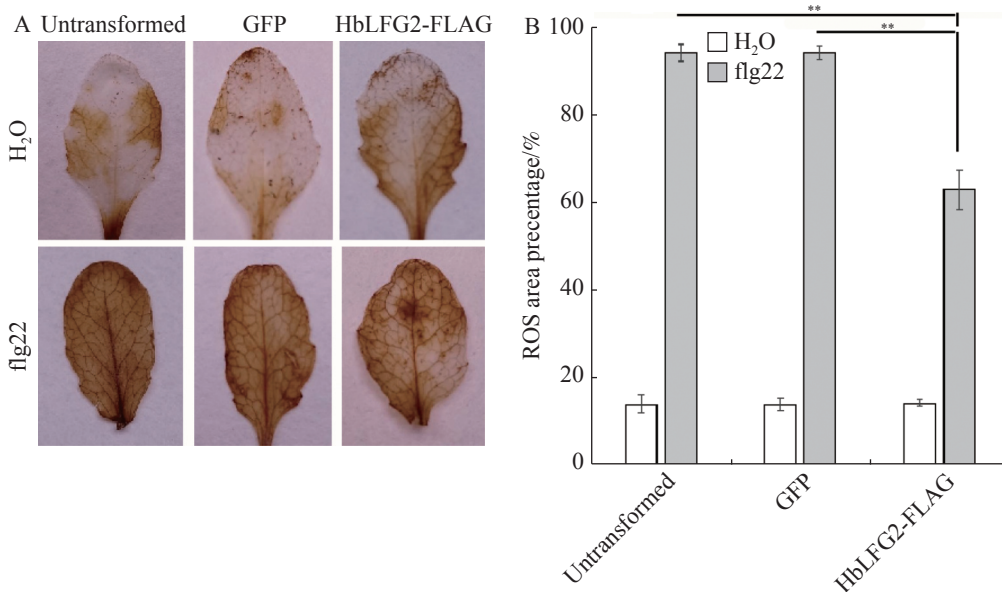


图3 在拟南芥上, HbLFG2-FLAG 对 flg22 诱导产生的活性氧积累的影响

A: 不同处理下拟南芥叶片的活性氧积累示意图; B: 计算活性氧面积占比平均数和标准差($n=9$)。**表示样本均数之间存在极显著性差异 ($P < 0.01$)。

生的活性氧积累(图 3-B)。

2.4 HbLFG2 基因对 INF1,Bax,DTT 所诱导的细胞坏死的影响 疫霉激发素 INF1, 细胞坏死诱导蛋白 Bax 和内质网胁迫剂 DTT 能在植物上造成细胞程序性死亡^[13-15]。在本氏烟草上, 测试 HbLFG2 对这些因子诱导的细胞死亡是否具有抑制作用。

对 HbLFG1, HbLFG2, GFP 蛋白进行 western

blot 表达验证, 发现 HbLFG1, HbLFG2, GFP 蛋白在烟草上发生了表达(图 4-A)。作为单独注射对照, 在烟草叶片上单独注射表达 INF1, Bax 基因的农杆菌位点以及药物 DTT 均发生了坏死, 单独注射表达 GFP, HbLFG1, HbLFG2 基因的农杆菌位点没有发生坏死, 说明对照处理正常(图 4-B, 表 2)。

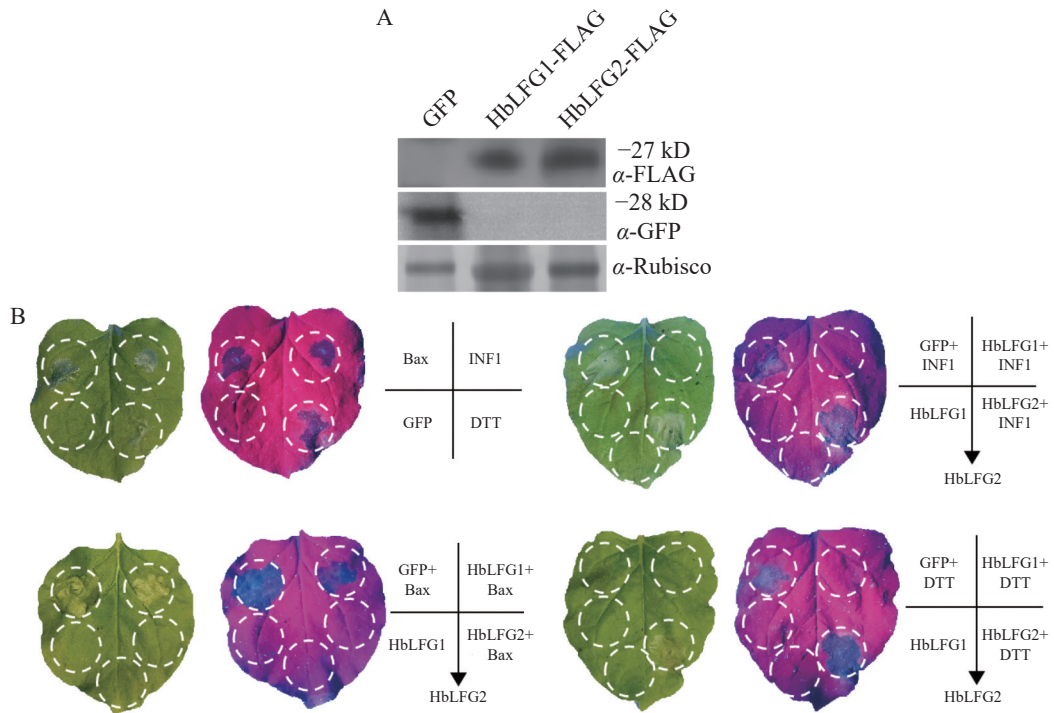


图 4 在本氏烟中, HbLFG2 基因对 INF1,Bax,DTT 所诱导的细胞坏死的影响

A: HbLFG1, HbLFG2, GFP 蛋白的 western blot 表达验证, Rubisco 为内参蛋白; B:在明场和紫外灯光下, INF1, Bax, DTT, GFP, HbLFG1, HbLFG2 的单独注射和共注射表型。

表 2 坏死发生情况统计

处理	坏死叶片数	总处理注射位数
INF1	12	12
Bax	12	12
DTT	12	12
GFP	0	12
HbLFG2-FLAG	0	12
HbLFG1--FLAG	0	12
GFP + INF1	12	12
HbLFG1-FLAG + INF1	2	12
HbLFG2-FLAG + INF1	10	12
GFP + Bax	12	12
HbLFG1-FLAG + Bax	10	12
HbLFG2-FLAG + Bax	2	12
GFP + DTT	12	12
HbLFG1-FLAG + DTT	1	12
HbLFG2-FLAG + DTT	12	12

注: 总处理注射位数是指对应处理下的叶片总数。

在 INF1 的共注射实验中, 作为 INF1 的共注射对照, 将含有 GFP 基因的农杆菌与含 INF1 基因的农杆菌共注射, 注射位点均坏死, 这说明载体并不会影响 INF1 诱导的细胞坏死; INF1 与 HbLFG1 基因共表达时, 发现 HbLFG1 能够抑制 INF1 导致的细胞坏死, 这与 Li 等^[10]的报道结果相同。而 HbLFG2 与 INF1 基因共表达则不能抑制 INF1 诱导的细胞坏死(图 4-B, 表 2)。

在 Bax 的共注射实验中, 作为 Bax 的共注射对照, 将含有空载 pBIN 载体的农杆菌与含 Bax 基因的农杆菌共注射, 注射位点均坏死, 说明载体并不会影响 Bax 诱导的细胞坏死; Bax 与 HbLFG1 基因共表达时, 发现 HbLFG1 不能够抑制 Bax 导致的细胞坏死, 与 Li 等^[10]的报道结果一致; 但 HbLFG2 与 Bax 基因共表达, 细胞坏死受到抑制(图 4-B, 表 2)。

在药物 DTT 的共注射实验中,作为 DTT 的共注射对照,将含有空载 pBIN 载体的农杆菌间隔 48 h 后与药物 DTT 共注射,注射位点均坏死,说明载体并不会影响 DTT 诱导的细胞坏死;DTT 与 *HbLFG1* 基因共表达时,发现 *HbLFG1* 可以抑制 DTT 导致的细胞坏死这与 Li 等^[10] 的报道结果相吻合;但 *HbLFG2* 与药物 DTT 共注射的位点坏死不受抑制(图 4-B,表 2)。

3 讨论

橡胶树中存在 2 个预测的 LFG 蛋白 HbLFG1 和 HbLFG2,2021 年文献^[10] 报道,HbLFG1 在本氏烟草和拟南芥的表达可以抑制植物的防卫反应和内质网胁迫引起的细胞死亡。在本研究中,HbLFG2 表现出具有类似 HbLFG1 的功能,可以抑制植物的防卫反应,因此该蛋白可能促进植物的感病性,是潜在的感病蛋白。

类似 HbLFG1^[10],在烟草或拟南芥中过表达 HbLFG2 可以抑制 flg22 激发的胼胝质,减少了活性氧的产生。植物感知 flg22 的是激酶类受体 FLS2 和 BAK1^[16],并且 flg22 可以诱导植物中免疫信号分子水杨酸的积累^[17],胼胝质的积累发生在细胞壁,水杨酸能够进一步诱导胼胝质的积累并增强活性氧爆发^[12,18]。而拟南芥 LFG/GAAP 蛋白在内质网胁迫条件下可以抑制水杨酸产生^[18],植物 BI-1 也能抑制水杨酸诱导的细胞坏死^[19]。据此,笔者推测 HbLFG2 或 HbLFG1 蛋白的积累可能干扰了 flg22 诱导的水杨酸途径,从而产生抑制防卫反应的效果。

在植物中,Bax、DTT 和 INF1 造成细胞坏死的原因不完全相同。Bax 能引起活性氧积累,进一步引起细胞离子渗漏、细胞色素 c 释放和脂质氧化反应^[19],DTT 会造成过度的内质网胁迫^[20],而 INF1 会激活丝裂原蛋白激酶通路和诱导活性氧迸发^[21]。植物 BI-1 可能主要通过降低改变细胞钙离子流、抑制细胞色素 c 的释放和脂质氧化反应来抑制细胞坏死^[19]。植物 BI-1 定位于内质网,因此,还可能通过降低对内质网胁迫的敏感度来干扰 Bax 诱导的细胞坏死,鉴于细胞会在内质网胁迫条件下启动自动死亡程序^[22-23]。类似的,拟南芥 LFG 蛋白 LFG1/GAAP1 和 LFG3/GAAP3 也定位于内质网等细胞器,可以在内质网胁迫条件下抑制细

胞坏死^[23],而且拟南芥 LFG 通过与内质网受体 IRE1 互动,负调控 IRE1 途径来影响对内质网胁迫的敏感度,借此发挥调节细胞坏死的作用^[24]。

本研究发现 HbLFG2 可以抑制 Bax 诱导的细胞坏死,但不能抑制 DTT 和 INF1 诱导的细胞坏死。相比之下,HbLFG1 不能抑制 Bax 诱导的细胞坏死,却能抑制 DTT 和 INF1 诱导的细胞坏死。这些结果表明 2 个橡胶树 LFG 蛋白虽然都具有抑制植物细胞坏死的功能,但二者作用的方式不太相同。二者在功能上可能互相补充,共同调节植物免疫。

参考文献:

- [1] 张宇,王萌,杨叶,等.防治橡胶树白粉病 15% 乙噻酚磺酸酯热雾剂的研制[J].*中国热带农业*,2011(4): 45-47.
- [2] WU H, PAN Y, DI R, et al. Molecular identification of the powdery mildew fungus infecting rubber trees in China [J]. *Forest Pathology*, 2019, 49(5): e12519.
- [3] 郑服丛.我国橡胶植保科技的现状与展望[J].*中国热带农业*,2011(4): 37-40.
- [4] SAIJO Y, LOO E P I, YASUDA S. Pattern recognition receptors and signaling in plant-microbe interactions [J]. *The Plant Journal*, 2018, 93(4): 592-613.
- [5] KUSCH S, PANSTRUGA R. *mlo*-based resistance: an apparently universal "weapon" to defeat powdery mildew disease [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2017, 30(3): 179-189.
- [6] EICHMANN R, DECHERT C, KOGEL K H, et al. Transient over-expression of barley BAX inhibitor-1 weakens oxidative defense and MLA12-mediated resistance to *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2006, 7(6): 543-552.
- [7] WEIS C, HÜCKELHOVEN R, EICHMANN R. LIFE-GUARD proteins support plant colonization by biotrophic powdery mildew fungi [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2013, 64(12): 3855-3867.
- [8] ROJAS-RIVERA D, ARMISÉN R, COLOMBO A, et al. TMBIM3/GRINA is a novel unfolded protein response (UPR) target gene that controls apoptosis through the modulation of ER calcium homeostasis [J]. *Cell Death & Differentiation*, 2012, 19(6): 1013-1026.
- [9] 李书缘,刘承圆,梁鹏,等.橡胶树感白粉病基因 *LFG1* 和 *LFG2* 的克隆及表达分析[J].*分子植物育种*, 2019, 17(3): 754-761.
- [10] LI X, LI S P, LIU Y H et al. HbLFG1, a rubber tree (*Hevea brasiliensis*) lifeguard protein, can facilitate powdery mildew infection by suppressing plant immunity [J]. *Phytopathology*, 2021, 111(9): 1648-

- 1659.
- [11] LI X, LIU Y, HE Q, et al. A candidate secreted effector protein of rubber tree powdery mildew fungus contributes to infection by regulating plant ABA biosynthesis [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 591387.
- [12] YAMADA K, YAMAGUCHI K, SHIRAKAWA T, et al. The *Arabidopsis* CERK1-associated kinase PBL27 connects chitin perception to MAPK activation [J]. *The EMBO Journal*, 2016, 35(22): 2468 – 2483.
- [13] LIU Y, BASSHAM D C. Degradation of the endoplasmic reticulum by autophagy in plants [J]. *Autophagy*, 2013, 9(4): 622 – 623.
- [14] KAWAI-YAMADA M, JIN L, YOSHINAGA K, et al. Mammalian Bax-induced plant cell death can be down-regulated by overexpression of *Arabidopsis* Bax inhibitor-1 (AtBI-1) [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(21): 12295 – 12300.
- [15] KANZAKI H, SAITOH H, TAKAHASHI Y, et al. NbLRK1, a lectin-like receptor kinase protein of *Nicotiana benthamiana*, interacts with *Phytophthora infestans* INF₁ elicitor and mediates INF₁-induced cell death [J]. *Planta*, 2008, 228(6): 977 – 987.
- [16] MACHO A P, ZIPFEL C. Plant PRRs and the activation of innate immune signaling [J]. *Molecular Cell*, 2014, 54(2): 263 – 272.
- [17] TATEDA C, ZHANG Z, SHRESTHA J, et al. Salicylic acid regulates *Arabidopsis* microbial pattern receptor kinase levels and signaling [J]. *The Plant Cell*, 2014, 26: 4171 – 4187.
- [18] WANG W, LI X, ZHU M, et al. *Arabidopsis* GAAP1 to GAAP3 Play redundant role in cell death inhibition by suppressing the upregulation of salicylic acid pathway under endoplasmic reticulum stress [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10: 1032.
- [19] KAWAI-YAMADA M, OHORI Y, UCHIMIYA H. Dissection of *Arabidopsis* Bax inhibitor-1 suppressing Bax-, hydrogen peroxide-, and salicylic acid-induced cell death [J]. *The Plant Cell*, 2004, 16: 21 – 32.
- [20] YANG X, SRIVASTAVA R, HOWELL S H, et al. Activation of autophagy by unfolded proteins during endoplasmic reticulum stress [J]. *The Plant Journal*, 2016, 85(1): 83 – 95.
- [21] ASAI S, OHTA K, YOSHIOKA H. MAPK signaling regulates nitric oxide and NADPH oxidase-dependent oxidative bursts in *Nicotiana benthamiana* [J]. *The Plant Cell*, 2008, 20: 1390 – 1406.
- [22] CHAE H J, KIM H R, XU C, et al. BI-1 regulates an apoptosis pathway linked to endoplasmic reticulum stress [J]. *Molecular Cell*, 2004, 15(3): 355 – 366.
- [23] WATANABE N, LAM E. Bax inhibitor-1, a conserved cell death suppressor, is a key molecular switch downstream from a variety of biotic and abiotic stress signals in plants [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2009, 10(7): 3149 – 3167.
- [24] GUO K, WANG W, FAN W, et al. *Arabidopsis* GAAP1 and GAAP3 modulate the unfolded protein response and the onset of cell death in response to ER stress [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2018(9): 348.

Rubber tree LFG protein HbLFG2 negatively regulates plant immunity responses

NIE Xuechun, LI Sipeng, LIU Yuhan, MIAO Weiguo, LI Xiao

(School of Plant Protection/Hainan Key Laboratory of Green Prevention and Control of Tropical Plant Diseases and Pests, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China)

Abstract: The rubber tree (*Hevea brasiliensis*) infected with powdery mildew fungus *Erysiphe quercicola* will have a significant loss in natural rubber yield. Previous studies suggest that LFG proteins confer susceptibility to plants, and that the mutations on LFGs can inhibit invasions of powdery mildew fungi in barley (*Hordeum vulgare*) and *Arabidopsis thaliana*. In *H. brasiliensis*, gene expressions of two putative LFG proteins including HbLFG1 and HbLFG2 respond to the pathogenic development of the powdery mildew. HbLFG1 negatively regulates plant immunity. However, the function of HbLFG2 was not known. In this context the function of HbLFG2 in plant immunity was investigated by using *Agrobacterium* mediated transformation in *A. thaliana* and *Nicotiana tabacum*. The results showed that constitutive expressions of HbLFG2 in *A. thaliana* and *N. benthamiana* inhibited reactive oxygen burst and callose deposition induced by bacteria flg22 (flagellin domain of a synthetic 22-amino-acid peptide). This function of HbLFG2 was similar to that of HbLFG1. Moreover, HbLFG2 could not inhibit the hypersensitive response induced by phytophthora elicitor INF1 or DTT (Dithiothreitol) but by Bax. It was different from HbLFG1. These results suggest that both HbLFG1 and HbLFG2 can inhibit plant immunity responses, but have different mechanisms for their functions.

Keywords: *Hevea brasiliensis*; powdery mildew; plant immunity system; LFG proteins

(责任编辑:叶 静)