

· 研究报告 ·

拟南芥 *GLP13* 基因在植物抗氧化胁迫响应中的作用

唐源江¹, 闵伶俐¹, 高桂兰², 杜金菊², 杨浪², 阳成伟^{2*}

¹华侨大学生物工程与技术系, 厦门 361021; ²华南师范大学生命科学学院, 广州 510631

摘要 类萌发素蛋白(germin-like protein, GLPs)是一类与小麦萌发素序列相似性较高、位于胞外基质的可溶性糖蛋白, 在植物的生长发育阶段以及对生物和非生物胁迫的应答中起着重要的作用。为了研究 *GLP13* 基因的生理功能, 我们分离并鉴定了 *GLP13* 的敲减突变体 *glp13*, 同时构建了其超表达植株 *35S::GLP13*。用甲基紫精(methyl viologen, MV)处理2种不同基因型和野生型(WT)植株, 结果发现, 与野生型相比, 突变体 *glp13* 子叶变绿率较低, 主根生长受抑制较明显; 而超表达植株 *35S::GLP13* 子叶变绿率较高, 主根生长的受抑制程度较WT轻。用MV处理2周的 *35S::GLP13* 植株, 其叶绿素荧光参数 F_v/F_m 的下降较野生型对照缓慢。半定量RT-PCR分析结果表明, 与野生型相比, 经MV处理4小时后的 *35S::GLP13* 中抗氧化酶系基因 *FSD1* 的表达上调, 而 *CAT1*、*CSD1* 和 *UGT71C1* 的表达水平在 *35S::GLP13*、*glp13* 和野生型植株三者之间没有明显差异。以上结果表明 *GLP13* 基因在拟南芥抗氧化胁迫响应中起重要作用。

关键词 拟南芥, 类萌发素蛋白, 甲基紫精, 氧化胁迫

唐源江, 闵伶俐, 高桂兰, 杜金菊, 杨浪, 阳成伟 (2011). 拟南芥 *GLP13* 基因在植物抗氧化胁迫响应中的作用. 植物学报 46, 147–154.

植物在生长过程中不可避免地受到环境信号调控, 并遭遇各种逆境胁迫。在研究植物对不同环境胁迫的响应时发现了大量的胁迫响应基因, 其中类萌发素蛋白(germin-like protein, GLPs)是参与各种胁迫响应的一类重要基因。GLPs是植物中广泛存在的一类蛋白家族, 它们以糖蛋白的形式通过离子键结合存在于细胞外基质中, 其中绝大多数为稳定的低聚物(Membré et al., 2000; Bernier and Berna, 2001; Lane, 2002)。GLPs功能多样, 但结构上都和cupin超家族成员相关。cupin超家族包括异构酶、环化酶、双加氧酶、糖或生长素结合蛋白、单体或者二聚体球蛋白以及种子贮藏蛋白, 如菜豆球蛋白(Druka et al., 2002)。生物信息学分析发现拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中类萌发素蛋白家族共有32个成员, 大麦(*Hordeum vulgare*)中有21个成员(Zimmermann et al., 2006)。GLPs家族成员的氨基酸序列同源性不高, 但它们有一些共同特征: 都包含1个N末端信号序列以及几个保守的寡肽和氨基酸残基, 其中包括预测能

够结合金属离子的基序(motifs)(Dunwell, 1998; Membré and Bernier, 1998)。

由于GLPs是一种在陆生植物中普遍存在、表达量很高的基因家族, 推测其功能多种多样, 在植物的不同生长发育阶段以及不同的生物或非生物胁迫条件下表现出不同的生物学功能, 因此引起了国内外许多学者的广泛关注, 并开展了大量的研究工作。实际上, GLPs主要以酶(如OXO/SOD/AGPPase等)、受体(如ABP19/20激素受体、Rhicadhesins受体)和结构蛋白的形式参与多种生理生化过程。目前对GLPs的功能研究主要集中在麦类作物上, 对水稻(*Oryza sativa*)和拟南芥这2种模式生物的研究还比较少。且已有研究大多以蛋白表达水平和酶的活性鉴定为主, 对于其功能的分子机理知之甚少, 很多功能研究都停留在理论推测和假设的水平上。本研究采用遗传、生理和生化的方法, 深入探讨 *GLP13*(Ehltling et al., 2005)参与植物抗氧化胁迫的作用机制及其生物学功能, 以期为进一步揭示植物的抗氧化胁迫机制提供新的证据和资料。

收稿日期: 2010-09-15; 接受日期: 2010-11-22

基金项目: 国家自然科学基金(No. 30770201)和广东省科技攻关项目(No. 2007B020701005)

* 通讯作者。E-mail: yangchw@scnu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 材料

实验材料为拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)类萌发素突变体 *glp13*(SAIL-433-H06, 购于美国拟南芥生物资源中心)及其野生型(WT)(哥伦比亚生态型, Columbia type)。

1.2 方法

1.2.1 拟南芥的培养

将拟南芥种子放在1.5 mL离心管中,先用75%乙醇消毒1–2分钟,再用1%次氯酸钠消毒3–5分钟。无菌水冲洗5次后,用枪头点播在灭菌的MS固体培养基(1.5%蔗糖,0.8%琼脂,pH 5.8)上。避光、4°C春化2天后,转到光照培养间。温度22°C/18°C(昼/夜),16小时光照/8小时黑暗,用白炽灯作为光源进行光照培养。

1.2.2 *GLP13*基因超表达载体的构建

利用 *GLP13* 特异性引物(F:5'-CTCGAGATGGAA-GCAAACACTTTG-3'; R:5'-ACTAGTTCAATGTT-ATTAGACATG-3')进行PCR扩增。具体扩增程序如下:94°C变性2分钟;94°C 30秒,58°C 30秒,72°C 2分钟,30个循环;72°C延伸10分钟。切胶回收后连接T载体,筛选阳性克隆并测序,将测序正确的质粒用 *SpeI*与 *XhoI*双酶切,并与用相同限制酶酶切处理的pBA载体连接转化大肠杆菌DH5 α ,筛选出阳性克隆,得到 *GLP13*基因超表达载体35S::*GLP13*。提取阳性克隆质粒,转化农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* EHA105,在含有巴斯卡(Bar)和利福平(Rif)的培养基上挑取单克隆,并进行PCR鉴定。用农杆菌花序浸泡法(Clough and Bent, 1998)转染野生型拟南芥,收种子后在含50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Bar的培养基上进行筛选。将抗性苗移至土壤中生长,待成熟后收集种子即得T0代,继续筛选至T2代后保存纯合体种子作为实验材料备用。

1.2.3 甲基紫精(MV)处理

配制含不同浓度梯度甲基紫精(methyl viologen, MV)的MS培养基,将灭菌后的WT、*glp13*或者35S::*GLP13*的种子均匀铺开或成一直线铺到培养基上,

用于观察萌发或统计根长。萌发实验中,每天记录萌发的种子数及子叶绿色株的数目,连续记录7天。根长统计实验中,待幼苗在垂直板中竖向生长7天后用直尺测量根长。移栽实验中,将在MS平板上生长4天的幼苗用镊子移到MS平板或含MV的MS平板上,1周后统计死亡株的比率($n>30$,重复3次)。

1.2.4 叶绿素荧光参数的测定

种子在MS平板上生长7天后移栽到含营养土的小盆中继续生长2个星期。离体实验中,取3–4位成熟叶片全叶浸泡于浓度为5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的MV溶液(含0.01%的吐温),放置在25°C、光照强度为30 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、相对湿度为80%的人工气候箱内进行光氧化处理,保持叶片反面向上。活体实验中取生长一致的整个植株,将根上土壤清洗干净后浸泡到浓度为50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的MV溶液(含0.01%的吐温),使根部完全浸没在MV溶液中且叶片漂浮在溶液上。实验过程中保持叶片充分接受光照,并以同等条件下蒸馏水处理为对照。

用脉冲调制荧光仪PAM 101-103(Walz, Effeltrich, Germany)测定叶绿素荧光参数。每次测定前将叶片暗适应10分钟。用弱光(0.04 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)测量初始荧光 F_0 ,饱和光脉冲6 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (脉冲时间2秒)测量最大荧光 F_m ,连续作用光强度为200 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。最大光化学效率 F_v/F_m 根据Gray等(1997)的公式计算。

1.2.5 半定量RT-PCR分析

用镊子小心取出在MS平板中生长2周的WT、*glp13*和35S::*GLP13*植株,将根部浸于浓度为50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的MV溶液中,分别处理2和4小时(以未处理作为对照)。胁迫处理后取整株幼苗,用吸水纸吸干水分,液氮速冻后保存于-80°C。采用Trizol法提取总RNA并反转录成cDNA用于RT-PCR分析。

2 结果与讨论

2.1 *GLP13*基因受氧化胁迫诱导表达

运用生物信息学研究方法,在拟南芥和水稻2个物种中分别鉴定了32个AtGLPs和42个OsGLPs基因;同时,利用GENEVESTIGATOR数据库分析发现,*GLP13*可能受氧化胁迫诱导表达。为了进一步验证

*GLP13*的表达是否受氧化胁迫诱导, 选取生长2周的野生型拟南芥幼苗进行MV($0.8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)处理, 在不同的处理时间点提取总RNA并反转录成cDNA, 进行RT-PCR分析。结果显示, 随着处理时间的延长, *GLP13*基因的表达水平上调(图1), 表明*GLP13*是一个受MV胁迫诱导表达的基因, 暗示其可能在拟南芥的氧化胁迫响应过程中具有重要作用。

2.2 *GLP13*的T-DNA插入突变体和过表达植株的筛选及鉴定

*GLP13*只有1个外显子, 没有内含子(图2A), 它定位于拟南芥基因组的第III号染色体上。为了深入研究*GLP13*的生理学功能, 在SIGnAL(Salk Institute Genomic Analysis Laboratory)的数据库中利用拟南

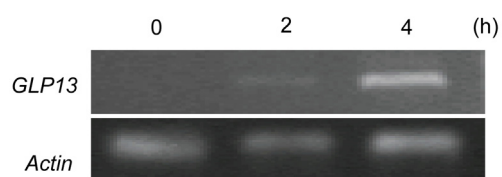


图1 $0.8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甲基紫精处理的野生型拟南芥幼苗中*GLP13*基因表达的RT-PCR分析

图中数字代表甲基紫精的处理时间(单位: 小时)。

Figure 1 RT-PCR analysis of the expression of *GLP13* in the wild-type *Arabidopsis* seedlings treated by the oxidative stress of $0.8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ methyl viologen

Numbers in the figure indicated the time of methyl viologen treatment (unit: hour).

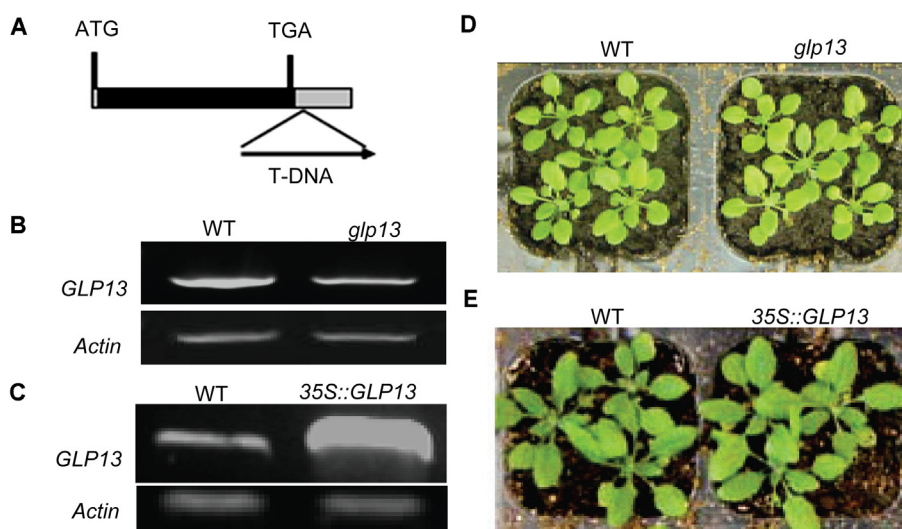


图2 拟南芥*GLP13*敲减突变体(*glp13*)和过表达植株(*35S::GLP13*)的表型和基因表达分析

(A) *GLP13*基因的敲减突变体*glp13*, 箭头示T-DNA的插入位置; (B) *GLP13*基因在野生型(WT)和*glp13*植株中的表达分析; (C) *GLP13*基因在野生型和*35S::GLP13*植株中的表达分析; (D) 正常生长条件下野生型和*glp13*植株的表型分析; (E) 正常生长条件下野生型和*35S::GLP13*植株的表型分析

Figure 2 RT-PCR and phenotypic analysis of *Arabidopsis GLP13* knock-down mutant (*glp13*) and over-expression plant (*35S::GLP13*)

(A) A knock-down mutation in *GLP13*, the arrowhead indicated the position of the T-DNA insertion; (B) Analysis of *GLP13* expression in wild-type (WT) and *glp13* plants; (C) Analysis of *GLP13* expression in wild-type and *GLP13* over-expression (*35S::GLP13*) plants; (D) Representative seedlings of wild-type and *glp13* plants grown under normal condition; (E) Representative seedlings of wild-type and *35S::GLP13* plants grown under normal condition

芥的 *GLP13* 基因序列进行搜索, 得到一个插入 *GLP13* 基因3'UTR区的突变体SALK-0, 经卡那霉素筛选后得到突变体的纯合植株, 并通过PCR确定其插入位点(图2A)。利用RT-PCR检测 *GLP13* 在突变纯合体植株中的表达水平, 发现突变体中 *GLP13* 的转录水平有所下降(knock-down), 但没有完全敲除(knock-out)(图2B)。结果表明, 该T-DNA插入突变体是一个 *GLP13* 基因的敲减突变体, 且在正常生长条件下野生型(WT)和 *GLP13* 敲减突变体(*glp13*)的表型没有明显差异(图2D)。

另外, 我们还构建了 *35S::GLP13* 过表达载体, 并转化野生型拟南芥获得转基因植株, 经卡那霉素筛选2代得到纯合体后进行半定量RT-PCR分析。结果显示(图2), *35S::GLP13* 过表达植株中 *GLP13* 的表达

水平明显高于野生型(图2C), 但在正常生长条件下野生型和 *35S::GLP13* 植株的表型没有明显差异(图2E)。

2.3 MV对*glp13*种子萌发和根长的影响

为了研究 *GLP13* 在植物应对氧化胁迫响应中的功能, 利用 *GLP13* 基因的敲减突变体 *glp13* 研究其对MV的响应。结果发现 *glp13* 对MV超敏感(图3)。野生型和 *glp13* 突变体在对照板(不含MV的MS平板)上种子萌发和根长没有明显差异(图3A, B)。但用不同浓度梯度的MV处理 *glp13* 和野生型, 随着MV浓度的升高, 两者子叶绿色株所占比率均减小, 且 *glp13* 减少得更明显。如在含 $0.6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MV的平板上, *glp13* 突变体萌发绿色株所占的百分率只有野生型的1/6(图3C)。

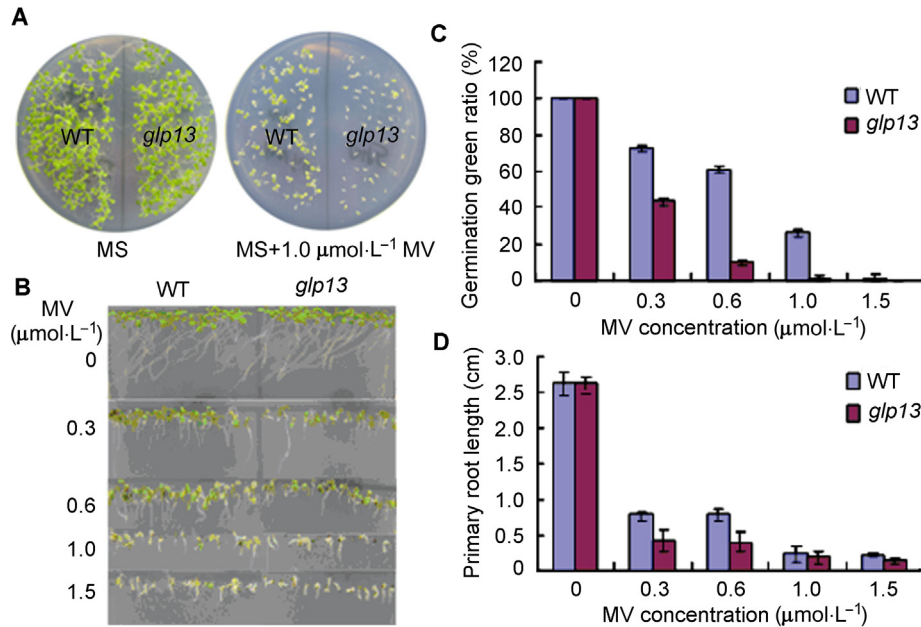


图3 拟南芥 *glp13* 突变体的种子萌发和根长对甲基紫精(MV)处理的响应

(A) *glp13* 和野生型(WT)的种子在MS和含 $1.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MV的MS培养基上萌发并生长10天; (B) *glp13* 和WT在含不同浓度(0、0.3、0.6、1.0和 $1.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) MV的MS培养基上萌发并生长10天的主根表型; (C) *glp13* 和WT在含不同浓度(0、0.3、0.6、1.0和 $1.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) MV的MS培养基上萌发并生长10天的子叶绿色株所占的比率; (D) 图B中主根长度的统计(3次重复取平均值)

Figure 3 The seed germination and seedling growth of *glp13* plants are sensitive to the methyl viologen (MV) treatment

(A) The seeds of *glp13* and wild-type (WT) germinated and grown for 10 days in the MS medium (left) and MS medium containing $1.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MV (right); (B) The growth of primary roots of *glp13* and WT grown for 10 days on MS medium containing a range of concentrations (0, 0.3, 0.6, 1.0 and $1.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) of MV; (C) Seedling greening ratios of *glp13* and WT plants grown for 10 days on MS medium containing a range of concentrations (0, 0.3, 0.6, 1.0 and $1.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) of MV; (D) The statistics of primary root length in figure B (data are means of three replicates)

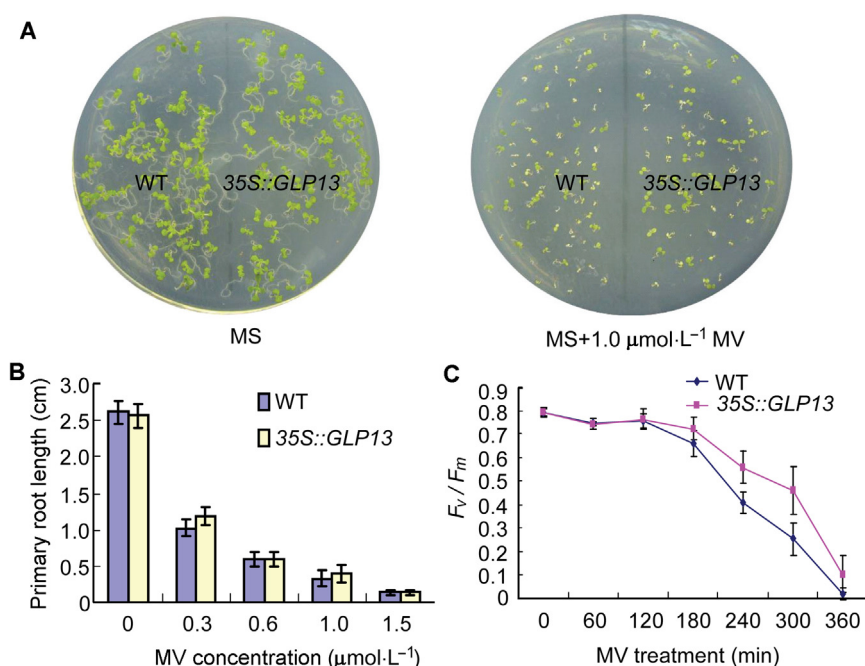


图4 甲基紫精(MV)氧化胁迫对拟南芥*GLP13*超表达转化体35S::*GLP13*种子萌发、根长及 F_v/F_m 的影响

(A) 35S::*GLP13*和野生型(WT)的种子在MS和含 $1.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MV的MS培养基上萌发并生长10天; (B) 35S::*GLP13*和WT在含不同浓度(0、0.3、0.6、1.0和 $1.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)MV的MS培养基上萌发并生长10天后, 统计主根长度; (C) $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MV氧化胁迫对35S::*GLP13*植株 F_v/F_m 的影响, 每1个小时测定1次数据(3次重复取平均值)。

Figure 4 Effect of methyl viologen (MV) oxidative stress on the seed germination, primary root growth and F_v/F_m of Arabidopsis *GLP13* over-expression plant (35S::*GLP13*)

(A) The seeds of 35S::*GLP13* and wild-type (WT) germinated and grown for 10 days in the MS medium (left) and MS medium containing $1.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MV (right); (B) The statistics of primary root length of WT and 35S::*GLP13* grown for 10 days on MS medium containing a range of concentrations (0, 0.3, 0.6, 1.0 and $1.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) of MV; (C) Changes of F_v/F_m in two-week-old 35S::*GLP13* and WT plants after $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MV treatment at different time. Data are means of three replicates.

同时还利用垂直板生长实验探讨了野生型和*glp13*的根对MV的响应。结果发现MV显著抑制野生型和*glp13*根的伸长(图3B)。当MV浓度为 $0.3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 野生型的根长为 0.81 cm , 为对照的1/3, 而*glp13*根长仅为 0.43 cm 。随着MV浓度的增加, 两者的根长均继续变短, 当MV浓度为 $1.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, *glp13*根长缩短为 0.14 cm , 约为野生型根长的一半(图3D)。

2.4 MV对*GLP13*超表达植株35S::*GLP13*根长和叶绿素荧光参数的影响

为了进一步研究*GLP13*的功能, 利用*GLP13*基因超表达转化体35S::*GLP13*研究其对MV的响应。结果发现, 野生型与35S::*GLP13*植株在种子萌发上具有差

异但不显著(图4A)。MV显著抑制野生型和35S::*GLP13*根的伸长, 35S::*GLP13*与野生型相比有一定抗性。当MV浓度为 $0.3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 野生型的根长为 0.81 cm , 过表达转基因植株的根长为 1.12 cm , 但随着MV浓度的增加, 两者根长的差距缩短, 当MV浓度为 $0.6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 两者的根长比较接近(图4B)。由此可见, *GLP13*基因的表达在一定程度上可以提高植株对较低浓度MV($\leq 1.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)胁迫的抗性。

另外, 为了研究*GLP13*基因对MV氧化胁迫下植物光合作用参数变化的影响, 用 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的MV对*GLP13*超表达转化体35S::*GLP13*和野生型植株进行氧化胁迫, 每60分钟取样测定植株的 F_v/F_m (图4C)。结果发现, 在正常生长条件下, 野生型和35S::*GLP13*

的 F_v/F_m (光系统II最大原初光化学量子效率)约为0.8。但在MV处理过程中, $35S::GLP13$ 的 F_v/F_m 持续下降, 说明MV胁迫造成了PSII功能的损伤。MV处理240分钟后, 野生型和转基因植株的 F_v/F_m 分别下降了51%和37.9%, 两者之间呈现显著差异($P < 0.05$)。结果显示MV胁迫下 $35S::GLP13$ 的PSII功能更稳定, 表明过量表达 $GLP13$ 基因可以提高氧化胁迫下植物光合机构的稳定性。

2.5 MV处理对氧化胁迫相关基因表达的影响

本实验利用半定量RT-PCR技术检测了MV处理后野生型、 $glp13$ 突变体及 $GLP13$ 超表达植株中氧化胁迫相关基因 $CSD1$ 、 $FSD1$ 、 $CAT1$ 和 $UGT71C1$ 的表达情况(图5)。结果表明, 与野生型相比, 经MV处理4小时后的 $35S::GLP13$ 植株中抗氧化酶系基因 $FSD1$ 的表达上调, 而 $CAT1$ 、 $CSD1$ 和 $UGT71C1$ 的表达水平在 $35S::GLP13$ 、 $glp13$ 和野生型植株三者之间没有明显差异。

2.6 讨论

2.6.1 拟南芥类萌发素蛋白突变体 $glp13$ 及 $GLP13$ 超表达转化体对氧化胁迫的响应

已知GLPs功能多样, 可作为酶、结构蛋白或者受体发挥功能(Patnaik and Khurana, 2001)。作为酶, 一些GLPs具有草酸氧化酶活性(Lane et al., 1993; Lane, 2000), 一些GLPs则具有超氧化物歧化酶(SOD)活性; 而它们在植物体内均能产生 H_2O_2 (Bernier and Berna, 2001)。近年来的研究发现GLPs在调节植物防御反应方面具有重要作用。通过瞬时超表达和沉默小麦(*Triticum aestivum*)、大麦中的GLPs证明GLPs成员在植物抵御白粉菌侵染过程中有重要作用(Schweizer et al., 1999; Christensen et al., 2004; Zimmermann et al., 2006)。此外研究表明GLPs在参与抵御食草动物捕食方面也有重要的作用, 如在玉米(*Zea mays*)中异源性表达小麦萌发素基因, 能增强玉米对玉米螟的抗性(Ramputh et al., 2002); 在饲喂天蛾科食草动物天蛾(*Manduca sexta*)幼虫的烟草(*Nicotiana attenuata*)中, 类萌发素基因 $NaGLP$ 的表达增加(Hermsmeier et al., 2001); 而通过病毒诱导基因沉默的方法沉默烟草中的 $NaGLP$ 基因, 减少 H_2O_2 的产生, 则提高了 $M. sexta$ 毛虫的偏好性(Lou

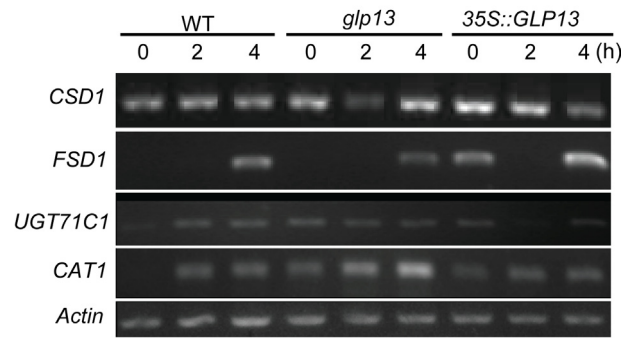


图5 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甲基紫精处理下野生型(WT)、 $GLP13$ 敲减突变体($glp13$)及超表达($35S::GLP13$)植株中氧化胁迫相关基因的表达分析

图中数字代表甲基紫精的处理时间(小时)。

Figure 5 Analysis of the expression of oxidative stress-related genes in wild-type(WT), $GLP13$ knock-down mutant ($glp13$) and over-expression ($35S::GLP13$) plants treated by 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ methyl viologen

Numbers in the figure indicated the time of methyl viologen treatment (hours).

and Baldwin, 2006)。因此, 多方面的证据表明, GLPs可能通过 H_2O_2 信号途径调节植物的防卫反应。近来有人提出, 由 H_2O_2 反应形成的 $\cdot\text{OH}$ 能参与多糖的分解、细胞壁的松弛以及细胞的伸展(Fryer et al., 1998), 对于该问题还没有定论。本研究发现, MV处理对拟南芥类萌发素蛋白突变体 $glp13$ 和野生型的种子萌发率没有明显影响(图3A)。但用MV处理 $glp13$ 和野生型后, 随着MV浓度的升高两者子叶变绿株所占比率和主根长度均减小, 且 $glp13$ 减小得更明显(图3B-D)。与野生型相比, $GLP13$ 超表达转基因植株 $35S::GLP13$ 对MV胁迫表现出一定的抗性(图4B)。总之, $GLP13$ 表达量下调的 $glp13$ 突变体对MV胁迫敏感, 而 $GLP13$ 的超表达转化植株对MV胁迫表现抗性, 表明 $GLP13$ 基因参与调控植物应对氧化胁迫, 是MV氧化胁迫响应途径的正调控因子。

2.6.2 $GLP13$ 基因在植物响应氧化胁迫过程中的作用机制

活性氧(reactive oxygen species, ROS)如超氧化物阴离子(superoxide radical, O_2^-)、羟自由基(hydroxyl

radical, OH·)和过氧化氢(hydrogen peroxide, H₂O₂)等作为正常代谢的副产物在植物的叶绿体、线粒体和过氧化物酶体等不同亚细胞器以及类似质膜的电子传递系统中均会不断产生。在正常生长条件下, ROS的生成和清除处于一定的平衡状态, 因此不会对细胞造成损伤。但当ROS的生成超出组织中抗氧化剂的清除能力时, ROS则在细胞内急剧积累而使细胞遭受氧化胁迫。植物在整个生长发育过程中会受到各种不良环境(如生物和非生物胁迫)的影响。细胞中ROS产生与清除之间的平衡被干扰, 从而导致ROS大量生成, 植物细胞遭受氧化胁迫。许多研究表明ROS对细胞有明显的毒害作用, 它们能与蛋白质、核酸和脂类发生作用而引起蛋白质失活和降解、DNA链断裂和膜脂过氧化等现象, 从而导致细胞结构和功能的破坏, 引起植物代谢失活、细胞死亡、光合作用速率下降以及同化物的形成减少, 甚至造成植物品质下降和生物量降低等严重后果。然而, 植物在长期的进化过程中形成了有效的活性氧清除机制。SOD和CAT是叶绿体内重要的活性氧清除酶类。CSD1、FSD1和CAT1是ROS响应基因, 在植物抵抗氧化胁迫过程中起重要作用(Mittler, 2002; Scandalios, 2005)。我们的研究结果发现, 在正常情况下, 未经MV胁迫处理, FSD1在GLP13超表达转基因植株中的表达量最高, 而在glp13突变体中最低; 当用MV处理4小时后, 野生型、glp13突变体及GLP13超表达植株中FSD1的表达均有不同程度的上调, 且以超表达转基因植株最为明显。因此, 我们推测GLP13基因可能通过影响FSD1的表达而间接参与拟南芥对氧化胁迫的抗性反应。

参考文献

- Bernier F, Berna A (2001). Germins and germin-like proteins: plant do-all proteins. But what do they do exactly. *Plant Physiol Biochem* **39**, 545–554.
- Christensen AB, Thordal-Christensen H, Zimmermann G, Gjetting T, Lyngkjær MF, Dudler R, Schweizer P (2004). The germinlike protein GLP4 exhibits superoxide dismutase activity and is an important component of quantitative resistance in wheat and barley. *Mol Plant Microbe Interact* **17**, 109–117.
- Clough SJ, Bent AF (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16**, 735–743.
- Druka A, Kudrna D, Kannangara CG, von Wettstein D, Kleinhofs A (2002). Physical and genetic mapping of barley (*Hordeum vulgare*) germin-like cDNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 850–855.
- Dunwell JM (1998). Sequence analysis of the cupin gene family in *Synechocystis* PCC6803. *Microb Comp Genomics* **3**, 141–148.
- Ehltling J, Mattheus N, Aeschliman DS, Li EY, Hamberger B, Cullis IF, Zhuang J, Kaneda M, Mansfield SD, Samuels L, Ritland K, Ellis BE, Bohlmann J, Douglas CJ (2005). Global transcript profiling of primary stems from *Arabidopsis thaliana* identifies candidate genes for missing links in lignin biosynthesis and transcriptional regulators of fiber differentiation. *Plant J* **42**, 618–640.
- Fryer MJ, Andrews JR, Oxborough K, Blowers DA, Baker NR (1998). Relationship between CO₂ assimilation, photosynthetic electron transport, and active O₂ metabolism in leaves of maize in the field during periods of low temperature. *Plant Physiol* **116**, 571–580.
- Gray GR, Chauvin LP, Sarhan F, Huner NPA (1997). Cold acclimation and freezing tolerance (a complex interaction of light and temperature). *Plant Physiol* **114**, 467–474.
- Hermesmeier D, Schittko U, Baldwin IT (2001). Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*. I. Large-scale changes in the accumulation of growth- and defense-related plant mRNAs. *Plant Physiol* **125**, 683–700.
- Lane BG (2000). Oxalate oxidases and differentiating surface structure in wheat: germins. *Biochem J* **349**, 309–321.
- Lane BG (2002). Oxalate, germins, and higher-plant pathogens. *IUBMB Life* **53**, 67–75.
- Lane BG, Dunwell JM, Ray JA, Schmitt MR, Cuming AC (1993). Germin, a protein marker of early plant development, is an oxalate oxidase. *J Biol Chem* **268**, 12239–12242.
- Lou YG, Baldwin IT (2006). Silencing of a germin-like gene in *Nicotiana attenuata* improves performance of native herbivores. *Plant Physiol* **140**, 1126–1136.
- Membré N, Bernier F (1998). The rice genome expresses at least six different genes for oxalate oxidase/germin-like proteins (GenBank AF032971, AF032972, AF032973, AF032974, AF032975, AF032976)(PGR98-021). *Plant Physiol* **116**, 868–868.
- Membré N, Bernier F, Staiger D, Berna A (2000). *Arabidopsis thaliana* germin-like proteins: common and specific fea-

- tures point to a variety of functions. *Planta* **211**, 345–354.
- Mittler R** (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* **7**, 405–410.
- Patnaik D, Khurana P** (2001). Germins and germin like proteins: an overview. *Indian J Exp Biol* **39**, 191–200.
- Ramputh AI, Arnason JT, Cass L, Simmonds JA** (2002). Reduced herbivory of the European corn borer (*Ostrinia nubilalis*) on corn transformed with germin, a wheat oxalate oxidase gene. *Plant Sci* **162**, 431–440.
- Scandalios JG** (2005). Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res* **38**, 995–1014.
- Schweizer P, Christoffel A, Dudler R** (1999). Transient expression of members of the germin-like gene family in epidermal cells of wheat confers disease resistance. *Plant J* **20**, 541–552.
- Zimmermann G, Bäumlein H, Mock HP, Himmelbach A, Schweizer P** (2006). The multigene family encoding germin-like proteins of barley. Regulation and function in basal host resistance. *Plant Physiol* **142**, 181–192.

Function of *GLP13* in Response to Plant Oxidative Stress in *Arabidopsis*

Yuanjiang Tang¹, Lingli Min¹, Guilan Gao², Jinju Du², Lang Yang², Chengwei Yang^{2*}

¹Department of Biological Engineering and Biotechnology, Huaqiao University, Xiamen 361021, China; ²College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China

Abstract Germin-like proteins (GLPs) comprise a large family of soluble extracellular matrix glycoprotein, which is similar to wheat germin and plays an important role in growth and development and in biotic and abiotic stress responses of plants. To understand the role of *GLP13* in *planta*, we investigated its expression patterns; isolated and characterized a knock-down mutation in the *GLP13* gene (named *glp13*); and constructed overexpression *GLP13* plants (named *35S::GLP13*). Compared to the wild type, the *glp13* mutant showed a lower cotyledon green ratio and more restrained root growth when 3 different types of plants were treated with methyl viologen (MV); however, the cotyledon green ratio was higher and the root growth less restrained in *35S::GLP13* plants. The chlorophyll fluorescence parameter F_v/F_m of *35S::GLP13* plants decreased slower than in the wild type after 2-week MV treatment of seedlings. The expression of oxidative stress response genes (*CSD1*, *FSD1*, *UGT71C1* and *CAT1*) were analyzed by semi-quantitative RT-PCR; the expression of *FSD1* was increased in *35S::GLP13* plants, with no differences in the expression level of *CAT1*, *CSD1* and *UGT71C1* among 3 different types of plants after 4-hr treatment with MV. Our results indicate that *GLP13* plays an important role in response to oxidative stress in *Arabidopsis*.

Key words *Arabidopsis*, germin-like protein, methyl viologen, oxidative stress

Tang YJ, Min LL, Gao GL, Du JJ, Yang L, Yang CW (2011). Function of *GLP13* in response to plant oxidative stress in *Arabidopsis*. *Chin Bull Bot* **46**, 147–154.

* Author for correspondence. E-mail: yangchw@scnu.edu.cn