

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2023.01.008

百合“索邦”病程相关蛋白基因 *LhSorPR10-2* 的克隆与分析

杜文婷, 孙正琼, 谭丽君, 柴楠, 眭顺照, 刘道凤

西南大学 园艺园林学院/南方山地园艺学教育部重点实验室/重庆市花卉工程技术中心, 重庆 400715

摘要: 病程相关蛋白(Pathogenesis-related Proteins, PR)是植物在受病原物侵染过程中诱导产生的一类蛋白。为研究百合“索邦”PR10 基因的生物学功能,本研究在灰霉菌(*Botrytis elliptica*)处理不同时间的百合“索邦”叶片转录组数据库中筛选获得显著诱导表达的一个病程相关蛋白 PR10 基因,命名为“*LhSorPR10-2*”,并对其进行生物信息学分析、表达模式分析及其启动子克隆分析。结果显示:*LhSorPR10-2* 全长 761 bp, 开放阅读框为 474 bp, 编码 158 个氨基酸, 等电点为 5.72。*LhSorPR10-2* 在百合“索邦”中的表达具有组织特异性,在叶中表达量最高;该基因可被病原菌椭圆葡萄孢(*Botrytis elliptica*)和尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)诱导上调表达,并能被植物激素茉莉酸甲酯(MeJA)、水杨酸(SA)和乙烯利(ETH)诱导响应以及高温(50 °C)和低温(0 °C)胁迫诱导表达。另外,启动子区的顺式作用元件分析显示 *LhSorPR10-2* 启动子区含有大量与光信号、植物激素、胁迫和分生组织等相关的功能域,推测其可能在生物及非生物胁迫响应过程中发挥重要作用。本研究旨在了解百合“索邦”PR10 基因的有关特性及在抗病防御反应中的作用,为今后揭示该基因的抗性分子机制提供理论基础。

关键词: 百合; 病程相关蛋白; 基因克隆; 表达分析; 启动子

中图分类号: S682.2⁺9

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2023)01-0074-09

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Cloning and Analysis of Pathogenesis-related Protein Gene *LhSorPR10-2* from ‘Sorbonne’ Lily

DU Wenting, SUN Zhengqiong, TAN Lijun,
CHAI Nan, SUI Shunzhao, LIU Daofeng

College of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University/Key Laboratory of Horticulture Science for Southern Mountainous Regions of Ministry of Education/Chongqing Engineering Research Center for Floriculture, Chongqing 400715, China

Abstract: Pathogenesis-related proteins (PR) are a class of proteins induced by pathogens in plants. In order to study the biological function of PR10 gene, a pathogenesis-related protein PR10 gene named ‘*LhSorPR10-2*’ was screened from the transcriptome database of ‘Sorbonne’ lily leaves treated with *Botrytis*

收稿日期: 2022-03-02

基金项目: 福建省星火计划项目(2021S0014); 福建省中科院 STS 计划配套项目(2022T3031)。

作者简介: 杜文婷, 硕士研究生, 主要从事园林和观赏植物分子遗传育种研究。

通信作者: 刘道凤, 博士, 副教授。

elliptica for different period of time. Bioinformatics analysis, expression pattern analysis and promoter analysis were carried out. The results showed that the total length of *LhSorPR10-2* was 761 bp with a 474 bp open reading frame, encoding 158 amino acids, and the isoelectric point was 5.72. The expression of *LhSorPR10-2* in ‘Sorbonne’ lily was tissue-specific, which had the highest expression in leaves. The expression of this gene could be induced by *Botrytis elliptica* and *Fusariumoxysporum*, also by phytohormones such as methyl jasmonate (MeJA), salicylic acid (SA) and ethephon (ETH) and by temperature stresses such as high temperature (50 °C) and low temperature (0 °C). In addition, *cis*-acting element analysis of the promoter region showed that the promoter region of *LhSorPR10-2* contained a large number of functional domains related to light signals, phytohormones, stress and meristems, which may play an important role in the process of biotic and abiotic stress response. The aim of this study was to understand the characteristics of *PR10* gene in ‘Sorbonne’ lily and its role in disease resistance and defense response, and to provide a theoretical basis for revealing the molecular mechanism of stress tolerance in the future.

Key words: lily; Pathogenesis-related Proteins; gene clone; expression analysis; promoter

百合是百合科(Liliaceae)百合属(*Lilium*)多年生草本球根植物,是世界上具有重要经济价值的观赏植物之一,可用作鲜切花、盆栽花卉和花园造景,一些百合品种也作为食用球茎和药源植物被广泛种植^[1-2]。百合生长过程中易受到多种病害的威胁,常发生真菌性病害如灰霉病、立枯病、炭疽病、斑点病、疫病以及病毒病等,给百合生产带来巨大的经济损失^[3-5]。

在病原体攻击下,植物已经进化出不同的防御机制以便在逆境中生存,除了植物已形成的有效结构和化学屏障的组成型防御机制外,植物还具有诱导型防御机制,在病原体攻击时被诱导。诱导型防御机制包括细胞壁交联、过敏性反应、活性氧(ROS)的产生和次生代谢物的积累,以及病程相关蛋白(Pathogenesis-related Proteins, PRP 或 PRs)的产生^[6-8]。病程相关蛋白是研究较为深入的植物防御蛋白之一,是植物防御系统的核心组成部分^[9-10]。根据其蛋白质序列的相似性、酶活性和其他生物学特征将 PR 蛋白分为 17 个家族^[11];其中 PR10 家族是该家族的重要成员,具有抗真菌、抗细菌和抗病毒等活性^[12-14]。迄今为止,已经从 70 多种植物中分离出 100 多个 PR10 蛋白和 PR10 基因序列^[15]。在玉米中研究发现 PR10 蛋白可作为抵抗不同真菌和病原菌的抗菌剂,并可应用于生产抗真菌药物或通过转基因获得抗真菌植株^[12]。在欧洲李感染褐腐病期间发现其 PR10 蛋白的转录本水平升高,并分析发现 PR10 可能与真菌病害抗性有关^[16]。在芭蕉中,PR10 基因的编码蛋白均具有 β -1, 3-葡聚糖酶和核糖核酸酶活性,并能抑制烟曲霉的生长^[15]。

为研究百合“索邦”PR10 基因的生物学功能,本研究在研究室已构建的灰霉菌(*Botrytis elliptica*)接种后不同时间百合“索邦”叶片的转录组数据库^[17]中筛选获得受病菌侵染后显著诱导表达的病程相关蛋白基因 *LhSorPR10-2*,并克隆得到该基因的全长序列。通过实时定量 PCR 分析 *LhSorPR10-2* 在百合“索邦”不同组织中的表达模式,以及病原菌处理、激素处理和高温处理后该基因的诱导表达情况,并对其启动子的顺式作用元件进行分析。本研究旨在了解百合 PR10 基因的有关特性及在抗病防御反应中的作用,为今后揭示该基因的抗性分子机制提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

基因克隆、组织表达特异性分析及灰霉菌(*Botrytis elliptica*)侵染分析所使用的植物材料为种植于西南大学花卉实验室温室的 1 龄东方百合“索邦”植株。培养条件为:光照强度 20 000 lx,光周期为光照 16 h 和黑暗 8 h,昼 25 °C/夜 20 °C,湿度为 85%。

尖孢镰刀菌处理、激素处理和温度胁迫分析表达的植物材料均为百合“索邦”组培苗。培养基为:MS+TDZ 0.01 mg/L+NAA 0.2 mg/L,培养条件同上。

1.2 *LhSorPR10-2* 及其启动子序列克隆

根据百合“索邦”感染灰霉病的转录组数据库筛选出的基因序列设计 *LhSorPR10-2* 特异引物,以百合叶片 cDNA 为模板,使用 Primer Star Max 酶进行 PCR 扩增,反应条件为 98 °C 10 s, 53 °C 5 s, 72 °C 4 s, 31 个循环. 在开放阅读框设计引物 *LhSorPR10-2*-DNA,以百合“索邦”叶片基因组 DNA 为模板,使用 HiFi 酶进行扩增,反应条件为 94 °C 5 min, 94 °C 30 s, 53 °C 30 s, 72 °C 30 s, 72 °C 10 min, 29 个循环(表 1).

利用 *LhSorPR10-2* 的蛋白序列作为查询序列,NCBI 数据库进行 Blastp 搜索,结果显示与麝香百合的 *LlPR107*(AAD17336.1)^[18] 基因相似度高达 95%. 因此,以麝香百合的 *LlPR107* 为百合“索邦”的 *LhSorPR10-2* 同源基因,根据麝香百合 *LlPR107* 的启动子序列(KC815691.1)^[19] 设计引物 *LhSorPR10-2*-pro,并以百合“索邦”叶片 DNA 为模板,使用 Top taq 酶进行 PCR 扩增,反应条件为 94 °C 5 min, 94 °C 30 s, 57 °C 30 s, 72 °C 1 min 20 s, 72 °C 10 min, 30 个循环(表 1).

表 1 不同用途的引物序列

用途	基因	引物序列(5'~3')
扩增 cDNA	<i>LhSorPR10-2</i> -cDNA	F: GGAGCAGGTGAATTAAGCAT R: CAGAACCATGCCTTTCTCAC
扩增 DNA	<i>LhSorPR10-2</i> -DNA	F: CATCGACTGGCCCAATCTC R: ACCATCACCATCGCCTCCT
荧光定量 PCR	<i>qLhSorPR10-2</i>	F: GCTTCCGCACACTTCAAGATTGAG R: ATCTCTGAAACCGCTCCCCT
	<i>qLhSorActin</i>	F: CACACTGGTGTCATGGTTGG R: ATCTCTGAAACCGCTCCCCT
	<i>qLhSor18s</i>	F: CGCAAGGCTGAAACTTAAAGG R: CAGACAAATCGCTCCACCAAC
启动子克隆	<i>LhSorPR10-2</i> -pro	F: ACAGGAGATCACTCGATGTATATGTG R: CAGTCGATGAGGGCAGCCTT

1.3 *LhSorPR10-2* 生物信息分析

通过 MegAlign 软件将测序结果与预测序列进行比对,最终得到目的基因序列,将得到的目的基因序列在 NCBI 上进行 BLAST 分析,同时进行生物信息学分析. 所用软件及网址如表 2.

表 2 生物信息学分析软件

分析项目	软件名称	网址/出版商
同源序列比对	BLAST	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
蛋白二级结构预测	SOPMA	https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html
蛋白亚细胞定位预测	Softberry	http://www.softberry.com/
蛋白信号肽预测	SignalP-5.0	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/
蛋白跨膜结构分析	TMHMM 2.0	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/
蛋白基本性质分析	ProtParam	https://web.expasy.org/protparam/
蛋白疏水性分析	ProtScale	https://web.expasy.org/protscale/
氨基酸多序列比对	DNAMAN 汉化版	Lynnon 公司
蛋白进化树构建	MEGA7.0	https://www.megasoftware.net/megaccusage.php
启动子顺式作用元件分析	PlantCARE	http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/

1.4 qRT-PCR 的植物材料及数据处理

分别采取 1 龄盛花期正常生长的百合“索邦”植株的茎、叶、花瓣、雌蕊、花药、花丝、鳞片及根为组织表达特异性分析的样品, 于液氮中冷冻后, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存以提取 RNA. 用打孔器取灰霉菌菌饼接种于 1 龄百合叶片, 以清水为对照, 取接种后 3 h, 6 h, 12 h, 24 h, 36 h, 48 h 的叶片染病部位为样品, 每个样品取 3 个生物重复, 进行病原菌感染后的基因表达分析.

选取苗高 5 cm, 球茎 0.5 cm 的百合“索邦”组培苗放置于无菌水中预培养 24 h 后进行尖孢镰刀菌及不同激素处理. 尖孢镰刀菌处理: 预处理后的组培苗放入 10^6 cfu/mL 尖孢镰刀菌悬浮液中 30 min 后, 转入无菌水中培养, 以无菌水处理为对照, 取感染后 3 h, 6 h, 12 h, 24 h, 36 h 和 48 h 的百合组培苗根部作为样品. 不同激素处理: 预处理后的组培苗分别移至 $100\text{ }\mu\text{mol/L}$ MeJA, $200\text{ }\mu\text{mol/L}$ SA 和 1 mmol/L ETH 的激素溶液中, 放置 30 min, 再转入无菌水中培养, 取处理后 0 h, 1 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h 和 48 h 的组培苗根部作为样品. 温度胁迫处理: 将预培养了两天的“索邦”组培苗分别放置于 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温恒湿培养箱, 湿度均为 85%, 取处理后 0 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h 和 48 h 的组培苗叶片为样品. 以上处理均是每个样品取 3 个生物重复, 液氮速冻后, 放置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中, 保存备用以提取 RNA.

荧光定量 PCR 以 *LhSorActin*, *LhSor18s* 作为内参基因进行表达量分析, 反应条件: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 s, $58\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 s; 40 个循环. 结果通过 Bio Rid CFX 软件剔除误差较大数据后, 导出数据至 GraphPad Prism 8.0.2 进行数据分析并作图, 使用 SPSS 20.0 软件进行差异统计学分析, 采用 Dunnett 检验, $p < 0.05$ 时表示差异有统计学意义.

2 结果与分析

2.1 *LhSorPR10-2* 的克隆和生物信息分析

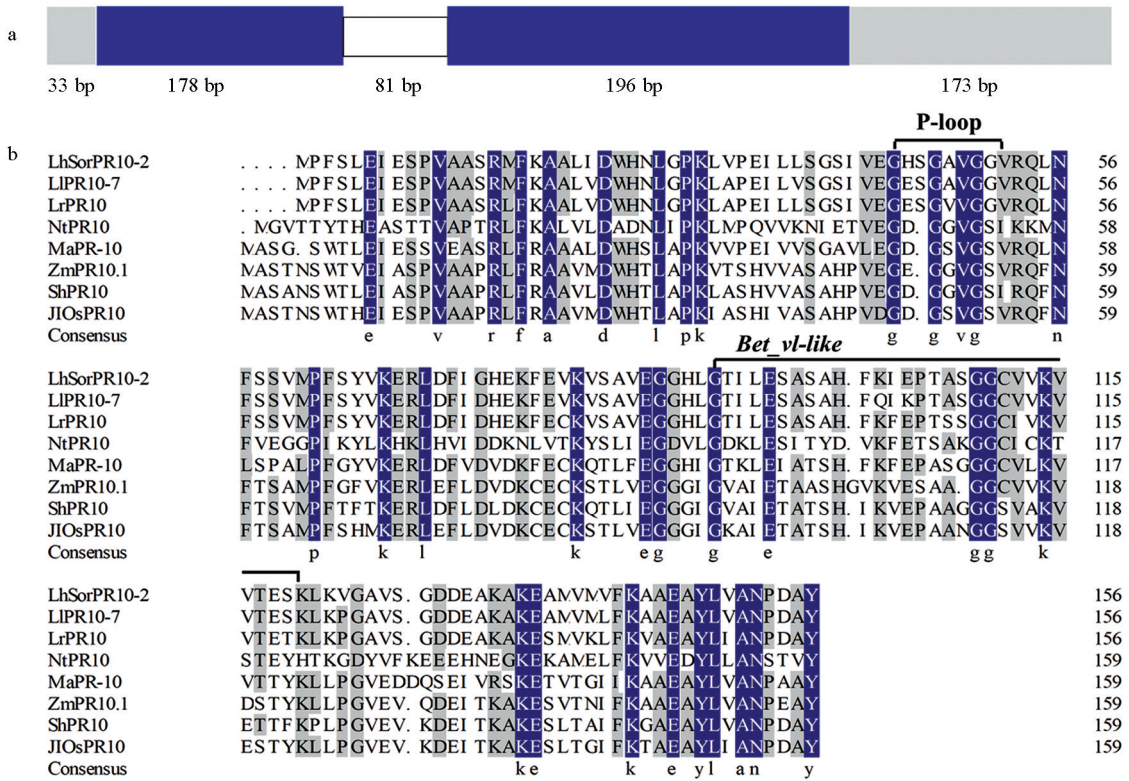
以百合“索邦”叶片的 cDNA 为模板, RT-PCR 扩增获得 680 bp 的 *LhSorPR10-2* 基因序列, 包含 474 bp 的开放阅读框, 编码 157 个氨基酸, $5'\text{UTR}$ 和 $3'\text{UTR}$ 的长度分别为 33 bp 和 173 bp. 此外, 以百合“索邦”叶片的基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 将 *LhSorPR10-2* 的 cDNA 与 DNA 序列进行比对, 发现含有 81 bp 的内含子(图 1a). *LhSorPR10-2* 蛋白分子量为 16.6 KD, 理论 PI 值为 5.72, 为稳定蛋白和疏水性蛋白, 并且不具有跨膜结构和信号肽, 对 *LhSorPR10-2* 进行亚细胞定位预测发现其定位在细胞质中.

使用 DNAMAN 对 *LhSorPR10-2* 蛋白的氨基酸序列进行多序列比对(图 1b), 发现其具有 PR10 蛋白保守结构域 P-loop 和 Bet_v1-like. 与麝香百合(AAD17336.1)、岷江百合(KF746434.1)、芭蕉(UED15065.1)、甘蔗(AMQ67074.1)、玉米(ADA68331.1)和水稻(AAL74406.1)这 6 个单子叶植物的 PR10 蛋白相似性较高, 分别为 94.2%, 88.3%, 57.8%, 53.2%, 53.2% 和 53.2%(图 1b). 利用 MEGA7.0 构建 *LhSorPR10-2* 蛋白系统进化树, 结果如图 2, *LhSorPR10-2* 与麝香百合 LIPR107 关系最近, 与麝香百合(*Lilium longiflorum*)和岷江百合(*Lilium regale*)的 PR10 家族成员聚在一起, 并与其他单子叶植物如水稻(*Oryza sativa*)、玉米(*Zea mays*)等 PR10 同源蛋白聚类在一支.

2.2 百合 *LhSorPR10-2* 基因表达模式分析

2.2.1 *LhSorPR10-2* 组织表达特性分析

设计基因表达检测特异引物, 采用实时荧光定量 PCR 来检测基因的表达特性. 结果发现 *LhSorPR10-2* 基因在百合“索邦”不同组织中表达的差异有统计学意义, 主要在叶和花瓣中有表达, 并在叶中表达量最高, 花瓣次之, 在叶片中的基因表达量为花瓣表达量的 8 倍左右. 而在其余的组织中基因表达量均较低, 在花药中几乎不表达(图 3).



a: 为 *LhSorPR10-2* 基因示意图, 外显子用蓝色区域表示, 内含子用白色区域表示, 非翻译区用灰色区域表示; b: 为 *LhSorPR10-2* 和来自不同植物物种的其他 PR10 蛋白的多重比对。Ll: 麝香百合; Lr: 岷江百合; Nt: 烟草; Ma: 芭蕉; Zm: 玉米; Sh: 甘蔗; JIOs: 水稻。

图 1 *LhSorPR10-2* 序列分析

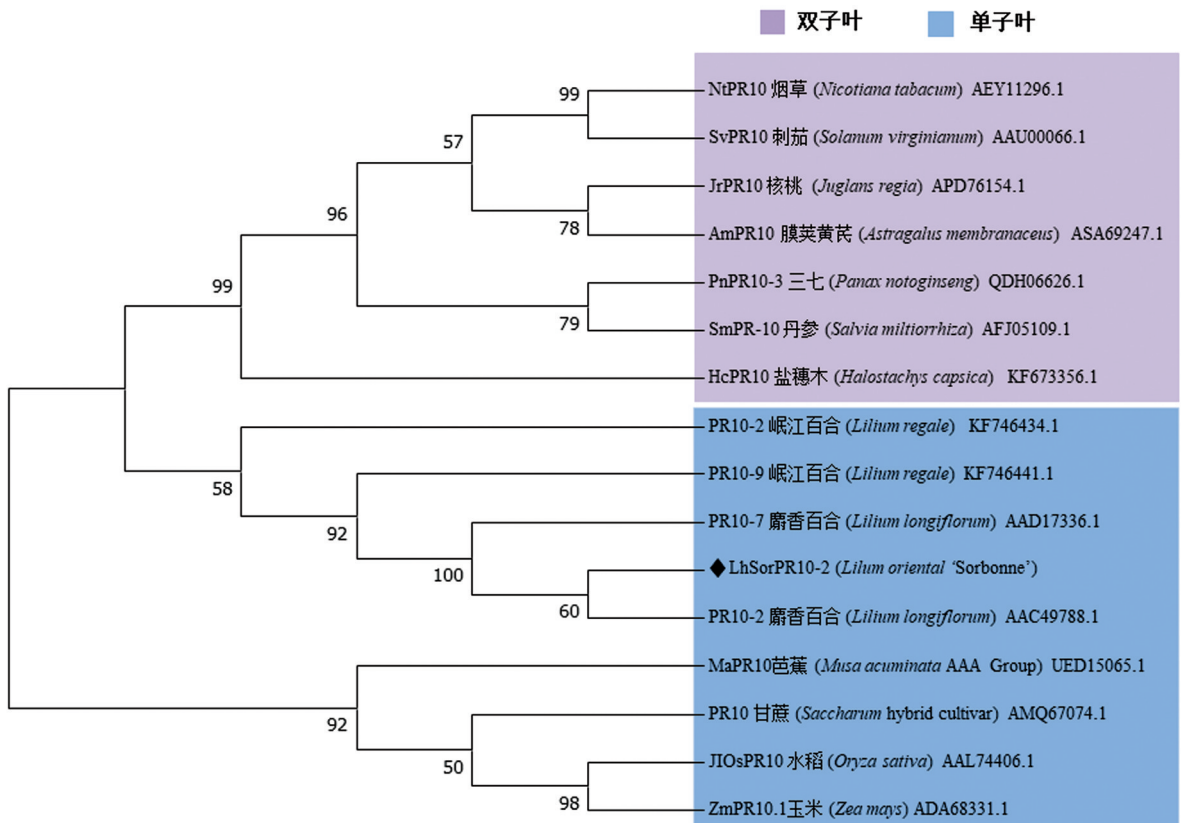


图 2 PR10 同源蛋白的系统进化树分析

2.2.2 *LhSorPR10-2* 基因的生物胁迫诱导特性分析

百合“索邦”叶片在灰霉菌和尖孢镰刀菌侵染后, 叶片中 *LhSorPR10-2* 基因的相对表达量均显著升高, 表达量始终高于对照且差异有统计学意义. 在接种灰霉菌后, *LhSorPR10-2* 基因表达量呈现逐渐升高的趋势, 6 h, 12 h, 36 h 和 48 h 时分别为对照的 1.6 倍、0.9 倍、2.7 倍、2.9 倍和 9.5 倍, 表明灰霉菌能诱导该基因的表达. 在接种尖孢镰刀菌后, *LhSorPR10-2* 基因表达量呈现先升高后降低再升高的趋势, 而在对照中几乎不表达, 表明尖孢镰刀菌显著诱导了 *LhSorPR10-2* 基因的表达(图 4). 综上, 灰霉菌和尖孢镰刀菌均能显著诱导 *LhSorPR10-2* 基因的表达, *LhSorPR10-2* 可能参与了百合的抗病过程.

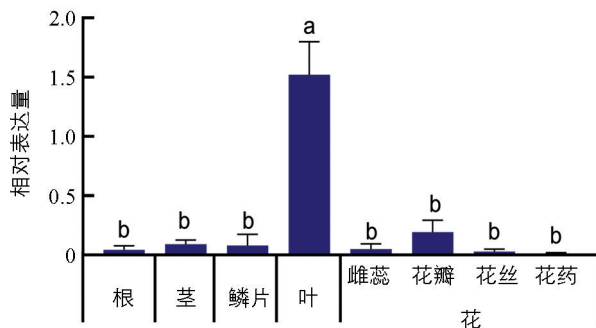


图 3 *LhSorPR10-2* 基因在百合“索邦”不同器官中的相对表达量

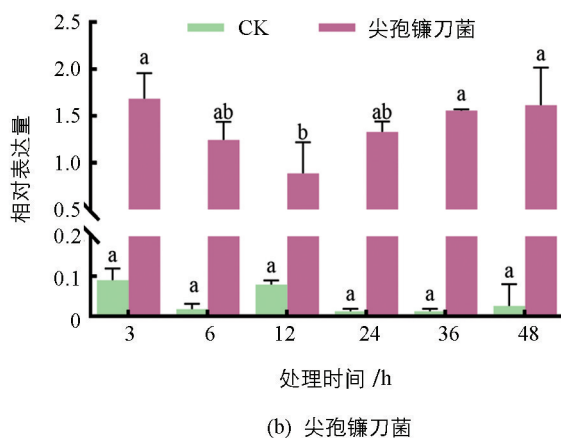
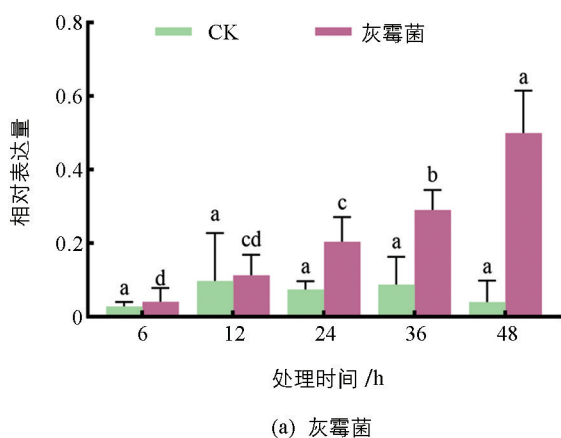


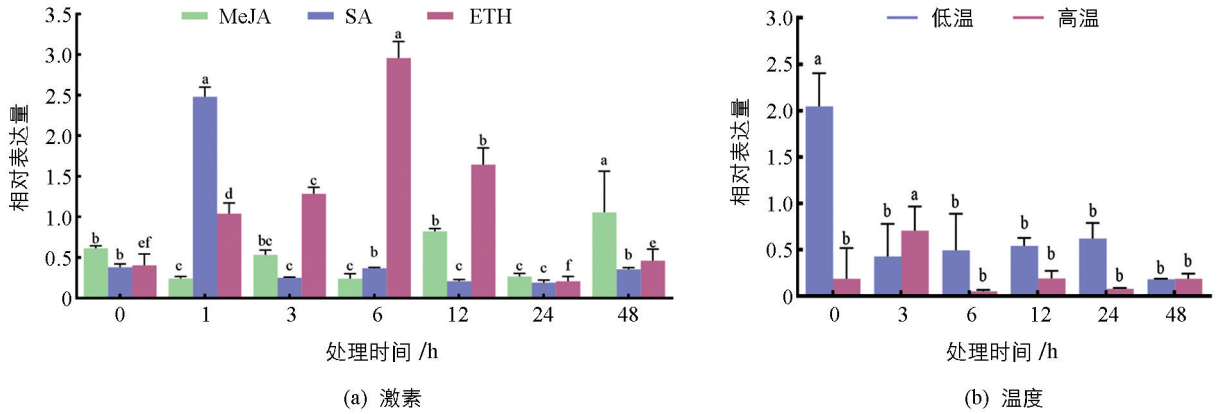
图 4 *LhSorPR10-2* 基因在生物胁迫下的表达分析

2.2.3 *LhSorPR10-2* 基因的非生物胁迫诱导特性分析

在 MeJA, SA 和 ETH 激素诱导下, *LhSorPR10-2* 基因的表达量情况各不相同(图 5). MeJA 处理后, *LhSorPR10-2* 表达量变化不大, 在 48 h 达到最高, 6 h 达到最低; SA 处理后, *LhSorPR10-2* 表达量呈现先升高后降低的趋势, 并在 1 h 表达量最高; ETH 处理后, *LhSorPR10-2* 表达量也呈现为先增高后降低的表达模式, *LhSorPR10-2* 在 6 h 表达量最高. 结果表明 *LhSorPR10-2* 基因表达受激素诱导表达, 但是不同激素的应答机制可能不同. 分别检测高温和低温胁迫对 *LhSorPR10-2* 基因表达的影响, 结果发现, 高温处理下的 *LhSorPR10-2* 基因表达量较低, 表现为先升高后降低的表达趋势, 在 3 h 时表达量达到最高, 48 h 表达量最低. 低温处理后 *LhSorPR10-2* 的表达量逐渐降低. 结果表明低温和高温胁迫均能一定程度上影响 *LhSorPR10-2* 基因的表达(图 5).

2.3 *LhSorPR10-2* 基因启动子顺式作用元件分析

通过 PlantCARE 对 *LhSorPR10-2* 启动子序列进行顺式调控元件分析, 发现该序列含有的元件有 15 个, 除了包含转录必备元件 TATA-Box 和 CAAT-Box 之外, 还含有 5 种光响应元件(AE-Box, GATA-motif, GT1-motif, TCT-motif 和 Sp1). 无氧诱导所必需的顺式作用调节元件 ARE, 参与胚乳表达的顺式调控元件 GCN4_motif, 赤霉素反应元件 P-box, 参与蛋白代谢调节的顺式作用元件 O2-site, MYC 特异识别位点和 MYB 识别位点(表 3). 这些顺式作用元件表明 *LhSorPR10-2* 基因可能响应光信号、植物激素和逆境胁迫.

图 5 *LhSorPR10-2* 基因在非生物胁迫下的表达分析表 3 *LhSorPR10-2* 基因的启动子顺式作用元件分析

顺式作用元件种类	数量	保守序列	生物学功能
AE-box	1	AGAACTT	光响应模块的一部分
ARE	3	AAACCA	无氧诱导所必需的顺式作用调节元件
CAAT-box	17	CAAT 或 CAACCAACTCC	启动子和增强子区域的共同顺式作用元件
GATA-motif	1	GATAGGA	光响应元件的一部分
GCN4_motif	1	TGAGTCA	参与胚乳表达的顺式调控元件
GT1-motif	1	GGTTAA	光响应元件
O2-site	2	GATGACATGG	参与玉米醇溶蛋白代谢的顺式作用调节元件
P-box	1	CCTTTTG	赤霉素反应元件
Sp1	1	GGGCGG	光响应元件
TATA-box	21	TATACA 或 TATA	转录起始点-30 附近的核启动子元件
TCT-motif	1	TCTTAC	光响应元件的一部分
Unnamed_1	2	CGTGG 或 GAATTTAATTAA	60K 蛋白结合位点
MYB	6	TAACCA 或 CAACCA	功能未知
MYB-like sequence	3	TAACCA	功能未知
MYC	3	CATGTG	功能未知

3 结论与讨论

本研究从百合“索邦”中分离并克隆获得 *LhSorPR10-2* 基因,全长 761 bp,开放阅读框为 474 bp,编码 158 个氨基酸,等电点为 5.72,含有一个内含子,这与华东葡萄、岷江百合和月季等克隆获得的 *PR10* 同源基因结果相似^[20-22]。生物信息学分析发现 *LhSorPR10-2* 蛋白分子量为 16.6 KD,理论 PI 值为 5.72,为稳定蛋白和疏水性蛋白,不具跨膜结构和信号肽,并且存在于细胞质内,这与大多数研究 *PR10* 蛋白家族的序列和结构特征结果一致^[13, 23]。系统进化分析发现 *LhSorPR10-2* 与麝香百合 *LIPR107* 关系最近,并与麝香百合和岷江百合的 *PR10* 家族成员聚集在一起,推测其可能具有相似的功能。

PR 蛋白广泛分布于植物所有器官,在叶中特别丰富,并占叶片中总蛋白质的 5%~10%^[11]。本研究中组织表达特性分析发现 *LhSorPR10-2* 基因主要在叶和花瓣中有表达,并在叶中表达量最高,这与已有的研究结果一致。植物在自然环境中不可避免地会受到各种生物及非生物的胁迫,而 *PR10* 蛋白对于植物防御具有重要作用^[24]。番红花 *CsPR10* 具有抗尖孢镰刀菌活性,通过激活茉莉酸途径,从而参与防御反应^[25]。辣椒真菌抗性品种和易感品种在真菌感染后,只有具真菌抗性的辣椒中有 *bacPR10* 基因

表达量的积累,表明该基因在逆境防御中可能具有重要功能^[26]。菠菜 *SoPR10* 的表达受硝酸盐胁迫和其他非生物胁迫包括聚乙二醇、NaCl、水杨酸和 H₂O₂ 的诱导,表明其可能在硝酸盐胁迫和其他逆境下发挥重要作用^[24]。

茉莉酸甲酯(MeJA)、水杨酸(SA)和乙烯利(ETH)等植物激素被描述为植物胁迫中的主要信号分子,其信号通路已被广泛研究^[27-28]。植物受到病原菌侵染后,防御信号通路如水杨酸(SA)和茉莉酸(JA)被激活,进一步导致 PR 蛋白的积累,从而最大限度地减少病原体扩增和未感染植物器官中的病原菌感染^[11]。本研究中,百合“索邦”叶片在接种灰霉菌和尖孢镰刀菌后,*LhSorPR10-2* 基因的相对表达量均明显诱导升高,且表达量始终高于对照且差异有统计学意义,说明 *LhSorPR10-2* 可能参与百合抗真菌的过程。在 MeJA,SA 和 ETH 等外源激素以及高温(50 °C)和低温(0 °C)胁迫处理下,*LhSorPR10-2* 转录水平的表达量表现出不同程度的响应,说明该基因在不同激素处理及温度胁迫中的应答机制可能有所不同。此外,*LhSorPR10-2* 启动子区有与逆境胁迫相关的顺式作用元件,推测其可能在生物及非生物胁迫过程中发挥作用。

本研究在百合“索邦”叶片转录组数据库中筛选获得受灰霉菌侵染后显著诱导表达的病程相关蛋白基因 *LhSorPR10-2*,并克隆得到该基因的全长序列。通过实时定量 PCR 分析了 *LhSorPR10-2* 在百合“索邦”不同组织中的表达模式,以及病原菌处理、不同激素处理、高温及低温胁迫处理后的诱导表达情况,并对其启动子的顺式作用元件进行了分析。然而,*LhSorPR10-2* 基因在百合“索邦”的具体抗病作用以及受灰霉菌诱导后激活了哪些下游基因?*LhSorPR10-2* 如何在百合-灰霉病互作过程中起作用等问题仍有待进一步研究。

参考文献:

- [1] BAKHSHAIE M, KHOSRAVI S, AZADI P, et al. Biotechnological Advances in Lilium [J]. *Plant Cell Reports*, 2016, 35(9): 1799-1826.
- [2] LI J W, ZHANG X C, WANG M R, et al. Development, Progress and Future Prospects in Cryobiotechnology of Lilium Spp [J]. *Plant Methods*, 2019, 15: 125.
- [3] GAO X. Evaluation of Resistance to Botrytis Elliptica in Lilium Hybrid Cultivars [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2018, 123: 392-399.
- [4] 陈鸣丽. 百合栽培与病虫害防治技术分析 [J]. *现代园艺*, 2020, 43(22): 17-18.
- [5] 叶世森, 林芳, 宋建英. 百合病害的研究综述 [J]. *西南林学院学报*, 2005, 25(3): 84-88.
- [6] SELS J. Plant Pathogenesis-Related (PR) Proteins: a Focus on PR Peptides [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2008, 46(11): 941-950.
- [7] SZALONTAI B, JAKAB G. Differential Expression of PRLIPs, a Pathogenesis-Related Gene Family Encoding Class 3 Lipase-Like Proteins in Arabidopsis [J]. *Acta Biologica Hungarica*, 2010, 61: 156-171.
- [8] 王诗宇, 王志兴, 张丽丽, 等. 植物防御反应的研究进展 [J]. *江苏农业科学*, 2021, 49(19): 39-45.
- [9] HAMAMOUCHE N, LI C Y, SEO P J, et al. Expression of Arabidopsis Pathogenesis-Related Genes during Nematode Infection [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2011, 12(4): 355-364.
- [10] ALMEIDA-SILVA F, VENANCIO T M. Pathogenesis-Related Protein 1 (PR-1) Genes in Soybean: Genome-Wide Identification, Structural Analysis and Expression Profiling under Multiple Biotic and Abiotic Stresses [J]. *Gene*, 2022, 809: 146013.
- [11] ALI S, GANAI B A, KAMILI A N, et al. Pathogenesis-Related Proteins and Peptides as Promising Tools for Engineering Plants with Multiple Stress Tolerance [J]. *Microbiological Research*, 2018, 212-213: 29-37.
- [12] ZANDVAKILI N, ZAMANI M, MOTALLEBI M, et al. Cloning, Overexpression and in Vitro Antifungal Activity of Zea Mays *PR10* Protein [J]. *Iranian Journal of Biotechnology*, 2017, 15(1): 42-49.

- [13] FERNANDES H, MICHALSKA K, SIKORSKI M, et al. Structural and Functional Aspects of PR-10 Proteins [J]. The FEBS Journal, 2013, 280(5): 1169-1199.
- [14] SLIWIAK J, SIKORSKI M, JASKOLSKI M. PR-10 Proteins as Potential Mediators of Melatonin-Cytokinin Cross-Talk in Plants: Crystallographic Studies of LLPR-10.2B Isoform from Yellow Lupine [J]. The FEBS Journal, 2018, 285(10): 1907-1922.
- [15] RAJENDRAM A, MOSTAFFA N H, DUMIN W, et al. Dual Activity of Meloidogyne Incognita-Regulated Musa Acuminata Pathogenesis-Related-10 (*MaPR*-10) Gene [J]. Gene, 2022, 809: 146041.
- [16] EL-KEREAMY A, JAYASANKAR S, TAHERI A, et al. Expression Analysis of a Plum Pathogenesis Related 10 (*PR*10) Protein during Brown Rot Infection [J]. Plant Cell Reports, 2009, 28(1): 95-102.
- [17] CHAI N, XU J, ZUO R M, et al. Metabolic and Transcriptomic Profiling of Lilium Leaves Infected with Botrytis Elliptica Reveals Different Stages of Plant Defense Mechanisms [J]. Frontiers in Plant Science, 2021, 12: 730620.
- [18] WANG C S, HUANG J C, HU J H. Characterization of Two Subclasses of PR-10 Transcripts in Lily Anthers and Induction of Their Genes through Separate Signal Transduction Pathways [J]. Plant Molecular Biology, 1999, 40(5): 807-814.
- [19] HSU S W, LIU M C, ZEN K C, et al. Identification of the Tapetum/Microspore-Specific Promoter of the Pathogenesis-Related 10 Gene and Its Regulation in the Anther of Lilium Longiflorum [J]. Plant Science, 2014, 215-216: 124-133.
- [20] 吴林, 李洪雷, 姜玉松, 等. 月季 *RhPR*10.2 基因克隆及生物学功能分析 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2018, 40(8): 8-15.
- [21] 张响玲, 张延龙, 牛立新, 等. 岷江百合中黄瓜花叶病毒诱导的 *LrPR*10 的克隆及表达分析 [J]. 园艺学报, 2014, 41(6): 1218-1226.
- [22] 赵霄晨. 华东葡萄病程相关蛋白 *VpPR*10.1 基因功能分析 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2012.
- [23] 卢一鹏, 李伟, 孙楠, 等. 植物病程相关蛋白 *PR*10 结构、功能及表达调控的研究进展 [J]. 湖北农业科学, 2016, 55(2): 273-279, 284.
- [24] BAI X, LONG J, HE X, et al. Molecular Cloning and Characterization of Pathogenesis-Related Protein Family 10 Gene from Spinach (*SoPR*10) [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2014, 78(5): 780-786.
- [25] GÓMEZ-GÓMEZ L, RUBIO-MORAGA A, AHRAZEM O. Molecular Cloning and Characterisation of a Pathogenesis-Related Protein *CsPR*10 from Crocus Sativus [J]. Plant Biology (Stuttgart, Germany), 2011, 13(2): 297-303.
- [26] SOH H C, PARK A R, PARK S, et al. Comparative Analysis of Pathogenesis-Related Protein 10 (*PR*10) Genes between Fungal Resistant and Susceptible Peppers [J]. European Journal of Plant Pathology, 2012, 132(1): 37-48.
- [27] CHAKRAVARTHI M, SYAMALADEVI D P, HARUNIPRIYA P, et al. A Novel *PR*10 Promoter from Erianthus Arundinaceus Directs High Constitutive Transgene Expression and is Enhanced Upon Wounding in Heterologous Plant Systems [J]. Molecular Biology Reports, 2016, 43(1): 17-30.
- [28] 刘新亮, 蔡金峰, 王欢利, 等. 银杏 *GbSAD* 基因对非生物胁迫的响应及原核表达 [J]. 东北林业大学学报, 2015, 43(12): 1-6.

责任编辑 王新娟