

# 结球白菜和拟南芥防御素基因的鉴定与比较分析

蒋明<sup>1</sup>, 张志仙<sup>2</sup>, 钱宝英<sup>1</sup>, 李金枝<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>台州学院生命科学学院, 临海 317000; <sup>2</sup>台州市农业科学研究院, 临海 317000)

**摘要:**植物防御素是一类富含半胱氨酸的小分子蛋白,在抗病反应中起着重要作用。本研究以结球白菜和拟南芥基因组序列为材料,利用生物信息学手段进行基因鉴定、染色体定位和进化分析。结果表明,结球白菜有 11 个防御素基因成员,数量少于拟南芥(15 个),基因组 DNA 全长 183 ~ 637 bp,开放阅读框全长 183 ~ 363 bp;除结球白菜 Bra029208 序列外,其余防御素基因均有 1 个内含子;基因定位结果表明,一些基因成簇分布,推测由串联重复所致,拟南芥的 3 号、结球白菜的 1、4、5 和 10 号染色体均没有防御素基因的分布;进化分析结果表明,26 个防御素成员可分为三大类,Ⅰ类有 10 条序列,Ⅱ类 13 条,Ⅲ类最少,仅 3 条。

**关键词:**结球白菜; 防御素基因; 序列分析; 染色体定位; 进化分析

**Genome-wide identification and comparative analysis of defensin genes from Chinese cabbage and *Arabidopsis thaliana*** JIANG Ming<sup>1</sup>, ZHANG Zhi-xian<sup>2</sup>, QIAN Bao-ying<sup>1</sup>, LI Jin-zhi<sup>1</sup> (<sup>1</sup>College of Life Science, Taizhou University, Linhai 317000, China; <sup>2</sup>Taizhou Academy of Agricultural Research, Linhai 317000, China)

**Abstract:** Plant defensins are low-molecular-weight cysteine-rich proteins, and play important roles in disease resistance response. Defensin gene identification, chromosomal location and evolution analysis were performed by bioinformatics methods taking genome sequences of Chinese cabbage and *Arabidopsis thaliana* as materials. The results revealed 11 defensin gene members in Chinese cabbage, less than those in *A. thaliana* (15). The full genomic DNA was 183 – 637 bp in length with open reading frames varying from 183 – 363 bp. All defensin genes contained an intron except Bra029208 from Chinese cabbage. Chromosomal location results showed few sets of genes clustered on chromosomes, and this phenomenon was speculated to be caused by tandem repeat. Evolutionary analysis indicated that the 26 defensin members could be divided into 3 types. There were 10 and 13 members in type I and type II defensin, respectively. However, only 3 members were found in type III defensin.

**Key words:** Chinese cabbage; defensin gene; sequence analysis; chromosomal location; evolution analysis

中图分类号: S436.3

文献标识码: A

文章编号: 0412-0914(2013)04-0368-08

植物受病原菌侵染,一系列防卫反应被激活,类黄酮、酚类、萜类和生物碱类物质大量产生,以阻碍或减缓病原菌在植物体内生长与繁殖<sup>[1,2]</sup>。植保素、木质素和防御素等都是防卫反应过程中诱导或积累的重要抗病物质,它们在抗病反应中起着重要的调控作用<sup>[3~5]</sup>。植物防御素是一类富含半胱

氨酸的小分子碱性蛋白,保守区由 45-54 个氨基酸残基组成,它们的分子结构与昆虫、哺乳动物和真菌的防御素相仿,大部分植物防御素具有抗菌活性<sup>[6]</sup>,一些则与抗虫、耐重金属和抗冻等相关<sup>[7~9]</sup>。将萝卜防御素基因 *RsAFP2* 导入烟草,提高了对赤星病菌 (*Alternaria longipes*) 的抗性<sup>[10]</sup>;将二月兰

收稿日期: 2012-10-20; 修回日期: 2013-04-15

基金项目: 浙江省公益性技术应用研究计划项目(2012C32011); 台州市科技计划项目(121KY16)

第一作者: 蒋明,男,浙江嵊州人,博士,副教授,主要从事植物发育生物学及其分子调控研究; E-mail: jiangming1973@139.com。

防御素基因导入甘蓝型油菜 (*Brassica napus*), 对菌核病 (*Sclerotinia sclerotiorum*) 的抗性显著增强<sup>[11]</sup>; 利用花粉管通道法将兔防御素 *NP-I* 基因导入小麦品种 G8901, 增强了对白粉病、叶锈病和条锈病的免疫力与抗性<sup>[12]</sup>。

近年来, 在银杏 (*Ginkgo biloba*)<sup>[13]</sup>、玉米 (*Zea mays*)<sup>[14]</sup>、蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula*)<sup>[15]</sup>、山葵 (*Wasabia japonica*)<sup>[16]</sup>、药西瓜 (*Colocynthis citrullus*)<sup>[17]</sup>、小麦 (*Triticum aestivum*)<sup>[9]</sup> 和油棕 (*Elaeis guineensis*)<sup>[18]</sup> 等植物中克隆到了防御素或类防御素基因。在十字花科植物二月兰 (*Orychophragmus violaceus*)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、结球白菜 (*B. rapa* ssp. *pekinensis*) 和萝卜 (*Raphanus sativus*) 中也有此类基因克隆的报道<sup>[11, 19-21]</sup>。结球白菜又名大白菜, 为十字花科 (Cruciferae) 芸薹属叶用蔬菜, 原产我国, 由于营养丰富、风味独特, 深受消费者的喜爱, 有“菜中之王”的美称。结球白菜的基因组测序已经顺利完成<sup>[22]</sup>, 为基因克隆、进化分析和全基因组鉴定奠定了基础。本研究以结球白菜和拟南芥基因组数据为材料, 进行防御素基因的挖掘、鉴定和比较分析, 为基因克隆、表达分析和功能鉴定提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

拟南芥防御素基因来自 TAIR 网站 (<http://www.arabidopsis.org>), 共 15 条 (AT1G19610、AT1G55010、AT1G75830、AT5G44420、AT5G44430、AT2G26010、AT2G26020、AT1G61070、AT5G63660、AT2G02100、AT2G02120、AT2G02130、AT2G02140、AT4G30070、AT5G38330), 结球白菜基因组数据来自 BRAD 网站 (<http://brassicadb.org/brad/index.php>)。

### 1.2 防御素基因的鉴定

以 15 条拟南芥防御素基因序列为参照, 利用 BLAST 工具在本地检索结球白菜基因组数据库 ( $P=0.001$ ), 手工剔除无完整开放阅读框 (Open reading frame, ORF) 的序列。候选序列翻译成蛋白质后, 利用 SMART 在线工具 (<http://smart.embl-heidelberg.de>) 检测结构域, 并去除重复序列。

### 1.3 防御素基因结构预测与染色体定位

GSDS (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn>) 是分析基

因结构的网站, 将编码区序列和基因组序列粘贴到相应的输入框中, 获得拟南芥和结球白菜防御素基因的内含子和外显子分布图。根据结球白菜和拟南芥染色体长度、基因位点等信息, 利用软件 MapChart 2.2 将防御素基因标注到相应的染色体上。

### 1.4 系统发育树的构建

用 Clustal X 1.81 对结球白菜和拟南芥的防御素蛋白序列进行联配, 比对时使用默认参数。利用 MEGA 4.0 生成系统发育树, 采用邻接法 (Neighbor-joining method) 自举检测 1 000 次, 其他参数为默认值。

## 2 结果与分析

### 2.1 防御素基因的序列特征

经 tBLASTn 检索、SMART 在线工具鉴定结构域和手工去除冗余序列, 共得到 11 条结球白菜防御素基因序列 (Bra008225、Bra008226、Bra026615、Bra029208、Bra024110、Bra024832、Bra003740、Bra015809、Bra015811、Bra016501 和 Bra017421), 它们的基因组 DNA 全长 183 ~ 637 bp, ORF 全长 183 ~ 363 bp。拟南芥共有 15 条防御素基因序列, 基因组 DNA 全长 326 ~ 942 bp, ORF 全长 222 ~ 390 bp (表 1)。利用 GSDS 服务器分析结球白菜和拟南芥防御素基因的结构, 结果表明, 除结球白菜的 Bra029208 外, 其余序列均具有 1 个内含子, 而 Bra029208 没有内含子 (图 1)。

### 2.2 防御素基因的染色体定位

根据染色体长度、基因位点等信息, 利用 MapChart 软件将防御素基因定位到染色体上。结果表明, 拟南芥的防御素基因分布在 1、2、3 和 5 号染色体, 其中 2 号染色体上最多, 有 6 个, 1 号和 5 号染色体次之, 均为 4 个, 3 号染色体未检测到防御素基因的分布。有 3 组基因成簇分布 (AT2G02100、AT2G02120、AT2G02130 和 AT2G02140; AT2G26010 和 AT2026020; AT5G44420 和 AT5G44430) (图 2)。结球白菜的防御素基因分布在 2、3、6、7、8 和 9 号染色体, 2 号染色体上最多, 有 4 个, 7 号染色体次之, 为 3 个, 3、6、8 和 9 号染色体均只有 1 个, 而其他染色体未检测到防御素基因, 有 2 组基因成簇分布 (Bra008226 和 Bra008-225、Bra015811 和 Bra015809) (图 3)。



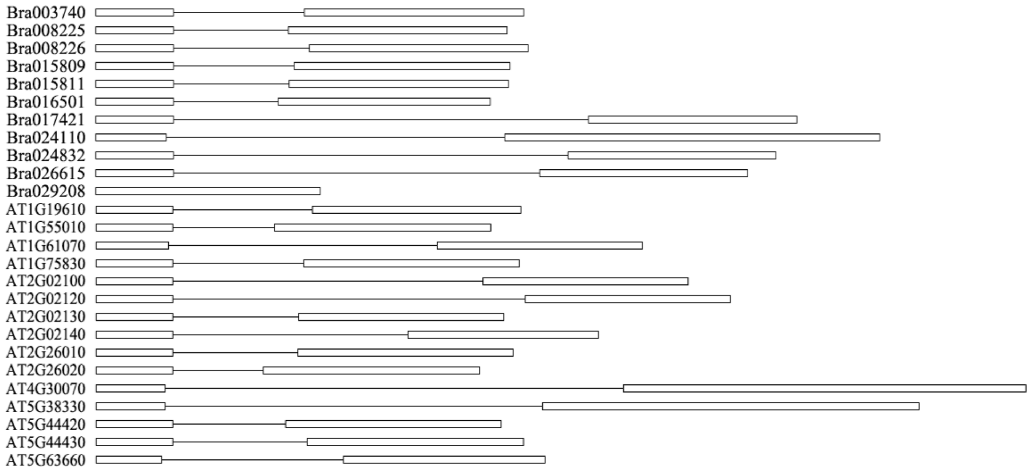


Fig. 1 Gene structure of defensin genes from Chinese cabbage and *Arabidopsis thaliana*  
The boxes indicate exons, and the lines show introns

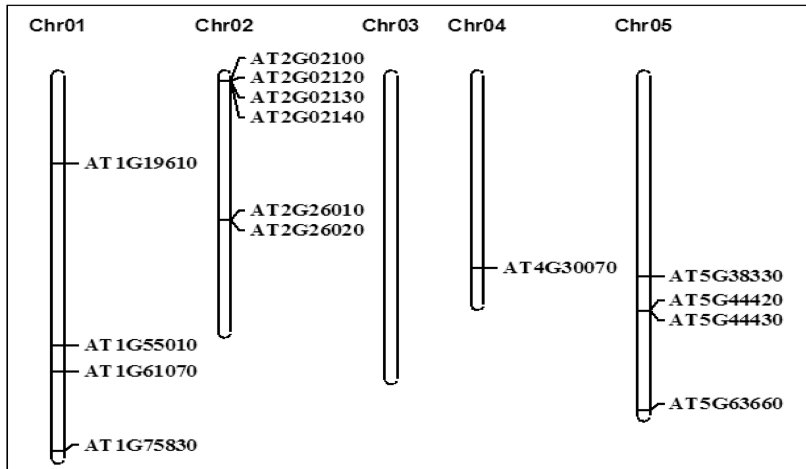


Fig. 2 Chromosomal locations of defensin genes from *Arabidopsis thaliana*

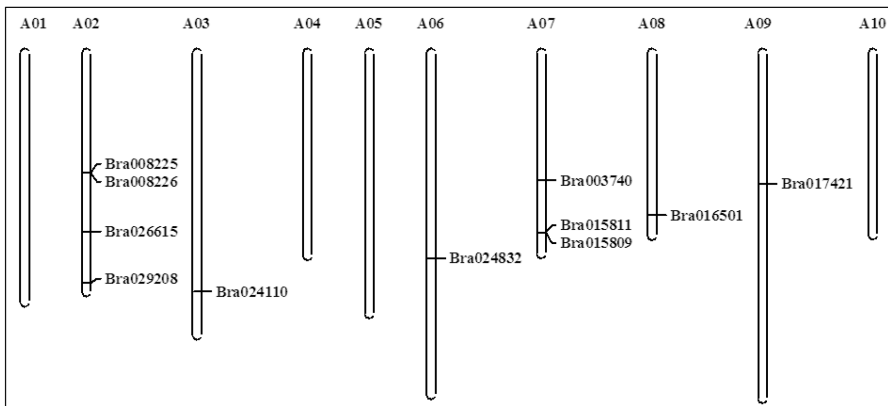


Fig. 3 Chromosomal locations of defensin genes from Chinese cabbage

### 2.3 防御素基因的进化分析

利用 Clustal X 软件对拟南芥和结球白菜的防御素蛋白序列进行多重比对,结果表明,26 条序列的长度范围为 60-129,存在 8 个保守的半胱氨酸残基,分别位于 36、90、99、103、114、124、126 和 130 (图 4)。利用 MEGA 软件生成进化树,26 个氨基

酸序列分成 3 大类,即 Defensin I、II 和 III, I 类有 10 条序列, II 类 13 条, III 类最少,仅 3 条(图 5)。每个大类可分为若干亚类, I 类的 Bra017421、AT2G02130 与 Bra024832、AT2G021120 与 AT2G02100、Bra029208 与 AT5G02140 聚为 3 个亚类,而 Bra026615、AT1G61070 和 AT2G02140 处于不同分支,单独成一个

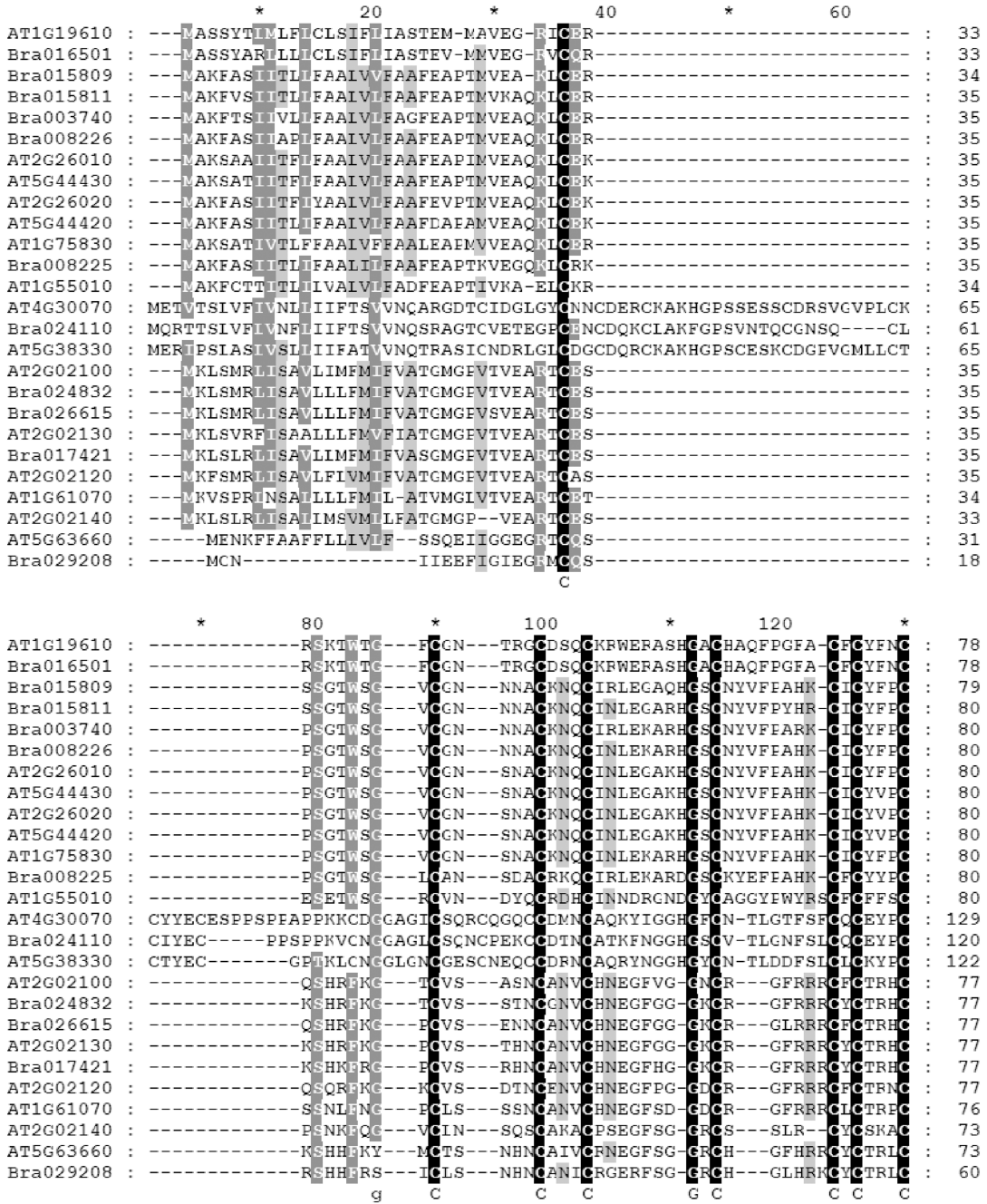


Fig. 4 Sequence comparison of defensin proteins from Chinese cabbage and *Arabidopsis thaliana*



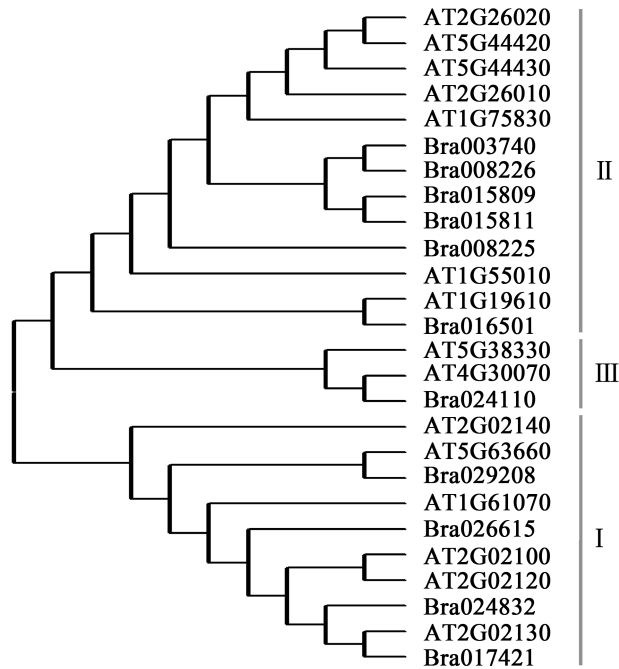


Fig. 5 Phylogenetic tree of defensins constructed with Neighbour-joining method

亚类。Ⅱ类的 AT1G75830、AT2G26010、AT5G44430、AT5G44420 与 AT2G26020、AT1G19610 与 Bra016501、Bra003740 与 Bra008226 以及 Bra015809 与 Bra015811 聚为 4 个亚类,其他成员分别处于不同分支。Ⅲ类仅 3 个成员,先是 Bra024110 与 AT4G30070 聚为一组,而后与 AT5G38330 聚为一类。

### 3 讨论

植物防御素是一类小分子蛋白质,大部分具有广谱抗菌活性,在防卫反应中起着重要作用<sup>[23]</sup>。防御素的三维结构(three-dimensional structure, 3-D 结构)由 1 个  $\alpha$ -螺旋和 3 个  $\beta$ -折叠构成,8 个保守的半胱氨酸由二硫键连接,形成稳定的  $\beta\alpha\beta\beta$  结构<sup>[24]</sup>。尽管它们具有相似的化学构成和 3-D 结构,但它们的氨基酸组成和生物活性各异<sup>[25]</sup>。近年来,已从多种植物中克隆到了防御素基因:Shen 等<sup>[13]</sup>从银杏中克隆到 1 个防御素基因,该基因的 CDS 全长为 243 bp,编码 80 个氨基酸,该基因在损伤或茉莉酮酸甲酯处理时上调表达。Balandin 等<sup>[14]</sup>从玉米中分离到 1 个防御素基因,该基因编码 108 个氨基酸,基因产物在种子发育早期对种胚

起保护作用。防御素基因在结球白菜中也有克隆(*BrD1*),该基因对应本文的 Bra015811,遗传转化结果表明,转 *BrD1* 基因的水稻抗褐飞虱(*Nilaparvata lugens*)能力增强<sup>[20]</sup>。本研究以拟南芥防御素基因序列为参照,从结球白菜中鉴定出 11 条序列,它们的编码氨基酸长度为 60-129,不同类型的防御素序列之间存在较大差异。但是,它们均含 8 个保守的半胱氨酸残基,这些基因在抗病反应中的功能,尚待进一步研究。

基因家族成员来自同一祖先,在漫长的进化过程中,通过复制事件形成的一组结构相似、功能相仿的基因,基因复制是进化的动力之一<sup>[26]</sup>。拟南芥和芸薹属植物的亲缘关系较近,尽管基因组大小存在较大差异,但基因相似性达 87%<sup>[27]</sup>。防御素广泛分布在植物和动物中,土曲霉(*Aspergillus terreus*)中也发现了类似的蛋白结构,说明防御素是一类古老的分子<sup>[28]</sup>。根据氨基酸序列比对结果,Harrison 等将植物防御素分为 2 类,分类结果与生物活性具有相关性<sup>[29]</sup>;De Samblanx 等则根据抗菌活性把防御素分为 3 类<sup>[21]</sup>。在本研究中,拟南芥和结球白菜的防御素基因分属 3 种不同类型,序列组成、数量等存在一定的差异。另外,一些基

因成簇分布在染色体上,推测结球白菜祖先种与拟南芥分化后,防御素基因发生了不同程度的复制和丢失事件。

以拟南芥和结球白菜基因组为材料,利用生物信息学手段鉴定了结球白菜的防御素基因,并将它与拟南芥的防御素基因进行了比对和序列分析,为基因克隆、表达、功能验证和转基因抗病材料的创制奠定了基础。

## 参考文献

- [1] Treutter D. Significance of flavonoids in plant resistance and enhancement of their biosynthesis [J]. *Plant Biology*, 2005, 7(6): 581–591.
- [2] Thevissen K, Osborn R W, Acland D P, *et al.* Specific binding sites for an antifungal plant defensin from dahlia (*Dahlia merckii*) on fungal cells are required for antifungal activity [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2000, 13(1): 54–61.
- [3] Kuć J. Phytoalexins, stress metabolism, and disease resistance in plants [J]. *Annual Review of Phytopathology*, 1995, 33: 275–297.
- [4] Thevissen K, Cammue B P, Lemaire K, *et al.* A gene encoding a sphingolipid biosynthesis enzyme determines the sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to an antifungal plant defensin from dahlia (*Dahlia merckii*) [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(17): 9531–9536.
- [5] Thomma B P, Eggermont K, Penninckx I A, *et al.* Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95(25): 15107–15111.
- [6] Mygind P H, Fischer R L, Schnorr K M, *et al.* Plectasin is a peptide antibiotic with therapeutic potential from a saprophytic fungus [J]. *Nature*, 2005, 437(7061): 975–980.
- [7] Lin K F, Lee T R, Tsai P H, *et al.* Structure-based protein engineering for alpha-amylase inhibitory activity of plant defensin [J]. *Proteins*, 2007, 68(2): 530–540.
- [8] Mirouze M, Sels J, Richard O, *et al.* A putative novel role for plant defensins: a defensin from the zinc hyper-accumulating plant, *Arabidopsis halleri*, confers zinc tolerance [J]. *The Plant Journal*, 2006, 47(3): 329–342.
- [9] Koike M, Okamoto T, Tsuda S, *et al.* A novel plant defensin-like gene of winter wheat is specifically induced during cold acclimation [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2002, 298(1): 46–53.
- [10] Terras F R, Eggermont K, Kovaleva V, *et al.* Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense [J]. *Plant Cell*, 1995, 7(5): 573–588.
- [11] Wu J, Wu L T, Liu Z B, *et al.* A plant defensin gene from *Orychophragmus violaceus* can improve *Brassica napus* resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* [J]. *African Journal of Biotechnology*, 2009, 8(22): 6101–6109.
- [12] Zhou C J, Ge R C, Zhao B C, *et al.* Study on transgenic wheat with rabbit defensin (NP-1) via the pollen-tube pathway (in Chinese) [J]. *Acta Agriculturae Boreali Sinica* (华北农学报), 2007, 22(2): 26–28.
- [13] Shen G, Pang Y, Wu W, *et al.* Molecular cloning, characterization and expression of a novel jasmonate-dependent defensin gene from *Ginkgo biloba* [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2005, 162(10): 1160–1168.
- [14] Balandin M, Royo J, Gomez E, *et al.* A protective role for the embryo surrounding region of the maize endosperm, as evidenced by the characterisation of ZmESR-6, a defensin gene specifically expressed in this region [J]. *Plant Molecular Biology*, 2005, 58(2): 269–282.
- [15] Hanks J N, Snyder A K, Graham M A, *et al.* Defensin gene family in *Medicago truncatula*: structure, expression and induction by signal molecules [J]. *Plant Molecular Biology*, 2005, 58(3): 385–399.

- [16] Kanzaki H, Nirasawa S, Saitoh H, *et al.* Overexpression of the wasabi defensin gene confers enhanced resistance to blast fungus (*Magnaporthe grisea*) in transgenic rice [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2002, 105(6-7): 809-814.
- [17] Ntui V O, Thirukkumaran G, Azadi P, *et al.* Stable integration and expression of wasabi defensin gene in "Egusi" melon (*Colocynthis citrullus* L.) confers resistance to *Fusarium* wilt and *Alternaria* leaf spot [J]. *Plant Cell Reports*, 2010, 29(9): 943-954.
- [18] Tregear J W, Morcillo F, Richaud F, *et al.* Characterization of a defensin gene expressed in oil palm inflorescences: induction during tissue culture and possible association with epigenetic somaclonal variation events [J]. *The Journal of Experimental Botany*, 2002, 53(373): 1387-1396.
- [19] Brown R L, Kazan K, McGrath K C, *et al.* A role for the GCC-box in jasmonate-mediated activation of the PDF1.2 gene of *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2003, 132(2): 1020-1032.
- [20] Choi M S, Kim Y H, Park H M, *et al.* Expression of BrD1, a plant defensin from *Brassica rapa*, confers resistance against brown plant hopper (*Nilaparvata lugens*) in transgenic rices [J]. *Molecules and Cells*, 2009, 28(2): 131-137.
- [21] De Samblanx G W, Goderis I J, Thevissen K, *et al.* Mutational analysis of a plant defensin from radish (*Raphanus sativus* L.) reveals two adjacent sites important for antifungal activity [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(2): 1171-1179.
- [22] Wang X, Wang H, Wang J, *et al.* The genome of the mesopolyploid crop species *Brassica rapa* [J]. *Nature Genetics*, 2011, 43(10): 1035-1039.
- [23] Sels J, Delauré S L, Aerts A M, *et al.* Use of a PTGS-MAR expression system for efficient in planta production of bioactive *Arabidopsis thaliana* plant defensins [J]. *Transgenic Research*, 2007, 16: 531-538.
- [24] Thomma B P, Cammue B P, Thevissen K. Plant defensins [J]. *Planta*, 2002, 216(2): 193-202.
- [25] Lay F T, Anderson M A. Defensins-components of the innate immune system in plants [J]. *Current Protein and Peptide Science*, 2005, 6: 85-101.
- [26] De Grassi A, Lanave C, Saccone C. Genome duplication and gene-family evolution: the case of three OXPPOS gene families [J]. *Gene*, 2008, 421(1-2): 1-6.
- [27] Cavell A C, Lydiat D, Parkin I A P, *et al.* Colinearity between a 30-centimorgan segment in *Arabidopsis thaliana* chromosome 4 and duplicated regions within the *Brassica napus* genome [J]. *Genome*, 1998, 41: 62-69.
- [28] Zhu S. Discovery of six families of fungal defensin-like peptides provides insights into origin and evolution of the CSalphabeta defensins [J]. *Molecular Immunology*, 2008, 45(3): 828-838.
- [29] Harrison S J, Marcus J P, Goulter K C, *et al.* An antimicrobial peptide from the Australian native *Hardenbergia violacea* provides the first functionally characterised member of a subfamily of plant defensins [J]. *Australian Journal of Plant Physiology*, 1997, 24: 571-578.