

百合抗病性防禦基因之 cDNA 選殖及表現分析

cDNA cloning and expression analysis of defense genes involved in disease resistance of lily

計畫編號：NSC 87-2313-B002-043

執行期間：86年8月1日 至 87年7月31日

計畫主持人：陳昭瑩

執行單位：臺灣大學植物病蟲害學系

(87年8月1日起為植物病理學系)

一、中英文摘要

防禦反應有關。

抽取百合葉片全 RNA 進行圓點斑跡雜合分析，以大麥、燕麥及菜豆抗病相關基因作為探針，在水楊酸處理的百合葉片中可偵測到類似防禦基因表現加強的情形。與大麥 PR-4, 14-3-3, chalcone synthase 及燕麥 *tlp* 類似的基因可能存在於百合中，且可能為水楊酸所誘導表現。為進行北方雜合分析，首先以 PCR 法釣取百合 18S rDNA，並完成分子選殖及序列的確認。續以 RT-PCR 自百合葉片全 RNA 中釣取化學物質誘導性防禦基因的 cDNA 片段。由已知幾丁質分解酵素基因及大麥 PR-4, 燕麥 *tlp* 核酸序列設計引子，進行 RT-PCR，釣取百合有抑菌功能的基因 cDNA 片段。在大麥 PR-4 引子的 RT-PCR 反應中獲得了與番茄低溫表現的 cysteine proteinase 有 32% 相似度的 cDNA 片段，可能與百合的

In the dot blot analysis with total RNA of lily leaves treated with salicylic acid (SA), the barley PR-4, 14-3-3, chalcone synthase and oat *tlp* gene probes detected stronger signals, indicating that related genes may present in lily and are SA inducible. In order to perform northern hybridization analysis, the 18S rDNA of lily was cloned and sequenced after PCR amplification. In order to clone the cDNA fragments of defense genes of lily in response to the induction of chemicals, RT-PCR was performed using primers designed according to the sequences of chitinase, barley PR-4, and oat *tlp* genes. A cDNA fragment with similar size to the prediction was amplified. The amino acid sequence showed 32% similarity to

that of cysteine proteinase of tomato, a protein expressed in cold temperature. This cDNA fragment was presumed related to the defense reaction of lily.

二、計畫緣由與目的

已知水楊酸及 probenazole 可誘導百合產生對灰黴病的抗性 (Chen and Huang, 1997; Lu and Chen, 1998)。誘導抗病反應發生的時候，許多植物防禦基因如 PR 基因會被誘導表現。水楊酸可誘導煙草、阿拉伯芥等植物 PR 基因的表現 (Palva *et al.*, 1994; Ward *et al.*, 1991); probenazole 也可以促進水稻、阿拉伯芥及煙草 PR 基因的表現 (Midoh and Iwata, 1996, 1997; Nakashita *et al.*, 1997)。在植物防禦蛋白質中，有許多是具有抑制真菌生長的作用，如 PR-2, PR-3, PR-4, PR-5 等。已知大麥 PR-4 蛋白質是一個具有抑制真菌生長活性 (antifungal activity) 的蛋白質，可與大麥的 PR3 蛋白質 (即幾丁質分解酵素) 及 PR-5 蛋白質有協力抑菌的作用；燕麥 PR-5 蛋白質也具有抑菌的作用 (Heigaard *et al.*, 1992; Lin *et al.*, 1996)。幾丁質分解酵素在許多植物抵抗微生物或害蟲為害時所產生的防禦性蛋白質，可以分解真菌細胞壁以及節肢動物外殼 (Meins *et al.*, 1994; Schlumbaum *et al.*, 1986)。幾丁質分解酵素種類甚多，目前至少已有六類，Class 的抑菌效果最強；Class 幾丁質分解酵素與 Class I 幾丁質分解酵素氨基酸序列十分接近，僅 catalytic domain 有些微差異 (Collinge *et al.*, 1993; Levorson and Chlan, 1997)。在本研

究中，希望以現有的防禦基因探針鑑定出百合中在誘導抗病反應中有增強表現的防禦基因，並希望針對有抑菌活性的防禦基因作進一步的研究。

三、結果與討論

以來自大麥 peroxidase (wir3), PAL (pp15), beta-1,3-glucanase (PR-3), PR-4, chalcon synthase (CHS14), glucose-regulating protein (GRP94), germin-like protein 等基因、燕麥 PR-5 (*tlp*) 基因、菜豆 protein kinase regulator 基因 (14-3-3) 探針分析百合防禦基因表現情形時，顯示百合誘導抗病性可能與類似於大麥 PR-4、大麥 CHS14、燕麥 *tlp*、菜豆 14-3-3 等基因的表現有關。由於以這些源於其他植物的防禦基因作為探針，無法順利進行北方轉漬分析，以瞭解百合防禦基因誘導表現的情形，故嘗試選殖百合相關基因的 cDNA，以便作為探針，來分析百合防禦基因誘導表現情形，增進對百合系統性誘導抗病特性的瞭解。

由於大麥 PR-4 蛋白質及燕麥 Tlp 蛋白質均有抑制真菌生長的作用 (Heigaard *et al.*, 1992; Lin *et al.*, 1996)，故也希望藉此獲得具有抑菌活性的基因，作為植病防治，建立抗病植物的有用基因資源。

(一) 百合 *tlp* 類似基因之選殖

根據燕麥 *tlp* 序列設計引子組 88-402, 5'-ATCACCAACA ACTGCGGCTTC-3'; 89-402, 5'-GGTGATCTGGTAGT TGCTGTTG-3'; 90-402, 5'-GT GCCAGC GCGG CCACCTTC-3'，以百合基因組 DNA 及水楊酸處理的全 RNA 為模版，進行 PCR 及 RT-PCR。僅以基因組 DNA

為模版時，可增殖一大小約為 650 bp 的片段；以全 RNA 作為模版並未獲得 RT-PCR 產物。

(二) 百合與大麥 PR-4 類似基因之選殖

以大麥 PR-4 cDNA 序列設計引子組，分別為 082-402, 5'-TGCAGGTTG TCACTGATC-3'; 083-402, 5'-TTAGCT AGCCTTGGATCC-3'; 084-402, 5'-ATG GCGGCACGCCTGATGC-3' 及 085-402, 5'-CTAGTCGCGGCAGTCGACG-3'。先以百合基因組 DNA 為模版，進行 PCR 反應，結果顯示 084-402 與 085-402 引子組可放大出一段大小約 400 bp 的 DNA 片段；但電腦分析並未發現類似的序列。以 probenazole 處理的百合全 RNA 為模版，084-402 與 085-402 為引子組時，可增殖相同大小的 RT-PCR 產物。經分子選殖(命名為 pNTU462)及序列分析顯示所鈎取的 cDNA 片段氨基酸序列(圖一)與番茄 cysteine proteinase 有 32% 相似度。番茄 cysteine proteinase 為低溫表現的蛋白質 (Schaffer and Fisher, 1988)。雖然不如預期地獲得 PR-4 類似基因，但仍鈎取到與逆境有關的防禦基因。

(三) 百合幾丁質分解酵素基因之選殖

根據水稻大麥 Class I 幾丁質分解酵素基因保守序列設計引子：52-402, 5'-GGGGCTACTGCTTCAAG-3'; 69-402, 5'-AACTGCCTCTGCTGCAGC-3'; 70-402, 5'-AACCCGGACCTGGTGGC CACG-3'; 63-402, 5'-TGTAGCAGTCG AGGTTG-3'; 64-402, 5'-GGCGTCATC CAGAACCA-3'。以百合基因組 DNA 為模版，在六組引子中 52-402 及 64-402 可增殖得到一約 550 bp 左右大小

的 PCR 產物，經分子選殖命名為 pNTU204，電腦分析並未發現具有相似性的 DNA 序列。以水楊酸處理的百合葉片全 RNA 為模版，則無法獲得 RT-PCR 產物。

根據菜豆、胡蘿蔔、*Vigna unguiculata* 及葡萄等植物 Class 幾丁質分解酵素基因 catalytic domain 的保守序列，設計引子：065-402, 5'-GG TTACTGTGGCACT-3'; 066-402, 5'-A TAGTTGTAGTTCCA-3'; 067-402, 5'-CGCGAGATTGCAG CT-3'; 068-402, 5'-TCCAGTACCACAAGGCT。以百合基因組 DNA 為模版，僅 065-402 與 066-402 引子組可以增殖大小約 600 bp 的 PCR 產物，經分子選殖序列分析並無相似序列，可能為非專一性 PCR 產物。以 probenazole 處理的百合全 RNA，進行 RT-PCR，無論是處理組或對照組均可在進行第二次 PCR 反應後，得到一約 600 bp 的片段；但經核酸解序後，均與幾丁質分解酵素序列無關，且似為 ribosomal DNA 分子，為非專一性 PCR 產物。因此推測百合幾丁質分解酵素基因序列與已知序列歧異度可能很高或引子序列設計不理想，導致非專一性雜合機率過高或幾丁質分解酵素基因誘導表現程度並不如預期的高，模版量過低，降低了鈎取的機率。

四、成果自評

目前已在百合葉片上獲得一與 cysteine proteinase 具有 32% 相似性的 cDNA 片段，雖然不如預期地獲得 PR-4 類似基因，但仍與逆境有關的基因具有相似性，有可能也與百合誘導抗病

性有關。由於幾丁質分解酵素基因的鈎取並不如意，可能為試驗策略不理想，未來將純化 mRNA 作為模版，將所設計引子組再作 RT-PCR，期望能增加鈎取的機率；也將製備 cDNA library，嘗試直接於幾丁質培養基上進行幾丁質分解酵素基因 cDNA 的篩選或於含真菌孢子的培養基上直接篩選具有抑菌活性的 cDNA 克隆；並考慮增加處理強度，提高基因表現的程度。

由於 RT-PCR 有負反應的情形，在缺少正對照下，無法判斷是基因無誘導表現或 RT-PCR 反應不佳，故設計 actin 基因引子，以確定 RT-PCR 反應的有無，作為判讀負反應真偽的正對照。

五、參考文獻

1. Chen, C.-Y., and Huang, H.-E. 1997. Salicylic acid-induced resistance of lily leaves against *Botrytis elliptica*. Plant Pathol. Bull. 6:76-82.
2. Collinge, D. B., Kragh, K. M., Mikkelsen, J. D., Nielsen, K. K., Rasmussen, U., and Vad, K. 1993. Plant chitinases. Plant J. 3:31-40.
3. Hejgaard, J., Jacobsen, S., Bjorn, S. E., and Kragh, K. M. 1992. Antifungal activity of chitin-binding PR4-type proteins from barley grain and stressed leaf. FEMS Lett. 307:389-392.
4. Levorson, J., and Chlan, C. A. 1997. Plant chitinase consensus sequences. Plant Mol. Biol. Rep. 15:122-133.
5. Lin, K.-C., Bushnell, W. R., Szabo, L. J., and Smith, A. G. 1996. Isolation and expression of a host response gene family encoding thaumatin-like proteins in incompatible oat-stem rust fungus interactions. Mol. Plant Microbe Interact. 9:511-522.
6. Lu, Y.-Y., and Chen, C.-Y. 1998. Probenazole-induced resistance of lily leaves against *Botrytis elliptica*. Plant Pathol. Bull. 7.
7. Meins, F. Jr., Fritig, B., Linthorst, H. J. M., Mikkelsen, J. D., Neuhaus, J.-M., and Ryals, J. 1994. Plant chitinase genes. Plant Mol. Biol. Rep. 12:22-28.
8. Midoh, N., and Iwata, M. 1996. Cloning and characterization of a probenazole-inducible gene for an intracellular pathogenesis-related protein in rice. Plant Cell Physiol. 37:9-18.
9. Midoh, N., and Iwata, M. 1997. Expression of defense-related genes by probenazole or 1,2-benzothiazole-3(2H)-one 1,1-dioxide. J. Pestic. Sci. 22:45-47.
10. Nakashita, H., Yoshioka, K., and Yamaguchi, I. 1997. Probenazole is a plant activator which induces systemic acquired resistance in plants. 5th international congress of plant molecular biology, Singapore.
11. Palva, T. K., Hurtig, M., Saindrenan, P., and Palva, E. T. 1994. Salicylic acid induced resistance to *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* in tobacco. Mol. Plant-Microbe Interact. 7:356-363.
12. Schaffer, M.A. and Fisher, R.L. 1988. Analysis of mRNAs that accumulate in

- response to low temperature identifies a thiol protease gene in tomato. *Plant Physiol.* 87:431-436.
13. Schlumbaum, A., Mauch, F., Vogeli, U., and Boller, T. 1986. Plant chitinases are protein inhibitors of fungal growth. *Nature* 365:367.
14. Ward, E. R., Uknes, S. J., Williams, S. C., Dincher, S. S., Wiederhold, D. L., et al. 1991. Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell* 3:1085-1094.

```

1   KLSKNKSDRY LPKVGDSLPE SIDWREKGVL VGVKDQGSCG SCWAFSAVAA
51  MESINAIVTG NLISLSEQEL VDCDRSYNEG CDGGLMDYAF EFVIKNGGID
101 TEEDYPYKER NGVCDQYRKN AKVVKIDSYE DVPVNNEKAL QKAVAHQPVS
151 IALEAGGRDF QHYKSGIFTG KCGTAVDHGV VIAGYGTENG MDYWIVRNSW
201 GANCRENGYL RVQRNVSSSS GLCGLAIEPS YPVKTGPNPP KPAPSPSPV
251 KPPTTEDEYS QCAVGTTCCE ILQFRRSCFS WGCCPLEGAT CCEDHYS CCP
301 HDYPICNVRQ GTCSMSKGNP LGVKAMKRIL AQPIGAFGNG GKKSSS

```

圖一、以大麥 PR4 cDNA 序列設計之引子組鈎取百合類似基因 cDNA 之氨基酸序列