

# 番茄青枯病抗性两个相关基因功能的初步鉴定

汪国平<sup>1,\*</sup>, 褚梦<sup>2,\*</sup>, 孔杰<sup>2</sup>, 陈馥莹<sup>2</sup>, 陈煜<sup>2</sup>, 赵亚华<sup>2,\*\*</sup>

(<sup>1</sup>华南农业大学园艺学院, 广州 510642; <sup>2</sup>华南农业大学生命科学学院, 广州 510642)

**摘要:** 对抗性番茄材料 ‘Hawaii 7996’ 分别接种强致病力青枯菌 (RsH) 和中等致病力青枯菌 (RsM) 后, 利用双向电泳技术找到了两个差异表达蛋白质——谷胱甘肽 S 转移酶 L3 和 Remorin 1 蛋白。在利用携带八氢番茄红素脱氢酶基因 *PDS* 的 TRV 重组病毒载体通过叶片浸润法证明 VIGS 体系可行后, 进一步利用该技术沉默上述两个蛋白质的对应基因 *GST-L3* 和 *Rem-1*, 并用半定量 RT-PCR 检测沉默效果。结果表明, 分别沉默 *GST-L3* 和 *Rem-1* 的番茄植株抗性减弱, 在接种中等致病力青枯菌 (RsM) 后青枯病发病率和病情指数都明显高于对照植株, 说明基因 *GST-L3* 和 *Rem-1* 与番茄对青枯病的抗性相关。

**关键词:** 番茄; 青枯病; 抗病性; 双向电泳; VIGS

**中图分类号:** S 641.2

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2014) 06-1096-09

## Studies of Two Genes Related to Bacterial Wilt Resistance in Tomato

WANG Guo-ping<sup>1,\*</sup>, CHU Meng<sup>2,\*</sup>, KONG Jie<sup>2</sup>, CHEN Fu-ying<sup>2</sup>, CHEN Yu<sup>2</sup>, and ZHAO Ya-hua<sup>2,\*\*</sup>

(<sup>1</sup>College of Horticulture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; <sup>2</sup>College of Life Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** Two-dimensional electrophoresis (2-DE) was employed to analyze the comparative proteome from stems of resistant tomato ‘Hawaii 7996’ plants inoculated with medium virulent strain RsM and high virulent strain RsH. Two differentially expressed proteins were identified to be Glutathione S-transferase L3 and Remorin 1 and the function of corresponding genes, *GST-L3* and *Rem-1*, were further studied. After confirming the effectiveness of VIGS system with TRV carrying the Phytoene Desaturase gene (*PDS*), two targeted genes were individually silenced in Hawaii 7996 using VIGS method and their expression levels were checked by semi-quantitative RT-PCR. The results showed that the average disease incidence and disease index of bacterial wilt on *GST-L3* or *Rem-1* silenced plants increased significantly when challenging with RsM strain, indicating that these two genes are involved in the resistance of tomato to bacterial wilt disease.

**Key words:** tomato; bacterial wilt; resistance; two-dimensional electrophoresis; VIGS

番茄青枯病 (bacterial wilt) 是番茄生产上的一种重要病害, 其病原菌为青枯雷尔氏菌 (*Ralstonia solanacearum*)。番茄植株受到青枯菌侵染后, 首先可观测到植株出现萎蔫, 然后整株植物会迅速枯

**收稿日期:** 2014-01-23; **修回日期:** 2014-05-12

**基金项目:** 国家自然科学基金项目 (31171957); 广东省自然科学基金团队项目 (S2011030001410); 广东省教育厅重点实验室项目 (KBL11008)

\* 对本文同等贡献者

\*\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: yzhao15-503@scau.edu.cn; Tel: 020-85283281)

萎死亡 (Allen, 2007)。青枯病在世界各地均有发生, 以热带、亚热带地区更为严重, 中国长江以南尤其是华南地区发生较为普遍, 严重时可导致番茄等相关作物绝产, 造成巨大的经济损失, 已成为番茄生产的制约因素 (汪国平等, 2004)。明确寄主的抗病机理对病害防治、抗病育种具有重要的指导意义。

病毒诱导的基因沉默 (Virus-Induced Gene Silencing, VIGS) 是一种快速检测基因功能的技术, 即通过构建携带目标基因的重组病毒载体, 沉默内源基因的表达 (Lu et al., 2003)。该方法具有无需全长的基因序列、无需转基因植株、获取表型快等诸多优点, 可高效、高通量地分析基因功能, 已被广泛应用于植物基因功能的研究, 在烟草、番茄、辣椒和豆类等植物中均已成功建立了 VIGS 体系 (徐幼平等, 2008)。目前, 基于烟草脆裂病毒 (TRV) 的 VIGS 载体已经在番茄的叶片 (Ekengren et al., 2003)、花 (Fu et al., 2006) 和果实 (Fu et al., 2005) 中获得良好的沉默效果。

本研究中首先通过双向电泳技术分离和分析了抗性番茄材料 ‘Hawaii 7996’ 在接种强致病力的青枯菌 (RsH) 和中致病力青枯菌 (RsM) 后蛋白质表达的差异, 再利用基于 TRV 病毒的 VIGS 体系, 沉默在双向电泳分析中得到的差异蛋白所对应的基因, 观察番茄植株的青枯病抗性是否发生变化, 验证这些基因是否为番茄青枯病抗性相关基因。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

番茄抗性材料 ‘Hawaii 7996’ 种植于光照培养室 (温度 25 ~ 28 °C, 每日光照 12 h)。VIGS 载体 TRV1 (Liu et al., 2002) 和 TRV2-LIC (Dong et al., 2007) 来自于 Arabidopsis Biological Resource Center, 由美国耶鲁大学 Dinesh-Kumar S P 惠赠。中等致病力青枯菌 (RsM) 和强致病力青枯菌 (RsH) 保藏于本实验室, 最初从广东省番茄产区病株分离, 农杆菌 GV3101 由中国农业大学王国英教授惠赠。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 双向电泳

取青枯菌 RsH 或 RsM 侵染 24 h 后的抗性番茄 ‘Hawaii 7996’ 的茎段, 用苯酚法提取全蛋白 (Thiellement, 2013)。为增加蛋白量, 视植株大小取 10 ~ 12 株混合, 将 800 μg 的蛋白样品溶于 450 μL 水化上样液 (7 mol · L<sup>-1</sup> 尿素, 2 mol · L<sup>-1</sup> 硫脲, 质量体积百分比为 4% 的 CHAPS, 40 mmol · L<sup>-1</sup> DTT, 质量体积百分比为 0.002% 的溴酚蓝), 使用 GE 21cm IPG 3-11 非线性胶条在 GE Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare) 上进行第一向等电聚焦。

然后将胶条在 Buffer A (0.1 mol · L<sup>-1</sup> Tris-HCl, 2% SDS, 6 mol · L<sup>-1</sup> 尿素, 30% 甘油, 0.1 mol · L<sup>-1</sup> DTT, pH 8.8) 中平衡 15 min, 在 Buffer B (0.1 mol · L<sup>-1</sup> Tris-HCl, 2% SDS, 6 mol · L<sup>-1</sup> 尿素, 30% 甘油, 0.25 mol · L<sup>-1</sup> 碘乙酰胺, pH 8.8) 中平衡 15 min (Gorg et al., 2000), 之后进行 12.5% SDS-PAGE 第二向电泳。用 0.066% 考马斯亮蓝 G-250 染色过夜, 用水脱色至蛋白点清晰。

完成染色的双向电泳凝胶经过扫描保存图像, 图像分析采用 PDQuest (version 8.0, Bio-Rad) 软件进行, 选择差异倍数大于 2.0 的蛋白点, 委托上海博苑生物科技有限公司进行质谱分析。

#### 1.2.2 VIGS 重组载体的构建

用植物总 RNA 提取试剂盒提取番茄叶片的总 RNA, 反转录合成 cDNA, 根据 NCBI 中提供的序列信息在 *PDS* 基因和目的基因 (*X*) 的中间部位设计特异性引物 (表 1), 在上、下游引物的 5' 端分别加上与 TRV2-LIC 相对应的 LIC (ligation-independent cloning) 接头序列 (Dong et al., 2007)。

PCR 扩增体系 (总 20  $\mu\text{L}$ ): 2  $\mu\text{L}$  10 $\times$  PCR buffer, 2  $\mu\text{L}$  dNTP (10 mmol  $\cdot$  L $^{-1}$ ), 0.1  $\mu\text{L}$  *Taq* DNA 聚合酶 (5 U  $\cdot$   $\mu\text{L}^{-1}$ ), 1  $\mu\text{L}$  cDNA, 两条引物 (10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 各 1  $\mu\text{L}$ , 12.9  $\mu\text{L}$  ddH $_2\text{O}$ 。30 个 PCR 循环。

扩增得到的 PCR 产物电泳后用凝胶回收试剂盒纯化。用 T $_4$  DNA 聚合酶处理回收产物, 反应体系: 6  $\mu\text{L}$  回收产物, 0.5  $\mu\text{L}$  dATP (100 mmol  $\cdot$  L $^{-1}$ ), 1  $\mu\text{L}$  0.1% BSA, 1  $\mu\text{L}$  10 $\times$  buffer, 0.5  $\mu\text{L}$  T $_4$  DNA 聚合酶 (5 U  $\cdot$   $\mu\text{L}^{-1}$ ), 1  $\mu\text{L}$  ddH $_2\text{O}$ 。反应条件: 22  $^{\circ}\text{C}$  35 min, 70  $^{\circ}\text{C}$  20 min。同样用 T $_4$  DNA 聚合酶处理被 *Pst* I 酶切后的 TRV2-LIC 载体, 反应体系: 6  $\mu\text{L}$  回收产物, 0.5  $\mu\text{L}$  dTTP (100 mmol  $\cdot$  L $^{-1}$ ), 1  $\mu\text{L}$  0.1% BSA, 1  $\mu\text{L}$  10 $\times$  buffer, 0.5  $\mu\text{L}$  T $_4$  DNA 聚合酶 (5 U  $\cdot$   $\mu\text{L}^{-1}$ ), 1  $\mu\text{L}$  ddH $_2\text{O}$ 。反应条件: 22  $^{\circ}\text{C}$  35 min, 70  $^{\circ}\text{C}$  20 min (Dong et al., 2007)。再将两者进行连接, 1  $\mu\text{L}$  质粒, 6  $\mu\text{L}$  目的片段, 65  $^{\circ}\text{C}$  2 min, 22  $^{\circ}\text{C}$  10 min。将连接产物转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 用质粒 PCR 及测序进行鉴定。挑取阳性克隆, 提取质粒转化农杆菌 GV3101, 质粒 PCR 鉴定。

载体 TRV2-LIC-PDS 表示携带 *PDS* 基因的重组载体, TRV2-LIC-X 表示携带目的基因片段的重组载体。

表 1 VIGS 引物序列

Table 1 The primer sequences used for VIGS tests

基因 Gene	GenBank 登录号 GenBank No.	引物序列 (5' - 3') Primer sequences	产物长度/bp Fragment length
<i>PDS</i>	M88683.1	F: <u>CGACGACAAGACCCTTTTAGATGGTAATCCTCCTG</u> R: <u>GAGGAGAAGAGCCCTACCAATTCCAACATAGACTG</u>	453
<i>GST-L3</i>	XM_004249461.1	F: <u>CGACGACAAGACCCTTCCGTTTCTTCTACCTGATG</u> R: <u>GAGGAGAAGAGCCCTCATAGAATGCTTATACCAAG</u>	478
<i>Rem-1</i>	NM_001247302.1	F: <u>CGACGACAAGACCCTAGCTCCTAAAGAAGTGGTGG</u> R: <u>GAGGAGAAGAGCCCTACAAAATGCAACTCCAATC</u>	591

注: 下划线的序列是 LIC 接头序列。

Note: The nucleotides underlined are LIC sequences.

### 1.2.3 农杆菌接种

将含有 TRV1、TRV2-LIC、TRV2-LIC-PDS 和 TRV2-LIC-X 的农杆菌 GV3101 分别接种入 LB 液体培养基中, 28  $^{\circ}\text{C}$ 、200 r  $\cdot$  min $^{-1}$  过夜培养。取 50 mL 菌液于 4  $^{\circ}\text{C}$ 、5 000 r  $\cdot$  min $^{-1}$  离心 10 min, 收集菌体, 加入一定体积的渗透液 (10 mmol  $\cdot$  L $^{-1}$  MES, 10 mmol  $\cdot$  L $^{-1}$  MgCl $_2$ , 200 mmol  $\cdot$  L $^{-1}$  乙酰丁香酮), 调节农杆菌悬浮液的 OD $_{600}$  = 0.5 ~ 0.6。将含有 TRV1 和 TRV2-LIC (或重组载体) 的农杆菌悬浮液按 1:1 比例混匀, 室温放置 3 h 用于叶片浸润 (Li et al., 2013)。

取生长 3 周的番茄苗, 每组 24 株, 设置 3 个重复, 进行 TRV 病毒侵染: 用 2 mL 去针头的注射器吸取混合的农杆菌悬浮液, 从叶片背面将菌液压注到叶片中, 之后将幼苗置于暗处 20 ~ 22  $^{\circ}\text{C}$  培养 24 h, 再于 20 ~ 22  $^{\circ}\text{C}$  下光照培养。

### 1.2.4 青枯菌接种

在农杆菌侵染 15 d 后, 对番茄植株进行青枯菌接种。对照组: TRV1 和 TRV2-LIC 空载体混合菌液浸润过的番茄植株; 试验组: TRV1 和 TRV2-LIC-X 混合菌液浸润过的番茄植株。将青枯菌接种到 TZC 固体培养基 [葡萄糖 5.0 g  $\cdot$  L $^{-1}$ , 蛋白胨 10 g  $\cdot$  L $^{-1}$ , 酸水解酪蛋白 1 g  $\cdot$  L $^{-1}$ , TTC (2,3,5-氯化三苯基四氮唑) 0.05 g  $\cdot$  L $^{-1}$ , 琼脂粉 17 g  $\cdot$  L $^{-1}$ , pH 7.0] 上 30  $^{\circ}\text{C}$  培养 2 d, 挑取有致病力的单菌落接种到 CPG 液体培养基 (葡萄糖 5.0 g  $\cdot$  L $^{-1}$ , 蛋白胨 10 g  $\cdot$  L $^{-1}$ , 水解酪蛋白 1 g  $\cdot$  L $^{-1}$ , pH 7.0) 中, 于 30  $^{\circ}\text{C}$ 、180 r  $\cdot$  min $^{-1}$  培养 2 d (刘丹 等, 2011)。取菌液在 4  $^{\circ}\text{C}$ 、6 000 r  $\cdot$  min $^{-1}$  离心 10 min, 收集菌体, 用无菌水重悬, 并调节菌液至 OD $_{600}$  = 0.3, 采用伤根侵染法接种 (Lin et al., 2008)。接种 5 d 后开始调查发病程度 (0 级: 健全; 1 级: 1 ~ 2 叶片萎焉; 2 级: 3 ~ 5 叶片萎焉; 3 级: 大部分叶片萎焉; 4 级: 整株萎凋或主干萎焉, 即将枯死), 分别在 5、7 和 10 d 调查统计, 计算发病率和病情指数 (李海涛 等, 2001)。

### 1.2.5 半定量 RT-PCR 检测沉默效果

农杆菌侵染 15 d 后, 取番茄植株上部叶片, 提取总 RNA, 反转录合成 cDNA。对沉默的基因重新设计引物, 保证每对引物中至少有一条引物在 VIGS 目的片段之外 (表 2), 进行半定量 RT-PCR, 以番茄的 *Actin* 基因作为内参基因, 检测目的基因与对照组相比是否表达量减少。为避免 PCR 产物量到达平台期造成干扰, 试验还分析了不同循环数 PCR 的产物量 (Chen et al., 2009)。

表 2 半定量 RT-PCR 的引物序列  
Table 2 The primer sequences used for semi-quantitative RT-PCR

基因 Gene	GenBank 登录号 GenBank No.	引物序列 (5'-3') Primer sequences	产物长度/bp Fragment length
<i>PDS</i>	M88683.1	F: TGCTGGTCACAAACCGATAC R: GAACACCTCATCTGTCACCCT	447
<i>GST-L3</i>	XM_004249461.1	F: ATGCCCTTTGACAGCGTC R: CAACGAAGGGAGCATAACCG	442
<i>Rem-1</i>	NM_001247302.1	F: CTCGAAAGCACTAGTTGT R: CACACAAATGTAATCTAAC	546
<i>Actin</i>	U60480.1	F: GGTATTGTGTGGACTCTGGTGATG R: GTACCACCACTGAGCACAATGTTTC	435

## 2 结果与分析

### 2.1 双向电泳

图 1 和图 2 分别为 RsM (致病力中等)、RsH (致病力强) 侵染后的双向电泳结果。

完成图像采集和软件分析后, 切割差异蛋白质点进行质谱分析, 结果显示存在多个差异蛋白质, 图 1 和图 2 中方框 A 和 B 所示的 2 个差异点分别为 Remorin 1 蛋白和谷胱甘肽 S 转移酶 L3 (Glutathione S-transferase L3, GST-L3), ‘Hawaii 7996’ 番茄植株中的表达量在 RsM 侵染后明显高于 RsH 侵染后。图 3 为两张双向电泳图的局部结果对比。因大量文献报道它们与植物的抗病性密切相关, 本试验中选定这两个基因进一步深入研究。

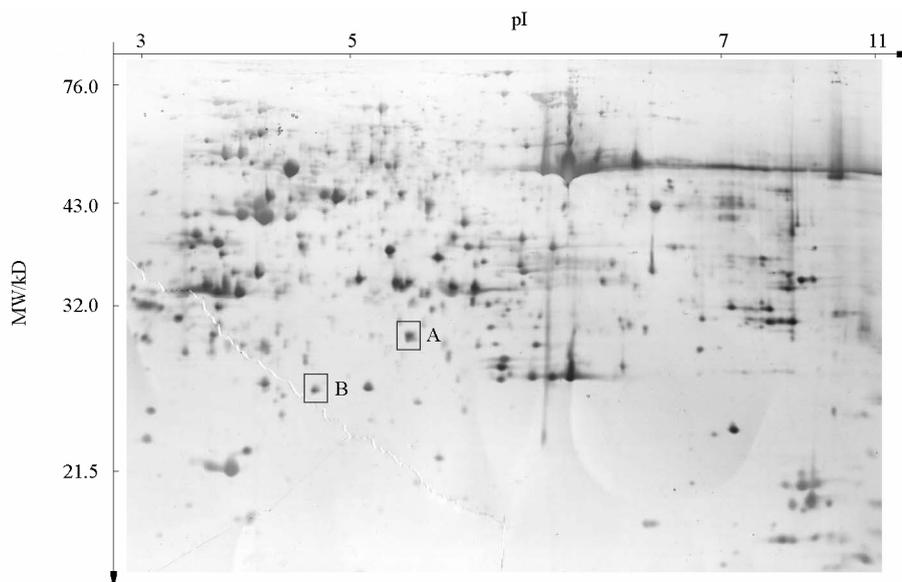


图 1 中等致病力青枯菌 (RsM) 侵染后番茄植株的蛋白质双向电泳图

A: Remorin 1; B: 谷胱甘肽 S 转移酶 L3。

Fig. 1 The 2-DE map of tomato plants inoculated with *R. solanacearum* strain RsM

A: Remorin 1; B: Glutathione S-transferase L3.

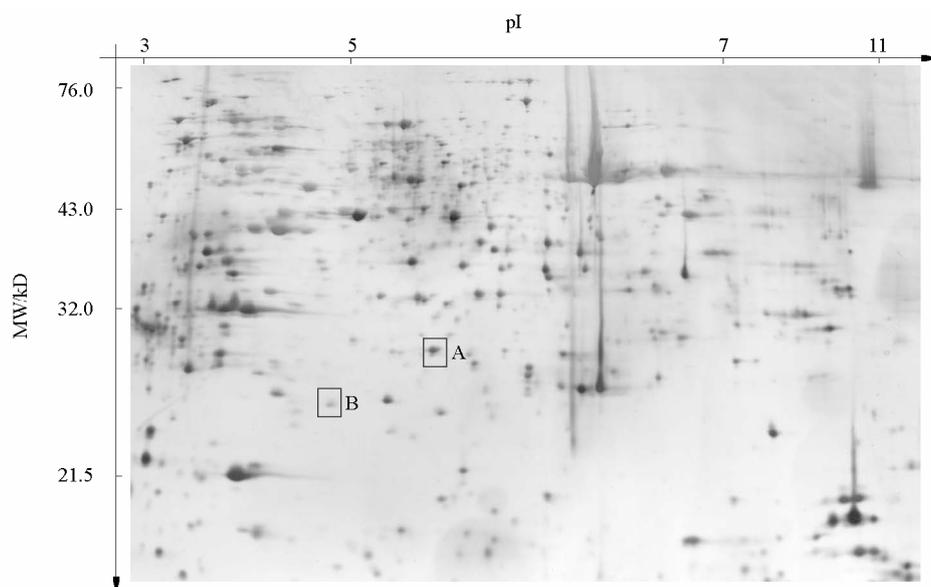


图2 强致病力青枯菌 (RsH) 侵染后番茄植株的蛋白质双向电泳图

A: Remorin 1; B: 谷胱甘肽 S 转移酶 L3。

Fig. 2 The 2-DE map of tomato plants inoculated with *R. solanacearum* strain RsH

A: Remorin 1; B: Glutathione S-transferase L3.

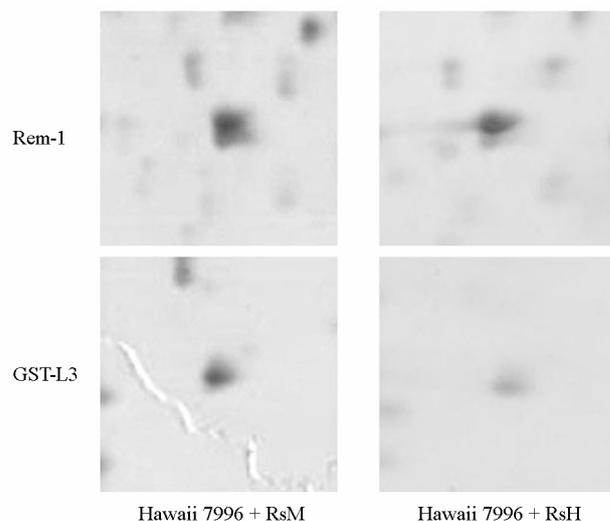


图3 不同致病力青枯菌侵染后番茄植株的双向电泳图的局部比较

Fig. 3 The local contrast of 2-DE map of tomato plants inoculated with two strains of *R. solanacearum*

## 2.2 重组载体的构建

八氢番茄红素脱氢酶基因 *PDS* (*phytoene desaturase*)、双向电泳结果中两个蛋白质对应的目的基因 *glutathione S-transferase L3* (*GST-L3*) 和 *remorin 1* (*Rem-1*) 经 PCR 扩增出的特异片段, 用  $T_4$  DNA 聚合酶处理后连接到 TRV2-LIC 载体上, 经过重组质粒 PCR 鉴定得到与目的基因的特异片段大小相符的条带, 再经测序, 结果证明 TRV2-LIC-PDS、TRV2-LIC-GST-L3 和 TRV2-LIC-Rem-1 重组载体构建成功。

### 2.3 VIGS 体系的建立

PDS 是类胡萝卜素生成过程中的关键酶，类胡萝卜素在植物中的生理作用是吸收光能和猝灭多余的光能，当植物体内缺少类胡萝卜素时，植株将出现光漂白样症状，此表型很容易分辨，因此选用此基因来构建和评价 VIGS 体系。

番茄植株在浸润 TRV1 和 TRV2-LIC-PDS 农杆菌 1:1 混合菌液 15 d 后顶部叶片开始显现光漂白现象，20 d 后 VIGS 体系番茄植株上部叶片都出现了光漂白现象（图 4），确认为 PDS 基因沉默后的表型，说明 VIGS 体系已经成功建立。



图 4 浸润含 TRV2-LIC-PDS 农杆菌的番茄植株 20 d 后的表型

Fig. 4 The phenotype of tomato plant at 20 days after infiltrated with *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 containing TRV2-LIC-PDS

### 2.4 接种青枯菌后的表型观察

设置的 3 组番茄苗：VIGS-CK、VIGS-GST-L3 和 VIGS-Rem-1，在接种青枯菌 RsM 3 d 后出现青枯病症状。最初是子叶萎蔫，然后整株逐渐萎蔫。由图 5 可见，GST-L3、Rem-1 基因沉默的番茄植株在青枯病发病程度上明显高于对照组。



图 5 接种青枯菌 (RsM) 5 d 后基因沉默及对照番茄植株的表型

Fig. 5 The phenotypes of gene-silenced and control tomato plants at 5 days after inoculated with *R. solanacearum* strain RsM

本试验中选用的 RsM 是中等致病力的青枯菌，‘Hawaii 7996’番茄对其有很强的抗性，平均发病率为 11.11%，病情指数仅为 3.82；而沉默基因 GST-L3 和 Rem-1 的番茄植株发病率分别为 61.11% 和 66.67%，病情指数分别为 33.68 和 36.11，发病等级多为 2 级，有整株死亡的情况出现（表 3）。

表 3 接种青枯菌 (RsM) 10 d 后基因沉默及对照番茄植株的发病情况

Table 3 The incidence of gene-silenced and control tomato plants at 10 days after inoculated with *R. solanacearum* strain RsM

被沉默的基因 Silenced gene	发病植株/接种总植株 Wilting plant/total plant	发病等级分布 Distribution of disease scales				平均发病率/% Average disease incidence	病情指数 Average disease index
		1	2	3	4		
VIGS-CK	8/72	5	3	0	0	11.11	3.82
<i>GST-L3</i>	44/72	6	26	9	3	61.11	33.68
<i>Rem-1</i>	48/72	8	29	6	5	66.67	36.11

## 2.5 VIGS 沉默效果的半定量 RT-PCR 鉴定

病毒诱导基因沉默能够引起目的基因的转录后沉默, 导致被沉默的基因在转录后其 mRNA 降解。为了鉴定 VIGS 处理后的番茄植株中相应的目的基因是否被沉默, 分别提取试验组、对照组总 RNA 用半定量 RT-PCR 进行比较, 循环数为 22、25、28、30, 结果如图 6 所示。当对照组与 VIGS 处理的植株 *Actin* 基因扩增量一致时, VIGS 处理的植株相应目的基因 *PDS*、*GST-L3*、*Rem-1* 的扩增量明显减少, 验证了 VIGS 沉默目的基因的有效性。

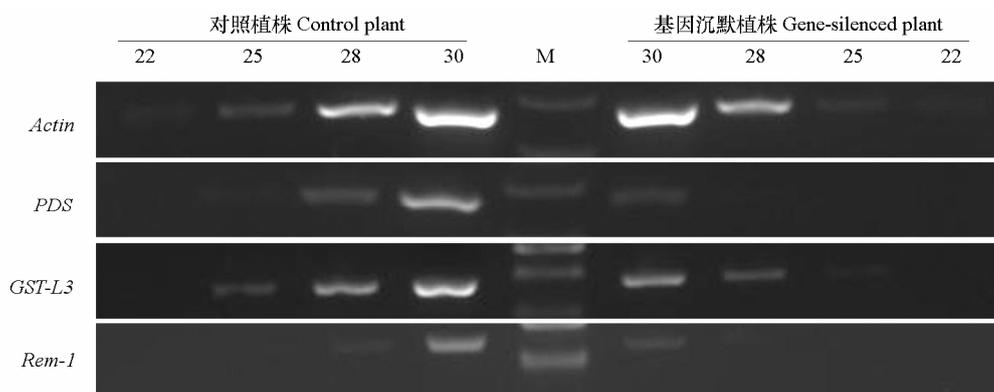


图 6 基因沉默的半定量 RT-PCR 检测

M: Marker; 22、25、28、30 为 PCR 循环数。

Fig. 6 VIGS-mediated degradation of specific transcripts in tomato

M: Marker; 22, 25, 28, 30: PCR cycle number.

## 3 讨论

‘Hawaii 7996’ 番茄是目前研究中广泛使用的抗病材料, 对中等致病力的青枯菌 RsM 有很强的抗性, 但对强致病力菌株 RsH 表现为感病, 所以在被两种不同致病力的青枯菌侵染后的植株中表达差异的蛋白质, 可能与番茄对青枯菌的抗性相关。在双向电泳的结果中, 青枯菌株 RsM 侵染的 ‘Hawaii 7996’ 番茄植株中谷胱甘肽 S 转移酶 L3 和 Remorin 1 蛋白表达量上调, 表明其对应基因 *GST-L3* 和 *Rem-1* 可能参与寄主对青枯病的防御反应; 分别沉默基因 *GST-L3* 和 *Rem-1* 后, ‘Hawaii 7996’ 植株对青枯病的抗性明显降低, 进一步证实了这一推断。

谷胱甘肽 S 转移酶 (GST) 是一种多功能的氧化还原酶 (EC2.5.1.18), 其显著功能是它能在细胞中排出外源性有毒物质和参与氧化应激反应 (Marrs, 1996)。GST 通过催化某些内源性或外来有害物质与还原型谷胱甘肽发生亲电取代反应, 增加这些物质的疏水性, 使其易于穿越细胞膜, 通过选择性的 ABC 转运蛋白转运出去, 达到去毒作用 (Dixon et al., 2010)。在植物细胞中, GST 的表达主要发生在植物的发育期 (细胞分裂等) 以及在细胞受到外界病原体入侵、外界环境的改变和喷

洒化学物质等情况下。Wisser 等 (2011) 研究发现 *GST* 基因对灰色叶斑病、玉米大斑病和小斑病这 3 种由真菌引起的玉米病害都有适度的抗性。在本研究中, 用 VIGS 的方法沉默 *GST-L3* 基因导致 ‘Hawaii 7996’ 番茄植株的青枯病抗性明显减弱, 表明 *GST* 不仅在植物对真菌的抗性中起作用, 在番茄对细菌性青枯病的抗性中也起了作用。

Remorin 蛋白是一种植物专一性的蛋白, 仅在细胞膜的脂筏上发现, 但其结构中不含跨膜域。单体 Remorin 可形成纤维结构, 在细胞骨架和膜骨架中发挥作用。它的另一个重要功能是参与植物抗性与发育的信号传导途径 (Raffaele et al., 2007)。研究发现在体外试验中 Remorin 蛋白能与寡聚半乳糖醛酸 (OGA) 结合, 在用多聚半乳糖醛酸处理过的马铃薯叶片上, Remorin 蛋白能与质膜结合并被磷酸化, 而 OGA 是一种胞外信号, 是植物抗性基因的调节物并参与植物的发育及形态建成, 说明 Remorin 蛋白很可能作用于细胞间信号传导和植物防御。Lefebvre 等 (2010) 研究发现, Remorin 蛋白能吸附在围绕着病菌的宿主质膜上, 从而控制根瘤菌的感染并阻止它释放到宿主细胞质中。Perraki 等 (2012) 进一步通过结构-功能法研究发现, Remorin 蛋白的一个短的 C 末端脂锚钩可以直接绑定到马铃薯细胞的质膜上, 从而限制马铃薯病毒 X 在细胞间的运动。结合本研究中 *Rem-1* 的 VIGS 沉默后番茄植株发病率明显增加这一结果, 表明 Remorin 蛋白很可能是通过阻碍青枯菌在细胞间的运动方式, 从而在番茄抗青枯病感染中起到一定的作用。

综上所述, 本研究中的这两个基因 *GST-3* 和 *Rem-1* 都属于番茄青枯病抗性相关基因, 参与了番茄植株对青枯病的防御反应, 但它们在防御反应中具体的分子作用还有待进一步研究。

## References

- Allen C. 2007. Strategies for managing bacterial wilt diseases of tomato, potato, and export ornamentals. *Phytopathology*, 97 (7): 148 - 149.
- Chen Y Y, Lin Y M, Chao T C, Wang J F, Liu A C, Ho F I, Cheng C P. 2009. Virus-induced gene silencing reveals the involvement of ethylene-, salicylic acid- and mitogen-activated protein kinase-related defense pathways in the resistance of tomato to bacterial wilt. *Physiologia Plantarum*, 136 (3): 324 - 335.
- Dixon D P, Skipsey M, Edwards R. 2010. Roles for glutathione transferases in plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, 71 (4): 338 - 350.
- Dong Y, Burch-Smith T M, Liu Y, Mamillapalli P, Dinesh-Kumar S P. 2007. A ligation-independent cloning tobacco rattle virus vector for high-throughput virus-induced gene silencing identifies roles for *NbMADS4-1* and *-2* in floral development. *Plant Physiology*, 145 (4): 1161 - 1170.
- Ekengren S K, Liu Y L, Schiff M, Dinesh-Kumar S P, Martin G B. 2003. Two MAPK cascades, NPR1 and TGA transcription factors play a role in Pto-mediated disease resistance in tomato. *Plant Journal*, 36 (6): 905 - 917.
- Fu D Q, Zhu B Z, Zhu H L, Jiang W B, Luo Y B. 2005. Virus-induced gene silencing in tomato fruit. *Plant Journal*, 43 (2): 299 - 308.
- Fu D Q, Zhu B Z, Zhu H L, Zhang H X, Xie Y H, Jiang W B, Zhao X D, Luo Y B. 2006. Enhancement of virus-induced gene silencing in tomato by low temperature and low humidity. *Molecules and Cells*, 21 (1): 153 - 160.
- Gorg A, Obermaier C, Boguth G, Harder A, Scheibe B, Wildgruber R, Weiss W. 2000. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, 21 (6): 1037 - 1053.
- Lefebvre B, Timmers T, Mbengue M, Moreau S, Herve C, Toth K, Bittencourt-Silvestre J, Klaus D, Deslandes L, Godiard L, Murray J D, Udvardi M K, Raffaele S, Mongrand S, Cullimore J, Gamas P, Niebel A, Ott T. 2010. A remorin protein interacts with symbiotic receptors and regulates bacterial infection. *Plant Biology*, 107 (5): 2343 - 2348.
- Li C, Yan J M, Li Y Z, Zhang Z C, Wang Q L, Liang Y. 2013. Silencing the *SpMPK1*, *SpMPK2*, and *SpMPK3* genes in tomato reduces abscisic acid-mediated drought tolerance. *International Journal of Molecular Sciences*, 14 (11): 21983 - 21996.
- Li Hai-tao, Zou Qing-dao, Lü Shu-wen, Mu Xin, Xu Wen-kui. 2001. Suitable identification method for *Ralstonia solanacearum* in tomato. *Liaoning Agricultural Sciences*, (4): 1 - 7. (in Chinese)
- 李海涛, 邹庆道, 吕书文, 穆欣, 许文奎. 2001. 番茄抗青枯病的最适鉴定方法研究. *辽宁农业科学*, (4): 1 - 7.
- Liu Dan, He Hong, Huang Hai-bo, Xie Jian-hui, Chai Ting-ting. 2011. Isolation of pathogenic *Ralstonia solanacearum* from *Pogostemon cablin* and

- determination of its pathogenicity. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 42 (8): 1596 - 1599. (in Chinese)
- 刘 丹, 贺 红, 黄海波, 谢建辉, 柴婷婷. 2011. 广藿香青枯病菌的分离培养及致病性测定. *中草药*, 42 (8): 1596 - 1599.
- Liu Y L, Schiff M, Dinesh-Kumar S P. 2002. Virus-induced gene silencing in tomato. *Plant Journal*, 31 (6): 777 - 786.
- Lin Y M, Chou I C, Wang J F, Ho F I, Chu Y J, Huang P C, Lu D K, Shen H L, Elbaz M, Huang S M, Cheng C P. 2008. Transposon mutagenesis reveals differential pathogenesis of *Ralstonia solanacearum* on tomato and *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21 (9): 1261 - 1270.
- Lu R, Martin-Hernandez A M, Peart J R, Malcuit I, Baulcombe D C. 2003. Virus-induced gene silencing in plants. *Methods*, 30 (4): 1046 - 2023.
- Marrs K A. 1996. The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47: 127 - 158.
- Perraki A, Cacas J L, Crowet J M, Lins L, Castroviejo M, German-Retana S, Mongrand S, Raffaele S. 2012. Plasma membrane localization of *Solanum tuberosum* remorin from group 1, homolog 3 is mediated by conformational changes in a novel C-terminal anchor and required for the restriction of potato virus X movement. *Plant Physiology*, 160 (2): 624 - 637.
- Raffaele S, Mongrand S, Gamas P, Niebel A, Ott T. 2007. Genome-wide annotation of remorins, a plant specific protein family: Evolutionary and functional perspectives. *Plant Physiology*, 145 (3): 593 - 600.
- Thiellement H. 2013. *Plant proteomics methods and protocols*. Shen Shi-hua translated. Beijing: Science Press. (in Chinese)
- Thiellement H. 2013. 植物蛋白质组学实验指南. 沈世华译. 北京: 科学出版社.
- Wang Guo-ping, Lin Ming-bao, Wu Ding-hua. 2004. Classical and molecular genetics of bacterial wilt resistance in tomato. *Acta Horticulturae Sinica*, 31 (3): 403 - 407. (in Chinese)
- 汪国平, 林明宝, 吴定华. 2004. 番茄青枯病抗性遗传研究进展. *园艺学报*, 31 (3): 403 - 407.
- Wisser R J, Kolkman J M, Patzoldt M, Holland J B, Yu J M, Krakowsky M, Nelson R J, Balint-Kurti P J. 2011. Multivariate analysis of maize disease resistances suggests a pleiotropic genetic basis and implicates a *GST* gene. *Agricultural Sciences*, 108 (18): 7339 - 7344.
- Xu You-ping, Xu Qiu-fang, Song Xiao-yi, Zhang Zhi-xin, Cai Xin-zhong. 2008. Virus-induced gene silencing. *Journal of Zhejiang University: Agriculture and Life Sciences*, 34 (2): 119 - 131. (in Chinese)
- 徐幼平, 徐秋芳, 宋晓毅, 张志新, 蔡新忠. 2008. 病毒诱导的基因沉默. *浙江大学学报: 农业与生命科学版*, 34 (2): 119 - 131.