北京林业大学学报
JOURNAL OF BEIJING FORESTRY UNIVERSITY

山新杨谷胱甘肽S-转移酶编码基因*PdbGSTU*功能分析

黄颖 王晓东 遇文婧

Functional analysis of encoding gene *PdbGSTU* for glutathione S-transferase in *Populus davidiana* × *P. bolleana*

Huang Ying, Wang Xiaodong, Yu Wenjing

引用本文:
黄颖, 王晓东, 遇文婧. 山新杨谷胱甘肽S-转移酶编码基因*PdbGSTU*功能分析[J]. 北京林业大学学报, 2024, 46(8):68-78. doi: 10.12171/j.1000-1522.20240020
Huang Ying, Wang Xiaodong, Yu Wenjing. Functional analysis of encoding gene *PdbGSTU* for glutathione S-transferase in *Populus davidiana* × *P. bolleana*[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2024, 46(8):68-78. doi: 10.12171/j.1000-1522.20240020

在线阅读 View online: https://doi.org/10.12171/j.1000-1522.20240020

您可能感兴趣的其他文章
Articles you may be interested in

秋水仙碱对银杏和毛新杨雄株生殖细胞的生理影响
Physiological effects of colchicine on the male germ cells of *Ginkgo biloba* and *Populus tomentosa* × *P. bolleana*
北京林业大学学报, 2019, 41(7): 83-90. https://doi.org/10.13332/j.1000-1522.20190133

响应槲皮素诱导的美国白蛾GST基因鉴定及表达分析
Identification and expression analysis of GST genes in response to quercetin induction in *Hyphantria cunea*
北京林业大学学报, 2023, 45(11): 110-118. https://doi.org/10.12171/j.1000-1522.20220181

‘84K’杨组氨酸激酶基因*PaHK3a*的表达及功能分析
Expression and function analysis of histidine kinase gene *PaHK3a* of poplar ‘84K’
北京林业大学学报, 2021, 43(2): 46-53. https://doi.org/10.12171/j.1000-1522.20200070

植物异源嫁接中转移mRNA序列与功能分析
Sequence and functional analysis of mobile mRNAs in the heterologous grafted plants
北京林业大学学报, 2022, 44(5): 8-18. https://doi.org/10.12171/j.1000-1522.20210085

日本落叶松谷胱甘肽过氧化物酶（GPX）酶学特性与抗逆性研究
Studies on enzymatic properties and stress resistance of glutathione peroxidase (GPX) from *Larix kaempferi*
北京林业大学学报, 2023, 45(2): 78-86. https://doi.org/10.12171/j.1000-1522.20210230

胡杨异形叶差异表达miRNA及其靶基因功能分析
Differential expression of miRNA and function of target genes in heteromorphic leaves of *Populus euphratica*
北京林业大学学报, 2020, 42(6): 1-13. https://doi.org/10.12171/j.1000-1522.20190464

DOI:10.12171/j.1000−1522.20240020

山新杨谷胱甘肽 S-转移酶编码基因 *PdbGSTU* 功能分析

黄 颖[1] 王晓东[2] 遇文婧[1]
（1. 黑龙江省森林保护研究所，黑龙江 哈尔滨 150080；2. 东北林业大学林学院，林木遗传育种全国重点实验室，黑龙江 哈尔滨 150040）

摘要:【目的】本研究旨在通过分析山新杨谷胱甘肽 S-转移酶编码基因 *PdbGSTU* 的抗病功能，为林木抗性育种提供基因资源与抗性种质。**【方法】**克隆 *PdbGSTU* 基因序列并对其进行生物信息学分析，利用荧光定量 PCR 技术分析该基因的组织特异性表达及植物激素诱导下的表达模式。利用转基因技术获得山新杨的过/抑制表达 *PdbGSTU* 基因植株，通过观察比较接种细链格孢菌后各植株叶片的表型和病斑面积，验证该基因的抗病功能；同时测定接种病原菌前后，野生型和转基因山新杨植株内过氧化氢含量和抗氧化相关酶活性。**【结果】**(1)山新杨 *PdbGSTU* 基因开放阅读框全长 753 bp，编码氨基酸 250 个，对应的蛋白质相对分子质量为 29.01 kDa，为稳定的酸性亲水蛋白，定位于细胞质中；系统进化分析显示，PdbGSTU 蛋白与银中杨的蛋白 KAJ6918316 亲缘关系最近；启动子序列分析显示，*PdbGSTU* 基因启动子序列含多种响应植物激素和逆境胁迫的顺式作用元件。(2)RT-qPCR 结果显示，*PdbGSTU* 基因在山新杨顶芽表达量最高，在其根部表达量最低，且该基因受茉莉酸甲酯、水杨酸和 1-氨基环丙基-1-羧酸 3 种植物激素诱导，均上调表达。(3)接种细链格孢菌后，野生型和抑制表达 *PdbGSTU* 基因植株的叶片上，病斑面积分别为 6.42 和 16.46 mm^2，而过表达 *PdbGSTU* 基因的植株叶片上，少部分接种点出现明显病斑，其余接种部分仅出现褪色。**【结论】***PdbGSTU* 正向参与山新杨对细链格孢菌侵染的抵御过程，可通过清除活性氧提高杨树对病原菌的抗性。

关键词：基因表达；山新杨；谷胱甘肽 S-转移酶；细链格孢菌；抗病功能
中图分类号：S763.1 **文献标志码：**A **文章编号：**1000−1522(2024)08−0068−11
引文格式：黄颖，王晓东，遇文婧. 山新杨谷胱甘肽 S-转移酶编码基因 *PdbGSTU* 功能分析［J］. 北京林业大学学报，2024，46(8)：68−78. Huang Ying, Wang Xiaodong, Yu Wenjing. Functional analysis of encoding gene *PdbGSTU* for glutathione S-transferase in *Populus davidiana* × *P. bolleana*［J］. Journal of Beijing Forestry University, 2024, 46(8): 68−78.

Functional analysis of encoding gene *PdbGSTU* for glutathione S-transferase in *Populus davidiana* × *P. bolleana*

Huang Ying[1] Wang Xiaodong[2] Yu Wenjing[1]
(1. Heilongjiang Provincial Institute of Forest Protection, Harbin 150080, Heilongjiang, China;
2. State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, School of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, Heilongjiang, China)

Abstract: ［**Objective**］This paper aims to provide genetic resources and resistant germplasm for tree resistance breeding by analyzing the disease-resistance function of encoding gene *PdbGSTU* for glutathione S-transferase in *Populus davidiana* × *P. bolleana*. ［**Method**］*PdbGSTU* was cloned in *P. davidiana* × *P. bolleana* by PCR, and bioinformatics analysis were analyzed. The tissue specific expression patterns and expression patterns induced by plant hormones of *PdbGSTU* were also analyzed by RT-qPCR. Overexpressing/sciencing *PdbGSTU* plants of *P. davidiana* × *P. bolleana* obtained through transgenic

收稿日期: 2024−01−17 **修回日期:** 2024−03−13
基金项目: 黑龙江省省属科研院所科研业务费项目(CZKYF2022-1-C048，LKSB2024-2)，中央高校基本科研业务费专项资金项目(2572020BA08)，黑龙江省博士后基金项目。

第一作者: 黄颖，博士。主要研究方向：森林保护。Email: 729218328@qq.com 地址：150040 黑龙江省哈尔滨市哈平路 134 号黑龙江省森林保护研究所。
责任作者: 遇文婧，博士，研究员。主要研究方法：森林保护。Email: ywjlinda2008@163.com 地址：同上。

本刊网址: http://j.bjfu.edu.cn；http://journal.bjfu.edu.cn

technology and function of *PdbGSTU* on disease resistance were verified by observing and comparing the phenotypes and concurrent lesion areas of leaves after inoculation with *Alternaria alternata*. Moreover, the contents of H_2O_2 and the activities of antioxidant enzyme were measured in leaves before and after *A. alternata* inoculation. [**Result**] (1) The open reading frame (ORF) length of *PdbGSTU* was 753 bp, which encoded 250 amino acids with the protein relative molecular mass 29.01 kDa. The PdbGSTU was a stable hydrophilic acidic protein located in the cytoplasm. Systematic evolutionary analysis revealed that PdbGSTU in *P. davidiana* × *P. bolleana* had a close relationship with KAJ6918316 in *P. alba* × *P. berolinensis*. The analysis of *cis*-acting elements in promoter sequence of *PdbGSTU* showed that, this sequence contained multiple *cis*-acting elements related to plant response to stress or phytohormones. (2) RT-qPCR showed that *PdbGSTU* had the highest expression level in apical bud of *P. davidiana* × *P. bolleana*, and the lowest expression level in root. In addition, *PdbGSTU* could response to MeJA, SA and ACC, and show up-regulated expression. (3) After inoculation with *A. alternata*, the lesion areas on the leaves of wild-type and *PdbGSTU* gene suppressed *P. davidiana* × *P. bolleana* were 6.42 and 16.46 mm^2, respectively. However, on the leaves of plants overexpressing *PdbGSTU* gene, a small number of inoculation sites showed obvious lesions, while the rest of inoculation sites only showed fading. [**Conclusion**] *PdbGSTU* is positively involved in the resistance process of *P. davidiana* × *P. bolleana* to *A. alternata* infection, and can enhance the resistance of *P. davidiana* × *P. bolleana* to pathogens by clearing reactive oxygen species.

Key words: gene expression; *Populus davidiana* × *P. bolleana*; glutathione S-transferases; *Alternaria alternata*; disease resistance function

在植物抵御病原微生物的侵染过程中，其体内会产生多种信号分子来激活下游的抗病反应，如：通过 Ca^{2+}或 MAPK 级联激发下游抗病信号途径[1]，通过激活植物激素信号途径促进抗病基因的表达[2]，通过活性氧（reactive oxygen species，ROS）的爆发引发细胞程序性死亡[3]等一系列抗病过程。其中，ROS（主要包括 O^{2-}和 H_2O_2）的爆发，不仅能够直接对病原微生物造成毒害，还能够引发细胞程序性死亡，刺激植物细胞壁的生长，刺激抗病相关基因的表达，是植物抗病过程中必不可少的一环[4−6]。然而，植物体内过量 ROS 累积也会对其本身造成毒害。因此，植物进化出了一系列氧化胁迫响应机制，来避免 ROS 产生的氧化损伤。总的来说，该机制包括酶系统和非酶系统两大类型。其中，非酶系统由谷胱甘肽（glutathione，GSH）、抗坏血酸（ascorbic acid，AsA）、维生素 E 等组成[7]；而用于清除植物 ROS 的酶系统包括超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）、过氧化氢酶（catalase，CAT）、抗坏血酸过氧化物酶（ascorbate peroxidase，APX）、谷胱甘肽 S-转移酶（glutathione S-transferases，GST）和过氧化物酶（peroxidase，POD）等[8−9]。同时，这些抗氧化酶也被证实在植物抗病过程中起到重要作用，如：针对黄瓜（*Cucumis sativus*）抗性品种与感病品种的对比发现，在抵御灰霉菌（*Botrytis cinerea*）的侵染过程中，抗性黄瓜品种中谷胱甘肽 S-转移酶的编码基因 *GST* 的表达显著上调，但在感病品种中则没有观察到这一现象，表明 *GST* 基因也能够参与植物抗病的过程[10]。

谷胱甘肽 S-转移酶是一类广泛存在于动、植物及微生物中的多功能酶[11−12]。在植物中，*GST* 基因最早被发现于玉米（*Zea mays*）中[13]。随后，在辣椒（*Capsicum annuum*）[14]、竹叶花椒（*Zanthoxylum armatum*）[15]、大豆（*Glycine max*）[16]、桑树（*Morus notabilis*）[17]、水稻（*Oryza sativa*）[18]、玉米[19]等不同植物中均被分离鉴定出 *GST* 基因。目前，*GST* 基因依据其基因的结构、蛋白质序列的相似性及底物的专一性等，被划分为 14 大类：metaxin、Phi（F）、Tau（U）、Zeta（Z）、谷胱甘肽依赖性脱氢抗坏血酸还原酶（DHAR）、真核翻译延伸因子 1B 的 γ-亚基类（EF1Bγ）、Lambda（L）、四氯对苯二酚脱氢卤化酶（TCHQD）、hemerythrin（H）、iota（I）、Theta（T）、微粒体前列腺素 E 合成酶 2 型（mPGES2）、含两种硫氧还原蛋白的 GST（GST2N）和谷胱甘肽氢醌还原酶（GHR）[20−21]。在这 14 类 *GST* 基因中，Tau、Phi、DHAR 和 Lambda 这 4 类为植物所特有，其中以针对 Tau 和 Phi 类 *GST* 基因功能的研究最为广泛。*GST* 基因功能众多，既能参与植物生长、发育及衰老过程，又能帮助植物抵御外界不良环境的毒害。近年来，针对 *GST* 基因表达模式的分析发现，*GST* 基

因能够不同程度地响应病原微生物的侵染[22−24]。同时，*GST* 基因在植物抗病过程中的功能已经初步被证实。在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中，*GSTU*13 基因功能的缺失使其对多种病原菌的抗性减弱[25]。而抑制茶树(*Camellia sinensis*)中的 *CsGSTU*45 基因的表达则能够显著提高其对山茶炭疽病的抗性，说明该基因在茶树抵御山茶炭疽菌(*Colletotrichum camelliae*)的侵染过程中起负作用[26]。尽管部分研究结果表明，*GST* 基因能够参与植物对病原微生物的抵御过程，但针对 *GST* 基因参与植物抗病的研究仍以草本植物为主，以木本植物为研究对象的报道相对较少。

杨树(*Populus* spp.)分布广泛且用途多样，兼具社会、经济及生态效益，也是研究林木抗逆机理，培育优良新品种的首选树种。目前，由细链格孢菌(*Alternaria alternata*)引起的杨树叶枯病广泛存在于我国北方地区，不仅能够侵染杨树叶片，还对新梢幼芽造成危害，对杨树的生长、生产造成了影响，而且化学防治也极易造成环境污染。为了提高杨树自身抗病能力，本研究前期构建了山新杨(*Populus davidiana* × *P. bolleana*)响应细链格孢菌侵染的转录组，经分析发现山新杨可通过降低活性氧的含量来抵御细链格孢菌的侵染。同时，转录组数据显示，Tau 类 GST(GSTU)家族中的 *PdbGSTU* 基因(转录组编号 Pda_00024536-RA)能够高度响应细链格孢菌的侵染，出现上调表达。因此，本文克隆了转录组中能够高度响应细链格孢菌侵染的 *PdbGSTU* 基因，并通过转基因技术手段分析了其对叶枯病的抗病功能，研究结果将为林木抗逆基因工程育种提供基因资源与抗性种质。

1 材料与方法

1.1 研究材料

1.1.1 杨树及处理方法

选取状态良好、长势一致的山新杨组培苗，移栽至规格为 11 cm × 10 cm 的花盆中进行培养，其培养基质为泥炭土、蛭石、珍珠岩体积比 3∶1∶1 的混合基质。其培养环境为光照 14 h/黑暗 10 h，平均温度约为(23 ± 1) ℃，相对湿度为 65% 左右，光照强度 400 μmol/(m^2·s)。培养 15 d 后，挑选长势一致，且状态优良、无病虫害的幼苗用于后续试验。分别摘取山新杨土培苗顶芽、叶片、叶柄、茎部和根部组织用于 *PdbGSTU* 基因的组织特异性分析，每个组织分别摘取自 3 株生长状态一致的山新杨土培苗，以此作为重复。

分别使用 0.001% 的茉莉酸甲酯(MeJA)溶液、5 mmol/L 水杨酸溶液(SA)和 200 μmol/L 1-氨基环丙基-1-羧酸(ACC)水溶液喷施山新杨土培苗，模拟生物胁迫处理。分别在处理 1、3、6、12、24 和 48 h，取叶片，液氮冷冻后储存于−70 ℃，用于 *PdbGSTU* 基因响应生物胁迫的基因表达模式分析。每种处理胁迫 25 株苗，每次取样 3 株植株作为重复，并分别以未经处理的山新杨土培苗的叶片作对照。

1.1.2 供试表达载体

植物过表达载体 pROK Ⅱ和抑制表达载体 pFGC5941 保存于东北林业大学林木遗传育种重点实验室，载体图谱见图 1。

1.2 山新杨 *PdbGSTU* 基因的克隆

使用山新杨 cDNA 作为模版，并将转录组中的基因序列作为参照设计引物，克隆 *PdbGST* 基因。使用引物如下：GST-F 为 ATGCAAGACACAACTCAAGTAAAAG;GST-R 为TCATACTTGCTCTGAAAGCCTAT。具体 PCR 扩增体系为：cDNA3 μL，上下游引物各 1 μL，无酶水 11.1 μL，10 × Star Taq PCR buffer 2 μL，dNTP Mix(2.5 mmol/L)1.6 μL，Star Taq(5 U/μL)0.3 μL。PCR 扩增程序为：94 ℃ 预变性 3 min；94 ℃ 变性 30 s，58 ℃ 退火 30 s，72 ℃ 延伸 45 s，35 个循环；72 ℃ 延伸 10 min。取 PCR 产物电泳检测，确认条带大小符合预期后，对 PCR 产物进行回收。将回收后的产物连接至 pMD18-T 载体，并转化至大肠杆菌 TOP10 中，将筛选后的阳性菌株送至生工进行测序[27]。

1.3 山新杨 PdbGSTU 蛋白质的生物信息学分析

使用 ExPASy-ProtParam(https://web.expasy.org/protparam/)对 PdbGSTU 蛋白进行基础理化性质分析；使用 ProtComp(http://yadamp.unisa.it/protcomp/)进行亚细胞定位预测。在 NCBI 官网通过 BlastP(https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=

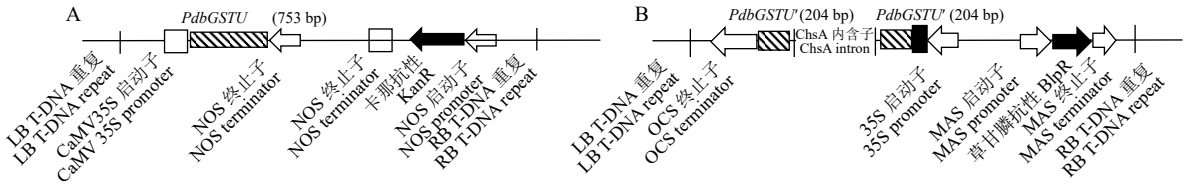


图 1 过表达载体 pROK Ⅱ(A)和抑制表达载体 pFGC5941(B)结构图谱

Fig. 1 Structure map of overexpression vector pROK Ⅱ(A) and RNA-silenced pFGC5941(B)

blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=&LINK_LOC=blasttab&LAST_PAGE=tblastn)进行比对，筛选与 PdbGSTU 相似性高的序列，使用 ClustalW（https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo）对这些序列进行多序列比对分析，并通过 MEGA7.0 软件，使用邻接法（Neighbor-Joining，NJ）构建进化树，其中 Bootstrap 参数设置为 1 000。使用 PredictProtein（https://www.predictprotein.org）预测蛋白质的二级结构，Swissmodel（https://swissmodel.expasy.org）预测蛋白质的三维结构。通过对山新杨基因组的搜索比对，获取 *PdbGSTU* 基因上游 2 000 bp 序列作为其启动子序列，使用 Plant CARE（http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/）进行启动子序列分析。

1.4　山新杨 *PdbGSTU* 基因的表达模式分析

提取不同处理后山新杨不同组织的 RNA 进行反转录，并进行荧光定量 PCR（RT-qPCR），分析不同植物组织和不同处理下 *PdbGSTU* 基因的表达模式，使用内参基因 *PdbEF*1-*α*（KP973951）和 *Pdbactin*（KP973950）的表达量作为对照，所用引物序列见表 1。使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法对定量数据进行处理，对所用基因的表达水平进行均一化处理[28]。反应体系为：预 95 ℃ 变性 30 s；95 ℃ 变性 5 s，59 ℃ 退火 15 s，72 ℃ 延伸 10 s，45 个循环；82 ℃ 补平 1 s；每间隔 0.5 ℃ 读板 1 s。

1.5　转基因植株的获取与抗病功能分析

分别构建 *PdbGSTU* 基因的过表达和抑制表达载体，通过农杆菌介导法获取转基因植株，构建载体使用引物见表 2，步骤参考黄颖[28]的研究。对获取的转基因植株，通过 RT-qPCR 分析 *PdbGSTU* 基因的表达量，分别选取表达量最高（转过表达载体植株）与抑制程度最高（转抑制表达载体植株）的植株进行后续试验。将实验室保存的细链格孢菌接种于 PDA 平板上进行活化后，用打孔器打直径 5 mm 的菌饼备用。分别选取健康且长势一致的野生型以及过/抑制表达 *PdbGSTU* 基因的山新杨转基因植株 3 月龄土培苗，接种细链格孢菌菌饼，并观察接种 4 d 后叶片的表型，并使用 ImageJ 软件对病斑面积进行测定。同时，叶片相关酶活性测定分别使用植物超氧化物歧化酶（SOD）、过氧化物酶（POD）、谷胱甘肽还原酶（GR）、谷胱甘肽过氧化物酶（GPX）、谷胱甘肽 S-转移酶（GST）测定试剂盒，以及植物过氧化氢（H_2O_2）含量试剂盒（南京建成）进行测定，测定方法参照说明书进行，并分别使用未接种的叶片做对照。

2　结果与分析

2.1　山新杨 *PdbGSTU* 基因克隆与理化性质分析

以山新杨 cDNA 为模版，将转录组测序获得的基因序列作参照，设计引物，克隆 *PdbGSTU* 基因，并对克隆获得的 *PdbGSTU* 基因所编码的蛋白质进行理化性质的分析（表 3）。表 3 显示：克隆的 *PdbGSTU* 基因开放阅读框全长 753 bp，编码氨基酸 250 个，构成的蛋白质相对分子质量为 29.01 kDa；蛋白质理论等电点为 6.36，推测 PdbGSTU 为酸性蛋白；不稳定系数为 35.59，推测 PdbGSTU 为稳定蛋白；蛋白质亲疏水性值为−0.296，推测 PdbGSTU 为亲水蛋白；亚细胞定位显示 PdbGSTU 定位于细胞质中，推测其在细胞质中发挥作用。

2.2　山新杨 PdbGSTU 蛋白质结构分析

对 *PdbGSTU* 基因编码形成的蛋白质进行二维结构预测，结果（图 2A）显示，其二级结构含有 59.60% 的螺旋、6.40% 的折叠以及 34.00% 的 Ω 环。

表 1　荧光定量所用引物

Tab. 1　Primers for fluorescence quantification

基因名称 Gene name	正向引物序列（5′—3′） Forward primer sequence (5′−3′)	反向引物序列（5′—3′） Reverse primer sequence (5′−3′)
PdbGSTU	CAAGACACAACTCAAGTAAAAGAAAG	CCTCAAGCTTTGTTCTTTGTACTCATAC
PdbEF1-α	TGGGTCGTGTTGAAACTGGTGT	GGCAGGATCGTCCTTGGAGTTC
Pdbactin	GCTGAGAGATTCCGTTGCCCTG	GGCGGTGATCTCCTTGCTCATT

表 2　构建载体所用引物列表

Tab. 2　List of primers used to construct vectors

引物名称 Primer name	正向引物序列（5′—3′） Forward primer sequence (5′−3′)	反向引物序列（5′—3′） Reverse primer sequence (5′−3′)
GSTU-OE	CGGTACCCGGGGATCATGCAAGACACAACTCAAGTAAAAG	CACGGGGGACTCTAGTCATACTTGCTCTGAAAGCCTAT
GSTU-anti	TAATTAACTCTCTAGCAAGACACAACTCAAGTAAAAG	GCAGGTATTTGGATCGCTTTGTTCTTTGTACTCATAC
GSTU-cis	TTACCATGGGGCGCGCAAGACACAACTCAAGTAAAAG	AATTCTTACACATTTGCTTTGTTCTTTGTACTCATAC

注：横线标注载体序列。Note: the vector sequence is marked with horizontal lines.

表 3 *PdbGSTU* 基因及编码蛋白的理化性质

Tab. 3 Physicochemical properties of *PdbGSTU* gene and its encoding protein

项目 Item	*PdbGSTU*
基因长度 Gene length/bp	753
氨基酸长度 Amino acid length/aa	250
蛋白质相对分子质量 Protein relative molecular mass/kDa	29.01
等电点 Isoelectric point	6.36
不稳定系数 Coefficient of instability	35.59
亲疏水性 Hydrophilicity	−0.296
亚细胞定位 Subcellular localization	细胞质 Cytoplasm

三维结构预测(图 2B)显示：该蛋白主要由 2 个亚基组成，其中位于 N 端的亚基较小，而位于 C 端的亚基较大；同时，这 2 个亚基由较短的氨基酸残基相连。该预测结果符合 GST 蛋白的结构特点。

2.3 山新杨 PdbGSTU 蛋白的进化树分析与多序列比对

通过 BlastP 比对，选取杨树中与 PdbGSTU 蛋白相似性高的 8 种杨树 GST 蛋白序列，进行多序列比对分析。结果(图 3)可见，GST 的氨基酸序列包含 2 个分别位于 N 端和 C 端的保守结构域。其中，N 端包含影响催化功能的 GSH 结合位点(G-site)，该位点在不同物种中通常较为保守；C 端则包含与特定底物结合的共底物结合域(H-site)，该位点的特点是高度可变，以帮助不同的 GST 蛋白结合不同的

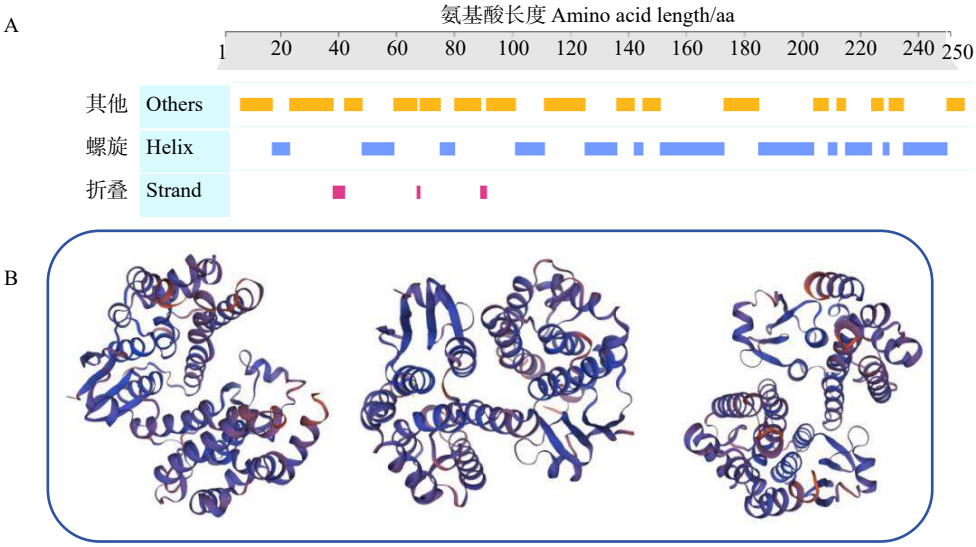
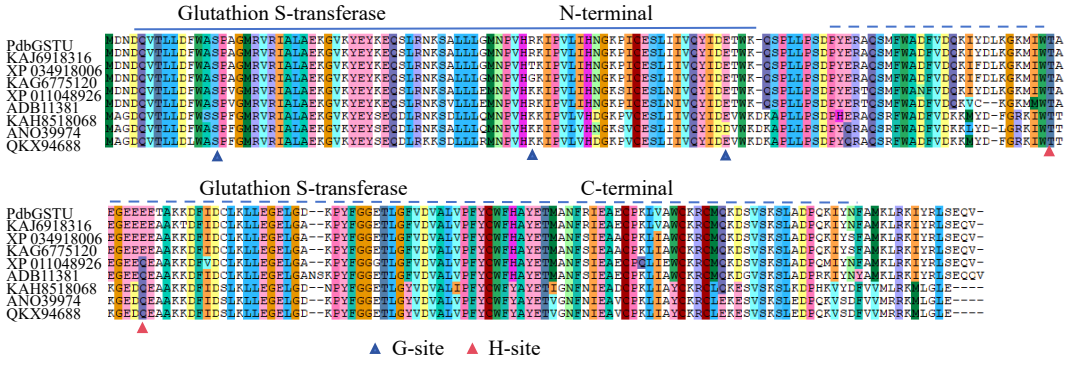


图 2 PdbGSTU 蛋白的二维结构(A)和三维结构(B)预测

Fig. 2 Two-dimensional structure (A) and three-dimensional structure (B) prediction of PdbGSTU protein



KAJ6918316. 银中杨 *Populus alba* × *P. berolinensis*；XP_034918006. 银白杨 *P. alba*；KAG6775120. 毛白杨 *P. tomentosa*；XP_011048926. 胡杨 *P. euphratica*；ADB11381. 毛果杨 *P. trichocarpa*；KAH8518068. 美洲黑杨 *P. deltoides*；ANO39974. 亚东杨 *P. yatungensis*；QKX94688. 小黑杨 *P. simonii* × *P. nigra*

图 3 PdbGSTU 蛋白的多序列比对

Fig. 3 Multiple sequence alignment of PdbGSTU proteins

催化底物（图 3）。

使用 MEGA7.0 软件对与 PdbGSTU 蛋白序列相似性高的杨树 GST 蛋白序列进行进化树分析。图 4 显示，9 个来自于不同种类杨树的 GST 蛋白序列被分为 3 大分支。其中，山新杨 PdbGSTU 蛋白与来自银中杨（*Populus alba* × *P. berolinensis*）的 KAJ6918316 蛋白亲缘关系最近，位于第 3 分支（group3）。

2.4　山新杨 *PdbGSTU* 基因的启动子顺式作用元件分析

通过对山新杨基因组序列搜索比对，获得了 *PdbGSTU* 基因 2 000 bp 的启动子序列。通过 Plant CARE 网站对其序列所含的顺式作用元件种类进行预测，图 5 显示：*PdbGSTU* 的启动子序列中共含有 39 种顺式作用元件，除去一些调控基因转录所必需的基本元件外，还含有 7 种能够响应光的顺式作用元件（Box-4、AE-box、GT1-motif、I-box、P-box、chs-CMA2a 和 TCCC-motif），以及 3 种能够响应激素诱导的元件（AuxRR-core、CGTCA-motif、TGACG-motif）。其中，CGTCA-motif 和 TGACG-motif 能够响应抗病相关激素茉莉酸甲酯的诱导；而 AuxRR-core 能够响应生长素的诱导。此外，该基因的启动子序列中也含有涉及响应生物或非生物胁迫相关的元件，如 MBS、MYB、MYC 等（图 5）。该预测结果表明：*PdbGSTU* 既有可能通过响应生长素的诱导参与山新杨的生长发育过程，也可能通过响应激素或其他胁迫相关元件的诱导，进而参与到山新杨对生物或非生物胁迫的抵御过程中。

2.5　山新杨 *PdbGSTU* 基因的表达模式分析

取山新杨土培苗的顶芽、叶片、叶柄、茎和根部组织，通过 RT-qPCR 分析 *PdbGSTU* 基因在这 5 个组织中的表达情况，图 6A 显示：*PdbGSTU* 在根部表达量最低，故以其作为对照进行数据处理。*PdbGSTU* 在山新杨顶芽表达量最高；其次在山新杨叶片和茎中也有较高表达量；此外，*PdbGSTU* 在杨树叶柄处也有少量表达。该结果表明在山新杨的不同组织中，*PdbGSTU* 基因的表达存在一定的差异，推测其在杨树的不同组织中，可能具有不同的功能。

分别使用茉莉酸甲酯溶液、水杨酸溶液和 1-氨基环丙基-1-羧酸水溶液喷施山新杨土培苗，分析了山新杨叶片中 *PdbGSTU* 基因在 3 种抗病相关激素的诱导下的表达模式。结果显示：在 SA 水溶液的诱导下，山新杨叶片 *PdbGSTU* 基因的表达量基本呈上调的趋势，基因的表达量在处理 12 h 时达到最大（图 6B）；而经 MeJA 溶液诱导后，山新杨叶片的 *PdbGSTU* 基因呈现先下调后上调的表达趋势，其表达量在处理 24 h 时达到最大（图 6C）；在 ACC 水溶液的处理下，山新杨叶片 *PdbGSTU* 基因呈上调的表达趋势，基因的表达量在处理 48 h 时达到最大（图 6D）。该结果表明：山新杨叶片 *PdbGSTU* 基因能够响应外源植物抗病相关激素的诱导，可能参与到杨树抵御病原微生物侵染的过程中。

2.6　山新杨 *PdbGSTU* 基因的抗病功能验证

为进一步分析 *PdbGSTU* 基因的抗病功能，本研究构建了该基因的过/抑制表达载体，并通过农杆菌介导法转入山新杨中，共获得了该基因的过、抑制表达植株各 5 株（图 7A）。分别选取过表达和抑制表达程度最高的转基因植株，通过比较其与野生型山新杨接种细链格孢菌后叶片的表型和病斑面积，验证 *PdbGSTU* 基因的抗病功能。结果（图 7B ~ C）显示：接种病原菌 4 d 后，野生型山新杨叶片在部分接种部位出现明显的黑色病斑，其病斑直径约为 2 ~ 3 mm，病斑总面积约为 6.42 mm^2；相比较而言，过

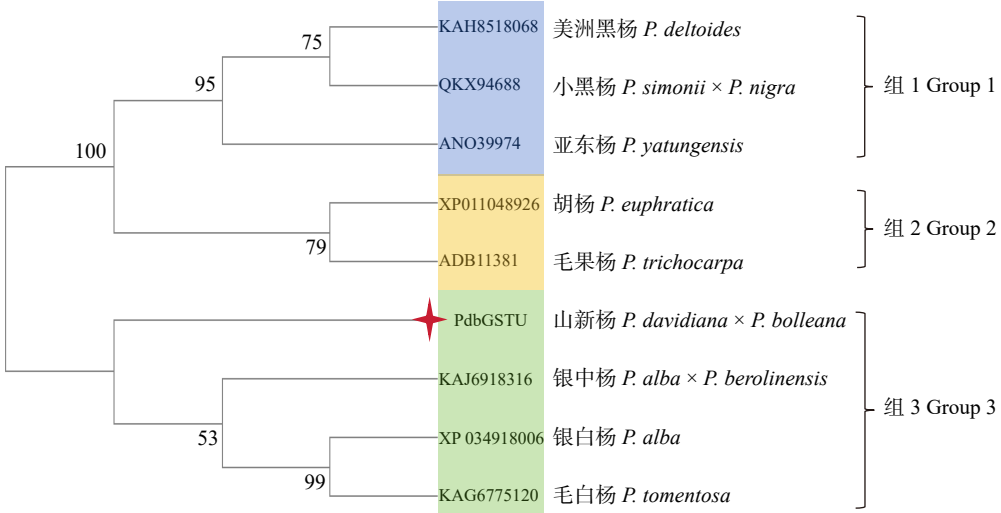


图 4　PdbGSTU 蛋白的进化树分析

Fig. 4　Evolutionary tree analysis of PdbGSTU protein

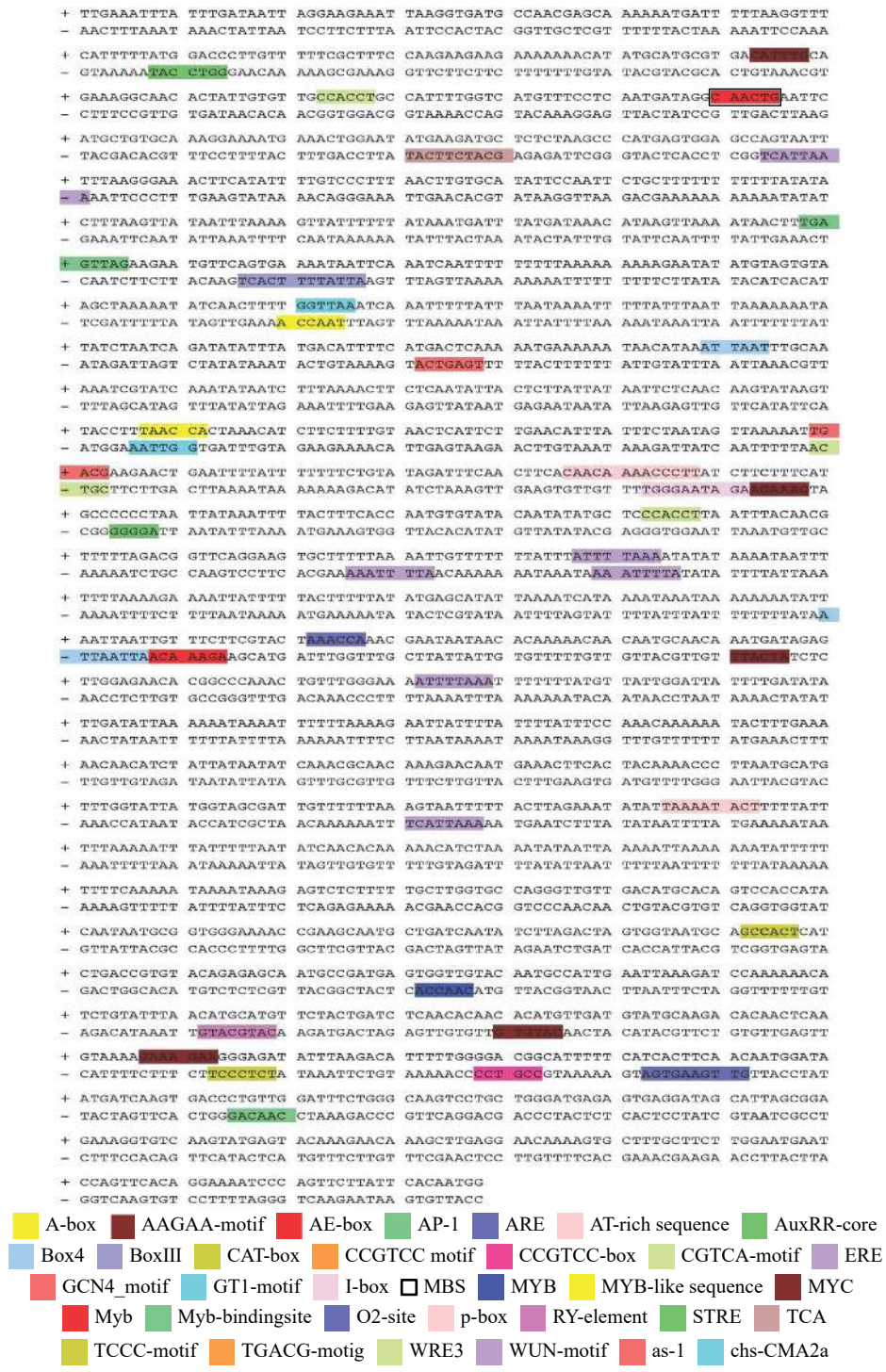
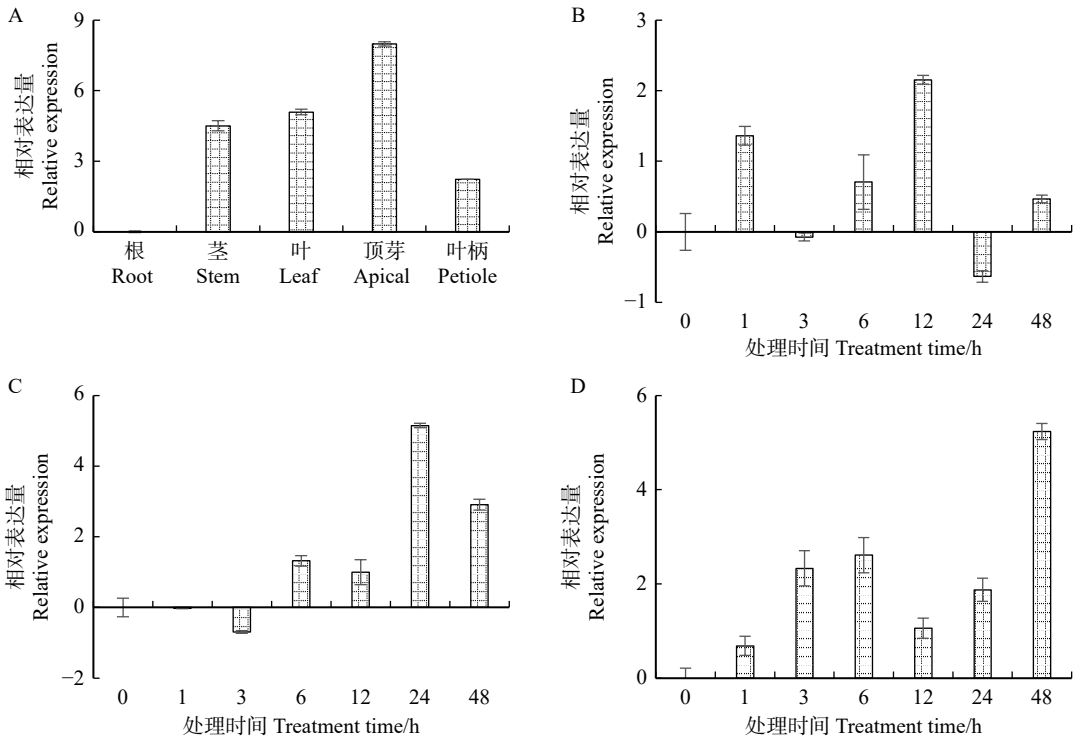


图 5 *PdbGSTU* 基因的启动子序列分析

Fig. 5 Sequence analysis of promoter of *PdbGSTU* gene

表达 *PdbGSTU* 基因叶片上，少部分接种点出现明显病斑，其余接种部分仅出现褪色；而在抑制表达 *PdbGSTU* 基因的叶片上，所有接种部位均出现明显黑色病斑，其病斑直径约为 4 ~ 6 mm，病斑总面积约为 16.46 mm^2。以上结果表明，*PdbGSTU* 基因能够正向参与到山新杨对细链格孢菌侵染的抵御过程中。

此外，GST 被认为能够参与到平衡植物体内活性氧的含量过程中。因此，本研究测定了接种病原菌前后，野生型及转基因山新杨体内过氧化氢含量和抗氧化相关酶的活性。结果显示：接种病原菌前后，过表达 *PdbGSTU* 基因的山新杨叶片中过氧化氢含量均低于野生型叶片；而抑制表达 *PdbGSTU* 基因的山新杨叶片中的过氧化氢含量则均高于野生型叶片（图 7E）。此外，GST 酶的酶活测定显示：接种病原菌前后，过表达 *PdbGSTU* 基因的山新杨叶片中 GST 酶活性均显著高于野生型叶片；而抑制表达 *PdbGSTU* 基因的山新杨叶片中的 GST 酶活性则均



A. *PdbGSTU* 基因的组织特异性表达分析；B. 水杨酸诱导后，叶片中 *PdbGSTU* 基因的表达分析；C. 茉莉酸甲酯诱导后，叶片中 *PdbGSTU* 基因的表达分析；D. 1-氨基环丙基-1-羧酸诱导后，叶片中 *PdbGSTU* 基因的表达分析。A, tissue-specific expression analysis of *PdbGSTU* gene; B, expression analysis of *PdbGSTU* gene in leaves after salicylic acid induction; C, expression analysis of *PdbGSTU* gene in leaves after induction of methyl jasmonate; D, expression analysis of *PdbGSTU* gene in leaves after induction of 1-aminocyclopropyl-1-carboxylic acid.

图 6　*PdbGSTU* 基因的表达模式分析

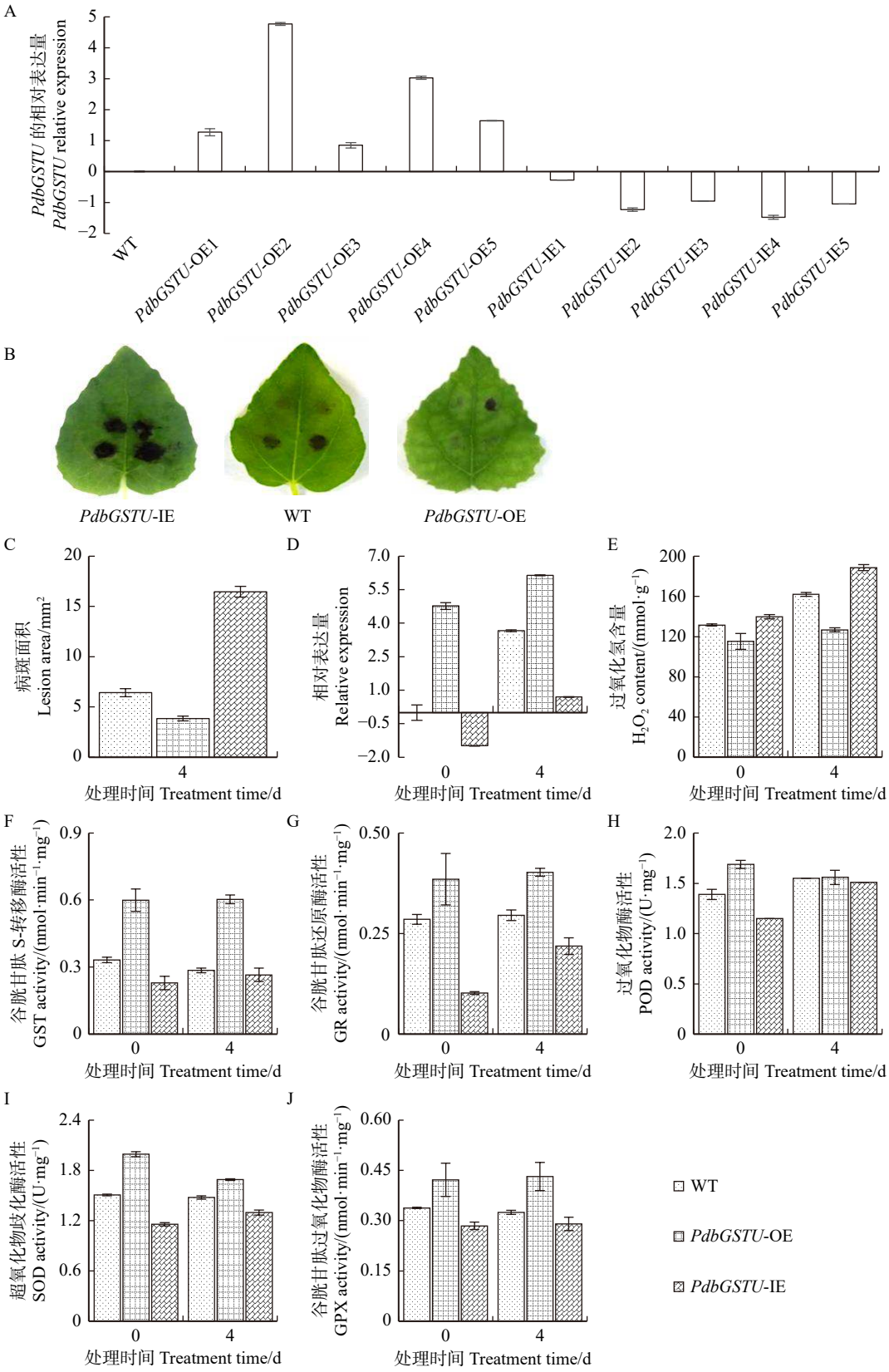
Fig. 6　Analysis of expression patterns of *PdbGSTU* gene

低于野生型叶片（图 7F）。其余抗氧化酶的活性测定显示：过表达 *PdbGSTU* 基因的山新杨叶片中超氧化物歧化酶、谷胱甘肽还原酶及谷胱甘肽过氧化物酶活性均高于野生型叶片；而抑制表达 *PdbGSTU* 基因的山新杨叶片中的超氧化物歧化酶、谷胱甘肽还原酶及谷胱甘肽过氧化物酶活性则均低于野生型叶片。尽管过氧化物酶的活性在 3 种杨树叶片未接种前存在差异，但在接种细链格孢菌后则没有明显变化（图 7G ~ J）。结果表明 *PdbGSTU* 基因能够影响植物体内活性氧的含量，过表达 *PdbGSTU* 基因能够引起杨树过氧化氢含量显著降低，同时 GST 酶、超氧化物歧化酶、谷胱甘肽还原酶及谷胱甘肽过氧化物酶活性显著升高。

3　讨论与结论

在植物组织内，谷胱甘肽 S-转移酶是一类数量众多、功能广泛的酶类。这类酶最早被证实能够参与植物对除草剂的解毒过程，随后 GST 也被证实能够参与植物响应逆境环境的胁迫等过程[11−12]。然而，目前针对 *GST* 基因的研究仍集中在草本植物中，极少有针对木本植物中的 *GST* 基因参与植物响应逆境胁迫的研究。因此，本研究克隆了山新杨谷胱甘肽 S-转移酶 *PdbGSTU* 基因，通过生物信息学分析证实其编码的 PdbGSTU 蛋白属于 GSTU 家族蛋白，相对分子质量为 29.01 kDa，且由位于 N 端和 C 端的 2 个亚基构成，其中位于 N 端的亚基含有高度保守的且能够影响其催化功能的 G-site，C 端的亚基则含有可变性较高的，能够与特定底物结合的 H-site。该预测结果与针对拟南芥、桑树、水稻中 GSTU 家族蛋白的分析一致[12,17−18]，说明在不同植物中 GSTU 家族蛋白的结构相似，这可以保证其在不同物种中表现出相同的生物功能。PdbGSTU 蛋白基因的启动子序列含有多种能够响应激素诱导或逆境胁迫的元件。其中，AuxRR-core 元件能够响应生长素的诱导，而 *PdbGSTU* 基因的表达量在顶芽中最高，该结果表明 *PdbGSTU* 基因能够响应生长素的诱导，进而参与到植物的生长发育过程中。这些针对 *PdbGSTU* 基因的初步分析显示：PdbGSTU 具有典型的 GSTU 家族蛋白结构域，且极有可能通过响应生长素信号途径参与到山新杨的生理生化过程中。

植物中 *GSTU* 基因被证实能够不同程度地响应多种植物激素的诱导。如：在拟南芥中，*AtGSTU*19 基因受茉莉酸甲酯的诱导上调表达，但在水杨酸诱导后该基因的表达则出现延迟；*AtGSTU*5 和 *AtGSTU*13 的表达则被 SA 与乙烯（ET）所抑制[29]。此外，Han 等[30]的研究显示，百合（*Lilium regale*）中的 *LrGSTU*5 基



WT. 野生型植株；*PdbGSTU*-OE. 过表达 *PdbGSTU* 基因植株；*PdbGSTU*-IE. 抑制表达 *PdbGSTU* 基因植株。WT, wild type plant; *PdbGSTU*-OE, *PdbGSTU*-overexpressed gene plant; *PdbGSTU*-IE, RNA-silenced *PdbGSTU* gene plant.

图 7 *PdbGSTU* 基因的抗病功能分析

Fig. 7 Analysis of disease-resistance function of *PdbGSTU* gene

因被 SA 和 ET 诱导后表达量显著上调。而在小麦（*Triticum aestivum*）中，*TaGSTU*97 基因的表达被 MeJA 所抑制[31]。同样，山新杨 *PdbGSTU* 基因也能够响应不同激素诱导，如受到 SA、MeJA 和 ACC 水

溶液的诱导后，*PdbGSTU* 均出现上调表达。同时，启动子序列分析显示，该基因启动子序列含有能够响应 MeJA 的顺式作用元件，证实 *PdbGSTU* 基因参与了响应茉莉酸的信号途径，从而参与该信号途径介导的各项生理生化过程。以上针对 *PdbGSTU* 基因表达模式的分析表明，该基因可能通过响应植物激素的诱导，进而参与到其介导的生理生化过程中。

此外，有研究证明 *GSTU* 基因在植物抵御病原微生物的侵染过程中起重要作用。如，抑制拟南芥中 *GSTU*13 的表达使其对大豆白粉菌（*Erysiphe pisi*）、胶孢炭疽菌（*Colletotrichum gloeosporioides*）和黄瓜织球壳菌（*Plectosphaerella cucumerina*）的抗性降低[25]。然而，Wang 等[26]的研究却显示，抑制茶树中 *CsGSTU*45 的表达增强了其对茶树炭疽病的抗性，说明该基因在茶树抵御炭疽菌侵染的过程中起负作用。本研究通过分析在细链格孢菌胁迫下杨树 *PdbGSTU* 基因的过/抑制表达植株叶片的表型特征，证实了 *PdbGSTU* 基因的抗病功能。过表达 *PdbGSTU* 基因能够显著增强山新杨对细链格孢菌的抗性，而抑制该基因的表达则使得山新杨叶片对细链格孢菌的抗性减弱，该结果表明 *PdbGSTU* 基因在山新杨抵御细链格孢菌的过程中起着积极的作用。此外，还有研究表明，*GSTU* 基因可能通过影响植物体内活性氧的含量，进而参与到植物抗病过程。如：Li 等[32]研究发现，沉默棉花（*Gossypium hirsutum*）中的 *GhGST* 基因使其体内过氧化氢的含量上升，最终导致其对棉花黄萎病的抗性下降。进一步的研究还发现，过表达 *GhGST* 基因增强了棉花中过氧化氢酶及过氧化物酶的活性，降低了其体内 H_2O_2 的含量，进而增强了其对棉花黄萎病的抗性。同样，过表达 *PdbGSTU* 基因降低了山新杨叶片中 H_2O_2 的含量，同时增强了多种抗氧化酶（SOD、GR 和 GPX）的活性；而在抑制表达 *PdbGSTU* 的山新杨叶片中则观察到了相反的结果，该结果表明 *PdbGSTU* 基因可以通过降低山新杨体内 H_2O_2 的含量，提高其对细链格孢菌的抗性。本研究证实了山新杨 *PdbGSTU* 基因能够参与杨树抗病的生理途径，对杨树抗病育种具有重要的研究价值。

参　考　文　献

[1] Yuan L, Wang L, Han Z, et al. Molecular cloning and characterization of *PtrLAR*3, a gene encoding leucoanthocyanidin reductase from *Populus trichocarpa*, and its constitutive expression enhances fungal resistance in transgenic plants[J]. Journal of Experimental Botany, 2012, 63: 2513−2524.

[2] Ullah F, Yi M. Mechanisms of ROS regulation of plant development and stress responses[J]. Frontiers in Plant Science, 2019, 10: 800−811.

[3] 龙书生. 活性氧、一氧化氮、细胞质游离钙离子和 G 蛋白在小麦对条锈菌过敏性坏死反应中的作用 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2011.
Long S S. Roles of ROS, NO, cytoplasm Ca^{2+} and G-protein in the HR process of wheat to stripe rust[D]. Yangling: Northwest A & F University, 2011.

[4] 郭建荣, 国娇娇, 马新颖, 等. 小麦壳针孢叶枯菌侵染与致病机理研究进展 [J]. 中国农学通报, 2014, 30(6): 20−25.
Guo J R, Guo J J, Ma X Y, et al. Advances on infection and pathogenic mechanism of *Mycosphaerella graminicola*[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2014, 30(6): 20−25.

[5] 阚光锋, 张广民, 房保海, 等. 烟草野火病菌 (*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*) 对烟草细胞内 5 种防御酶系统的影响 [J]. 山东农业大学学报 (自然科学版), 2002, 33(1): 28−31.
Kan G F, Zhang G M, Fang B H, et al. The effect of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* on the defendant enzymes in tobacco cells[J]. Journal of Shandong Agricultural University (Natural Science), 2002, 33(1): 28−31.

[6] 俞禄珍, 王晨, 陆苗. ROS 信号分子及其在植物抗病反应中的作用 [J]. 陕西林业科技, 2015(2): 70−72.
Yu L Z, Wang C, Lu M. The role of ROS signaling molecules in plant disease resistance response[J]. Shaanxi Forest Science and Techmology, 2015 (2): 70−72.

[7] Zurbriggen M D, Carrillo N, Tognetti V B, et al. Chloroplast-generated reactive oxygen species play a major role in localized cell death during the non-host interaction between tobacco and *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*[J]. The Plant Journal, 2009, 60: 962−973.

[8] Rossi F R, Krapp A R, Bisaro F, et al. Reactive oxygen species generated in chloroplasts contribute to tobacco leaf infection by the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea*[J]. The Plant Journal, 2017, 92(5): 761−773.

[9] Apel K, Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction[J]. Annual Review of Plant Biology, 2004, 55: 373−399.

[10] Chen S. Redox status, JA and ET signaling pathway regulating responses to *Botrytis cinerea* infection between the resistant cucumber genotype and its susceptible mutant[J]. Frontiers in Plant Science, 2020, 11: 1467−1484.

[11] Vaish S, Gupta D, Mehrotra R, et al. Glutathione S-transferase: a versatile protein family[J]. 3 Biotech, 2020, 10(7): 321.

[12] Edward R, Dixon D P. Plant glutathione transferases[J]. Methods in Enzymology, 2005, 401: 169−186.

[13] Shimabukuro R H, Swanson H R, Walsh W C. Glutathione conjugation: atrazine detoxication mechanism in corn[J]. Plant Physiology, 1970, 46(1): 103−107.

[14] Islam S, Sajib D S, Jui S Z, et al. Genome-wide identification of glutathione S-transferase gene family in pepper, its classification, and expression profiling under different anatomical and environmental conditions[J]. Scientific Reports, 2019(9): 1−15.

[15] 董凯麟, 任妙珍, 张剑, 等. 竹叶花椒 GST 基因家族的全基因组鉴定及表达分析 [J]. 分子植物育种, 2023, 21(1): 1−17.

Dong K L, Ren M Z, Zhang J, et al. Genome-wide identification and expression analysis of GST gene family in *Zanthoxylum armatum*[J]. Molecular Plant Breeding, 2023, 21(1): 1−17.

[16] 江董丽, 才华, 端木慧子, 等. 大豆 GST 基因家族全基因组筛选、分类和表达 [J]. 分子植物育种, 2013, 11(5): 465−475.
Jiang D L, Cai H, Duang M H Z, et al. Genome-wide filter, classification and expression analysis of GST gene family in soybean[J]. Molecular Plant Breeding, 2013, 11(5): 465−475.

[17] 李静, 薛佳齐, 魏世平, 等. 桑 GST 基因家族鉴定及表达分析 [J]. 分子植物育种, 2024, 22(1): 1−14.
Li J, Xue J Q, Wei S P, et al. Genome-wide identification and expression analysis of GST gene family in *Morus notabilis*[J]. Molecular Plant Breeding, 2024, 22(1): 1−14.

[18] Soranzo N, Gorla M S, Mizzi L, et al. Organisation and structural evolution of the rice glutathione S-transferase gene family[J]. Molecular Genetics & Genomic Medicine, 2024, 271: 511−521.

[19] Sytykiewicz H. Expression patterns of glutathione transferase gene (GstI) in maize seedlings under juglone-induced oxidative stress[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2011, 12: 7982−7995.

[20] Yang Q, Liu Y J, Zeng Q Y. Biochemical functions of the glutathione transferase supergene family of *Larix kaempferi*[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2014, 77: 99−107.

[21] Angela R L P, Valeria M, Ivana P, et al. Gene isolation and expression analysis of two distinct sweet orange [*Citrus sinensis* L: (Osbeck)] tau-type glutathione transferases[J]. Gene, 2009, 443: 143−150.

[22] Chronopoulou E, Madesis P, Tsaftaris A, et al. Cloning and characterization of a biotic-stress-inducible glutathione transferase from phaseolus vulgaris[J]. Planta, 2012, 235: 1253−1269.

[23] Ahn S Y, Kim S A, Yun H K. Glutathione S-transferase genes differently expressed by pathogen-infection in *Vitis flexuosa*[J]. Plant Breeding & Biotechnology, 2016, 4: 61−70.

[24] Hasan M S, Singh V, Islam S, et al. Genome-wide identification and expression profiling of glutathione S-transferase family under multiple abiotic and biotic stresses in *Medicago truncatula* L.[J]. PLoS One, 2021, 16(2): e0247170.

[25] Pislewska-Bednarek M, Nakano R, Bednarek P. Glutathione transferase U13 functions in pathogen-triggered glucosinolate metabolism[J]. Plant Physiology, 2018, 176: 538−551.

[26] Lü W Y, Jiang H, Cao Q H, et al. A tau class glutathione S-transferase in tea plant, CsGSTU45, facilitates tea plant susceptibility to *Colletotrichum camelliae* infection mediated by jasmonate signaling pathway[J]. The Plant Journal, 2023, 117(5): 16567.

[27] 遇文婧. 深绿木霉刺激植物响应蛋白 TatEpl1 诱导杨树系统抗病性机制 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2014.
Yu W J. Mechaniam of disease resistance of *Populus davidiana* × *P. alba* var. *pyramidlis* under eliciting plant response protein TatEpl1 of *Trichoderma atrovirite* inducing[D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2014.

[28] 黄颖. 山新杨响应细链格孢菌侵染的转录组分析及 *PdbMYB85* 基因功能的研究 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2022.
Huang Y. Transcriptome analysis of *Populus davidiana* × *P. alba* var. *pyramidlis* in response to *Alternaria alternata* infection and function analysis of *PdbMYB85* [D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2022.

[29] Wagner U, Edwards R, Dixon D D, et al. Probing the diversity of the *Arabidopsis* glutathione S-transferase gene family[J]. Plant Molecular Biology, 2002, 49: 515−532.

[30] Han Q. A glutathione S-transferase gene from *Lilium regale* Wilson confers transgenic tobacco resistance to *Fusarium oxysporum*[J]. Scientia Horticulturae, 2016, 198: 370−378.

[31] Kayum M A, Nath U K, Park J I, et al. Genome-wide identification, characterization, and expression profiling of glutathione S-transferase (GST) family in pumpkin reveals likely role in cold-stress tolerance[J]. Gene, 2018, 9(84): 1−21.

[32] Li Z K, Chen B, Li X X, et al. A newly identified cluster of glutathione S-transferase genes provides verticillium wilt resistance in cotton[J]. The Plant Journal, 2019, 98(2): 213−227.

（责任编辑 吴 娟 赵田芸
责任编委 卢孟柱）