

# 花生黄曲霉抗性与糖原合成酶激酶-3 的关系

严海燕<sup>1</sup> 宗成志<sup>1</sup> 包文志<sup>1</sup> 单世华<sup>2</sup>

(1. 中南民族大学 生命科学学院, 湖北 武汉 430074; 2. 山东省花生研究所, 山东 青岛 266100)

**摘要:** 前期研究证明糖原合成酶激酶(GSK3 $\beta$ ) 在花生黄曲霉敏感品种中上调表达。本研究对花生黄曲霉抗性品种和易感品种发育种子表达的 GSK3 进行了生物信息学和定量 PCR 的分析验证。结果表明 在抗性品系中 GSK3 $\beta$  基因在小果时期上调表达。由于 GSK3 $\beta$  是油菜类甾醇信号传导的负调控因子 在细胞延长中起着抑制作用。因此推测 GSK3 $\beta$  在花生果实发育中是种子和果实大小的抑制因子 与黄曲霉抗性有间接或直接的关系。

**关键词:** 花生; 糖原合成酶激酶-3; 生物信息学; 黄曲霉抗性; 果实发育

中图分类号: S565.03 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2011)05-0001-04

## Relationship between Peanut *Aspergillus flavus* Resistance and Glycogen Synthase Kinase-3

YAN Hai-yan<sup>1</sup> ZONG Cheng-zhi<sup>1</sup> BAO Wen-zhi<sup>1</sup> SHAN Shi-hua<sup>2</sup>

(1. College of Life Sciences, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China

2. Shandong Peanut Research Institute, Qingdao 266100, China)

**Abstract:** It has been reported that Glycogen synthase kinase-3 was upregulated in peanut developing seed coat of *Aspergillus flavus* sensitive line. In this paper, we analysed the expression differences of GSK3 $\beta$  gene in developing seeds between *Aspergillus flavus* resistant lines and susceptible lines with bioinformatic methods and QPCR-methods. The results indicated in early fruits stage, GSK3 $\beta$  gene was upregulated in *Aspergillus flavus* resistant lines. GSK3 $\beta$  is negative regulator for brassinosteroids, which inhibits cell elongation. Thus it's possible that GSK3 $\beta$  is a inhibitive factor in sizes of seeds and fruits in peanut development, direct or indirect related to the resistance to *Aspergillus flavus*.

**Key words:** Peanut; Glycogen synthase kinase-3; Bioinformatics; *Aspergillus flavus* resistance; Fruit development

糖原合成酶激酶(GSK3) 是一种高度保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,在动物中参与诸如糖原合成、胰岛素调节、多种蛋白的转录激活和发育调控等许多生命活动的信号转导。在拟南芥中的 GSKs 家族分为四种<sup>[1]</sup>。GSKs 家族在植物中也扮演着重要的角色,现有的证据表明,植物 GSKs 可能参与植物的渗透胁迫应答<sup>[2]</sup>、伤害应答<sup>[3]</sup>以及油菜素内酯信号转导<sup>[4,5]</sup>,调节花的发育等等一系列生命活动进程<sup>[6]</sup>。GSK3 类基因 *BF595610* 在黄曲霉敏感品系的发育中种皮上调表达<sup>[7]</sup>,其原因如何,在果实的其他发育时期也是如此,进一步探究清楚,对于研究花生黄曲霉抗性机理有一定理论和实际意义。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

EST 数据来自 GeneBank 数据库中黄曲霉抗性、TSMV 敏感的品种 C20R 和黄曲霉敏感、TSMV 抗性品种 TFR 以及 VBL6 发育中种子的 cDNA 文库。

花生材料取自黄曲霉抗性品种 KB153 和敏感品种 JH1012 发育中小果(未形成种子)、未形成颜色时的白色种皮(种皮 1)、形成颜色的种皮(种皮 2)、发育中子叶、发育中果荚、幼嫩叶片。

### 1.2 方法

RNA 提取采用 CTAB 方法<sup>[8]</sup>。反转录如下:

收稿日期: 2011-08-11

基金项目: 与山东省花生所合作项目(HZY05013); 国家自然科学基金项目(NSFC307711361)

作者简介: 严海燕(1961-),女,湖北人,教授,博士,主要从事植物发育分子生物学教学和研究工作。

dNTPsMix(各 10 mmol/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L, 5  $\times$  RT 缓冲液 4  $\mu$ L, Oligo( dT) 10( 250 mol/L) 5  $\mu$ L, Primescriptase 0.25  $\mu$ L, RNA 9.75  $\mu$ L。每个体系中, 总 RNA 均为 0.8  $\mu$ g。

PCR 引物以 *BF595610* 为模板设计引物, F 引物: 5'-TGACCAACTCGTGGAAAT-3', R 5'-CGTCAAA GAAAGGATGTG-3'。

Actin 引物根据 *GO340080* 设计: F 5'-GAAG CACCCCTCAACCCA-3', R 5'-ACACCGTCTCCAGA GTCCAA-3'。

定量 PCR 扩增体系为 10  $\mu$ L, 其中包含 SYBR® GreenPCRMasterMix 5.0  $\mu$ L, 引物 R( 10  $\mu$ mol/L) 0.2  $\mu$ L, 引物 F( 10  $\mu$ mol/L) 0.2  $\mu$ L, 模板( cDNA 第一链反应产物稀释 10 倍) 0.2  $\mu$ L, 无菌蒸馏水 补至 10  $\mu$ L。

定量 PCR 扩增程序为 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 95 $^{\circ}$ C 25 s; actin 引物 54 $^{\circ}$ C, *BF595610* 引物 45 $^{\circ}$ C 30 s; 72 $^{\circ}$ C 20 s。45 个循环, 在循环过程第二步收集荧光信号。

## 2 结果与分析

### 2.1 *BF595610* 在 KB153 和 JH1012 果实不同发育时期和部位及叶片中的表达分析

在对黄曲霉抗性和敏感品种的发育早期小果、没有着色期的种皮、着色的种皮、发育中子叶、发育中果荚、嫩叶中 *GSK3* 的表达进行定量 PCR 分析, 结果表明, 抗性品种和敏感品种在各时期各部位的表达趋势一致( 图 1), 表明在发育过程中, *GSK3* 的主要功能是保守的。相对于肌动蛋白, *GSK3* 在小果、果荚和叶片中都是上调表达, 而其他部位和时期都是下调表达。

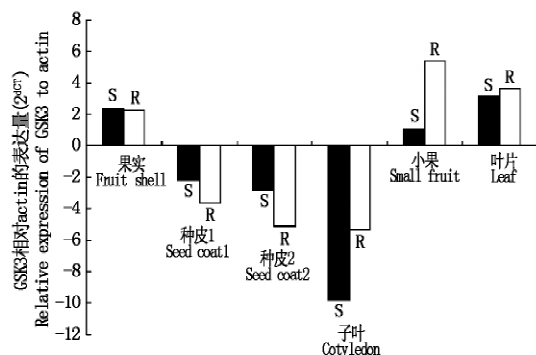


图 1 *GSK3* 在花生黄曲霉抗性和敏感品种不同发育时期和部位的表达

Fig. 1 Expression of *GSK3* in different tissues at different developing stage of peanut *A. flavus* resistant and sensitive strains

抗性品种和敏感品种之间比较, *GSK3* 在抗性品种的小果期、发育中子叶和叶片明显上调表达

(图 2)。

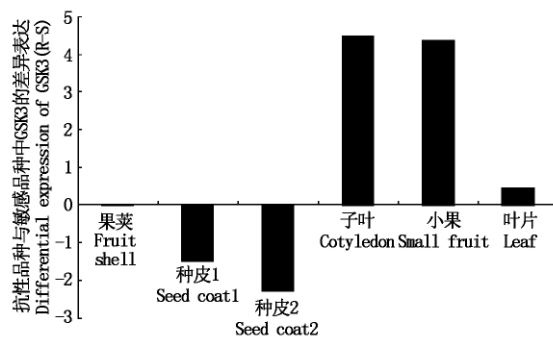


图 2 黄曲霉抗性敏感品种间 *GSK3* 基因在花生不同发育时期和部位的表达差异

Fig. 2 Expression differences of *GSK3* gene between *A. flavus* resistant and sensitive strains at different developmental stages and different tissues

由于 *GSK3* 是一个基因家族, 与其相似的基因在拟南芥中有 10 个基因<sup>[9]</sup>。定量 PCR 获得的结果也许是多种 *GSK3* 表达的总的结果, 因此对开放数据库中相似的花生发育种子中表达的 *GSK3* 类似基因进行了序列相似性和表达情况分析。

### 2.2 在黄曲霉抗性品种和敏感品种中 *GSK3* 表达的相似序列比较分析

在开放数据库获得的花生发育中种子表达的 *BF595610* 类似的 *GSK3s* 和相似度列在表 1 中。最相似的是 VBL6cDNA 文库中的两个 cDNA *GO326561* 和 *GO330601*, 其次是黄曲霉敏感品种 TFR 发育早期 5 表达的 *ES722127*, 黄曲霉抗性品种 C20R 发育中期 6 和发育晚期 7 表达的 *ES718968* 和 *ES719538* 相似性较小。此外黄曲霉敏感品种早期 6 还表达了两条相似性更低的 cDNA *ES712701* 和 *ES714725*( 表 2)。

从表 1 还可以看出, 与 *BF595610* 最为相似的 cDNA 编码糖原合成酶激酶 3 $\beta$  蛋白, 该蛋白被证明是油菜类固醇激素信号传导途径中的重要成分<sup>[4, 5]</sup>。将所用引物与相似 EST 序列比较, 发现与正向引物最相似的是来自敏感品种种子早期 5 的 *ES722127*( 图 3), 该序列编码 *GSK3 $\beta$* ( 表 1)。因此用 *BF595610* 引物进行定量 PCR 得到的结果反映的可能主要是油菜类固醇激素作用的情况。

对 *BF595610* 相似的花生种子 EST 序列在黄曲霉抗性和敏感品种种子的不同发育时期的分布进行分析, 结果显示, *GSK3* 类似序列在抗性和敏感品种种子发育的不同时期分布不同( 表 2)。敏感品种在种子发育早期 5 有一条 *GSK3 $\beta$*  EST, 而抗性品种没有, 相当于抗性品种在这个时期相对于敏感品种下调表达。在种子发育中期 6, 抗性品种 C20R 有一条

*GSK3β* 相似序列,虽然其 EST 序列与 *BF595610* 的相似度小于敏感品种的 *ES722127* 与 *BF595610* 的相似度,但其编码的蛋白序列与 *BF595610* 编码的蛋白相似度却大于 *ES722127* 与 *BF595610* 的相似度(图 4)。敏感品种在种子发育中期 6 有两条 EST,但无论其 EST 序列还是其编码的 GSK 蛋白序列与 *BF595610* EST 和其编码蛋白序列的相似度都低于抗性品种中的 *ES718968*(表 1,图 4)。在种子

发育晚期 7,只有抗性品种 C20R 中有一条 *ES719538* 序列(表 2),它与 *BF595610* EST 和其编码蛋白序列的相似度都高于敏感品种 TFR6,但低于敏感品种的 TFR5 以及抗性品种的 C20R6(表 1,图 4)。这些结果表明,*GSK3* 类基因在黄曲霉抗性和敏感品种发育种子的不同时期表达和分布都不同,可能有不同的调控机理。

表 1 关于 *BF595610* 的相似序列 blast nr 的结果  
Tab.1 *BF595610* similar sequences from blast nr

基因 Genebank No.	功能 Function	相似度 Bits Similarity
<i>GO326561</i>	Glycogen synthase kinase-3 beta	412
<i>GO330601</i>	Glycogen synthase kinase-3 beta	361
<i>ES712701</i>	Similar to shaggy-related protein	91.5
<i>ES722127</i>	Glycogen synthase kinase-3 beta	309
<i>GO324196</i>	Shaggy related protein kinase ASK-GAMMA	237
<i>ES719538</i>	Glycogen synthase kinase	244
<i>ES714725</i>	Glycogen synthase kinase	46.4
<i>ES718968</i>	Glycogen synthase kinase-3 beta	125

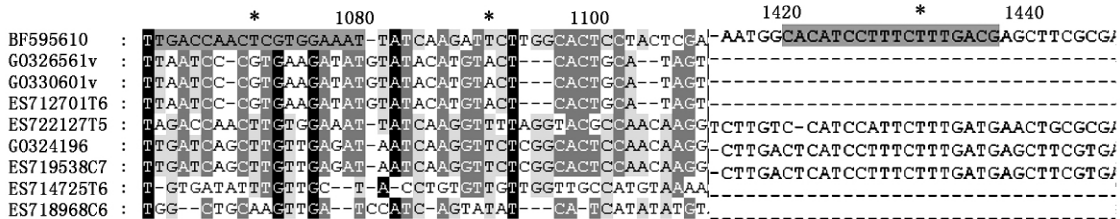


图 3 *BF595610* 引物与相似花生 EST 序列的比较

Fig. 3 Comparison of primers of *BF595610* to similar EST sequences

表 2 *BF595610* 基因的相似序列按照品种与时期分类

Tab.2 Classification of *BF595610* similar genes according to cultivars and development stages

序列号 Genebank No.	TFR			C20R			Vbl6
	R5	R6	R7	R5	R6	R7	
	<i>ES722127</i>	<i>ES712701</i>			<i>ES718968</i>	<i>ES719538</i>	<i>GO326561</i>
		<i>ES714725</i>					<i>GO330601</i>
							<i>GO324196</i>

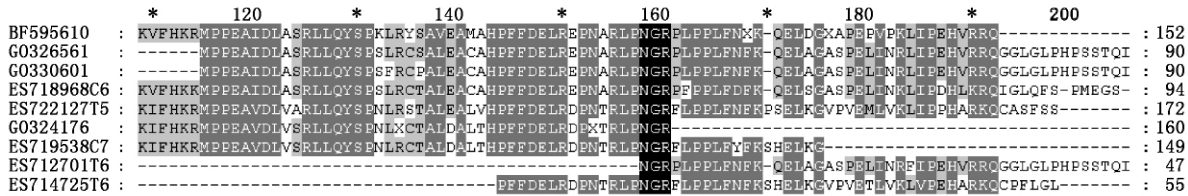


图 4 花生发育中种子 GSK3 蛋白序列的比较

Fig. 4 Comparison of protein sequences of GSK3s in developing peanut seeds

3 讨论

*GSK3*(属于 MAPK 家族胞质激酶,在植物油菜类甾醇( Brassinosteroids ,BR) 信号传导途径中是一个关键的传递环节。拟南芥编码 *GSK3* 的基因是 *Bin2/dwarf12/ucul1/AtSK2-I* [10-12],在没有 BR 信号时,*GSK3* 处于磷酸化激活状态,对 *BZR1/BZR2*

磷酸化,通过泛素蛋白酶途径使它们降解,抑制它们的转录活性[13]。当有 BR 信号时,经过一系列的磷酸化、去磷酸化信号传递,*GSK3* 失去磷酸而失活,解除对 *BZR1/BZR2* 的抑制,开始激活它们所控制的转录[5]。最近的研究发现 *Bin2* *GSK3* 与其他 *GSK3* 类的激酶作用重叠,共同调控 BR 的信号传导[4]。*BIN2* 本身在 BR 信号下也受蛋白酶降解途

径的调节<sup>[14]</sup>。在花生果实的发育过程中,也许不同的 GSK3 转录的组合造成了果实发育中结构建成和代谢组合的变化,导致对逆境抗性的变化。

BR 与其他激素一起,在植物的各种发育和逆境信号传导过程中起重要作用<sup>[15]</sup>。如在黄瓜早期果实发育中<sup>[16]</sup>、在植物黄化和萌发中<sup>[17]</sup>、在水稻籽粒灌浆期<sup>[18]</sup>、葡萄浆果成熟期<sup>[19]</sup>、茎端维管束分化<sup>[20]</sup>、向性生长<sup>[21]</sup>、渗透胁迫<sup>[2]</sup>和伤害胁迫<sup>[3]</sup>等过程中。GSK3 活性形式是 BR 的负调控作用。其大量存在,说明 BR 诱导的正调控转录因子受到抑制。BZR2 和 BZR1 可以促进细胞延长,同时也促进 BR 合成<sup>[22]</sup>,说明在发育的小果中 GSK3 的在黄曲霉抗性品种上调表达具有抑制果实在细胞延长方面的作用,从而影响果实的生长,这与一般黄曲霉抗性品种果实和种子粒小的表型是一致的<sup>[23 24]</sup>。这种小果现象可能由于营养竞争而引起。因为另一方面,黄曲霉抗性品种由于在果实和种子外被的结构和组成上有更严密的防御<sup>[25 26]</sup>,需要更多的营养物质和能量供给,造成个体生长供给受到限制。

#### 参考文献:

- [1] Yoo M, Albert V A, Soltis P S *et al.* Phylogenetic diversification of glycogen synthase kinase 3/SHAGGY-like kinase genes in plants[J]. BMC Plant Biol 2006 6: 3.
- [2] Piao H, Pih K, Lim J *et al.* An Arabidopsis GSK3/shaggy-Like gene that complements yeast salt stress-sensitive mutants is induced by NaCl and abscisic acid [J]. Plant Physiol, 1999, 119(4): 1527 - 1534.
- [3] Jonak C, Beisteiner D, Beyerly J *et al.* Wound-induced expression and activation of WIG a novel glycogen synthase kinase 3 [J]. Plant Cell 2000, 12(8): 1467 - 1476.
- [4] Yan Z, Zhao J, Peng P *et al.* BIN2 functions redundantly with other Arabidopsis GSK3-Like kinases to regulate brassinosteroid signaling [J]. Plant Physiol, 2009, 150(2): 710 - 721.
- [5] Kim T, Guan S, Sun Y *et al.* Brassinosteroid signal transduction from cell surface receptor kinases to nuclear transcription factors [J]. Nat Cell Biol Nat Cell Biol 2009, 11(10): 1254 - 1260.
- [6] Jonak C, Hirt H. Glycogen synthase kinase 3/SHAGGY-like kinases in plants: an emerging family with novel functions [J]. Trends Plant Sci 2002, 7: 457 - 461.
- [7] 单世华, 李春娟, 严海燕, 等. 花生种皮抗黄曲霉差异基因表达分析 [J]. 植物遗传资源学报, 2007, 8(1): 26 - 29.
- [8] 宗成志. 发育中花生种子黄曲霉抗性相关基因的研究 [D]. 武汉: 中南民族大学, 2010.
- [9] Charrier B, Champion A, Henry Y *et al.* Expression profiling of the whole arabidopsis shaggy-like kinase multigene family by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction [J]. Plant Physiol 2002, 130(2): 577 - 590.
- [10] Choe S, Schmitz R J, Fujioka S *et al.* Arabidopsis Brassinosteroid-insensitive dwarf12 mutants are semidominant and defective in a Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$ -like kinase [J]. Plant Physiol, 2002, 130(3): 1506 - 1515.
- [11] Li J, Nam K H, Vafeados D *et al.* BIN2, a new brassinosteroid-insensitive locus in Arabidopsis [J]. Plant Physiol 2001, 127: 14 - 22.
- [12] Perez-Perez J M, Ponce M R, Micol J L. The UCU1 Arabidopsis gene encodes a SHAGGY/GSK3-like kinase required for cell expansion along the proximodistal axis [J]. Dev Biol 2002, 242: 161 - 173.
- [13] He J X, Gendron J M, Yang Y L *et al.* The GSK3-like kinase BIN2 phosphorylates and destabilizes BZR1, a positive regulator of the brassinosteroid signaling pathway in Arabidopsis [J]. Proc Natl Acad Sci USA 2002, 99: 10185 - 10190.
- [14] Peng P, Yan Z, Zhu Y *et al.* Regulation of the Arabidopsis GSK3-like Kinase BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 2 through Proteasome-Mediated Protein Degradation [J]. Mol Plant 2008, 1(2): 338 - 346.
- [15] Zhang S, Wei Y, Lu Y *et al.* Mechanisms of brassinosteroids interacting with multiple hormones [J]. Plant Signal Behav 2009, 4(12): 1117 - 1120.
- [16] Fu F, Mao W, Shi K *et al.* A role of brassinosteroids in early fruit development in cucumber [J]. J Exp Bot, 2008, 59(9): 2299 - 2308.
- [17] Symons G M, Reid J B. Brassinosteroids, de-etiolation and the re-emerging art of plant hormone quantification [J]. Plant Signal Behav 2008, 3(10): 868 - 870.
- [18] Wu C, Trieu A, Radhakrishnan P *et al.* Brassinosteroids regulate grain filling in rice [J]. Plant Cell, 2008, 20(8): 2130 - 2145.
- [19] Symons G M, Davies C, Shavrukov Y *et al.* Grapes on Steroids. Brassinosteroids are involved in grape berry ripening [J]. Plant Physiol 2006, 140(1): 150 - 158.
- [20] Ibaes M, Fàbregas N, Chory J *et al.* Brassinosteroid signaling and auxin transport are required to establish the periodic pattern of Arabidopsis shoot vascular bundles [J]. Proc Natl Acad Sci U S A 2009, 106(32): 13630 - 13635.
- [21] Li L, Xu J, Xu Z *et al.* Brassinosteroids stimulate plant tropisms through modulation of polar auxin transport in brassica and Arabidopsis [J]. Plant Cell 2005, 17: 2738 - 2753.
- [22] He J, Gendron J M, Sun Y *et al.* BZR1 is a transcriptional repressor with dual roles in brassinosteroid homeostasis and growth responses [J]. Science, 2005, 307(5715): 1634 - 1638.
- [23] 纪荣昌, 唐兆秀, 李光星, 等. 五个抗黄曲霉花生品种的生产力及田间抗性测定 [J]. 福建农业科技, 2000, 3: 10 - 11.
- [24] 周桂元, 梁炫强, 李一聪, 等. 抗黄曲霉侵染花生品种的引进鉴定和利用 [J]. 花生学报, 2002, 31(2): 14 - 17.
- [25] 梁炫强, 周桂元, 潘瑞炽. 花生种皮蜡质和角质层与黄曲霉侵染和产毒的关系 [J]. 热带亚热带植物学报, 2003, 11(1): 11 - 14.
- [26] 周桂元, 梁炫强, 李一聪, 等. 抗黄曲霉花生种皮纹理超微结构的研究 [J]. 中国油料作物学报, 1999, 17: 43 - 53.