

杨霞, 王笑, 管荣展, 等. 多抗性稗草中 2 个谷胱甘肽转移酶基因的克隆与分析[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(6): 1296-1303.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2015.06.016

多抗性稗草中 2 个谷胱甘肽转移酶基因的克隆与分析

杨霞¹, 王笑^{1,2}, 管荣展², 李永丰¹, 董明超^{1,2}, 张自常¹

(1. 江苏省农业科学院植物保护研究所, 江苏 南京 210014; 2. 南京农业大学农学院, 江苏 南京 210095)

摘要: 为深入揭示稗草中谷胱甘肽转移酶(GST)对除草剂的解毒机理, 本研究通过 PCR 方法从多抗性稗草中获得了 *phi* 类 *EcGSTF1* 和 *zeta* 类 *EcGSTZ1* 基因, 并进行生物信息学、基因表达研究及酶活性测定。系统进化树分析结果显示稗草 GST 家族成员与禾本科植物的亲缘关系较近; 将 *EcGSTF1* 和 *EcGSTZ1* 分别插入 pET28b 载体中进行 0.4 mmol/L IPTG 诱导表达, 蛋白质分子量大小为 26 000; 实时荧光定量 PCR 结果显示 *EcGST* 在多抗性稗草中的表达量高于在敏感性稗草, 其中 *EcGSTF1* 基因表达量比 *EcGSTZ1* 高; GST 酶比活力分析显示表明未施药处理的多抗性稗草 GST 酶比活力高于敏感性稗草, 施药 7 d 后多抗性稗草 GST 酶比活力高于敏感性稗草。综上所述, 稗草中 GST 酶对除草剂有解毒作用, 其中 *phi* 类 GST 更为突出。

关键词: 稗草; 谷胱甘肽转移酶(GST); 基因克隆; 原核表达; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: S451.21

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2015)06-1296-08

Cloning and characterization of two glutathione S-transferases genes from herbicide-resistant *Echinochloa crus-galli*

YANG Xia¹, WANG Xiao^{1,2}, GUAN Rong-zhan², LI Yong-feng¹, DONG Ming-chao^{1,2}, ZHANG Zi-chang¹

(1. Institute of Plant Protection, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 2. College of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: To achieve a better understanding of the detoxification mechanism of plant glutathione S-transferases (GST), *phi EcGSTF1* and *zeta EcGSTZ1* genes were identified from multiple herbicide-resistant and susceptible barnyard-grass (*Echinochloa crus-galli*) using PCR method and analyzed using bioinformatics. Gene expression and enzyme activity were measured as well. Phylogenetic analysis revealed that *EcGSTs* was highly homologous to GST from Gramineae plants. The molecular weight of HIS₆-GST fusion proteins induced by 0.4 mmol/L IPTG was 26 000 in weight. Quantitative real-time PCR showed that the expression level of *EcGSTF1* was higher than that of *EcGSTZ1*, and *EcGST* gene expression levels in resistant populations was higher than that in susceptible populations. The specific activity of GST was higher in resistant biotypes than that in susceptible biotypes seven days after herbicides application.

Key words: *Echinochloa crus-galli*; glutathione S-transferases; gene cloning; prokaryotic expression; quantitative real-time PCR

收稿日期: 2015-07-01

基金项目: 国家自然科学基金项目(31371953、31200334); 江苏省农业科技自主创新基金项目[SCX(13)3063]; 江苏省面上基金项目(SBK2014020595)

作者简介: 杨霞(1981-), 女, 江苏姜堰人, 博士, 副研究员, 主要从事杂草抗药性机制研究。(E-mail) yangxia@jaas.ac.cn

通讯作者: 李永丰, (E-mail) liyongfeng_2010@163.com

谷胱甘肽转移酶(GST)是一类由超基因家族编码的古老的多功能酶类, 以同源或异源二聚体形式的可溶性蛋白广泛存在于微生物和动植物中。目前 GST 至少分为 13 个种类, 在植物中仅发现 7 种, 即 *phi* (F)、*tau* (U)、*theta* (T)、*lambda* (L)、*zeta* (Z)、谷胱甘肽依赖的抗坏血酸还原酶(DHAR)和四氯代氢醌脱卤素酶(TCHQD)^[1]。除 *theta* 和 *zeta* 在动物

中存在外,其他 *GST* 家族为植物中所特有。*phi* 类和 *tau* 类是种类最多、含量最为丰富的植物 *GST* 基因,利用 *G* 位点含有保守的丝氨酸残基将还原型谷胱甘肽与外源亲电子物质相结合,进行催化作用,从而达到解毒作用^[2-3]; *lambda* 类与植物耐药性相关,如水稻中的 *OsGSTL1* 和 *OsGSTL2*^[4-5]; *zeta* 类在酪氨酸催化机制中起作用; *theta* 类在解毒氧化脂类中起作用^[6]。植物体中 *GST* 除对包括除草剂在内的异源物质具有解毒功能外^[7-9],还发现其在抗氧化胁迫、抗逆反应、抗病、细胞信号转导、跨膜运输定位等方面也有重要作用^[10-13]。

稗草(*Echinochloa crus-galli*)是全球农业生产中的重要恶性杂草之一,同时也是中国稻田恶性杂草之首,严重影响水稻的生长发育和产量^[14-15]。使用除草剂防控杂草是广大农户最简单、有效的措施,但是由于长时间连续使用单一作用机理的除草剂,加速了农田杂草产生抗药性,目前已报道了中国稻田稗草对禾草丹、丁草胺、精喹禾灵、精恶唑禾草灵及二氯喹啉酸等除草剂产生了抗药性^[16-17]。前期研究中,江苏省农业科学院植物保护研究所草害与农药研究室已筛选获得具有兼抗二氯喹啉酸、五氟磺草胺和双草醚等多种除草剂的多抗性稗草^[18-19]。本研究拟从多抗性稗草中克隆抗性基因,通过原核表达、荧光定量 PCR 和酶比活力测定等方法进行功能分析,研究稗草的抗药性机制和 *GST* 解毒机理,为改良作物抗逆性、开发新型除草剂提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料与供试药剂

供试材料:多抗性和敏感性稗草(*Echinochloa crus-galli*)种子均于 2010 年 7 月采集于安徽省庐江县稻田。

供试药剂:50% 二氯喹啉酸可湿性粉剂(Quinclorac,浙江新安化工集团股份有限公司产品),2.5% 五氟磺草胺油悬浮剂(Penoxsulam,商品名为稻杰,美国陶氏益农公司产品)和 20% 双草醚可湿性粉剂(Bispyribac-sodium,江苏省激素研究所有限公司产品)。

1.2 稗草总 RNA 的提取及 cDNA 的合成

在装有土的塑料盆钵中分别播种多抗性和敏感性稗草种子,置于人工气候箱(光照 16 h/黑暗 8 h、白天 30 ℃/夜间 25 ℃)中培养。待稗草苗长至 2~3

时期时,分别收获多抗性和敏感性的稗草叶片进行总 RNA 提取,提取方法参照 RNA 提取试剂盒(原平皓生物技术有限公司产品)说明书进行。以 1 μg RNA 为模板,采用反转录试剂盒(GBT 公司产品)进行稗草 cDNA 第一链的合成,反应条件为 25 ℃ 10 min,42 ℃ 30 min,85 ℃ 5 min。

1.3 *EcGST* 基因的克隆及生物信息学分析

根据前期稗草转录组测序数据中得到的 *GST* 基因序列为探针,登陆 NCBI 网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)进行 Blastn 搜索,分析其他物种已知 *GST* 同源基因序列,设计基因克隆的引物。扩增 *EcGSTF1* 基因的正向引物 5'-GAAGAGAGATCATG-GCTCCGAT-3'和反向引物 5'-CCACTTCAAGCAGAT-GGCTTC-3';扩增 *EcGSTZ1* 基因的正向引物 5'-CACCTGACCTACTGCTGCATCT-3'和反向引物 5'-GATGGCTCGCTAATCTTGATTC-3'。分别以多抗性和敏感性稗草 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,50 μl 反应体系包括:cDNA 1 μl,5×PrimeSTAR Buffer (Mg²⁺) 10 μl,dNTP mixture (10 mmol/L) 4 μl,PrimeSTAR HS DNA polymerase 1 μl,正、反向引物 (10 μmol/L) 各 2 μl,ddH₂O 30 μL。PCR 反应程序为 95 ℃ 预变性 3 min;95 ℃ 变性 30 s,56 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 1 min,33 个循环。将 PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳后用胶回收试剂盒(BIOMIGA 公司产品)进行回收纯化。然后将 PCR 纯化产物进行 3' 端加 polyA 尾,70 μl 反应体系为:10×Buffer (Mg²⁺) 7 μl,Taq 酶 4 μl,dNTP (10 mmol/L) 7 μl,PCR 纯化产物和 ddH₂O 52 μl。72 ℃ 延伸 30 min 后于冰上冷却,反应产物进行胶回收纯化。将纯化好的已加 polyA 尾的片段连接至 pMD-18T 载体(TaKaRa 公司产品),筛选阳性单克隆送英潍捷基(上海)贸易有限公司进行测序。采用 BioXM 2.6 软件对测序得到的基因序列进行开放阅读框(ORF)分析,翻译得到相应的氨基酸序列,以其氨基酸序列为探针,在 NCBI 网站上进行 BLASTP 搜索,获得其他物种的同源蛋白质氨基酸序列,利用 MEGA5.05 程序的 Neighbour-joining (NJ) 模型对这些 *GST* 家族成员进行系统发生树分析。

1.4 载体构建及其原核表达

采用 BioXM 2.6 软件对 *EcGSTZ1* 和 *EcGSTF1* 的 ORF 序列进行酶切位点分析,结合原核表达载体 pET-28b 多克隆位点限制性内切酶类型,设计基因

C 端和 N 端分别含 *Nde* I 和 *Xho* I 酶切位点。其中 *EcGSTZ1* 基因的载体构建引物为 *EcGSTZ1-Nde-F*: 5'-GGTATATACATATGCGGACGGCGAAACC-3' (划线处为 *Nde* I 位点), *EcGSTZ1-Xho-R*: 5'-GGCTCTCACTCGAGTCATTATGATGGTGCATCTGG-3' (划线处为 *Xho* I 位点); *EcGSTF1* 基因的载体构建引物为 *EcGSTF1-Nde-F*: 5'-GGTATATACATATGGCTCCGATGAAGCTGTAC-3' (划线处为 *Nde* I 位点), *EcGSTF1-Xho-R*: 5'-GGCTCTCACTCGAGTTATCAAGCAGATGGCTTCATCAG-3' (划线处为 *Xho* I 位点)。*EcGSTZ1* 基因以 *EcGSTZ1-Nde-F* 和 *EcGSTZ1-Xho-R* 为两端引物, *EcGSTF1* 以 *EcGSTF1-Nde-F* 和 *EcGSTF1-Xho-R* 为两端引物, 分别扩增 *EcGSTZ1* 和 *EcGSTF1* 的 ORF 序列。用 *Nde* I 和 *Xho* I 酶双酶切 PCR 扩增产物, 同时用相同的酶双酶切含有 HIS 标签的原核表达载体 pET-28b, 分别回收基因片段和线性载体, 经 T4-DNA 连接酶 (TaKaRa 公司产品) 16 °C 连接过夜后转化大肠杆菌 DH5 α , 在含有卡那霉素 (Km^+) 的 LB 固体培养基上 37 °C 过夜培养。经 PCR 和双酶切鉴定出阳性单克隆后进行测序验证。

将测序正确的重组质粒转化大肠杆菌菌株 BL21 接种到含 Km^+ 的 LB 固体培养基上 37 °C 过夜培养后, 挑取单菌落接种到 10 ml 含 Km^+ (50 mg/L) 的 LB 液体培养基中, 37 °C 培养过夜。按 1:100 的比例接种至新鲜的含 Km^+ 的 LB 培养基中, 37 °C 培养至 OD_{600} 约 0.6 时, 加入 IPTG 至终浓度为 0.4 mmol/L, 37 °C 诱导 0 h、1 h、2 h、3 h、4 h 和 5 h, 并依次取样。4 000 g 离心收集菌体, 用缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl、200 mmol/L NaCl、1 mmol/L EDTA) 悬浮后, 13 000 g 离心 10 min 后, 取上清液分别加入 5 \times SDS 上样缓冲液, 进行 12% SDS-PAGE 蛋白质表达检测。

1.5 实时荧光定量 PCR

取 3 叶期多抗性和敏感性稗草喷施 50% 二氯喹啉酸可湿性粉剂 (制剂用药量为 450 g/hm²)、2.5% 五氟磺草胺悬浮剂 (制剂用药量为 1 200 ml/hm²) 和 20% 双草醚可湿性粉剂 (制剂用药量为 200 g/hm²), 并设喷施清水为空白对照。药剂喷施处理 24 h 后收获植株, 提取 RNA 并反转录为 cDNA。以 cDNA 为模板进行实时荧光定量 PCR 分析, 设 β -actin 基因为内参, 内参的特异性引物为 5'-CACTGGTGTTCATGGTAGG-3' 和 5'-AGAAAGTGTG-

ATGCCAGAT-3'。目标基因 *EcGSTZ1* 的特异性引物为: 5'-AGGCTATGCCGTTATTGGTT-3' 和 5'-TTGATGGCTCGGTAATCTTG-3'; 目标基因 *EcGSTF1* 的特异性引物为: 5'-TTCCAGTGCCTCATCAGTCC-3' 和 5'-CCATCCGCATTAGGAAAACC-3'。实时定量 PCR 在 ABI-Stepone plus 实时定量 PCR 仪上进行, 反应体系及程序参照 TaKaRa SYBR Premix EX TaqTM II 说明书操作。3 次重复, 对 *EcGST* 基因在施药前敏感性稗草 (SC)、施药处理后敏感性稗草 (ST)、施药前多抗性稗草 (RC) 和施药处理后多抗性稗草 (RT) 进行荧光定量 PCR, 利用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法对不同抗性稗草施药前后 *EcGST* 基因的相对定量进行计算^[20]。以 SC 为对照, 其 *EcGST* 基因的表达量定义为 1 个单位, 对其他基因的表达量进行定量分析。

1.6 GST 酶比活力测定

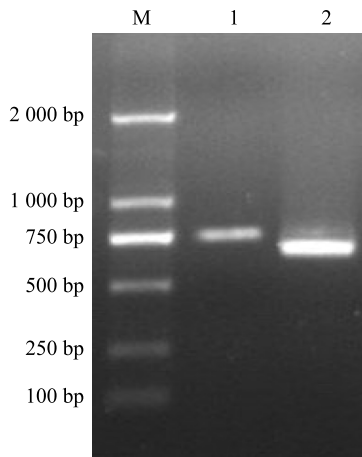
多抗性和敏感性稗草 2~3 叶期, 同时以 50% 二氯喹啉酸可湿性粉剂 (制剂用药量为 450 g/hm²)、2.5% 五氟磺草胺悬浮剂 (制剂用药量为 1 200 ml/hm²) 和 20% 双草醚可湿性粉剂 (制剂用药量为 200 g/hm²) 进行喷施处理, 收获处理第 0 d、1 d、2 d、3 d、5 d 和 7 d 的叶片于 -80 °C 保存, 每次处理重复 3 次。参照 Pamela 等的方法提取酶液^[21], 参照 Gerard 等方法测定酶活力^[22], 参照 Bradford 考马斯亮蓝 G-250 方法测定蛋白质含量^[23]。酶比活力 [nmol/(min·mg)] = 酶活性单位/蛋白质含量。

2 结果与分析

2.1 *EcGST* 基因的克隆与序列分析

以稗草 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, *EcGSTZ1* 基因扩增大小为 750 bp 左右, *EcGSTF1* 基因扩增大小为 650 bp 左右 (图 1)。将回收纯化后的 PCR 产物连接至 pMD-18T 载体中进行测序, 测序结果分别获得了 *EcGSTZ1* 和 *EcGSTF1* 基因扩增的全长序列及其对应编码的氨基酸序列 (图 2 和图 3)。*EcGSTZ1* 的核苷酸序列长度为 747 bp, 在第 86 个核苷酸处有起始密码子 ATG, 在 725 个核苷酸处有终止密码子 TGA, 其编码区为 639 bp, 编码 212 个氨基酸残基; *EcGSTF1* 的核苷酸序列长度为 661 bp, 在第 12 个核苷酸处有起始密码子 ATG, 在 654 个核苷酸处有终止密码子 TGA, 其编码区为 645 bp, 编码 214 个氨基酸残基。将 *EcGSTZ1* 和 *EcGSTF1* 基因登陆至 NCBI 网站, GenBank 登录号分别为:

JX122857 和 JX122858。同时,以敏感性稗草 cDNA 为模板,PCR 扩增出的 *EcGSTZ1* 和 *EcGSTF1* 基因的序列与从多抗性稗草中 PCR 扩增出的序列完全一致。



M:分子量标准 DL 2000;1:*EcGSTZ1* 基因的 PCR 扩增产物;2:*EcGSTF1* 基因的 PCR 扩增产物。

图1 *EcGSTZ1* 和 *EcGSTF1* 基因的 PCR 扩增结果

Fig.1 Electrophoresis of *EcGST* genes amplified by PCR

2.2 *EcGST* 基因的生物信息学分析

将 *EcGST* 氨基酸序列通过 NCBI 的 PSI-BLAST 搜索,对其进行保守结构域分析,*EcGSTZ1* 属于 *zeta* 类 GST;*EcGSTF1* 属于 *phi* 类 GST。这两类 *EcGST* 均有 2 个保守的结构域,N 端为类似硫氧还蛋白超

家族结构域,C 端为 GST 超家族结构域。

选取单子叶植物高粱 (*Sorghum bicolor*)、玉米 (*Zea mays*)、二穗短柄草 (*Brachypodium distachyon*)、粳稻 (*Oryza sativa Japonica Group*)、双子叶植物油桃 (*Prunus persica*)、毛果杨 (*Populus trichocarpa*)、大豆 (*Glycine max*) 和昆虫纲柑桔全爪螨 (*Panonychus citri*)、帝王蝶 (*Danaus plexippus*) 的 GST 家族成员与稗草中的 *EcGSTZ1* 和 *EcGSTF1* 进行多重序列比较,并构建系统进化树。结果显示,GST 家族归为两类,即 *phi* 类 GST 和 *zeta* 类 GST。*EcGST* 和单子叶植物的高粱、玉米、二穗短柄草和粳稻的 GST 聚为一枝,亲缘关系较近;双子叶植物油桃的 GST 和毛果杨的 GST 聚为一枝,亲缘关系较近;昆虫纲的帝王蝶的 GST 和柑橘全爪螨的 GST 聚为一枝(图 4)。

2.3 *EcGST* 的原核表达分析

将 *EcESTZ1* 和 *EcGSTF1* 的 ORF 序列插入至含 HIS 标签的 pET28b 载体中,对重组质粒 HIS::*EcGSTs* 进行双酶切和测序验证,结果显示 *EcGST* 基因序列无缺失和突变,表明 HIS::*EcGST* 载体构建成功。

以空载体 pET28b 为阴性对照,0.4 mmol/L IPTG 诱导 HIS::*EcGST* 的表达产物经 12% SDS-PAGE 电泳分析结果显示,蛋白质大小约 26 000 左右,与预测蛋白质分子量接近,表明 HIS::*EcGST* 经

```

1  CACCTGACCTACTGCTGCATCTCATCATCTGATACTGGTAGTTTCAGTTGCTACTGATTGAGGAGGACGAGGTAGCAGCAGCCATGGCGACGGCGAAA
                                     M A T A K

101 CCCATCCTGTACAACGCTTGATCAGCTCCTGCTCCACCGTGTCCGCATCGCTCTCAACCTCAAAGGTGTGGACTATGAGTACAAGTCAGTAAATCCCA
    P I L Y N A W I S S C S H R V R I A L N L K G V D Y E Y K S V N P

201 GGACAGATCCAGATTATGAAAAGATCAATCAATCAAATATATTCCAGCTTTTGTGGATGGGGATATAGTTGTTTCTGACTCTCTTGCCATCTCATTGTA
    R T D P D Y E K I N P I K Y I P A F V D G D I V V S D S L A I S L Y

301 TTTGGAAGATAAATATCCTGCGCATCTCTTCTGCCTAAGGATCTCAAGAGGAAAGCTCTTAATATTGAGATTGCTAACATAGTTTGTTCGAGCATTCAA
    L E D K Y P A H P L L P K D L K R K A L N I Q I A N I V C S S I Q

401 CCTCTTCAAGGCTATGCCGTTATTGGTTTGCATGAGGGCAGCATGAGCCCTGATCAGAGCCTTCAAATTGTTTCAGCATTATATTGATAAGGGATTGAGAG
    P L Q G Y A V I G L H E G S M S P D Q S L Q I V Q H Y I D K G F R

501 CGATTGAAAAGCTTTTGGATGGATGCGAGAGTAAATATGCTACTGGAGATGATATCAATTTGGGTGATGATTTCTAGAACCACAGATCCATGCCGGCAT
    A I E K L L D G C E S K Y A T G D D I Q L G D V F L E P Q I H A G I

601 AAATCGCTTCAGATTGATATGTCGAAGTACCCGATTTTGGCAAGACTTCATGATGCATACATGGAATTCGGCATTCAAGCTGCGCTCCCTAAAAAT
    N R F Q I D M S K Y P I L A R L H D A Y M E I P A F Q A A L P K N

701 CAGCCAGATGCACCATCATATAATGAATCAAGATTACCGAGCCATC
    Q P D A P S S *
  
```

图2 *EcGSTZ1* 基因的核苷酸序列及其所编码的氨基酸序列

Fig.2 Nucleotide and putative amino acid sequence of *EcGSTZ1*

```

1   GAAGAGAGATCATGGCTCCGATGAAGCTGTACGGCTCGACGATGTCGTGGAACGTGACGAGGTGCGCGGTGGCGCTGGAGGAGGCCGCGCCGAGTACGA
    M A P M K L Y G S T M S W N V T R C A V A L E E A G A E Y E
101  GATCGTGCCCATCAACTTCGCCACCGCCGAGCACAAGAGCCCCGAGCACCTCGCCCGCAACCCATTGGTCAGGTTCCAGCTTTGCAAGATGGTGACTTG
    I V P I N F A T A E H K S P E H L A R N P F G Q V P A L Q D G D L
201  TACGTCTGGGAATCAGTGAATTTGCAAGTATGCAGCCGTAACCAACCGGAGCTGTTGAAGGAAGGCAATCTTGTGGAGTCAGCAATGGTGGATG
    Y V W E S R A I C K Y A A R K N K P E L L K E G N L V E S A M V D
301  TTTGGATGGAGGTGGAGGCCAACAGTACACCTCTGTGCTGAACCCATCCTCTTCCAGTGCCTCATCAGTCTATGCTTGGCGGAACCCGACCAGAA
    V W M E V E A N Q Y T S V L N P I L F Q C L I S P M L G G T T D Q K
401  GGTGTGGAGGAGAACATTGAGAAGCTGAAGAAGGTGCTGGAGGTGTATGAGGCGCAACTGACCAAGTGCAAGTACCTGGCTGGAGACTTCCTCAGCCTT
    V V E E N I E K L K K V L E V Y E A Q L T K C K Y L A G D F L S L
501  GCTGACCTTAACCATGTCTCCGCTACCTGTGCTTGTTCGACGCCCCATGCGTCGGTACTTGACGGATACCCCATGTGAAGGCATGGTGGTCTAGCC
    A D L N H V S A T L C L F A T P H A S V L D G Y P H V K A W W S S
601  TGATGGAGAGGCCATCTGTTTCAAGGTTGCAGCTCTGATGAAGCCATCTGCTTGAAGTGG
    L M E R P S V Q K V A A L M K P S A *

```

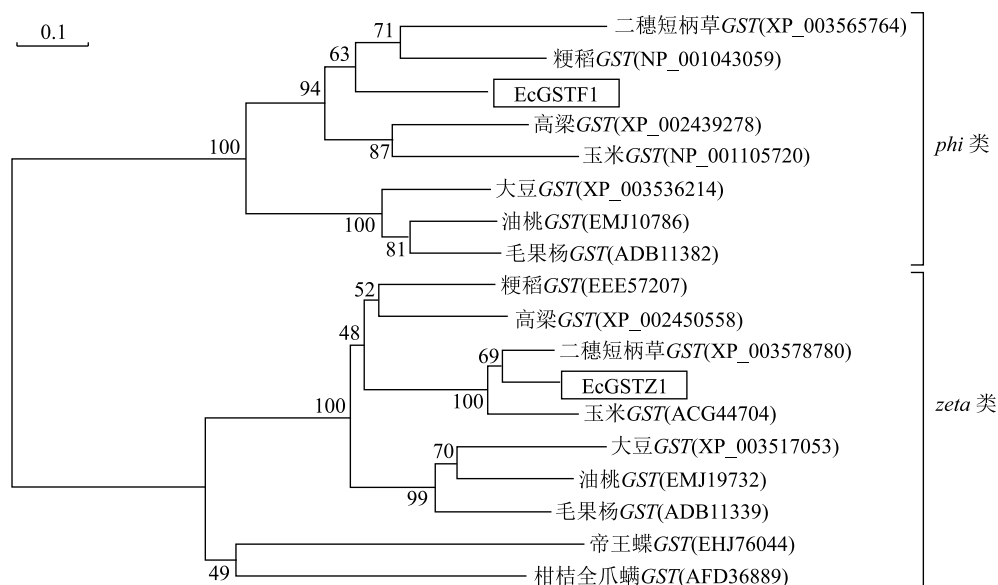
图 3 *EcGSTF1* 基因的核苷酸序列及其所编码的氨基酸序列Fig.3 Nucleotide and putative amino acid sequence of *EcGSTF1*

图 4 邻接法构建的 GST 家族成员的系统进化树

Fig.4 Phylogenetic trees constructed by neighbor-joining based on GST family from various plant species

IPTG 诱导后能够在大肠杆菌 BL21 中成功表达(图 5)。

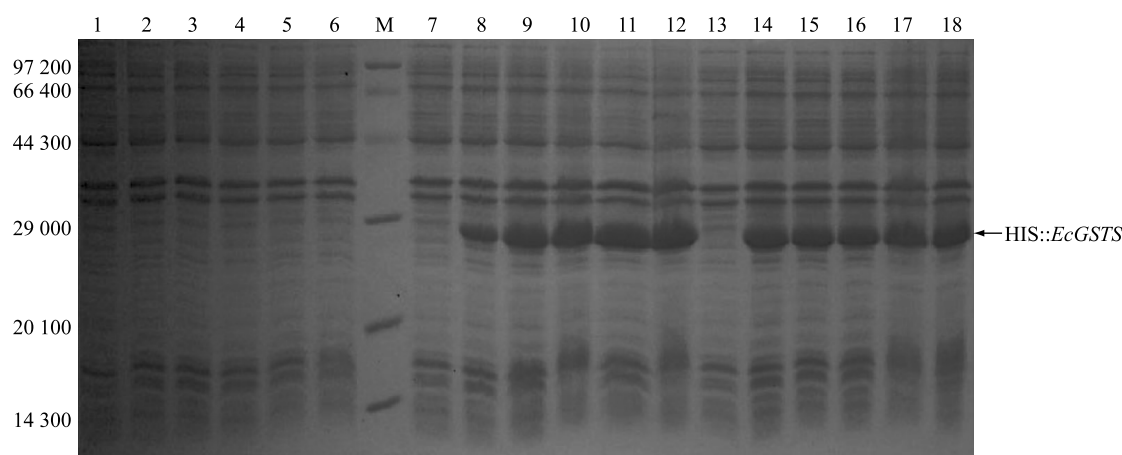
2.4 *EcGST* 基因的实时荧光定量分析

实时荧光定量 PCR 分析结果显示,*EcGSTZ1* 和 *EcGSTF1* 基因在多抗性和敏感性稗草中均有表达,且在处理前的稗草中表达量无显著性差异。而在喷药处理后,*EcGSTZ1* 和 *EcGSTF1* 基因在多抗性稗草中表达量均最高,相对表达量分别为 6.25 和 8.79,比其在喷药处理后的敏感性稗草中的表达量高(图

6)。

2.5 稗草 GST 酶比活力

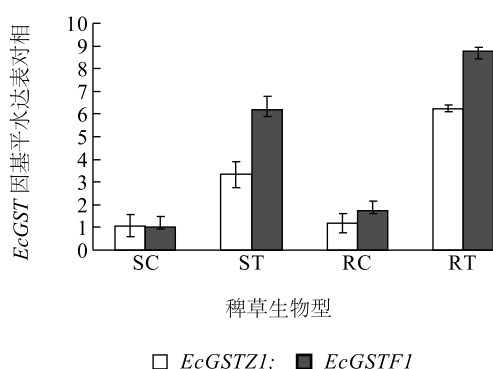
图 7 显示在处理前多抗性稗草的 GST 酶比活力高于敏感性稗草。多抗性稗草 GST 酶比活力在药剂处理第 1 d 降低到最低值后开始持续上升;敏感性稗草的 GST 酶比活力在药剂处理后持续下降 2 d 后才开始上升,并在处理第 5 d 达到最高值后开始呈现下降趋势。在处理第 7 d 时多抗性稗草的 GST 酶比活力高于敏感性稗草。



M: 蛋白质分子量标准; 1~6: 空质粒 pET28b 经 IPTG 诱导 0~5 h; 7~12: HIS::EcGSTZ1 经 IPTG 诱导 0~5 h; 13~18: HIS::EcGSTF1 经 IPTG 诱导 0~5 h。

图 5 SDS-PAGE 电泳分析 HIS::EcGSTs 的诱导表达

Fig.5 SDS-PAGE analysis of HIS::EcGSTs fusion protein induced with IPTG



SC: 施药前敏感性稗草; ST: 施药处理后敏感性稗草; RC: 施药前多抗性稗草; RT: 施药处理后多抗性稗草。

图 6 *EcGST* 基因在多抗性和敏感性稗草施药前后的相对表达水平

Fig.6 The relative expression level of *EcGST* before or after herbicide application in herbicide-resistant and susceptible barnyardgrass

3 讨论

本研究通过 PCR 扩增获得了稗草中 *GST* 家族的 2 个不同成员, 即 *zeta* 类 *EcGSTZ1* 和 *phi* 类 *EcGSTF1*, 通过生物信息学方法分析了其基因序列。结果显示 *EcGSTF1* 和 *EcGSTZ1* 分别在多抗性和敏感性稗草中碱基序列没有差异; 原核表达分析结果显示 HIS::*EcGST* 融合蛋白质的分子量大小约为 26 000, 与推测理论值相一致。构建的系统进化树结果显示, *phi* 类 *GST* 和 *zeta* 类 *GST* 分别聚为一大

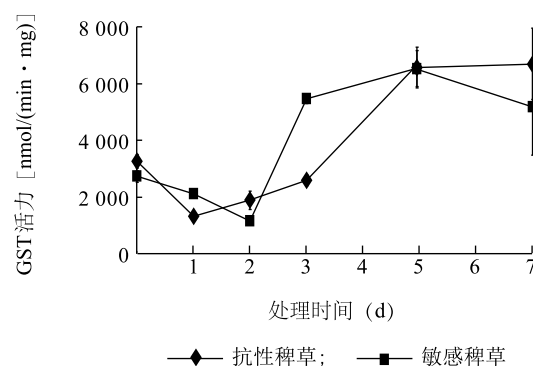


图 7 抗性及敏感种群叶片谷胱甘肽转移酶比活力

Fig.7 GSTs specific activity in the leaves of resistant and susceptible barnyardgrass

簇, 其中稗草 *GST* 与禾本科植物高粱、玉米、二穗短柄草和粳稻的 *GST* 聚为一大簇, 具有较高的同源性, 推测禾本科植物在进化上具有相似性, 形态特征与系统进化关系紧密, 形态相同的禾本科植物亲缘关系较近。

实时定量 PCR 分析结果显示, *EcGSTZ1* 和 *EcGSTF1* 基因在施药前的多抗性稗草中的表达量 (1.18 和 1.73) 均高于其在敏感性稗草中的表达量 (1.00 和 1.00); 在施药后的多抗性稗草中的表达量 (6.25 和 8.79) 均比其在施药后的敏感性稗草中的表达量 (3.33 和 6.18) 要高, 这与稗草 *GST* 酶比活力测定结果一致, 施药前多抗性稗草的 *GST* 酶比活力高于敏感性稗草, 施药 7 d 后敏感性稗草的 *GST* 酶比活

力明显低于多抗性稗草。同时施药 1 d 后 *GST* 酶比活力在多抗性和敏感性稗草中先呈下降趋势,随后多抗性稗草首先出现上升趋势,虽然敏感性稗草也出现上升趋势,但最终仍明显低于多抗性稗草,这与高效氟吡甲禾灵处理日本看麦娘后 *GST* 酶的活性趋势^[24-25]相一致。而荧光定量 PCR 结果显示施药 1 d 后 *GST* 酶基因表达量均得到提高,表明在施药初期 *GST* 酶比活力与酶表达量并非呈正相关,从基因激活、转录到翻译成蛋白质需要一段时间进程,从而导致 *GST* 酶比活力存在一定的滞后性。

实时荧光定量 PCR 分析结果还发现,无论施药前还是施药后,*EcGSTF1* 在多抗性稗草中的表达量均比 *EcGSTZ1* 要高,推测 *phi* 类 *GST* 在催化谷胱甘肽(*GSH*)与除草剂共轭作用过程中可能比 *zeta* 类更为显著,有力地支撑了 *phi* 类 *GST* 的强解毒功能。国际上已对 *phi* 类 *GST* 做了深入的研究,发现其对包括除草剂在内的外源化学物质有广泛的解毒能力^[26],因此稗草中的 *phi* 类 *GST* 可以作为植物抵抗除草剂能力的一个重要指标。*zeta* 类 *GST* 酶具有异构酶活性,在苯丙氨酸/酪氨酸分解代谢中作为马来酰乙酰乙酸异构酶(*MAAI*)将 *GSH* 可逆地与马来酰乙酰乙酸(*MAA*)的顺式双键结合,形成延胡索乙酰乙酸(*FAA*),是苯丙氨酸/酪氨酸降解代谢的关键步骤。康乃馨的 2 个 *zeta* 家族启动子上存在乙烯响应元件,能被乙烯或逆境诱导表达,在芳香族氨基酸的分解代谢中起作用^[27]。本试验得到的 *zeta* 类 *GST* 在除草剂处理后的多抗性和敏感性稗草中表达量增加,说明此类 *GST* 产生解毒能力可能与异构酶活性有一定的关系。

GST 介导的除草剂代谢解毒功能的研究结果可应用于除草剂安全剂、增效剂的筛选以及抗药性杂草治理和改良作物抗逆性方面,如精恶唑禾草灵除草剂的安全剂吡啶唑草酯和解草唑诱导了鼠尾看麦娘中 *GSTF1* 活性,导致 *GPOX* 活性加倍,类黄酮保护类物质增加^[28];多抗性鼠尾看麦娘 *AmGSTF1* 转基因拟南芥植株表现出了多药抗性,在次生代谢、外源物质代谢和抗氧化代谢方面与多抗性鼠尾看麦娘有着相似之处^[29]。因此,拟通过 *phi* 类 *EcGSTF1* 和 *zeta* 类 *EcGSTZ1* 的转基因植株,分析供试除草剂的降解动力学和催化效率,从而深入阐明多抗性稗草的 *GST* 介导的除草剂代谢解毒机制,为改良作物抗逆性及开发新型除草剂提供理论基础。

参考文献:

- [1] DIXON D P, LAPHORN A, MADESI P, et al. Binding and glutathione conjugation of porphyrinogens by plant glutathione transferases [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283 (29): 20268-20276.
- [2] NOCTOR G, MHAMDI A, CHAOUCH S, et al. Glutathione in plants: an integrated overview [J]. *Plant Cell and Environment*, 2012, 35(2): 454-484.
- [3] EDWARDS R, DIXON D P, CUMMINS I, et al. New perspectives on the metabolism and detoxification of synthetic compounds in plants [M]//SCHRÖDER P, COLLINS C D. *Organic xenobiotics and plants: from mode of action to ecophysiology*. New York: Springer Science+Business Media BV, 2011: 125-148.
- [4] HU T, QU X, XIAO G, et al. Enhanced tolerance to herbicide of rice plants by over-expression of a glutathione S-transferase [J]. *Molecular Breeding*, 2009, 24(4): 409-418.
- [5] HU T, HE S, YANG G, et al. Isolation and characterization of a rice glutathione S-transferase gene promoter regulated by herbicides and hormones [J]. *Plant Cell Report*, 2011, 30(4): 539-549.
- [6] SOMERVILLE C, MEYEROWITZ E. *The Arabidopsis book* [M]. Washington DC: American Society of Plant Biologists, 2010: e0131.
- [7] CUMMINS I, DIXON D P, FREITAG-POHL S, et al. Multiple roles for plant glutathione transferases in xenobiotic detoxification [J]. *Drug Metabolism Reviews*, 2011, 43 (20): 266-280.
- [8] BENEKOS K, KISSOUDIS C, NIANIOU-OBEIDAT I, et al. Overexpression of a specific soybean *GmGSTU4* isoenzyme improves diphenyl ether and chloroacetanilide herbicide tolerance of transgenic tobacco plants [J]. *Journal of Biotechnology*, 2010, 150 (1): 195-201.
- [9] LO CICERO L, MADESI P, TSAFTARIS A, et al. Tobacco plants over-expressing the sweet orange tau glutathione transferases (CsG-SUs) acquire tolerance to the diphenyl ether herbicide fluorodifen and to salt and drought stresses [J]. *Phytochemistry*, 2015, 116 (8): 69-77.
- [10] 戚元成, 张慧, 赵彦修. 植物谷胱甘肽转移酶和盐胁迫 [J]. *山东师范大学学报: 自然科学版*, 2002, 17(2): 71-75.
- [11] SCHRÖDER P, LYUBENOVA L, HUBER C. Do heavy metals and metalloids influence the detoxification of organic xenobiotics in plant? [J]. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2009, 16(7): 795-804.
- [12] DIXIT P, MUKHERJEE P K, RAMACHANDRAN V, et al. Glutathione transferase from *Trichoderma virens* enhances cadmium tolerance without enhancing its accumulation in transgenic *Nicotiana tabacum* [J]. *Plos One*, 2011, 6(1): e16360.
- [13] LIU D, LIU Y, RAO J, et al. Overexpression of the glutathione S-transferase gene from *Pyrus pyrifolia* fruit improves tolerance to abiotic stress in transgenic tobacco plants [J]. *Molekulyarnaya Biologiya*, 2013, 47 (4): 591-601.

- [14] 张自常,李永丰,张 彬,等.稗属杂草对水稻生长发育和产量的影响[J].应用生态学报,2014,25(11):3177-3184.
- [15] 张自常,李永丰,张 彬,等.江苏省稻田常见稗草的生物学特性[J].江苏农业科学,2013,41(12):136-138.
- [16] HEAP I. International survey of herbicide resistant weeds [R]. (2013-12-19) [2015-05-23] www.weedscience.org.
- [17] 李公春,孙 婷,鞠志宇,等. 1-甲基-6-三氟甲基-3-取代脲嘧啶类化合物的合成及除草活性[J]. 江苏农业科学,2013,41(7):110-111.
- [18] 俞欣妍,葛林利,刘丽萍,等.直播稻田稗草对二氯喹啉酸、氰氟草酯与双草醚除草剂复合抗性的初步研究[J].江苏农业学报,2010,26(6):1438-1440.
- [19] YANG X, YU X Y, LI Y F. De novo assembly and characterization of the barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) transcriptome using next-generation pyrosequencing [J]. Plos One, 2013, 8(7):e69168.
- [20] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) Method [J]. Methods, 2001, 25(4):402-408.
- [21] PAMELA J H, DAVID D P. Glutathione transferase activities and herbicide selectivity in maize and associated weed species [J]. Pesticide Science, 1996, 46(3):267-275.
- [22] GERARD P, IRZY K, PATRICK F E. Purification and characterization of a glutathione S-transferase from benoxacor-treated maize (*Zea mays*) [J]. Journal of Plant Physiology, 1993, 102(3):803-810.
- [23] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(5):248-254.
- [24] READE J P H, MILNER L J, COBB A H. A role for glutathione S-transferases in resistance to herbicides in grasses [J]. Weed Science, 2004, 52(3):468-474.
- [25] 韩瑞娟,董立尧,李 俊,等.日本看麦娘对高效氟吡甲禾灵代谢抗性的初步研究[J].杂草科学,2010,21(1):3-7.
- [26] KAPOLI P, AXARLI I A, PLATIS D, et al. Engineering sensitive glutathione transferase for the detection of xenobiotics [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2008, 24(3):498-503.
- [27] DIXON D P, COLE D J, EDWARDS R. Characterisation of a zeta class glutathione transferase from *Arabidopsis thaliana* with a putative role in tyrosine catabolism [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2000, 384(2):407-412.
- [28] CUMMINS I, BRYANT D N, ROBERT EDWARDS. Safener responsiveness and multiple herbicide resistance in the weed black-grass (*Alopecurus myosuroides*) [J]. Plant Biotechnology Journal, 2009, 7(8):807-820.
- [29] CUMMINS I, WORTLEY D J, SABBADIN F, et al. Key role for a glutathione transferase in multiple-herbicide resistance in grass weeds [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110(15):5812-5817.

(责任编辑:袁 伟)