

植物类甜蛋白基因家族研究进展

姜晓玲¹, 黄秋娴¹, 李虹², 赵嘉平³

(1. 河北农业大学 林学院, 河北 保定 071001; 2. 中国林业科学研究院 林业研究所, 北京 100091; 3. 北京林业大学 林学院 省部共建森林培育与保护教育部重点实验室, 北京 100083)

摘要: 植物受到生物或非生物胁迫时, 病程相关蛋白(pathogenesis-related proteins, PRs)PR-5 家族(又称类甜蛋白, thaumatin-like proteins, TLPs)在植物组织内迅速表达并积累, 从而快速提高植物抗性。研究发现许多植物的 TLPs 具有抗真菌活性, 而且转 TLPs 基因的植物能够抑制病害发展进程。介绍了 TLPs 基因的分布起源和进化特征、结构特征、生理功能; 分析了 TLPs 基因在不同植物中的差异表达特征、TLPs 的抗真菌机制以及 TLPs 基因在植物抗病遗传改良中的应用; 提出了植物 TLPs 未来研究的主要问题以及 TLPs 基因在林木病理学和林木抗病遗传育种中的应用前景。参 81

关键词: 植物学; 类甜蛋白; 病程相关蛋白; 抗真菌活性; 抗病育种; 综述

中图分类号: Q943; S330 **文献标志码:** A **文章编号:** 2095-0756(2012)02-0279-09

A review of advances in plant thaumatin-like proteins

JIANG Xiao-ling¹, HUANG Qiu-xian¹, LI Hong², ZHAO Jia-ping³

(1. College of Forestry, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, Hebei, China; 2. Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China; 3. Key Laboratory for Silviculture and Conservation of Ministry of Education, College of Forestry, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract: Thaumatin-like proteins (TLPs) are a pathogenesis-related protein associated with many biotic or abiotic stresses that can be expressed in plants, animals, and even fungi. This study reviewed phylogenetic origin, three-dimensional structure, physiological function, as well as expression and evolution patterns of plant TLPs. The prospect of trans-TLP genes for antifungal genetic engineering of plants was also discussed. Finally, selected future research issues and perspectives related to plant TLPs were mentioned. [Ch, 81 ref.]

Key words: botany; thaumatin-like proteins; pathogenesis-related proteins; anti-fungal activity; plant genetic engineering; review

病程相关蛋白(pathogenesis-related proteins, PRs)由植物 PRs 基因编码, 最早从烟草 *Nicotiana tabacum* 花叶病毒(tobacco mosaic virus, TMV)侵染的烟草叶片中发现, 依据氨基酸组成、生物化学和血清学特性, 将 PRs 分为 17 个不同的蛋白家族, 即 PR-1~PR-17^[1]。由于 PR-5 蛋白家族的氨基酸序列与西非灌 *Thaumatococcus daniellii* 甜蛋白(thaumatin)的氨基酸序列高度同源, 因此又被称为类甜蛋白(thaumatin-like proteins, TLPs)^[2]。研究表明: TLPs 与植物的抗逆反应有关, 当植物受到病原物(真菌、细菌、病毒等), 化学因子(乙烯、水杨酸、氨基酸衍生物、重金属离子等), 物理因子(紫外线、热处理、机械损伤等)以及特定的生理因素(衰老、开花、质壁分离等)诱导时, TLPs 基因在植物体特定部位迅速表达并积累。许多研究发现植物 TLPs 具有显著的抗真菌活性, 一些转 TLPs 基因的植物对于真菌性病害的抗性也显著增强^[3], 因而近年来, TLPs 的抗真菌功能在植物病理学研究中受到越来越广泛的关注。作为具有较高

收稿日期: 2011-05-09; 修回日期: 2011-06-14

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30872048)

作者简介: 姜晓玲, 硕士, 从事森林保护学研究。E-mail: jx10805@163.com。通信作者: 赵嘉平, 博士, 从事分子植物病理学研究。E-mail: zhaojiaping@gmail.com

利用价值的潜在遗传资源, TLPs 基因也在植物抗病育种中展现出了广阔的应用前景。笔者将从 TLPs 基因的起源分布、结构特征、表达特征和 TLPs 的生理功能出发, 分析 TLPs 基因的研究前景及在植物抗病育种中的应用趋势。

1 类甜蛋白(TLPs)基因的分布、起源及进化特征

TLPs 分布广泛, 不但存在被子植物、裸子植物和苔藓植物中, 而且存在于线虫^[4]、节肢动物^[5-6]以及真菌^[7-8]中。在植物中, TLPs 分布于不同的细胞或组织中。Léon-Kloosterziel 等^[9]发现在无致病性假单胞杆菌的作用下, *AtTLP1* 基因在拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 根部维管束特异性表达; 而在转基因拟南芥中, 由 CKTLP 和绿色荧光蛋白构成的融合蛋白在细胞外或细胞壁上表达^[10]。也有研究表明: 一种特定的杨树 TLP1 蛋白在有明显维管系统(例如中脉, 叶柄和茎)的组织中表达, 而另一种 TLP 主要在嫩叶和枝条尖部的淀粉储藏质粒体中表达^[11]。

植物基因组中的 TLPs 基因以基因家族的形式出现, 如模式植物杨树、拟南芥、水稻 *Oryza sativa* 基因组中分别有 55 个^[12]、24 个^[12]、30 个基因^[6]。不同于动物和真菌的单系 TLPs 基因类群^[13], 系统发育分析表明植物 TLPs 基因家族是一个由 10 个类群构成的复系类群, 这 10 个类群分别起源于单子叶与双子叶植物分化之前的 10 个祖先序列。在植物漫长的进化过程中, 经过染色体复制、基因复制、基因转换以及突变最终在不同的植物中形成为数目不一的基因家族^[13-14]。与植物 PR1 基因家族、 β -1,3-葡聚糖酶类似, 具有抗微生物活性的 TLPs 被认为是植物天然免疫系统的组成之一^[15], 考虑到 TLPs 基因的古老起源、广泛分布以及之后在漫长的进化历史中的频繁发生基因复制事件, 这些都预示着 TLPs 在植物抗逆反应中的重要作用, 而且研究证明 TLPs 基因的适应性进化过程仍然在持续^[16], 预期植物尤其是木本植物 TLPs 基因家族还会随着环境胁迫压力发生一定程度的适应性进化。

2 TLPs 的结构特征

TLPs 最为重要的结构特征在于其分子中由 16 个半胱氨酸残基配对形成的 8 个二硫键, 由于这些二硫键的存在, 使得 TLPs 具有了相对稳定的化学结构, 能够抗热, 抗酶解和抗酸碱^[17-19]。一些 TLPs 含有 N 端信号肽, 用于引导成熟的蛋白到分泌路径。逆渗透蛋白(osmotin)和植物 OLPs 还具有 C 端前导肽, 用于引导蛋白到达液泡^[20]。

TLPs 分子的三级结构一般由 3 个结构域构成, 结构域 I 由 11 个 β 片层(β -sheet)反向平行折叠形成, 结构域 II 和结构域 III 主要由 α 螺旋区域构成^[21-23], 而结构域 I 和结构域 II 之间形成一个具有强烈电负性的裂缝(cleft)^[23]。然而也有一些特殊的 TLPs, 其三级结构只具有结构域 I 和结构域 II, 甚至有些 TLPs 仅仅包含结构域 I, 因此, 植物 TLPs 的分子量大小不等, 一般为 16~40 kDa, 然而不论分子量如何变化, TLPs 的氨基酸序列高度同源, 并且具有相似的生理学特征。

3 TLPs 的生理功能

3.1 抗真菌活性

抗真菌活性是 TLPs 的主要功能之一。TLPs 参与多种植物病原真菌侵染之后的主动防御反应, 如水稻纹枯病菌 *Rhizocotonia solani* 的侵染可诱导水稻 TLPs 基因表达, 增强它对该病原菌的抗性^[24-25]; 烟草逆渗透蛋白具有裂解致病疫霉 *Phytophthora infestans* 孢子, 抑制菌丝生长的功能^[26]。牛心朴子 *Cynanchum komarovii* CKTLP 对轮枝菌属 *Verticillium dahliae*, 尖孢镰刀菌 *Fusarium oxysporum* 和丝核菌 *Rhizoctonia solani* 等真菌生长有抑制^[10]。葡萄 *Vitis vinifera* 藤 TLPs(VvTLP-1)在体外能明显抑制痂囊腔菌属 *Elsinoe ampelina* 孢子的萌发和菌丝生长^[27]。

林木受到病原物侵染之后也有类甜蛋白产生。Zamani 等^[28]从花旗松 *Pseudotsuga menziesii* 中分离了第一个林木类甜蛋白(PmTLP), Western blot 显示该蛋白在受真菌感染的根部比非感染区域含量显著增高, 说明该蛋白参与寄主抗真菌防御反应。研究还表明: 该蛋白可能具有阻止真菌在树木体内进一步扩展的作用。Piggott 等^[29]发现茶藨子生柱锈菌 *Cronartium ribicola* 可诱导西部白皮松类甜蛋白 Pin mTLP 在受感染植株干部周围表达, Pin mTLP 的表达对松树疱锈病 *Cronartium ribicola* 的发展有一定抑制作用。

研究表明：植物 TLPs 主要通过裂解真菌孢子，抑制孢子萌发，降低幼嫩菌丝活力等方式对致病和非致病真菌产生抑制作用^[26,30-33]。并且转 TLPs 基因植物能够延缓多种真菌病害发展过程，如葡萄孢 *Botrytis* sp.，镰刀菌 *Fusarium* sp.，丝核菌 *Rhizoctonia* sp.，核盘菌 *Sclerotinia* sp.等引起的病害发展过程，增强转基因植物对病原真菌的抗性^[34-38]。

3.2 β -1,3-葡聚糖酶活性

Grenier 等^[7,39]发现许多不同来源的 TLPs 具有 β -1,3-葡聚糖酶活性。大麦 *Hordeum vulgare* 的 TLPs 具有 β -1,3-葡聚糖酶活性，能够结合并水解 β -1,3-葡聚糖^[39-42]。苹果 *Malus pumila* 和樱桃 *Prunus avium* 中的 TLPs 也具有中等的 β -1,3-葡聚糖酶活性^[42]。Martin 等^[43]研究显示：一些发病的真菌和另外一些丝状真菌分泌的葡聚糖酶能够降解真菌细胞壁。研究发现：烟草 TLPs 的 β -1,3-葡聚糖酶活性与蛋白质分子表面的酸性裂缝中的 2 个保守的酸性氨基酸残基有关^[44]。通过蛋白质建模以及功能分析，笔者发现：部分杨树 TLPs 中也有保守性的 Glu92-Asp110 氨基酸残基存在，并且这 2 个残基中的活性氧原子处于催化活性发挥的正确位置，因此，认为部分杨树 TLPs 也具有 β -1,3-葡聚糖酶活性^[9]。研究表明：这个结构与 TLPs 的生理功能有密切联系。

然而，相对与真正的 β -1,3-葡聚糖酶催化位点之间的较短距离^[45]，杨树，玉米 *Zea mays*，草莓 *Fragaria ananassa* 等 TLPs 分子的催化位点之间较长的距离^[16]，可能解释了 TLPs 的 β -1,3-葡聚糖酶活性较低的事实，因此，Menu-Bouaouiche 等^[42]认为，仅仅 TLPs 本身可能无法直接通过破坏真菌细胞壁，而是通过 β -1,3-葡聚糖酶反应的产物来诱导植物的防御反应进而抵抗真菌的侵染。

3.3 其他活性

除了抗真菌活性和 β -1,3-葡聚糖酶活性外，许多研究还发现 TLPs 具有酶抑制剂活性。来自玉米的抗真菌蛋白(zeamatin)是较早被鉴定出的具有淀粉酶抑制剂活性的 TLPs^[30,46]。抗真菌蛋白通过抑制昆虫淀粉酶活性，阻碍昆虫消化吸收食物中的碳水化合物，减少糖分摄取，造成昆虫营养不良和能量不足，进而导致昆虫死亡。因此，Franco 等^[47]建议利用具有 α -淀粉酶抑制剂活性的 TLPs 来控制象鼻虫 (weevils)等以淀粉为主要食物的有害生物。

一些植物果实和花粉中的 TLPs 具有植物过敏原活性。第一个被鉴定出具有过敏原活性的 TLPs 是来自苹果的 Mal d 2^[48]。并且 Krebitz 等^[49]发现重组的烟草花叶病毒在烟草中表达的 Mal d 2 也具有过敏原活性。继 Mal d 2 之后，又从甜椒 *Capsicum annuum*^[50]，樱桃 *Prunus avium*^[51]，猕猴桃 *Actinidia* sp.^[52]，葡萄^[53]和香蕉 *Musa sapientum*^[54]的果肉中分离出具有过敏原活性的 TLPs。由于果实中含有大量水分和甜味物质，很容易被真菌或昆虫侵袭，因此，Hoffmann-Sommergruber^[55]认为：组成型表达于特定发育阶段的 TLPs 可以对果实起到快速保护作用。也有研究者从杜松 *Juniperus ashei*^[56]，绿干柏 *Cupressus arizonica*^[57] 和日本柳杉 *Cryptomeria japonica*^[58]的花粉中分离出具有过敏原活性的 TLPs Jun a 3, Cup a 3, Cry j 3。此外，引起人类过敏症的过敏原中也包括 TLPs，Palacín 等^[59]在研究中发现桃子 *Prunus persica* 中的 3 种 TLPs 是桃的首要过敏原。Lehto 等^[60]发现小麦中的 TLPs 是与面包房哮喘相关的最新的过敏原。笔者发现：部分杨树 TLPs 具有过敏原活性，并且这些 TLPs 多数在美洲黑杨及青杨花粉中表达(待发表)。因此，春季杨树花粉中特定 TLPs 基因的表达可能是造成部分人群过敏的原因之一，然而过敏原活性对于杨树、松树等的生理意义仍是值得深入探讨的问题。

一些研究者发现：植物 TLPs 还具有抗冻活性，木聚糖酶抑制剂活性和抗虫活性。Hon 等^[61]通过氨基末端序列比较，免疫交叉反应和酶活性分析，在冬黑麦 *Secale cereale* 的叶片质外体中分离出 2 个具有抗冻活性的 TLPs(25 kDa 和 16 kDa)；最近的研究发现一种来自小麦的新型木聚糖酶抑制剂(TLX1)属于 TLP 家族，重组的 TLX1 蛋白对长枝木霉 *Trichoderma longibrachiatum* 木聚糖酶 XynI 有抑制活性^[62]；新近研究表明：被麦二叉蚜 *Schizaphis graminum* 取食后，高粱 *Sorghum vulgare* TLPs 基因上调表达，因此，证明 TLPs 与植物抵御昆虫反应有关^[63]。

4 TLPs 的抗真菌机制

虽然已有很多关于 TLPs 抗真菌活性的报道，但是植物 TLPs 抗真菌病害的详细分子机制还不明确。由于玉米类甜蛋白抗真菌蛋白可以导致链孢霉 *Neurospora crassa* 细胞的快速裂解，而烟草逆渗透蛋白也

能够导致白色念珠菌 *Candida albicans* 细胞内容物迅速外溢而致死。因此, 早期研究认为: 植物 TLPs 促使真菌细胞膜形成小孔, 从而使水流入, 进而引起细胞渗透破裂, 来达到抗菌目的^[20,26]。然而, 结构分析表明: 抗真菌蛋白和逆渗透蛋白并不具有导致细胞膜孔洞形成的特征^[26,33]。

Menu-Bouaouiche 等^[42]认为: TLPs 结构域 I 和结构域 II 之间的酸性裂缝与抗真菌活性有关^[64-66]。然而, Chan 等^[67]发现冬黑麦 *Secale cereale* 中的 TLPs 只具有结构域 I 中的酸性残基, 没有裂缝结构, 也具有抗真菌活性。所以, 他们认为 TLPs 结构域 I 中的酸性残基与真菌细胞膜上的水通道蛋白、离子通道蛋白和渗透感受器之间的相互作用, 使得 TLPs 具有了抗真菌活性。通过适应性进化和蛋白质三级结构分析, Zhao 和 Su^[16]进一步证明了杨树 TLPs 分子表面酸性裂缝与抗真菌活性之间的相关性。

另外, TLPs 的裂缝区域是一个典型的碳水化合物的结合位点, Osmond 等^[40]用实验证明 TLPs 与线性 β -1,3-葡聚糖的结合发生于裂缝区域, 裂缝区域内的几个残基与真菌细胞壁的碳水化合物形成氢键, 并且芳香族氨基酸在裂缝处参与形成堆积力共同破坏了真菌细胞壁的结构, 使 TLPs 与细胞膜接触, 造成真菌细胞死亡。改变细胞壁结构是 TLPs 抑制真菌侵染的先决条件。TLPs 除了与细胞壁上的 β -1,3-葡聚糖特异性结合改变细胞壁结构外, 还可以通过其他的途径改变细胞的结构。烟草逆渗透蛋白能够诱导酵母有丝分裂过程中的促细胞分裂原活化蛋白激酶(MAP-kinase)的表达, 通过改变细胞壁结构使逆渗透蛋白能够与细胞膜接触而导致细胞死亡^[68]。

TLPs 的抗真菌机制不仅与真菌细胞壁破坏和真菌细胞膜透性改变有关之外, 还与木质素, 植保素等抗性物质的合成以及抗性结构的形成有关, 植物 TLPs 表现的抗真菌活性很可能是与这些防御机制协同作用的结果。

5 TLPs 基因的表达

TLPs 基因一般在植物特定组织、器官中低水平组成型表达, 而且表达活性不同。如草莓 TLPs 基因在叶和花冠中表达量最多, 在根中表达量中等, 在未成熟果实中表达量最少^[69]。受到外界逆境胁迫后, TLPs 基因的表达可以迅速上调。研究表明: 被麦二叉蚜取食的高粱中 TLPs 基因的转录增加几千倍^[63]。草莓 *Fragaria ananassa* 受到脱落酸胁迫 6 h 后, 体内 TLPs 表达量为最初表达量的 8.8 倍; 受水杨酸胁迫 48 h 后, TLPs 基因表达量为最初的 30.5 倍; 而机械损伤可以诱导其 TLPs 表达量增加 7.8 倍^[69]。

TLPs 基因的表达与植物生长环境(生长状态)和植物抗病性有关。植物生长状态方面, 如雪松 *Cedrus deodara* 花粉中具有过敏原活性的 TLPs 在不同年份的含量差别高达 5.0 倍以上^[70]。大麦和燕麦 *Avena sativa* 从子房壁发育到糊粉层的过程中, TLPs 基因的表达发生了改变^[71]。一种胡椒 TLP 基因也是在果实成长过程中表达^[72]。一种葡萄糖苷酸酶启动子聚变(融合)研究发现日本梨 *Pyrus serotina* 的 TLP 基因(*PsTL1*)特定的在雌蕊和花药中低水平表达, 但是在其他花器官和叶子中没有表达^[73]。植物抗病性方面, 小麦冠腐病菌 *Fusarium pseudograminearum* 侵染 4 d 后, 小麦抗病品种中 TLPs 基因表达显著高于感病品种^[74]。林木中, Petre 等^[13]最近发现杨树 TLPs 基因的表达可能与杨树对于杨栅锈菌 *Melampsora* sp. 的抗性有关。然而, 也有一些 TLPs 基因对病原菌胁迫不敏感, 而在植物受到生理、化学或物理因素诱导时大量表达。例如: 有些 TLPs 基因只有在植物的某些发育阶段的特定器官, 如检测到 *Ban-TLP*, *Mal-TLP* 和 *Pru-TLP* 在香蕉、苹果以及梨的果实中高量表达^[42]。

最新研究显示: 在 TLPs 基因表达受启动子调控。启动子中的沉默子会抑制防御反应中生姜 *Zingiber officinale* TLPs (*ZoPR5*) 的表达。启动子中的 GT-1 box 和 TGTCA 可以激活植物防御反应中枳果姜 *Curcuma amada* TLPs (*CaPR5*) 的表达^[75]。

进一步分析研究表明: TLPs 基因家族的特定成员在特定条件下的表达模式并不相同。笔者的研究表明: 室温光照培养条件下, 杨树 TLPs 基因的 55 个成员中, 有 37 个基因至少在根、成熟皮、嫩皮、成熟叶、嫩叶 5 个部位中的 1 个部位表达, 而仅有 4 个基因在全部 5 个部位同时表达, 并且这些表达的基因分布在除类群 9 之外的 9 个不同的系统发育类群中; 同时初步研究表明: 类群 5 及类群 6 中的多数 TLPs 基因的表达与真菌侵染存在相关性(未发表), 考虑到系统发育特征, 因此以往研究中 TLPs 基因的复杂多样的表达特征以及功能特征可能是 TLPs 基因家族不同成员的特征的集合, 对于植物 TLPs 基因的功能需要在全基因组水平上进行细致的研究, 目前, 杨树 TLPs 基因的差异表达模式及 TLPs 基因家

族不同成员的功能验证工作正在进行中。

6 TLPs 基因在植物抗病育种方面的应用

由于具有有效的抗真菌作用，TLPs 基因现已被应用到多种作物的抗真菌基因工程中，并且取得了理想的效果。Kuwabara 等^[76]克隆了冬小麦 *taTLPs* 基因，其表达蛋白在低温下能够抑制小麦雪霉叶枯病菌 *Microdochium nivale* 菌丝的生长，增强冬小麦的雪霉病抗性。研究显示：小麦 TLPs 基因的表达可以减轻由 *Fusarium pseudograminearum* 导致的小麦冠腐病症状^[74]。另外，将水稻 TLP 基因转入小麦中，可增强小麦对小麦禾谷镰刀菌 *F. graminearum* 的抗性^[35]。超量表达的 CKTLP 明显的提高了拟南芥对轮枝菌 *Verticillium dahliae* 的抗性^[10]。

组成型表达逆渗透蛋白的转基因烟草对交链孢菌 *Alternaria* sp. 的抗性得到明显增强^[77]。转逆渗透蛋白基因的马铃薯 *Solanum tuberosum*，晚疫病症状减轻，抗病性得到增强^[37]；超量表达类似逆渗透蛋白 (osmotin-like) 的转基因马铃薯对致病疫霉的抗性增强^[3]。

组成型表达 TLPs 的转基因水稻抗真菌能力明显增强^[78]；在籼稻优良品种中超量表达水稻 TLPs 基因增强了其对水稻纹枯病致病菌 *Rhizoctonia solani* 和水稻叶鞘腐败病菌 *Sarocladium oryzae* 的抗性^[79]。将水稻 *TLPD34* 导入匍匐剪股颖 *Agrostis palustris* 中，能够增强其对币斑病菌 *Sclerotinia homoeocarpa* 的抗性^[25]。重组龙葵 *Solanum nigrum* TLPs (SnOLP) 在体外对 *Fusarium solani* f. sp. *glycines*, *Colletotrichum* spp., *Macrophomina phaseolina* 和 *Phytophthora nicotiana* var. *parasitic* 等植物病原真菌的生长均具有抑制活性^[80]。TLPs 基因已经在多种植物中成功表达，转基因植物显示的对于多种病原真菌的抗性揭示培育转 TLPs 基因植物将是植物抗病育种的有效途径之一，然而在林木 TLPs 基因的遗传转化仍未见报道。

7 问题与展望

对于植物 TLPs 基因家族，虽然在其结构，生理功能等方面已经有了大量的研究，在植物转基因抗病育种中也有了一些较为成功的应用实例，但在 TLPs 的功能、TLPs 诱导植物抗性的信号传递、与 TLPs 基因有关的多基因聚合育种等方面仍有许多问题有待深入探讨。首先，如前所述，虽然 TLPs 是与抗真菌有关的许多特性已经得到证明，但是 TLPs 抗真菌活性的核心机理有待进一步阐明，而这将会对 TLPs 分子功能的定向设计奠定基础，从而有利于 TLPs 抗真菌功能的进一步发挥。其次，植物 TLPs 基因家族是由 10 个具有共同起源的旁系类群构成，不同类群内的 TLPs 基因高度分化，而已经报道的 TLPs 基因多数属于类群 5 和类群 6，其他类群的 TLPs 是否具有相近的功能，或者说 TLPs 的不同分支是否对应于不同的生理功能，这仍然是一个需要深入研究的课题。第三，研究发现：在不同的条件下，植物特定 TLPs 基因的表达分别与茉莉酸 (JA)，乙烯 (ET) 及水杨酸 (SA) 信号传导途径有关，而病原菌胁迫过程中，茉莉酸以及水杨酸信号传导途径分别与酸性以及碱性 PR 蛋白有关^[81]，然而具体到 TLPs 基因家族，诱导酸性、碱性 TLPs 产生的信号传导机制仍然不明确。对于以上问题的探索，将会有助于对外来生物或非生物胁迫出现时，植物天然免疫系统发挥免疫作用细节的了解。第四，基于 TLPs 基因家族的功能特性，显而易见，通过研究真菌病害过程中 TLPs 基因的表达特征，探讨 TLPs 与林木抗病性之间的联系，发现有效地林木抗病性相关 TLPs 基因并实现遗传转化，将是当今林木病理学和遗传育种研究中的重要内容之一。另外，由于已经发现很多 TLPs 与人体的过敏反应有关，因此，林木，尤其对于在中国具有广泛栽植面积的杨树、松树所引起的过敏性疾病的防治不仅是一个亟待解决的公共卫生课题，也是林木遗传育种研究中需要引起关注的重要问题。

参考文献：

- [1] van LOON L C, van STRIEN E A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 proteins [J]. *Physiol Mol Plant Pathol*, 1999, **55**: 85 - 97.
- [2] van LOON L C, PIERPOINT W S, BOLLER T, et al. Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 1994, **12** (3): 245 - 264.
- [3] ZHU Baolong, CHEN T H H, LI P H. Analysis of late-blight disease resistance and freezing tolerance in transgenic

- potato plants expressing sense and antisense genes for an osmotin-like protein [J]. *Planta*, 1996, **198**: 70 – 77.
- [4] KITAJIMA S, SATO F. Plant pathogenesis-related proteins: molecular mechanisms of gene expression and protein function [J]. *J Biochem*, 1999, **125** (1): 1 – 8.
- [5] BRANDAZZA A, ANGELI S, TEGONI M, *et al.* Plant stress proteins of the thaumatin-like family discovered in animals [J]. *FEBS Lett*, 2004, **572** (1/3): 3 – 7.
- [6] SHATTERS R G Jr, BOYKIN L M, LAPOINTE S L, *et al.* Phylogenetic and structural relationships of the PR-5 gene family reveal an ancient multigene family conserved in plants and select animal taxa [J]. *J Mol Evol*, 2006, **63** (1): 12 – 29.
- [7] GRENIER J, POTVIN C, ASSELIN A. Some fungi express β -1,3-glucanases similar to thaumatin-like proteins [J]. *Mycologia*, 2000, **92** (5): 841 – 848.
- [8] SAKAMOTO Y, WATANABE H, NAGAI M, *et al.* *Lentinula edodes* tlg1 encodes a thaumatin-like protein that is involved in lentinan degradation and fruiting body senescence [J]. *Plant Physiol*, 2006, **141**: 793 – 801.
- [9] LÉON-KLOOSTERZIEL K M, VERHAGEN B W M, KEURENTJES J J B, *et al.* Colonization of the *Arabidopsis rhizosphere* by fluorescent *Pseudomonas* spp. activates a root-specific, ethylene-responsive PR-5 gene in the vascular bundle [J]. *Plant Mol Biol*, 2005, **57**: 731 – 748.
- [10] WANG Qinghua, LI Fuguang, ZHANG Xue, *et al.* Purification and characterization of a CKTLP protein from *Cynanchum komarovii* seeds that confers antifungal activity [J]. *PLoS One*, 2011, **6** (2): e16930. doi: 10.1371/journal.pone.0016930.
- [11] DAFOE N J, GOWEN B E, CONSTABEL C P. Thaumatin-like proteins are differentially expressed and localized in phloem tissues of hybrid poplar [J]. *BMC Plant Biol*, 2010, **10**: 191.
- [12] TUSKAN G A, DIFAZIO S, JANSSON S, *et al.* The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray) [J]. *Science*, 2006, **313** (5793): 1596 – 1604.
- [13] BENJAMIN P, IAN M, NICOLAS R, *et al.* Genome-wide analysis of eukaryote thaumatin-like proteins (TLPs) with an emphasis on poplar [J]. *BMC Plant Biol*, 2011, **11**: 33.
- [14] SHATTERS R G Jr, BOYKIN L M, LAPOINTE S L, *et al.* Phylogenetic and structural relationships of the pr5 gene family reveal an ancient multigene family conserved in plants and select animal taxa [J]. *J Mol Evol*, 2006, **63** (1): 12 – 29.
- [15] BORREGAARD N, ELSBACH P, GANZ T, *et al.* Innate immunity: from plants to humans [J]. *Immunol, Today*, 2000, **21** (1): 68 – 70.
- [16] ZHAO Jiaping, SU Xiaohua. Patterns of molecular evolution and predicted function in thaumatin-like proteins of *Populus trichocarpa* [J]. *Planta*, 2010, **232** (4): 949 – 962.
- [17] VELAZHAHAN R, DATTA S K, MUTHUKRISHNAN S. The PR-5 family: thaumatin-like proteins [G] // DATTA S K, MUTHUKRISHNAN S. *Pathogenesis-Related Proteins in Plants*. Boca Raton: CRC Press, 1999: 118 – 140.
- [18] SMOLE U, BUBLIN M, RADAUER C, *et al.* Mal d 2, the thaumatin-like allergen from apple, is highly resistant to gastrointestinal digestion and thermal processing [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2008, **147** (4): 289 – 298.
- [19] FIERENS E, GEBRUERS K, VOET A R D, *et al.* Biochemical and structural characterization of TLXI, the *Triticum aestivum* L. thaumatin-like xylanase inhibitor [J]. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2009, **24** (4): 646 – 654.
- [20] ANŽLOVAR S, DERMASTIA M. The comparative analysis of osmotins and osmotin-like PR-5 proteins [J]. *Plant Biol*, 2003, **5** (2): 116 – 124.
- [21] OGATA C M, GORDON P F, de VOS AM, *et al.* Crystal structure of a sweet tasting protein thaumatin I, at 1.65 Å resolution [J]. *J Mol Biol*, 1992, **228**: 893 – 908.
- [22] BATALIA M A, MONZINGO A F, ERNST S, *et al.* The crystal structure of the antifungal protein zeamatin, a member of the thaumatin-like, PR-5 protein family [J]. *Nat Struct Biol*, 1996, **3**: 19 – 23.
- [23] GHOSH R, CHAKRABARTI C. Crystal structure analysis of NP24-I: a thaumatin-like protein [J]. *Planta*, 2008, **228** (5): 883 – 890.
- [24] VELAZHAHAN R, CHENCOLE K, ANURATHA C S, *et al.* Induction of thaumatin-like protein (TLPs) in *Rhizoctonia solani*-infected rice and characterization of two new cDNA clones [J]. *Physiol Plantarum*, 1998, **102**: 21 – 28.
- [25] FU Daolin, TISSERAT N A, XIAO Yanmei, *et al.* Over expression of a rice TLPD34 enhances dollar-spot resistance

- in transgenic bent grass [J]. *Plant Sci*, 2005, **168** (3): 671 – 680.
- [26] ABAD L R, D'URZO M P, LIU Dong, *et al.* Antifungal activity of tobacco osmotin has specificity and involves plasma membrane permeabilization [J]. *Plant Sci*, 1996, **118** (1): 11 – 23.
- [27] JAYASANKAR S, LI Zhijian, GRAY D J. Constitutive expression of *Vitis vinifera* thaumatin-like protein after in vitro selection and its role in anthracnose resistance [J]. *Funct Plant Biol*, 2003, **30** (11): 1105 – 1115.
- [28] ZAMANI A, STURROCK R N, EKRAMODDOULLAH A K, *et al.* Gene cloning and tissue expression analysis of a PR-5 thaumatin-like protein in *Phellinus weirii*-infected Douglas-fir [J]. *Biochem Cell Biol*, **94** (11): 1235 – 1243.
- [29] PIGGOTT N, EKRAMODDOULLAH A K M, LIU Junjun, *et al.* Gene cloning of a thaumatin-like (PR-5) protein of western white pine (*Pinus monticola* D. Don) and expression studies of members of the PR-5 group [J]. *Physiol Mol Plant Pathol*, 2004, **64** (1): 1 – 8.
- [30] ROBERTS W K, SELITRENNIKOFF C P. Zeamatin, an antifungal protein from maize with membrane-permeabilizing activity [J]. *Microbiology*, 1990, **136** (9): 1771 – 1778.
- [31] WOLOSHUK C P, MEULENHOF J S, SELA-BUURLAGE M, *et al.* Pathogen-induced proteins with inhibitory activity toward *Phytophthora infestans* [J]. *Plant Cell*, 1991, **3** (6): 619 – 628.
- [32] HU Xu, REDDY A S N. Cloning and expression of a PR5-like protein from *Arabidopsis*: inhibition of fungal growth by bacterially expressed protein [J]. *Plant Mol Biol*, 1997, **34** (6): 949 – 959.
- [33] KOIWA H, KATO H, NAKATSU T, *et al.* Purification and characterization of tobacco pathogenesis-related protein PR-5d, an antifungal thaumatin-like protein [J]. *Plant Cell Physiol*, 1997, **38** (7): 783 – 791.
- [34] PUNJA Z K. Genetic engineering of plants to enhance resistance to fungal pathogens—a review of progress and future prospects [J]. *Can J Plant Pathol*, 2001, **23**: 216 – 235.
- [35] CHEN W P, CHEN P D, LIU D J, *et al.* Development of wheat scab symptoms is delayed in transgenic wheat plants that constitutively express a rice thaumatin-like protein gene [J]. *Theor Appl Genet*, 1999, **99** (5): 755 – 760.
- [36] DATTA K, VELAZHAHAN R, OLIVA N, *et al.* Over-expression of the cloned rice thaumatin-like protein (PR-5) gene in transgenic rice plants enhances environmentally friendly resistance to *Rhizoctonia solani* causing sheath blight disease [J]. *Theor Appl Genet*, **98**: 1138 – 1145.
- [37] LIU Dong, RAGHOTHAMA K G, HASEGAWA P M, *et al.* Osmotin over expression in potato delays development of disease symptoms [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91** (5): 1888 – 1892.
- [38] LIU Dong, RHODES D, D'URZO M P, *et al.* In vivo and in vitro activity of truncated osmotin that is secreted into the extracellular matrix [J]. *Plant Sci*, 1996, **121** (2): 123 – 131.
- [39] GRENIER J, POTVIN C, TRUDEL J, *et al.* Some thaumatin-like proteins hydrolyze polymeric β -1,3-glucans [J]. *Plant J*, 1999, **19** (4): 473 – 480.
- [40] OSMOND R I, HRMOVA M, FONTAINE F, *et al.* Binding interactions between barley thaumatin-like proteins and (1,3)- β -D-glucans: kinetics, specificity, structural analysis and biological implications [J]. *Euro J Biochem*, 2001, **268** (15): 4190 – 4199.
- [41] TRUDEL J, GRENIER J, POTVIN C, *et al.* Several thaumatin-like proteins bind to β -1,3-glucans [J]. *Plant Physiol*, 1998, **118** (4): 1431 – 1438.
- [42] MENU-BOUAOUICHE L, VRIET C, PEUMANS W J, *et al.* A molecular basis for the endo- β -1,3-glucanase activity of the thaumatin-like proteins from edible fruits [J]. *Biochimie*, 2003, **85** (1/2): 123 – 131.
- [43] MARTIN K, McDOUGALL B M, MCILROY S, *et al.* Biochemistry and molecular biology of exocellular fungal β -(1,3)-and β -(1,6)-glucanases [J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2007, **31** (2): 168 – 192.
- [44] GHOSH R, CHAKRABARTI C. Crystal structure analysis of NP24-I: a thaumatin-like protein [J]. *Planta*, 2008, **228** (5): 883 – 890.
- [45] ZECHEL D L, WITHERS S G. Dissection of nucleophilic and acid-base catalysis in glycosidases [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2001, **5** (6): 643 – 649.
- [46] SCHIMOLER-ÓROURKE R, RICHARDSON M, SELITRENNIKOFF C P. Zeamatin inhibits trypsin and alpha-amylase activities [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67** (5): 2365 – 2366.
- [47] FRANCO O L, RIGDEN D J, MELO F R. Plant α -amylase inhibitors and their interaction with insect α -amylases [J]. *Eur J Biochem*, 2002, **269** (2): 397 – 412.

- [48] HSIEH L S, MOOS M Jr, LI Yuan. Characterization of apple 18 and 31 kd allergens by microsequencing and evaluation of their content during storage and ripening [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 1995, **96** (6): 960 – 970.
- [49] KREBITZ M, WAGNER B, FERREIRA F, *et al.* Plant-based heterologous expression of mal d 2, a thaumatin-like protein and allergen of apple (*Malus domestica*), and its characterization as an antifungal protein [J]. *J Mol Biol*, 2003, **329** (4): 721 – 730.
- [50] JENSEN-JAROLIM E, SANTNER B, LEITNER A, *et al.* Bell peppers (*Capsicum annuum*) express allergens (profilin, pathogenesis-related protein P23 and bet v 1) depending on the horticultural strain [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 1998, **116** (2): 103 – 109.
- [51] INSCHLAG C, HOFFMANN-SOMMERGRUBER K, O'RIORDAIN G, *et al.* Biochemical characterization of Pru a 2, a 23-kD thaumatin-like protein representing a potential major allergen in cherry (*Prunus avium*) [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 1998, **116** (1): 22 – 28.
- [52] GAVROVIĆ-JANKULOVIĆ M, ĆIRKOVIĆ T, VUČKOVIĆ O, *et al.* Isolation and biochemical characterization of a thaumatin-like kiwi allergen [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2002, **110** (5): 805 – 810.
- [53] PASTORELLO E A, FARIOLI L, PRAVETTONI V, *et al.* Identification of grape and wine allergens as an endochitinase 4, a lipid-transfer protein, and a Thaumatin [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2003, **111** (2): 350 – 359.
- [54] LEONE P, MENU-BOUAOUICHE L, PEUMANS W J, *et al.* Resolution of the structure of the allergenic and antifungal banana fruit thaumatinlike protein at 1.7-Å [J]. *Biochimie*, 2006, **88**: 45 – 52.
- [55] HOFFMANN-SOMMERGRUBER K. Plant allergens and pathogenesis-related proteins [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2000, **122** (3): 155 – 166.
- [56] MIDORO-HORIUTI T, GOLDBLUM R M, KUROSKY A, *et al.* Variable expression of pathogenesis-related protein allergen in mountain cedar (*Juniperus ashei*) pollen [J]. *J Immunol*, 2000, **164** (4): 2188 – 2192.
- [57] CORTEGANO I, CIVANTOS E, ACEITUNO E, *et al.* Cloning and expression of a major allergen from *Cupressus arizonica* pollen, cup a 3, a PR-5 protein expressed under polluted environment [J]. *Allergy*, 2004, **59** (5): 485 – 490.
- [58] FUJIMURA T, FUTAMURA N, MIDORO-HORIUTI T, *et al.* Isolation and characterization of native cry j 3 from Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen [J]. *Allergy*, 2007, **62** (5): 547 – 553.
- [59] PALACÍN A, TORDESILLAS L, GAMBOA P, *et al.* Characterization of peach thaumatin-like proteins and their identification as major peach allergens [J]. *Clin & Exp Allergy*, 2010, **40** (9): 1422 – 1430.
- [60] LEHTO M, AIRAKSINEN L, PUUSTINEN A, *et al.* Thaumatin-like protein and baker's respiratory allergy [J]. *Ann Allergy Asthma & Immunol*, 2010, **104** (2): 139 – 146.
- [61] HON W C, GRIFFITH M, MLYNARZ A, *et al.* Antifreeze proteins in winter rye are similar to pathogenesis-related proteins [J]. *Plant Physiol*, 1995, **109** (3): 879 – 889.
- [62] FIERENS E, ROMBOUTS S, GEBRUERS K, *et al.* TLXI, a novel type of xylanase inhibitor from wheat (*Triticum aestivum*) belonging to the thaumatin family [J]. *Biochem J*, 2007, **403**: 583 – 591.
- [63] CHOU Juan, HUANG Yinghua. Differential expression of thaumatin-like proteins in sorghum infested with greenbugs [J]. *Z Naturforsch*, 2010, **65** (3/4): 271 – 276.
- [64] BATALIA M A, MONZINGO A F, ERNST S, *et al.* The crystal structure of the antifungal protein zeamatin, a member of the thaumatin-like, PR-5 protein family [J]. *Nat Struct & Mol Biol*, 1996, **3**: 19 – 23.
- [65] KOIWA H, KATO H, NAKATSU T, *et al.* Crystal structure of tobacco PR-5d protein at 1.8 Å resolution reveals a conserved acidic cleft structure in antifungal thaumatin-like proteins [J]. *J Mol Biol*, 1999, **286**: 1137 – 1145.
- [66] MIN K, HA S C, HASEGAWA P M, *et al.* Crystal structure of osmotin, a plant antifungal protein [J]. *Proteins Struct Funct Bioinform*, 2004, **54**: 170 – 173.
- [67] CHAN Y W, TUNG W L, GRIFFITH M, *et al.* Cloning of a cDNA encoding the thaumatin-like protein of winter rye (*Secale cereale* L. Musketeer) and its functional characterization [J]. *J Exp Bot*, 1999, **50** (339): 1627 – 1628.
- [68] YUN D J, ZHAO Y, PARDO J M, *et al.* Stress proteins on the yeast cell surface determine resistance to osmotin, a plant antifungal protein [J]. *PNAS*, 1997, **94** (13): 7082 – 7087.
- [69] ZHANG Yuhua, SHIH D S. Isolation of an osmotin-like protein gene from strawberry and analysis of the response of this gene to abiotic stresses [J]. *J Pant Physiol*, 2007, **164** (1): 68 – 77.

- [70] MIDORO-HORIUTI T, GOLDBLUM R M., KUROSKY A, *et al.* Variable expression of pathogenesis-related protein allergen in mountain cedar (*Juniperus ashei*) pollen [J]. *J Immunol*, 2000, **164** (4): 2188 – 2192.
- [71] SKADSEN R W, SATHISH P, KAEPLER H F. Expression of thaumatin-like protein PR-5 genes switches from the ovary wall to the aleurone in developing barley and oat seeds [J]. *Plant Sci*, 2000, **156** (1): 11 – 22.
- [72] KIM Y S, PARK J Y, KIM K S, *et al.* A thaumatin-like gene in nonclimacteric pepper fruits used as molecular marker in probing disease resistance, ripening, and sugar accumulation [J]. *Plant Mol Biol*, 2002, **49** (2): 125 – 135.
- [73] SASSA H, USHIJIMA K, HIRANO H. A pistil-specific thaumatin/ PR5-like protein gene of Japanese pear (*Pyrus serotina*): sequence and promoter activity of the 50 region in transgenic tobacco [J]. *Plant Mol Biol*, 2002, **50** (3): 371 – 377.
- [74] DESMONDOJ O J, EDGAR C I, MANNERS J M, *et al.* Methyl jasmonate induced gene expression in wheat delays symptom development by the crown rot pathogen *Fusarium pseudograminearum* [J]. *Physiol Mol Plant Pathol*, 2006, **67** (3/5): 171 – 179.
- [75] PRASATH D, EL-SHARKAWY I, SHERIF S, *et al.* Cloning and characterization of PR-5 gene from *Curcuma amada* and *Zingiber officinale* in response to *Ralstonia solanacearum* infection [J/OL]. *Plant Cell Rep.* 2011-05-19 [2011-05-28]. <http://www.springerlink.com/content/7pnr204736343np2/fulltext.pdf>.
- [76] KUWABARA C, TAKEZAWA D, SHIMADA D, *et al.* Abscisic acid-and cold-induced thaumatin-like protein in winter wheat has an antifungal activity against snow mould, *Microdochium nivale* [J]. *Physiol Plantarum*, 2002, **115** (1): 101 – 110.
- [77] VELAZHAHAN R, MUTHUKRISHNAN S. Transgenic tobacco plants constitutively overexpressing a rice thaumatin-like protein (PR-5) show enhanced resistance to *Alternaria alternata* [J]. *Biol Plant*, 2003, **47** (3): 347 – 354.
- [78] DATTA K, VELAZHAHAN R, OLIVA N, *et al.* Over-expression of the cloned rice thaumatin-like protein (PR-5) gene in transgenic rice plants enhances environmentally friendly resistance to *Rhizoctonia solani* causing sheath blight disease [J]. *Theor Appl Genet*, 1999, **98**: 1138 – 1145.
- [79] KALPANA K, MARUTHASALAM S, RAJESH T, *et al.* Engineering sheath blight resistance in elite indica rice cultivars using genes encoding defense proteins [J]. *Plant Sci*, 2006, **170** (2): 203 – 215.
- [80] CAMPOS M A, SILVA M S, MAGALHÃES C P, *et al.* Expression in *Escherichia coli*, purification, refolding and antifungal activity of an osmotin from *Solanum nigrum* [J]. *Microbial Cell Factories*, 2008, **7**: 1 – 7.
- [81] KUNKEL B N, BROOKS D M. Cross talk between signaling pathways in pathogen defense [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2002, **5** (4): 325 – 331.