

文章编号: 1004-0374(2011)06-0598-07

## 植物糖生物学与糖链植物疫苗

尹 恒, 赵小明, 王文霞, 杜昱光\*

(中国科学院大连化学物理研究所天然产物与糖工程课题组, 辽宁省碳水化合物重点实验室, 大连 116023)

**摘 要:** 植物糖生物学是研究植物与糖类互作机制、植物体内糖链与糖缀合物结构及生物学功能的科学, 具体涉及糖信号、糖蛋白及其糖链功能、糖基转移酶及植物凝集素等研究方向。依据相关文献及实际研究经验, 简要综述植物糖生物学的最新研究进展, 其中重点介绍糖链植物疫苗并阐述其应用情况及作用机制。

**关键词:** 植物糖生物学; 糖链植物疫苗; 糖蛋白; 糖基转移酶; 植物免疫

**中图分类号:** Q513<sup>+.3</sup>; Q522      **文献标志码:** A

## Plant glycobiology and carbohydrate-based plant disease vaccines

YIN Heng, ZHAO Xiao-Ming, WANG Wen-Xia, DU Yu-Guang\*

(Liaoning Provincial Key Laboratory of Carbohydrates, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China)

**Abstract:** Plant glycobiology is concentrated on the plant-carbohydrates interaction mechanism as well as the structure and biology function of carbohydrates (sugar chains or glycans) and glycoconjugates. It contains several research aspects like sugar signaling, plant glycoprotein and glycan, plant glycosyltransferases and plant lectins. Based on published papers and our previous results, the recent research advance of plant glycobiology was reviewed and focused on carbohydrate-based plant disease vaccines (CPDVs). The carbohydrates which have the ability to active plant immunity and defense were named carbohydrate-based plant disease vaccines and the application and mechanism of carbohydrate-based plant disease vaccines were introduced and discussed.

**Key words:** plant glycobiology; carbohydrate-based plant disease vaccines; glycoprotein; glycosyltransferases; plant immunity

糖类是生物体的重要组成成份, 不仅可作为代谢能量来源或结构保护材料, 还广泛参与了生物的生殖发育、生长、应激等过程, 是很多生理和病理过程分子识别的决定因素, 与核酸、蛋白质并列为三种重要的生物信息分子。但由于糖类物质结构复杂等客观原因, 对于糖的研究远远落后于核酸、蛋白质。直到二十世纪七八十年代, 糖生物学的工作才为人所重视, 1988年, Rademacher等<sup>[1]</sup>在《生物化学年评》杂志发表了题为糖生物学 (Glycobiology) 的综述文章, 才标志着糖生物学的正式诞生。糖生物学的广义定义是: 研究自然界中广泛分布的糖 (糖链或聚糖) 的结构、生物合成和生物学意义; 尤其是一些重要的功能糖、生物体内糖蛋白、蛋白聚糖等糖缀合物的生物学功能。

糖生物学的研究工作开展已略显缓慢, 而关于植物糖生物学的研究更寥寥可数。目前关于植物糖生物学 (Plant Glycobiology) 尚无系统的专著问世, 本实验室从1996年以来, 持续开展植物糖生物学方面的研究工作, 并于国内首先提出了植物糖生物学的概念<sup>[2]</sup>, 将其定义为研究植物与糖类互作机制、植物体内糖链与糖缀合物结构及生物学功能的科

收稿日期: 2011-01-20

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (“863”计划) (2011AA090704); 中国科学院知识创新工程重要方向项目 (KSCX2-YW-N-081); 公益性 (农业) 科研专项 (200903052); 大连化学物理研究所博士探索基金

\*通信作者: E-mail: duyg@dicp.ac.cn

学。植物糖生物学涵盖内容广泛,但基于作者前期的研究基础,本文将仅从糖蛋白、糖基转移酶(Glycosyltransferase, GTs)等几方面介绍植物糖生物学的最新研究进展,尤其是糖链植物疫苗(carbohydrate-based plant disease vaccines, CPDVs)概念及其作用机制。

## 1 糖蛋白

糖蛋白是指由糖链与蛋白质分子相连构成的一类糖复合物,其中这些糖链被称为聚糖(glycan)或寡糖链(oligosaccharide chain),由少则一个、多则数百个糖基连成,生物体内有数百万糖蛋白,参与到生物活动的方方面面。植物糖蛋白广泛存在于细胞壁、细胞膜、细胞质中,包括各种酶、凝集素、贮藏蛋白等,在植物的萌发、生长、生殖、防卫等生命过程中均起重要的作用。组成植物糖蛋白糖链的单糖基有半乳糖、甘露糖、阿拉伯糖、N-乙酰氨基葡萄糖、木糖等。具有类似构成与结构的糖蛋白可被归入同一个家族,且具有相近的功能。如细胞壁的富含羟脯氨酸糖蛋白(HRGP),在大多数双子叶植物中均被发现,其蛋白部分大约有300个氨基酸残基,其中羟脯氨酸(Hyp)含量高达30%~40%;HRGP的糖链成分主要是阿拉伯糖和半乳糖,含量达26%~65%,HRGP在植物抗病抗逆过程起重要作用<sup>[3]</sup>。目前研究较多的植物糖蛋白还有具有高度特异性糖结合活性的植物凝集素和在被子植物受精过程中起作用的阿拉伯半乳糖蛋白家族(AGP)<sup>[4]</sup>等。

但最为研究者关注的是细胞膜上的糖蛋白,因为它们往往负责植物细胞接受外界信号,是细胞与外界信息交换的第一道开关。有些糖蛋白仅在细胞膜上起重要作用,如植物激素生长素的结合蛋白ABP1。ABP1由3个高度保守的结构域构成,含有1个或2个(在双子叶植物中)糖基化位点,常见的修饰糖基有甘露糖等。ABP1虽广泛存在于细胞内质网腔、细胞壁与质膜,但只有位于质膜的ABP1可以结合生长素,参与激活生长素信号的早期反应。此外,相当一部分植物激发子的受体也为糖蛋白,如几丁寡糖的受体CEBiP<sup>[5]</sup>、CERK<sup>[6]</sup>、EF-Tu的受体EFR,鞭毛蛋白的受体FLS2<sup>[7]</sup>等。

糖蛋白中蛋白质是生理功能的主要实现者,而糖链通过影响蛋白质的整体构象对蛋白质功能起辅助作用,如HRGP的糖链主要负责维持该糖蛋白的结构稳定。研究发现糖链缺失往往将使糖蛋白丧失功能,最新的实验证明N-糖链的缺少将使得EFR

丧失对EF-Tu的识别能力<sup>[8]</sup>。糖链结构的细微差异,如糖链的长短及连接位置、单糖组成和数目、排列顺序和构型,也会导致功能的显著差异。因此,对糖链结构进行解析也成为了植物糖生物学的一个重要研究分支,目前通常使用HPLC和质谱串连技术进行糖链结构解析,通过对糖链进行柱前衍生化带上紫外或荧光基团后经由HPLC分离,再将纯化得到的糖链样品利用电喷雾质谱或飞行质谱进行结构解析<sup>[9]</sup>。但由于植物体系复杂,糖链形成规律性不强,目前成功解析的植物糖蛋白糖链尚不多见<sup>[10]</sup>,大部分工作由日本Kimura实验室完成,自1997年以来,他们利用荧光标记、高效排阻液相色谱、离子喷雾串联质谱等技术对大豆、烟草、番茄等植物中的多个糖蛋白成功进行了糖链结构解析<sup>[11]</sup>。

## 2 糖基转移酶

糖基转移酶是植物中广泛存在的一大类酶,参与了蛋白聚糖(proteoglycan)、糖蛋白等糖缀合物中糖链部分的生物合成,糖链的合成是通过GTs将糖基由糖基的供体转移到受体上,所有的GTs都有高度的底物专一性,既对糖基的供体有专一性,又对受体具有专一性。对GTs进行研究,可为揭示聚糖及糖蛋白功能奠定基础,目前在植物体中,已经发现数以百计的GTs,虽然其中大多数的具体功能尚不明了,但总体而言,植物中GTs的功能可分为以下三类<sup>[12]</sup>。

### 2.1 合成细胞壁多糖

植物细胞的主要特征是有一层复杂的细胞壁包围着每一个细胞,细胞壁在细胞生长发育、信号转导和细胞对病原体响应等方面扮演着重要角色。典型的细胞壁结构中包含多种糖类物质如纤维素和嵌于壁上的粘胶质半纤维聚糖等。细胞壁上的聚糖通常在高尔基体中合成,这一过程分为两个步骤:聚糖合酶合成骨架,各种各样的GTs催化添加糖基到侧链上<sup>[13]</sup>。与细胞壁聚糖合成相关的GTs通常位于分泌路径,多数是II型膜蛋白,跨膜的疏水端锚定膜上,一个短N端部分朝向细胞溶质,糖类的接触反应区域位于高尔基体的腔内。目前已经在拟南芥、豌豆等多种作物中克隆得到此类GTs。

### 2.2 合成植物糖蛋白上糖链

植物糖蛋白上糖链依据其连接方式和组成的不同,主要分为N-糖链和O-糖链两种。N-糖链指糖链通过还原端的N-乙酰氨基葡萄糖(GlcNAc)以 $\beta$ -1,4糖苷键与蛋白质肽链上Asn-XXX-Ser/Thr序

列(XXX为除脯氨酸以外的氨基酸)中Asn残基上的氨基(-NH<sub>2</sub>)相连。第一步合成由N-乙酰氨基葡萄糖转移酶(N-acetylglucosaminyltransferase, GnT)完成。植物中第一个GnT基因(GnTI)于1999年在烟草中发现<sup>[14]</sup>,GnTI定位于内质网和高尔基体中<sup>[15]</sup>。随后在拟南芥、马铃薯中也鉴定出一系列GnT基因,这些基因均与动物GnT基因有较高的相似性,揭示真核细胞中N-糖链的合成路径高度保守。

O-糖链相对N-糖链更为复杂,有多种组成形式,在动物体系中研究最深入的是O-乙酰氨基半乳糖(O-GalNAc)连接糖链,在此过程中,多肽N-乙酰氨基半乳糖转移酶(polypeptide-N-acetylgalactosaminyltransferase, ppGalNAc)将UDP-GalNAc上的GalNAc基团转移至多肽链上Ser/Thr特定序列的羟基上,从而合成GalNAc-O-Ser/Thr糖蛋白片段。虽然目前研究者尚未在植物中找到任何ppGalNAc基因,但有报道在水稻的谷蛋白和醇溶蛋白中含有O-GalNAc连接糖链<sup>[16-17]</sup>,说明植物中也应该存在ppGalNAc。

除了上述发生在内质网和高尔基体的糖基化外,在细胞核和细胞质中存在另一种O连接-N-乙酰氨基葡萄糖糖基化(O-GlcNAc)过程,O-乙酰氨基葡萄糖糖基转移酶(O-GlcNAc-transferase, OGT)在此过程中起作用。OGT通过氧连的形式将单个的N-GlcNAc添加到肽链的Ser/Thr上。这种修饰方式与蛋白磷酸化修饰类似,说明O-GlcNAc修饰很可能通过改变蛋白质细微结构或形成空间位阻从而抑制该肽链临近位置的磷酸化,从而影响蛋白质的磷酸化、定位、稳定性以及与其他蛋白质的相互作用。糖生物学大师Hart将这种糖基化与磷酸化的关系形象的称作“阴阳调控”<sup>[18]</sup>。目前研究较多的OGT基因是SPINDLY(SPY),SPY在拟南芥、大麦、番茄、水稻等植物中均存在<sup>[19]</sup>,由作为信号域的TRP结构域与催化功能域两部分组成,通常通过与其他具有核定位信号的蛋白互作而实现功能。SPY广泛参与植物中脱落酸、赤霉素、油菜素内酯等信号通路<sup>[20-21]</sup>,不仅在植物发育过程中起作用,还涉及到植物抗性反应。

### 2.3 植物小分子糖苷糖基转移酶

植物中另一类重要的GTs将糖基转运到激素、脂类等小分子上,从而调节代谢物的水溶性、稳定性、结合性等性质<sup>[22]</sup>。植物中小分子糖苷的糖基化作用影响到植物的大部分生命过程,在次生代谢、防卫反应等领域都起到重要的作用。目前已经从植

物中鉴定出将糖基加到吲哚乙酸、水杨酸、类黄酮、芥子酸胆碱酸、腈等物质上的GTs。GTs大多参与植物次生代谢物的生物合成,如草莓中的肉桂酸葡萄糖基转移酶(FaGT2)负责催化合成肉桂酸、安息香酸的1-O-酰基-糖基酯<sup>[23]</sup>,从而影响植物果实的口味。更为重要的是此类GTs通过对植物激素修饰形成糖苷物在植物体内作为“激素库”从而控制激素平衡<sup>[24]</sup>。目前在植物体内除了乙烯外,其余激素的糖基化衍生物均已被发现。Hou等<sup>[25]</sup>发现拟南芥中的细胞分裂素可被糖基转移酶在不同位点修饰形成无活性的N-糖苷细胞分裂素和O-糖苷细胞分裂素,其中后者是细胞分裂素的贮藏形式,起到激素库的作用,在一定条件下可通过对其去糖基化而恢复细胞分裂素活性。

## 3 糖链植物疫苗

自然界中,当植物受到外界生物或非生物胁迫时,细胞壁起到第一层防御的作用,而植物细胞壁中富含纤维素、半纤维素和果胶类等多糖,构成这些多糖的单糖单元主要有 $\beta$ -D-葡萄糖、半乳糖醛酸、甘露糖、阿拉伯糖等;与此同时,某些病原菌的细胞壁上也含有几丁质、壳聚糖等多糖,在病原菌与植物互作过程中,一系列糖基水解酶活力被激发,将病原菌与植物细胞壁上的多糖降解为寡糖片段,而极微量的寡糖就可以激发植物产生有效的抗病反应。在实际农业生产中,糖类物质的应用也具有悠久历史,如法国沿海地区的农民将虾蟹壳粉末(含几丁聚糖、壳聚糖)、海带粉末(含葡聚糖)直接施用于田间防治病害已有千余年的传统。但直到20世纪70年代,尤其是1985年寡糖素(Oligosaccharins)概念提出后<sup>[26]</sup>,糖类物质在植物保护方面的研究才为人们所重视。针对这些糖类物质诱导植物抗性的特点以及近年来重新活跃的植物免疫学说,本课题组在2008年尝试提出了糖链植物疫苗的概念<sup>[27]</sup>。

### 3.1 糖链植物疫苗概念的提出

与动物相比,植物的自身免疫机制往往受到忽视,甚至在一段时间内不为学术界所认可,但最近几年,大量的研究工作证实了植物体内也具有整体性的免疫系统<sup>[28]</sup>,且其与动物免疫机制有很多共同点<sup>[29-30]</sup>。同时,在对壳寡糖等糖类物质诱导植物抗病过程的研究中,发现糖类物质的作用更多体现在防而不是治,如使用适当浓度的糖类物质在植物感病前处理植株,并不使植物产生强抗病反应,但经此处理后的植物再受到病虫害侵染时可表现出比正

常植株更高的防范作用;且在植物感病后再使用糖类物质处理,效果往往不如感病前处理好。糖类物质的这种特性符合植物免疫学中的预警机制(PRIME)<sup>[31]</sup>,这种对植物免疫系统起到预警增敏作用的特性,使我们联想到了动物疫苗在预防动物疾病过程中的功用,进而联想到这两者间的相似性(表1)<sup>[32]</sup>,从而归纳提出了糖链植物疫苗(CPDVs)的概念,将这类可以增敏激活植物免疫系统,具有预防植物病害功能的糖类物质定义为CPDVs,当然这个概念还有待植物免疫学界进一步的讨论与认可。

### 3.2 应用研究

比较常见的CPDVs有几丁聚糖及其寡糖、壳聚糖及其寡糖、寡聚半乳糖醛酸、葡聚糖及其寡糖等。与动物疫苗类似,CPDVs在作用对象上具有广谱性,结合我们实验室开展的温室、田间实验及相关文献报道发现CPDV可针对70余种作物起作用,涵盖到了粮食作物、经济作物、蔬菜、花卉、林木等多种作物,可防治真菌、细菌、病毒等多种病害<sup>[33-34]</sup>。除了最明显的防胜于治外,CPDVs还有其他的作用特点:

(1) 同样的植物-病原菌环境下,不同的CPDVs作用不同。如Ben-Shalom等<sup>[35]</sup>研究发现,在黄瓜接种白粉病前提前1、4或24h喷施壳聚糖,对黄瓜白粉病有65%、82%和87%的抑制率;而同样处理条件下,几丁寡糖对黄瓜白粉病的防治效果远低于此。这些研究结果说明不同的CPDVs针对相同的植物病害效果不尽相同。

(2) 同一种CPDVs,不同聚合度效果不同。CPDVs通常为寡糖或聚糖,聚合度不同的CPDVs不仅在水溶性等物理性质上有一定差异,在生理活

性上也有所不同,但没有明显的规律性,针对不同的植物-病原菌条件往往表现出来的现象各不相同。如Cabrera等<sup>[36]</sup>报道壳寡糖可以诱导拟南芥中苯丙氨酸转氨酶(PAL)与过氧化物酶(POD)活力提高及抗性提高,且聚合度越高的壳寡糖能力越强。而Falcon等<sup>[37]</sup>报道壳寡糖可以诱导烟草抵抗烟草黑胫病,同时烟草中PAL和葡聚糖酶(GLU)的活力也被壳寡糖诱导提高;但在这种情况下,则是聚合度越低诱抗效果越好。这些现象都揭示了CPDVs作用的复杂性,这不仅为CPDVs研究带来了困难,也在极大程度上影响了CPDVs的推广应用。因此,关于CPDVs在不同植物-病原菌环境下作用效果的应用研究工作仍具有一定意义,也是当前围绕CPDVs开展较多的工作。

### 3.3 作用机制

虽然针对CPDVs的研究从20世纪80年代以来大量增多,但如上所述,目前仍以应用研究为主,对CPDVs在植物中的作用机制仍不明了。结合实验与文献报道,分析认为其作用机制大致由以下几步组成:信号识别;信号转导与放大;调控防卫相关基因、激活相关蛋白活性;抗性次生代谢产物积累从而诱导抗性反应产生。

#### 3.3.1 信号识别

信号识别是CPDVs激发植物免疫系统的第一步,植物通常由一系列模式识别受体(pattern recognition receptors)来完成此功能。目前几丁聚糖及其寡糖、葡寡糖等CPDVs的受体已被鉴定发现<sup>[29]</sup>,其中研究最深入的是几丁寡糖的受体。日本Shibuya实验室从1993年以来,利用同位素标记及亲和色谱的方法从水稻、大豆、小麦、大麦等多种植物中筛选发现了几丁寡糖的特异结合位点和蛋白<sup>[38]</sup>。

表1 CPDVs与传统动物疫苗的比较<sup>[32]</sup>

Content	Animal vaccines	CPDVs
Immunity inoculated effect	Yes	Yes
Specificity of resistance	Yes	No
Microbe-associated molecular patterns (MAMP)	Yes	Yes
Pattern recognition receptors	Yes	Yes
Signaling molecules	NO	NO
	Reactive oxygen species(ROS)	ROS
	Salicylic acid (SA)	SA
Kinase mediated signaling	Yes	Yes
Resistant gene family	Immunoglobulin gene superfamily	PR gene family
Specialized antigen-presenting cells	Yes	No
Autoantibodies	Yes	No

2006年, Kaku等<sup>[51]</sup>分离得到了水稻中的几丁寡糖结合蛋白 CEBiP, 并克隆其编码基因进行了后续研究。结构分析显示 CEBiP 缺少膜内区域, 说明其可能与其他蛋白形成复合体参与几丁寡糖的信号识别。果然, 随后两个研究组独立发现了这个推测的结合蛋白 CERK1/LysM RLK1<sup>[6,39]</sup>。最新研究结果已经证实 CEBiP 与 CERK1 的相互作用<sup>[40]</sup>, 并说明 CERK1 在几丁寡糖信号识别过程中起主要作用, 且此蛋白中的三个 LysM 结构域是作用关键位置<sup>[41]</sup>。虽然几丁寡糖受体的发现是 CPDVs 乃至植物免疫研究领域的一个里程碑式重要发现, 但仍有不少重要 CPDVs(如壳寡糖、寡聚半乳糖醛酸)的受体还未被发现<sup>[42]</sup>, 不过已有文献报道它们在植物上具有特异结合蛋白<sup>[43-44]</sup>, 说明了受体存在的可能性。

### 3.3.2 信号转导与放大

CPDVs 信号转导与放大是一个十分复杂的过程, 通常伴随着离子流、质膜蛋白的可逆磷酸化、质膜去极化、活性氧和一氧化氮爆发、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 等信号通路激活、植物激素 (水杨酸、茉莉酸、乙烯等) 产生等一系列信号转导和放大过程, 已有文献进行了较详细的综述<sup>[32,42,45]</sup>, 因此在此不做赘述。值得一提的是, 基于研究技术的成熟性, 目前研究较多的是 CPDVs 诱导的活性氧和一氧化氮爆发反应, 大多数已知 CPDVs 都被发现具有此功能, 如 Zhao 等<sup>[46]</sup>发现壳寡糖可以诱导烟草中一氧化氮产生且与抗性直接相关。而其他环节的研究相对较少且共性不强, 因此至今仍未有完整的 CPDVs 信号转导通路被实验发现, 尤其是其中一些重要的信号节点 (hub) 基因仍未知, 相信今后几年寻找这些重要的信号节点将是此领域的研究热点之一。

### 3.3.3 调控防卫相关基因、激活相关蛋白活性

许多与直接抗性或信号转导有关的 CPDVs 响应基因如 MAPK、SKP1、WRKY、OPR1 等已被单独鉴定出来, 并研究了功能。在此基础上, 高通量的基因分析技术也被应用于 CPDVs 响应基因的筛选。如 Feng 等<sup>[47]</sup>利用 mRNA 差异显示技术从烟草中筛选得到 96 个壳寡糖响应基因。此后, 基因芯片技术作为最有效的基因分析技术也被广泛应用于此, 筛选得到了大量的几丁质、葡聚糖、壳寡糖等多种 CPDVs 的响应基因信息<sup>[48-50]</sup>, 其中有很多基因参与了植物免疫调控, 为寻找信号节点基因, 更好的阐述 CPDVs 作用机理奠定了基础。

与响应基因类似, CPDVs 的响应蛋白研究最初也是从单个蛋白开始, 最初发现的主要是抗性酶类, 如几丁质酶 (CHI)、GLU、PAL 等。但近年来, 随着蛋白质组学技术发展, 大量的响应蛋白被鉴定, 如 Chen 等<sup>[51]</sup>在水稻质膜蛋白中鉴定了 14 个壳聚糖响应基因, 大部分与信号转导有关。此外, Ferri 等<sup>[52]</sup>从葡萄中鉴定出 73 个壳聚糖响应蛋白, 其中有 11 个属于直接参与防卫的 PR-10 家族, 而其他蛋白则涉及到次生代谢等方面。

### 3.3.4 抗性次生代谢产物积累

CPDVs 对抗性次生代谢物质的诱导作用研究开展很早, 1980 年, Hadwiger 发现壳寡糖处理 24 h 内即可以诱导一种植保素——豌豆素的产生<sup>[53]</sup>, CPDVs 对香豆素等其他植保素也有较好的诱导作用<sup>[54]</sup>。此外, CPDVs 还可以通过诱导木质素等物质产生从而增强植物细胞壁, 提高植物结构抗性, 与植物整体防效结果相仿, 不同的 CPDVs 也会有不同的效果, 如 Vander 等<sup>[55]</sup>发现壳寡糖处理相较于几丁寡糖处理能更有效地增加小麦中的木质素含量。

## 4 现状与展望

糖类物质在植物界中广泛存在, 糖基化现象也涉及到植物的几乎所有生理活动, 因此, 植物糖生物学是揭示植物生命活动的重要研究领域。近年来, 植物糖生物学的研究取得了一定进展, 但相较于动物、微生物领域, 开展仍十分缓慢, 最为明显的标志是在糖生物学领域的相关期刊及会议中, 植物糖生物学都只能占到很小的一部分。如糖生物学的主流杂志 *Glycobiology* 2010 年发表的 412 篇论文中, 植物糖生物学方面的仅有 10 余篇; 国内的研究情况也大同小异, 在我国糖生物学界的重要会议——2010 年全国糖生物学大会上, 44 个会议报告中仅有 4 个与植物糖生物学有关。这些严峻的事实说明了植物糖生物学发展不快的研究现状, 也鞭策着我们从事此方面工作的科技人员应加快研究步伐、加深研究内容。

结合现有文献和研究经验, 笔者认为近阶段植物糖生物学的研究重点有以下几方面: 植物糖蛋白功能研究 (尤其是糖蛋白上糖链的结构构象与功能的关系); 植物糖基转移酶鉴定及功能分析; CPDVs 作用机制的研究 (重点在于受体、信号网络中关键节点的寻找)。值得注意的是, 这些研究问题大多涉及到糖与蛋白质的互动, 与“蛋白质和糖

类的相互作用是糖生物学的基础”理念相吻合<sup>[56]</sup>。而解决这些问题, 则将依赖于多学科的协同工作, 尤其是生物化学、分子生物学、植物免疫学等领域的最新进展, 更为重要的是要从现有的动物、微生物糖生物学理论与技术等资源中学习, 用现有动物、微生物糖生物学的技术来解决植物糖生物学中的问题, 也许能取得事半功倍的良好效果。

### [参 考 文 献]

- [1] Rademacher TW, Parekh RB, Dwek RA. Glycobiology. *Annu Rev Biochem*, 1988, 57: 785-838
- [2] 尹恒, 王文霞, 赵小明, 等. 植物糖生物学研究进展. *植物学报*, 2010, 45 (5): 521-9
- [3] Deepak S, Shailasree S, Kini RK, et al. Hydroxyproline-rich glycoproteins and plant defence. *J Phytopathol*, 2010, 158(9): 585-93
- [4] Seifert GJ, Roberts K. The biology of arabinogalactan proteins. *Annu Rev Plant Biol*, 2007, 58: 137-61
- [5] Kaku H, Nishizawa Y, Ishii-Minami N, et al. Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(29): 11086-91
- [6] Miya A, Albert P, Shinya T, et al. CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(49): 19613-8
- [7] Chinchilla D, Bauer Z, Regenass M, et al. The *Arabidopsis* receptor kinase FLS2 binds flg22 and determines the specificity of flagellin perception. *Plant Cell*, 2006, 18(2): 465-76
- [8] Haweker H, Rips S, Koiwa H, et al. Pattern recognition receptors require N-glycosylation to mediate plant immunity. *J Biol Chem*, 2010, 285(7): 4629-36
- [9] 王承健, 王仲孚. 糖链的生物质谱分析. *生命科学*, 2010, 23(6): 569-77
- [10] Seveno M, Cabrera G, Triguero A, et al. Plant N-glycan profiling of minute amounts of material. *Anal Biochem*, 2008, 379(1): 66-72
- [11] Maeda M, Kimura M, Kimura Y. Intracellular and extracellular free N-glycans produced by plant cells: occurrence of unusual plant complex-type free N-glycans in extracellular spaces. *J Biochem (Tokyo)*, 2010, 148(6): 681-92
- [12] Keegstra K, Raikhel N. Plant glycosyltransferases. *Curr Opin Plant Biol*, 2001, 4(3): 219-24
- [13] Farrokhi N, Burton RA, Brownfield L, et al. Plant cell wall biosynthesis: genetic, biochemical and functional genomics approaches to the identification of key genes. *Plant Biotech J*, 2006, 4(2): 145-67
- [14] Strasser R, Mucha J, Schwihla H, et al. Molecular cloning and characterization of cDNA coding for  $\beta$  1,2N-acetylglucosaminyltransferase I (GlcNAc-TI) from *Nicotiana tabacum*. *Glycobiology*, 1999, 9(8): 779-85
- [15] Saint-Jore-Dupas C, Nebenfuhr A, Boulaflous A, et al. Plant N-glycan processing enzymes employ different targeting mechanisms for their spatial arrangement along the secretory pathway. *Plant Cell*, 2006, 18(11): 3182-200
- [16] Kishimoto T, Watanabe M, Mitsui T, et al. Glutelin basic subunits have a mammalian mucin-type O-linked disaccharide side chain. *Arch Biochem Biophys*, 1999, 370(2): 271-7
- [17] Kilcoyne M, Shah M, Gerlach JQ, et al. O-glycosylation of protein subpopulations in alcohol-extracted rice proteins. *J Plant Physiol*, 2009, 166(3): 219-32
- [18] Hart GW, Greis KD, Dong LYD, et al. O-linked N-acetylglucosamine: The “yin-yang” of ser/thr phosphorylation? Nuclear and cytoplasmic glycosylation. *Glycoimmunology*, 1995, 376: 115-23
- [19] Filardo F, Robertson M, Singh DP, et al. Functional analysis of *HvSPY*, a negative regulator of GA response, in barley aleurone cells and *Arabidopsis*. *Planta*, 2009, 229(3): 523-37
- [20] Silverstone AL, Tseng TS, Swain SM, et al. Functional analysis of *SPINDLY* in gibberellin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2007, 143(2): 987-1000
- [21] Shimada A, Ueguchi-Tanaka M, Sakamoto T, et al. The rice *SPINDLY* gene functions as a negative regulator of gibberellin signaling by controlling the suppressive function of the DELLA protein, SLR1, and modulating brassinosteroid synthesis. *Plant J*, 2006, 48(3): 390-402
- [22] Bowles D, Isayenkova J, Lim EK, et al. Glycosyltransferases: managers of small molecules. *Curr Opin Plant Biol*, 2005, 8(3): 254-63
- [23] Lunkenbein S, Bellido M, Aharoni A, et al. Cinnamate metabolism in ripening fruit. Characterization of a UDP-glucose: Cinnamate glucosyltransferase from strawberry. *Plant Physiol*, 2006, 140(3): 1047-58
- [24] Gachon CMM, Langlois-Meurinne M, Saindrenan P. Plant secondary metabolism glycosyltransferases: the emerging functional analysis. *Trends Plant Sci*, 2005, 10(11): 542-9
- [25] Hou BK, Lim EK, Higgins GS, et al. N-glycosylation of cytokinins by glycosyltransferases of *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem*, 2004, 279(46): 47822-32
- [26] Albersheim P, Darvill AG. Oligosaccharins. *Sci Am*, 1985, 253(3): 58-64
- [27] 赵小明, 杜昱光. 寡糖激发植物免疫及寡糖植物疫苗的研究进展[M]//邱德文. 植物免疫与植物疫苗——研究与实践. 北京: 科学出版社, 2008: 48-66
- [28] Jones JDG, Dangl JL. The plant immune system. *Nature*, 2006, 444: 323-9
- [29] Boller T, Felix G. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu Rev Plant Biol*, 2009, 60: 379-406
- [30] Nurnberger T, Brunner F, Kemmerling B, et al. Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol Rev*, 2004, 198: 249-66
- [31] Conrath U, Beckers GJM, Flors V, et al. Priming: Getting ready for battle. *Mol Plant-Microbe Interact*, 2006, 19(10): 1062-71
- [32] Yin H, Zhao XM, Du YG. Oligochitosan: A plant diseases vaccine-A review. *Carbohydr Polym*, 2010, 82(1): 1-8
- [33] Zhao XM, She XP, Du YG, et al. Induction of antiviral

- resistance and stimulatory effect by oligochitosan in tobacco. *Pestic Biochem Physiol*, 2007, 87(1): 78-84
- [34] Trouvelot S, Varnier AL, Allegre M, et al. A  $\beta$ -1,3 glucan sulfate induces resistance in grapevine against *Plasmopara viticola* through priming of defense responses, including HR-like cell death. *Mol Plant-Microbe Interact*, 2008, 21(2): 232-43
- [35] Ben-Shalom N, Aki C, Ardi R, et al. Elicitation effects of chitin oligomers and chitosan sprayed on the leaves of cucumber (*Cucumis sativus*) and bean (*Phaseolus vulgaris*) plants. *Isr J Plant Sci*, 2002, 50(3): 199-206
- [36] Cabrera JC, Messiaen J, Cambier P, et al. Size, acetylation and concentration of chitooligosaccharide elicitors determine the switch from defence involving PAL activation to cell death and water peroxide production in *Arabidopsis* cell suspensions. *Physiol Plant*, 2006, 127(1): 44-56
- [37] Falcon AB, Cabrera JC, Costales D, et al. The effect of size and acetylation degree of chitosan derivatives on tobacco plant protection against *Phytophthora parasitica nicotianae*. *World J Microbiol Biotechnol*, 2008, 24(1): 103-12
- [38] Yamaguchi T, Ito Y, Shibuya N. Oligosaccharide elicitors and their receptors for plant defense responses. *Trends Glycos Glyc*, 2000, 12(64): 113-20
- [39] Wan JR, Zhang XC, Neece D, et al. A LysM receptor-like kinase plays a critical role in chitin signaling and fungal resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2008, 20(2): 471-81
- [40] Shimizu T, Nakano T, Takamizawa D, et al. Two LysM receptor molecules, CEBiP and OsCERK1, cooperatively regulate chitin elicitor signaling in rice. *Plant J*, 2010, 64(2): 204-14
- [41] Petutschnig EK, Jones AME, Serazetdinova L, et al. The Lysin Motif Receptor-like Kinase (LysM-RLK) CERK1 is a major chitin-binding protein in *Arabidopsis thaliana* and subject to chitin-induced phosphorylation. *J Biol Chem*, 2010, 285(37): 28902-11
- [42] Hamel L-P, Beaudoin N. Chitooligosaccharide sensing and downstream signaling: contrasted outcomes in pathogenic and beneficial plant-microbe interactions. *Planta*, 2010, 232(4): 787-806
- [43] Cabrera JC, Boland A, Messiaen J, et al. Egg box conformation of oligogalacturonides: The time-dependent stabilization of the elicitor-active conformation increases its biological activity. *Glycobiology*, 2008, 18(6): 473-82
- [44] Guo WH, Ye ZQ, Wang GL, et al. Measurement of oligo-chitosan-tobacco cell interaction by fluorometric method using europium complexes as fluorescence probes. *Talanta*, 2009, 78(3): 977-82
- [45] Garcia-Brugger A, Lamotte O, Vandelle E, et al. Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. *Mol Plant-Microbe Interact*, 2006, 19(7): 711-24
- [46] Zhao XM, She XP, Yu W, et al. Effects of oligochitosans on tobacco cells and role of endogenous nitric oxide burst in the resistance of tobacco to tobacco mosaic virus. *J Plant Pathol*, 2007, 89(1): 55-65
- [47] Feng B, Chen Y, Zhao C, et al. Isolation of a novel Ser/Thr protein kinase gene from oligochitosan-induced tobacco and its role in resistance against tobacco mosaic virus. *Plant Physio Biochem*, 2006, 44(10): 596-603
- [48] Yin H, Li S, Zhao X, et al. cDNA microarray analysis of gene expression in *Brassica napus* treated with oligochitosan elicitor. *Plant Physio Biochem*, 2006, 44(11-12): 910-6
- [49] Libault M, Wan JR, Czechowski T, et al. Identification of 118 *Arabidopsis* transcription factor and 30 ubiquitin-ligase genes responding to chitin, a plant-defense elicitor. *Mol Plant-Microbe Interact*, 2007, 20(8): 900-11
- [50] Shinya T, Galis I, Narisawa T, et al. Comprehensive analysis of glucan elicitor-regulated gene expression in tobacco BY-2 cells reveals a novel MYB transcription factor involved in the regulation of phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell Physiol*, 2007, 48(10): 1404-13
- [51] Chen F, Li Q, He ZH. Proteomic analysis of rice plasma membrane-associated proteins in response to chitooligosaccharide elicitors. *J Integr Plant Biol*, 2007, 49(6): 863-70
- [52] Ferri M, Tassoni A, Franceschetti M, et al. Chitosan treatment induces changes of protein expression profile and stilbene distribution in *Vitis vinifera* cell suspensions. *Proteomics*, 2009, 9(3): 610-24
- [53] Hadwiger LA, Beckman JM. Chitosan as a component of pea-fusarium-solani interactions. *Plant Physiol*, 1980, 66(2): 205-11
- [54] Orlita A, Sidwa-Gorycka M, Paszkiewicz M, et al. Application of chitin and chitosan as elicitors of coumarins and furoquinolone alkaloids in *Ruta graveolens* L. (common rue). *Biotechnol Appl Biochem*, 2008, 51: 91-6
- [55] Vander P, Varum KM, Domard A, et al. Comparison of the ability of partially N-acetylated chitosans and chitooligosaccharides to elicit resistance reactions in wheat leaves. *Plant Physiol*, 1998, 118(4): 1353-9
- [56] 王克夷. 糖生物学和糖组学. 生命的化学, 2009, 29(3): 299-305