

邹晓威,王 娜,刘 芬,等. 玉米抗病相关基因在玉米与玉米丝黑穗病菌、玉米黑粉病菌互作过程中的表达差异分析[J]. 江苏农业科学, 2014,42(11):150-152.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2014.11.051

玉米抗病相关基因在玉米与玉米丝黑穗病菌、玉米黑粉病菌互作过程中的表达差异分析

邹晓威^{1,2}, 王 娜^{1,2}, 刘 芬³, 夏 蕾^{1,2}, 王艳丽⁴, 洪泽源⁵, 徐冲力⁶, 郑 岩^{1,2}

(1. 吉林省农业科学院, 吉林长春 130033; 2. 农业部东北作物有害生物综合治理重点实验室, 吉林公主岭 136100;

3. 吉林大学生命科学学院, 吉林长春 130012; 4. 吉林省汪清县农业局农业技术推广中心, 吉林汪清 133200;

5. 长春市园林科学研究所, 吉林长春 130000; 6. 吉林省汪清县天桥岭镇政府, 吉林汪清 133400)

摘要:提取玉米丝黑穗病与黑粉病发病叶片的 RNA, 反转录获得 cDNA 后, 通过玉米抗病相关基因(登录号分别为: AI881638、AW424529、CF028241、CO526016、CK371597、BM379188、AI649523、CF349132、BM074921、BM349111) 的序列设计引物, 对玉米抗病相关基因进行 RT-PCR 扩增, 分析目标基因的表达差异。结果显示, 抗病基因病程相关蛋白(BM379188)、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(AW424529)、无毒性蛋白(AI881638)、富含亮氨酸重复区域蛋白激酶(CF028241)在 2 种病害发生过程中均呈现上调表达, 其他选取基因在侵染玉米叶片中均未检测到其表达, 所选取的抗病相关基因在对照玉米叶片中均未检测到其表达。

关键词:玉米; 玉米丝黑穗病菌; 玉米黑粉病菌; 抗病基因; 互作机制; 基因表达

中图分类号: Q786; S435.131.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)11-0150-03

玉米丝黑穗病(*Sphacelotheca reiliana*)和玉米黑粉病(*Ustilago maydis*)是 2 种经常发生的玉米真菌性病害, 传统防治方法主要以种子包衣为主, 但该方法会造成农民生产成本提高, 并对环境产生不良影响, 选育和推广抗病品种是控制玉米丝黑穗病与玉米黑粉病发生的有效措施^[1], 因此有必要针对病原菌的侵染扩散机理对玉米抗病基因进行深入的研究。玉米丝黑穗病及玉米黑粉病的病原菌都属于黑粉菌科, 其亲缘关系较近, 在同一寄主上前者是系统性病害, 后者是局部性病害。寄主植物在与病原菌互作的过程中, 诱导表达的基因往往抑制或促进病原菌繁殖, 这些基因的表达产物有直接攻击病原菌的病程相关蛋白, 如病程相关蛋白、几丁质酶^[2-4]; 有参与调控的转录因子, 如 WRKY 蛋白^[5-6]; 同时存在信号级联放大的蛋白激酶, 如丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶等^[7-9]。本研究根据前人研究结果^[10], 选取部分玉米抗病相关基因, 分析其在玉米丝黑穗病菌及玉米黑粉病菌侵染过程中的表达变化, 为进一步明确寄主植物玉米与 2 种病原菌互作过程中的抑制或促进病菌繁殖的机制及抗病育种提供新思路。

1 材料与方法

1.1 试验材料

收稿日期: 2014-03-25

基金项目: 吉林省科技发展规划(编号: 20090710); 吉林省科研育种专项资金(编号: 0811104)。

作者简介: 邹晓威(1983—), 女, 吉林长春人, 硕士, 助理研究员, 主要从事玉米与真菌互作相关研究。E-mail: zouxiaowei2008@126.com。

通信作者: 郑 岩, 博士, 研究员, 主要从事玉米与真菌互作相关研究。E-mail: yanzheng@yaho.com。

本试验所用的玉米丝黑穗病菌 SR1、SR2 菌株及玉米黑粉病菌 SG200 菌株均为玉米与真菌互作实验室保存菌种。供试玉米品种为吉单 209。

1.2 试验方法

1.2.1 接种菌液的制备 从冻存管内取 SR1、SR2 菌株菌液至 3mL 的酵母浸出粉胨葡萄糖培养基(yeast extract peptone dextrose medium, YPD), 以及 SG200 菌株菌液至 3mL 的 YEPS 培养基内, 28℃振荡培养进行菌株活化, 再分别从活化的菌液内取 500 μL 菌液至 100 mL YPD、YEPS 培养基内, 28℃振荡培养 12~16 h, 至菌液的 $D_{600\text{nm}}$ 值达到 2.0。菌液离心后收集菌体, 加适量灭菌纯水溶解, SR1、SR2 菌液进行混合后与 SG200 菌株菌液置于常温下, 用于下一步的接种试验。

1.2.2 玉米植株的准备 挑选玉米品种吉单 209 的饱满种子, 用 5% 次氯酸钠溶液表面消毒 3~5 min 后, 用无菌水冲洗 3 次, 28℃下放置于无菌水中浸泡 5 h; 滤纸经过无菌纯水浸泡后平铺于无菌培养皿底部, 将浸泡后的玉米种子转移到培养皿中的滤纸上, 然后将培养皿放入光照培养箱内, 在 28℃条件下进行暗培养直至种子出芽; 将出芽的种子播种于 15 cm 塑料花盆中, 每盆 5 粒。播种后的花盆放入光照培养箱内, 在 28℃条件下进行培养。

1.2.3 玉米植株的病菌侵染 种子出土的 2 张叶片完全展开时, 使用“1.2.1”节方法制备的玉米丝黑穗病菌菌液对玉米植株进行注射接种; 待种子出土的 3 张叶完全展开, 进行玉米黑粉病菌注射接种; 预留未接种玉米植株作为对照。注射接种玉米丝黑穗病菌 2~3 d 后, 玉米叶片会出现明显的褪绿病斑, 取发病叶片于液氮中进行速冻后, 置于 -80℃冰箱中备用; 注射接种玉米黑粉病菌 3~5 d 后, 玉米叶片出现明显肿瘤, 切取肿瘤组织于液氮中进行速冻后, 置于 -80℃冰箱

中备用。同时割取对照植株叶片于液氮中进行速冻,置于 -80°C 冰箱内备用。

1.2.4 玉米发病叶片 RNA 提取 分别取保存于 -80°C 冰箱内的发病叶片提取叶片组织中的 RNA,操作方法如下:(1)收集 1 g 发病玉米叶片在液氮中冷冻(冷冻后可放入 -80°C 冰箱长期保存);(2)将叶片放入研钵中,加液氮后进行快速研磨 2~3 次,至叶片组织成粉末状;(3)收集粉末,放入 30 mL 离心管中,加 10 mL Trizol 后涡旋混匀;(4)室温下放置 15 min,再加入 2 mL 氯仿,涡旋 10 s 混匀;(5)室温下放置 3 min 后,于 4°C 、3 500 r/min 离心 15 min;(6)收集上清液转入到新离心管中,加入等体积的酚氯仿(苯酚和氯仿体积比为 1:1,pH 值为 8.0),涡旋 10 s 混匀后,于 4°C 、3 500 r/min 离心 10 min;(7)收集上清液转入新离心管中,加入 5 mL 的异丙醇,上下颠倒混匀,冰上静置 10 min 后,于 4°C 、9 000 r/min 离心 20 min;(8)去除上清液后,加 80 μL RNA free H_2O ,放入 -80°C 冰箱保存待用。

1.2.5 RNA 反转录成 cDNA 首先用 DNase I、RNase-free 酶消解 RNA 中的 DNA,制备不含 DNA 的 RNA。操作方法见使用说明书;然后选用全式金反转录试剂盒进行 RNA 反转录,形成 cDNA;运用 Nanodrop 2000 微量紫外分光光度计测定 cDNA 的浓度,将所有 cDNA 调至相同浓度。

1.2.6 RT-PCR 选取的抗病相关基因的登录号分别为 AI881638、AW424529、CF028241、CO526016、CK371597、BM379188、AI649523、CF349132、BM074921、BM349111、*Actin* (gi121211756)(表 1),以基因登录号代表相关基因。根据抗病相关基因片段设计上下游引物(表 2)。

表 1 玉米抗病相关基因信息

基因登录号	编码蛋白	长度 (bp)
AI881638	avirulence-responsive protein	603
AW424529	丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶	580
CF028241	富含亮氨酸重复区域蛋白激酶	562
CO526016	multi antimicrobial extrusion protein	598
CK371597	蛋白激酶家族	621
BM379188	pathogenesis-related protein1 (PR1)	611
AI649523	pathogenesis-related protein2 (PR2)	620
CF349132	几丁质酶	507
BM074921	MAP 激酶	446
BM349111	WRKY DNA-绑定转录子	659
<i>Actin</i> (gi121211756)	玉米肌动蛋白基因,partial cds	453

分别以玉米丝黑穗病发病植株叶片组织中的 cDNA、玉米黑粉病发病植株叶片肿瘤中的 cDNA、未发病对照植株叶片组织中的 cDNA 为模板,对目标基因进行 RT-PCR 扩增。采用梯度 PCR 设置不同的退火温度,RT-PCR 扩增条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,54 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。内参对照为 *Actin* 基因。用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测抗病基因的信号强度。

2 结果与分析

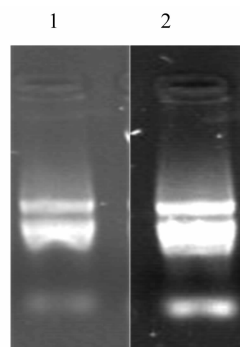
2.1 RNA 检测

样品总 RNA 检测结果表明,感染玉米丝黑穗病菌发病叶

表 2 玉米抗病相关基因的引物信息

引物名称	引物序列
AI881638 上游	5'-AGCTGCTCCTGCTTCCGATCCGAAC-3'
AI881638 下游	5'-TACTCTGGCGCATCATTTGAGC-3'
AW424529 上游	5'-GGAGGTGCAATATTTCCACGGAAGG-3'
AW424529 下游	5'-GGAGTGGTCTTGCTTAAGCTGCTC-3'
CF028241 上游	5'-CAACCTGACAGGGCCTATACCACCATC-3'
CF028241 下游	5'-TCAGGCATATGGCGCATGACGCATGTG-3'
CO526016 上游	5'-GAAATCGACCCGGTTTCGCTC-3'
CO526016 下游	5'-GCATCTGGATCGGCATGCTG-3'
CK371597 上游	5'-TTGTGTTGGGCCTGCTGTAGCTG-3'
CK371597 下游	5'-GGTACTCCACGATCGTACGTTTCC-3'
BM379188 上游	5'-CTCCAAACCCACATTTGAT-3'
BM379188 下游	5'-GGAACGGTCTGCTTGTAC-3'
AI649523 上游	5'-TGAATCACGTCGATAGTAATG-3'
AI649523 下游	5'-CAGGTGGCGCTCGGGTAC-3'
CF349132 上游	5'-GAAGGGGTACTACGGCCGC-3'
CF349132 下游	5'-CTTATATAGTCAGTATCAG-3'
BM074921 上游	5'-CCATATTTGAGTCAATAC-3'
BM074921 下游	5'-GTCATCAGCCCAAGCCTTA-3'
BM349111 上游	5'-TAATGAGGGGTGGTATCAC-3'
BM349111 下游	5'-GCCTTCCAGACGCGCAGCCA-3'
<i>Actin</i> (gi121211756) 上游	5'-GTGACCTTACCGACAACC-3'
<i>Actin</i> (gi121211756) 下游	5'-CCAATACCAGGGAACATAG-3'

片的 RNA 浓度为 10 525.3 ng/ μL ,感染玉米黑粉病菌发病叶片的 RNA 浓度为 9 623.4 ng/ μL ,纯度均较高。利用电泳检测 RNA 的完整性和质量,结果显示没有明显的拖尾现象(图 1),说明提取的 RNA 质量较好,没有发生降解,可以用于后续试验。



1—感染玉米丝黑穗病菌发病叶片中所提取的 RNA
2—感染玉米黑粉病菌发病叶片中所提取的 RNA

图 1 玉米发病叶片的 RNA 电泳检测

2.2 RT-PCR 扩增检测

RT-PCR 扩增结果显示,内参在对照植株叶片及发病植株叶片中均能正常表达,结果可信。所选取的抗病相关基因在对照植株叶片中均未见表达,玉米丝黑穗病菌及玉米黑粉病菌发病叶片中抗病相关基因 AI881638、AW424529、CF028241、BM379188 均呈上调表达。而选取的其他抗病相关基因 CO526016、CK371597、AI649523、CF349132、BM074921、BM349111 在感染玉米丝黑穗病菌及玉米黑粉病菌发病叶片中均未见表达(图 2)。

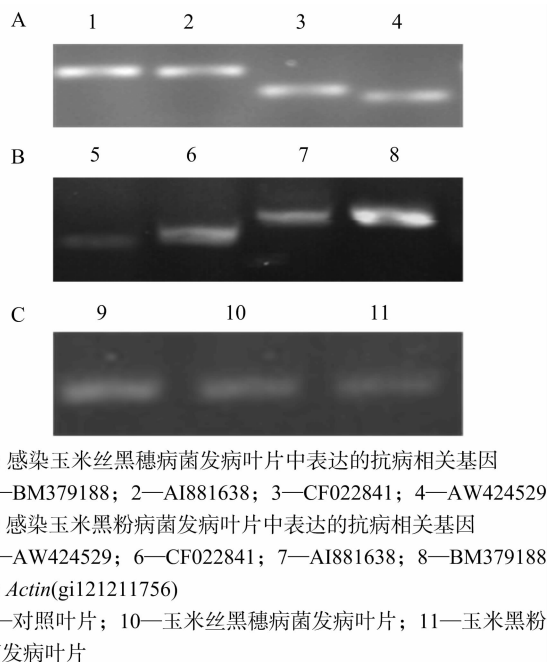


图2 玉米发病叶片中抗病基因的表达情况

3 结论与讨论

寄主植物与病原菌互作过程往往诱导许多基因的表达,其中包括转录调控因子、蛋白激酶及病程相关蛋白等^[11],这些基因的表达往往抑制或促进病原菌的繁殖。本研究结果显示,玉米感病品种吉单 209 在受到玉米丝黑穗病菌及玉米黑粉病菌侵染后,病程相关蛋白 BM379188 (PR1)、AI881638 (avirulence - responsive protein) 均上调表达,其中病程相关蛋白是植物防卫反应中的重要因子,在植物中广泛存在,PR1 与无毒性病菌诱导蛋白在植物系统获得抗性中起到重要的作用,它们是植物受病原侵染或其他因子胁迫产生的诱导性蛋白,在抑制病原菌的繁殖过程中发挥作用^[12-14]。基因 CF022841、AW424529 均上调表达,蛋白激酶通过氧化磷酸开启信号的级联放大作用,因此蛋白激酶结构的蛋白在 2 种病菌互作的过程中起到重要的作用;而丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶结构在许多已经克隆的抗病蛋白中存在,可能在抑制 2 种病菌繁殖的过程中发挥作用^[7-9]。本试验中选取的几丁质酶基因在接种与未接种玉米丝黑穗病菌及黑粉病菌的叶片中均未表达,说明该几丁质酶并未参与抑制 2 种病菌在玉米体内的繁殖。研究中未检测到 WRKY 蛋白的表达,说明 WRKY 蛋白并未参与促进 2 种病菌在玉米体内的繁殖。试验结果显示玉米与玉米丝黑穗菌及玉米黑粉菌的互作机制有相似之处,诱导表达的基因抑制或促进菌丝生长的机制相近。

参考文献:

- [1] 邢跃先,吴凤新,李姝睿,等. 抗玉米丝黑穗病分子标记辅助育种研究[J]. 玉米科学,2012,20(6):9-13.
- [2] Agrawal G K, Jwa N S, Rakwal R. A novel rice (*Oryza sativa* L.) acidic *PR1* gene highly responsive to cut, phytohormones, and protein phosphatase inhibitors [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000, 274 (1): 157-165.
- [3] 许明辉,唐祚舜,谭亚玲,等. 几丁质酶-葡聚糖酶双价基因导入滇型杂交稻恢复系提高稻瘟病抗性的研究[J]. 遗传学报,2003,30(4):330-334.
- [4] Sharaf A N, Abdelkader H S, Abd EI -Hadi A A, et al. Over expression of rice chitinase gene: evaluation of chitinase ability as a bio - antifungal agent [J]. Arab Journal of Biotechnology, 2009, 12 (1): 85-98.
- [5] Wei T, Ou B, Li J B, et al. Transcriptional profiling of rice early response to *Magnaporthe oryzae* identified OsWRKYs as important regulators in rice blast resistance [J]. PLoS One, 2013, 8 (3): e59720.
- [6] Chujo T, Miyamoto K, Ogawa S, et al. Overexpression of phosphomimic mutated OsWRKY53 leads to enhanced blast resistance rice [J]. PLoS One, 2014, 9 (6): e98737.
- [7] Song W Y, Wang G L, Chen L L, et al. A receptor kinase - like protein encoded by the rice disease resistance gene, *Xa21* [J]. Science, 1995, 270 (5243): 1804-1806.
- [8] Feuillet C, Schachermayr G, Keller B. Molecular cloning of a new receptor - like kinase gene encoded at the Lr10 disease resistance locus of wheat [J]. The Plant Journal, 1997, 11 (1): 45-52.
- [9] Martin G B, Brommonschenkel S H, Chunwongse J, et al. Map - based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato [J]. Science, 1993, 262 (5138): 1432-1436.
- [10] 袁广胜. 玉米抗穗粒腐病差异表达基因的分离及其功能分析 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2011: 1-147.
- [11] 姜兆远, 任金平, 刘晓梅, 等. 水稻与稻瘟病菌不同小种互作的基因差异表达谱分析 [J]. 中国农业科学, 2013, 46 (24): 5123-5131.
- [12] Naz R, Bano A, Wilson N L, et al. Pathogenesis - related protein expression in the apoplast of wheat leaves protected against leaf rust following application of plant extracts [J]. Phytopathology, 2014, 104 (9): 933-944.
- [13] 周益军, 李 硕, 程兆榜, 等. 中国水稻条纹叶枯病研究进展 [J]. 江苏农业学报, 2012, 28 (5): 1007-1015.
- [14] Hwang I S, Choi D S, Kim N H, et al. Pathogenesis - related protein 4b interacts with leucine - rich repeat protein 1 to suppress PR4b - triggered cell death and defense response in pepper [J]. The Plant Journal, 2014, 77 (4): 521-533.
- [15] Gabriëls S H, Vossen J H, Ekengren S K, et al. An NB - LRR protein required for HR signalling mediated by both extra - and intracellular resistance proteins [J]. The Plant Journal, 2007, 50 (1): 14-28.