

花生黄曲霉抗性与类受体蛋白激酶的相关性分析

严海燕¹, 宗成志¹, 景聪慧¹, 单世华²

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

摘要: LRR 类受体激酶 *RHG* 基因在花生黄曲霉敏感品种发育种子的种皮中上调表达。基于这类受体激酶多由于序列的变异导致抗性的变异, 笔者将数据库中花生抗黄曲霉和敏感品种相似基因编码的蛋白进行序列比较分析, 发现抗性品种与敏感品种的类似蛋白序列有很大差别。用荧光定量 PCR 方法对抗性品种 KB153 与敏感品种 JH1012 发育中不同时期的果实和部位进行差异表达分析, 结果表明, 果实发育的早期类受体蛋白激酶的大量表达可能是导致黄曲霉抗性的重要原因之一。

关键词: 黄曲霉; 花生; 类受体蛋白激酶; 抗性基因

中国分类号: S565.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2011)04-0198-04

Analysis of Relativity of Receptor-like Kinase to *Aspergillus flavus* Resistance in Peanut

YAN Hai-yan¹, ZONG Cheng-zhi¹, JING Cong-hui¹, SHAN Shi-hua²

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

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

Abstract: LRR type receptor like kinase (RLK) RHG is up-regulated in developing seed coat of sensitive strain relative to resistant strain to *Aspergillus flavus*. Based on the knowledge that variation in sequences of LRR type RLK cause their function variety, we compared similar protein sequences encoded by ESTs from resistance and sensitive strains of *Arachis hypogaea* in public database, found that there were significant differences between protein sequences resistance and sensitive strains of *Arachis hypogaea*. We further conducted expression differential analysis on different tissues in different developing stages of both peanut *Aspergillus flavus* resistance and sensitive strains. The results indicate that up-regulation of expression of RLK is a possible reason of *Aspergillus flavus* resistance.

Key words: *Aspergillus flavus*; *Arachis hypogaea*; Receptor-like protein kinase; Resistance gene

RHG4 是一个大豆基因中大豆线虫 *Heterodera glycines* 的抗性位点^[1], 提供 0 类 Hg 抗性。*RHG4* 编码丝/苏氨酸类受体蛋白激酶, 具有 LRR 区域, 属于植物感受信号传导的受体。在植物对各种逆境和病虫害的感受受体中有许多结构相似的 LRR 类蛋白激酶, 它们在部分或某些特定区域的差异导致植物反应和抗性的差异。因此对于特定家族的受体蛋白, 不同的结构可能导致不同抗性品种中对不同病原的抗性。

花生黄曲霉毒素是黄曲霉菌属黄曲霉菌、寄生曲霉菌产生的代谢物, 剧毒, 同时还有致癌、致畸、致突

变的作用^[2]。所以对黄曲霉抗性品种的培育以及研究显得愈为重要。在对抗黄曲霉品种 KB153 和敏感品种 JH1012 发育中种皮差异表达的基因分析中, 发现一个与大豆 AY163905 序列相似的基因在敏感品种中上调表达^[3]。那么是否在抗性品种中有相似的基因, 其表达情况如何? 笔者对 Genbank 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 发育中种子的 cDNA 文库进行搜索比较, 并对抗黄曲霉品种 KB153 和敏感品种 JH1012 发育中果实的不同时期和部位中的表达进行了定量 PCR 分析, 比较类受体蛋白激酶在两类品种中的异同。

收稿日期: 2011-03-15

基金项目: 与山东花生所的横向合作项目 (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, 主要从事植物发育分子生物学研究工作。

1 材料和方法

1.1 材料

EST 数据来自 Genbank 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。

花生材料取自抗黄曲霉品种 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^[4]。反转录如下: dNTPs Mix (各 10 mmol/μL) 1 μL, 5 × RT 缓冲液 4 μL, P3 5'-CGCGG ATCCT TAGTA CAAGA AAGCT GGGTT TTTT TTTT TTTT TTTVN-3' (10 μmol/L) 5 μL, Primescriptase 0.25 μL, RNA 9.75 μL, 每个体系中, 总 RNA 不超过 1 μg, 本试验所有反转录均使用 0.8 μg 起始模板量。

PCR 引物以与大豆 *AY163905* 序列相似的基因 *GO338510* 为模板设计引物, F 引物: 5'-CATTCTG-GCACCCTCGTT-3', R 5'-AATACTACTCTTGCT-GTC-3'。Actin 引物根据 *GO340080* 设计: F 5'-GAAGCACCCCTCAACCCA-3', R 5'-ACACCGTCTC-CAGAGTCCAA-3'。

定量 PCR 扩增体系为 10 μL, 其中包含 SYBR[®] Green PCR MasterMix 5.0 μL, 引物 R (10 μmol/L)

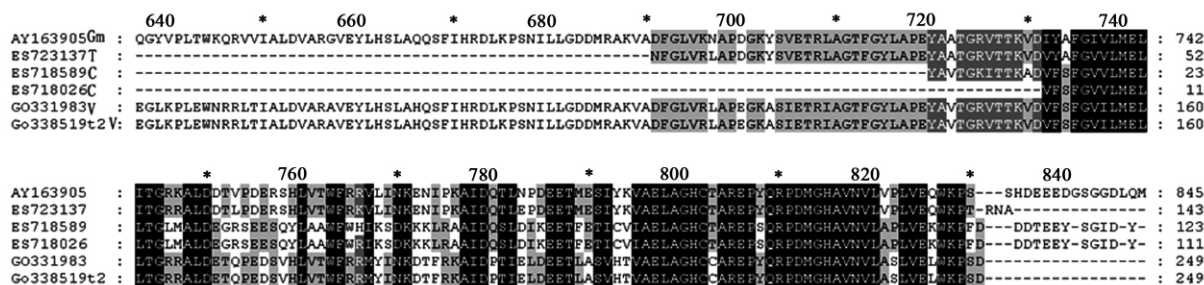
0.2 μL, 引物 F (10 μmol/L) 0.2 μL, 模板 (cDNA 第一链反应产物稀释 10 倍) 0.2 μL, 无菌蒸馏水, 补至 10 μL。

定量 PCR 扩增程序为 95℃ 预变性 3 min; 95℃ 25 s; actin 引物 54℃, RLK 引物 50℃ 30 s; 72℃ 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 不同花生品种相似类受体激酶蛋白序列分析

从图 1 可以看出, 在已知序列中, 有两段比较保守, 一段是 721 ~ 750, 另一段是 795 ~ 829。但在不同品种间也有差异。在保守区域 721 ~ 750 中, 敏感品种和抗性品种之间有三处不同, 即敏感品种的 A₇₂₂ 与 V₇₂₂、V₇₃₀ 与 A₇₃₀、A₇₄₆、A₇₄₇ 位的 RR 与 LM (图 1)。在保守区域 795 ~ 829 中, 敏感品种和抗性品种之间有两处不同, 它们是 Y₈₀₈ 与 S₈₀₈ 和 V₈₂₂ 与 A₈₂₂。区域 750 ~ 794 是变化较大的区域。抗性品种与敏感品种之间有很大的差异。值得注意的是大豆的序列与敏感品种序列高度相似, 而与抗性品种不同。在前期基因芯片差异表达分析中, 与大豆序列的杂交信号在敏感品种中高于抗性品种。这和序列分析结果一致。VBL6 是另外一个抗叶斑病的品种, 其黄曲霉抗性未知。来自 VBL6 类受体激酶蛋白序列多数情况下与敏感品种和大豆更相似。这些序列间的不同可能与不同品种间不同的抗性有关。



C. C20R; T. TFR; V. VB6; Gm. G max.

图 1 不同花生品种相似类受体激酶蛋白序列分析

Fig. 1 Protein sequences analysis of RGH-like receptors between different peanut strains

2.2 抗性与敏感品种间发育中果实不同部位与时期类受体激酶转录表达分析

选择 *GO338519* 设计引物, 引物正向和反向序列在蛋白质编码区域, 但已知 EST 只有 *ES718589*

长度足够看到反向序列, 且与 *GO338519* 反向引物完全相同。而几个品种中 RHG 序列中, 两个 C20R5 的序列与 *GO338519* 更相似 (图 2)。PCR 检测各样品峰值单一, 说明产物单纯。

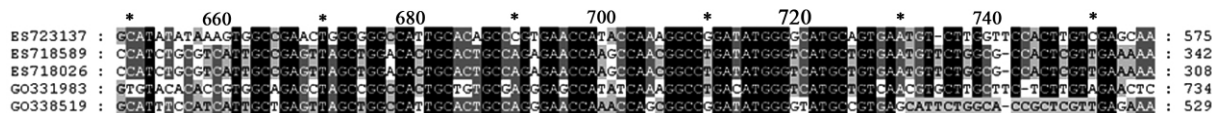


图 2 定量 PCR 引物与不同花生品种类受体蛋白激酶 EST 序列的匹配分析

Fig. 2 Comparison of QPCR primer with ESTs of RHGs from different peanut strains

对抗性品种 KB153 和敏感品种 JH012 发育中果实的 7 个部位和叶子中 *GO338519* 基因进行表达分析, 结果表明, 该基因在抗性和敏感品种不同部位和时期表达变化趋势是一致的(图 3)。在发育中种子的种皮和子叶中表达相对于果荚、小果和叶子下降。可以看出一个共同特征, 在 *GO338519* 类似基因相对于肌动蛋白上调表达的果荚、小果和叶子都直接与外界环境接触, 而种皮和子叶都是包裹在果实内部, 不直接与环境接触的部位, 因此 *GO338519* 类似基因可能与对环境逆境的直接反应或感应有关。

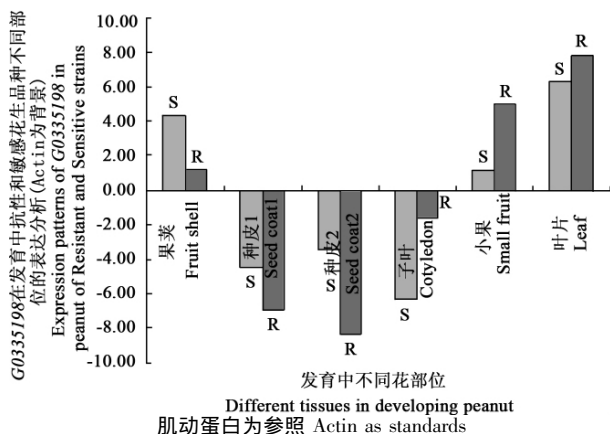


图 3 类受体蛋白激酶在黄曲霉抗性 KB153 和敏感品种 JH012 中的表达

Fig. 3 Expression of RHGs in *Aspergillus flavus* resistant KB153 and sensitive JH012 strains

将 *GO338519* 在抗性品种 KB153 和敏感品种 JH012 中的表达做相对差异分析(图 4), 结果表明在果荚、种皮 1 和种皮 2, 抗性品种的 *GO338519* 类似基因表达下降, 而在子叶、小果和叶片, *GO338519* 类似基因表达上升, 而子叶和叶片很难与黄曲霉抗性直接相关。小果阶段, 是果实最幼嫩的阶段, 抵抗力最差, 抗性品种在这个阶段上调 *GO338519* 类似基因的表达, 可能与抗性的提高有关。此外, 一般抗性品种的果荚的结构和化学组成上更严密, 抵抗力更强^[5], 也许与早期的更多抗性信号传导有关。

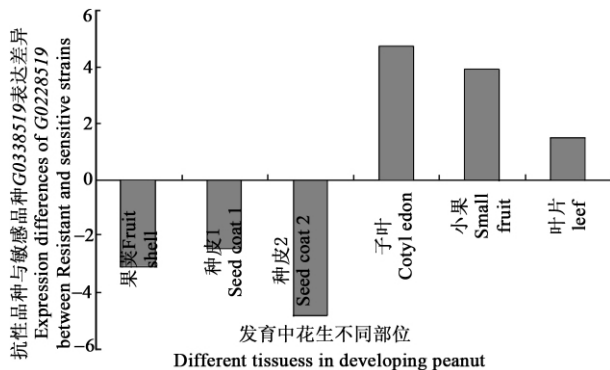


图 4 黄曲霉抗性品种 KB153 与敏感品种 JH012 中的表达差异分析

Fig. 4 Expression differences between *Aspergillus flavus* resistant KB153 and sensitive JH012 strains

3 讨论

花生果实和种子的发育是在土壤中进行, 果针在进入土壤后才开始发育。早期开始膨胀后的花生果实一方面吸收水分和养分进行生长, 另一方面由于在土壤中膨胀扩张, 与土壤这种外界环境中的各种化学物理生物因素接触, 感知并传递各种信号到果实内部, 引起相应的反映。不同的品种对于环境中逆境的信号识别、传导和反应不同, 引起不同的机体生理生化 and 结构形态的反应和适应。抗黄曲霉品种多具有产量较低、荚果较小的特点^[6, 7], 说明抗黄曲霉品种以降低产量的代价获得抵抗黄曲霉的能力。花生果实的大小通常受到果壳生长的制约, 如果果壳过早加厚、机械硬度增强, 将会限制果实的生长, 而这种加厚和机械硬度的增强往往是黄曲霉抗性需要的。所以黄曲霉抗性品种与易感品种的差异往往反映在早期代谢和形态建成活动的不同。这种不同从分子水平表现在多个层次和方面, 从信号传导、网络调控到生理代谢和形态建成活动的不同^[8-10]。类受体蛋白激酶位于这种网络调控、生理生化和形态建成的前沿, 是直接感受内外环境的信号感知者, 所以在抗性品种果实发育过程中其上调表达发生在最需要的时期和部位——面向环境的小果时期, 这种表达类型与黄曲霉抗性品种果实小, 产量低的性状相一致。

此外不同品种中类受体蛋白激酶一级结构的差异可能也是造成信号感知和功能的不同。与花生 *GO338519* 相似的基因来自大豆线虫抗性位点 RHG4, 该位点的抗性不如另外一个抗性位点 RHG1 作用广泛, 该位点引起大豆根的蛋白组和初生代谢的变化^[1]。该位点包括了几个基因, 其中有改变根发育的受体激酶 (RLK)^[11, 12]。笔者的一些研究结果表现了与 *GO338519* 相似的现象。而抗黄曲霉品种花生果实发育早期 LRR 类受体蛋白激酶的上调表达是否与抗黄曲霉果实的小果性状有关, 是否由于诱导了一系列代谢途径和形态建成调控网络的变化, 有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Afzal A J, Natarajan A, Saini N, et al. The nematode resistance allele at the rhg1 locus alters the proteome and primary metabolism of soybean roots [J]. Plant Physiol, 2009, 151: 1264 - 1280.
- [2] 李晓岚, 李炎, 侯天亮. 辽宁花生黄曲霉毒素污染水平及分布 [J]. 检验检疫学刊, 2009, 19(4): 55 - 57.
- [3] 单世华, 严海燕, 李春娟, 等. 花生种皮抗黄曲霉差异

- 基因表达初步分析[J]. 花生学报 2005 ,34 (4) :21 - 24.
- [4] 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.
- [5] 梁炫强,潘瑞织,宾金华. 花生抗黄曲霉侵染机理的研究进展[J]. 中国油料作物学报 2000 ,22 (3) :77 - 80.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 周桂元,梁炫强. 花生种子苯丙氨酸解氨酶活性与抗黄曲霉侵染的关系[J]. 花生学报 2002 ,31 (1) :14 - 17.
- [9] 梁炫强,周桂元,潘瑞织,等. 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.
- [10] 曲明静,黄忠林,鞠倩,等. 花生网斑病菌和黄曲霉菌对花生几丁质酶诱导的研究[J]. 花生学报 2008 ,37 (1) :1 - 6.
- [11] Afzal A J, Lightfoot D A. Soybean disease resistance protein RHG1-LRR domain expressed, purified and re-folded from Escherichia coli inclusion bodies: preparation for a functional analysis[J]. Protein Expr Purif, 2007 53: 346 - 355.
- [12] Afzal A J, Saini N, Srour A, *et al.* The multigeneic rhg1 locus: a model for the effects on root development, nematode resistance and recombination suppression[J]. Nature Precedings, 2008 ,<http://hdl.handle.net/10101/npre.2008.2726.1>.