

cDNA-SRAP 标记在玉米氮素营养诊断上的应用初探

高 伟 苗利娟 黄冰艳 董保红 张新友

(河南省农业科学院 经济作物研究所 河南省油料作物遗传改良重点实验室 河南 郑州 450002)

摘要: 为探讨对玉米氮素营养状况进行分子诊断的可行性,以大面积推广的玉米(*Zea mays*)杂交种郑单958为材料,用cDNA-SRAP标记的方法研究了玉米幼苗在不同氮素水平下基因表达的差异,对其中的一些差异表达片段进行了克隆和测序,并通过Real-time PCR鉴定了克隆的差异表达片段的真实性。结果表明:不同的SRAP标记引物对扩增效率不同,玉米基因表达受到氮素水平的严格调控,cDNA-SRAP标记的方法与Real-time PCR检测到的基因表达情况基本一致,基因差异表达片段N1、N9、N20、N30可作为玉米缺氮的分子诊断的候选靶标。因此cDNA-SRAP标记可以用来研究植物营养状况的分子诊断。

关键词: 玉米;氮素营养;cDNA-SRAP;分子诊断

中图分类号:S143.1 文献标识码:A 文章编号:1000-7091(2011)05-0214-04

Preliminary Application of cDNA-SRAP Marker in Diagnosis of Maize Nitrogen Nutritional Status

GAO Wei, MIAO Li-juan, HUANG Bing-yan, DONG Bao-hong, ZHANG Xin-you

(Industrial Crops Research Institute, Henan Academy of Agricultural Sciences, Henan Provincial Key Laboratory for Oil Crops Improvement, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: To investigate the feasibility of diagnosis for nitrogen nutritional status of maize in molecular level, the elite hybrid variety Zhengdan958(*Zea mays*) was used to study the transcriptional difference of maize seedlings under different nitrogen levels by cDNA-SRAP markers. Several differentially expressed fragments were cloned and sequenced, and identified using Real-time PCR. The PCR amplification efficiency were various with different primer pairs. The nitrogen nutrition levels affected gene expression in maize. The results of cDNA-SRAP were basically consistent with those of Real-time PCR. Some fragments(such as N1, N9, N20, N30) could be taken as the candidate targets of molecular diagnosis of nitrogen nutrition in maize. cDNA-SRAP markers is an efficient way to develop molecular diagnosis of plant nutrition.

Key words: Maize(*Zea mays*); Nitrogen nutrition; cDNA-SRAP; Molecular diagnosis

氮是蛋白质、核酸、磷脂及其他植物生长发育所必需的有机氮化合物的构成成分,而这些物质是植物细胞赖以生存的结构或功能组分,因此氮是植物生长的必需元素。玉米是我国和世界上重要的谷类作物,总产量超过水稻和小麦。氮素水平对玉米植株形态、干物质积累、非结构碳水化合物、叶片光合特性、籽粒品质和产量均有调控作用,是制约产量的重要因子^[1]。施用氮肥是玉米增产的重要措施。然而,随着氮肥施用量的不断增加,其利用效率逐渐

降低。同时,氮肥的过量施用,在一定程度上带来了地上水源污染和生态破坏等诸多问题^[2]。因此建立一套科学有效的氮肥施用指导方法对提高农作物生产综合效益至关重要。关于氮肥适宜施用量的判断方法已进行了长期的研究,在研究方法上主要是通过外形诊断、土壤分析、植株分析或其他生理生化指标的测定来确定适宜施氮量^[3],存在准确性低、时效性差等缺点。郭建华等^[4]以手持式主动遥感光谱仪 Greenseeker 和叶绿素仪 SPAD 对玉米不同氮素水平下各个生育期的 NDVI 值及叶片 SPAD 值

收稿日期:2011-08-12

基金项目:国家科技支撑计划重点项目(2008BAD4B07-6)

作者简介:高 伟(1978-),男,河南项城人,助理研究员,博士,主要从事作物分子生物学研究。

通讯作者:张新友(1963-),男,河南太康人,研究员,主要从事作物遗传育种研究。

进行研究,结果表明在一定的范围内 NDVI 值随着氮肥用量的增加而增加,NDVI 与氮肥施用量符合线性加平台的关系,玉米不同生育期间 NDVI 值变化明显;SPAD 值与叶绿素含量呈正相关关系。硝酸盐是调节植物硝酸盐吸收的最初信号,光、细胞分裂素、CO₂ 水平、生理节奏、碳氮代谢物等也都调节植物硝酸盐的吸收。诱导基因表达是植物对硝酸盐的普遍反应。已经有报道的这类受诱导基因包括硝酸盐转运体、硝酸还原酶、亚硝酸还原酶、谷氨酰胺合成酶,以及依赖铁氧还蛋白的谷氨酸合成酶等^[5]。

SRAP(Sequence-related amplified polymorphism, 序列相关扩增多态性)是一种新型的基于 PCR 的标记系统。SRAP 标记所用的模板可以是 DNA^[6],也可以是 cDNA^[7]。文献中报道多用 cDNA-AFLP 进行基因表达差异的筛选研究,利用 cDNA-SRAP 分析报道较少,SRAP 结合了 AFLP 和 RAPD 的优点,具有简便、稳定、产率高、便于克隆目标片段的特点,是进行基因表达差异研究的有效工具^[8]。

分子水平的诊断在医学和检疫方面的应用已成为热点,在某些植物病害研究中也显示出准确、快捷的特点,但在植物营养诊断方面尚未见报道。本研究应用 cDNA-SRAP 的方法分析了不同氮水平下的玉米幼苗转录本的表达差异,克隆了一些差异表达的片段,并进行荧光定量 PCR 鉴定了这些差异表达片段的真实性。初步为玉米氮素营养的分子诊断找到了一些候选靶标,为利用分子诊断指导玉米施肥奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

以我国推广面积最大的高产稳产玉米杂交种郑单 958 为研究材料。

1.2 试验方法

试验采用水培的方法进行。培养室温度为 25℃,昼夜光照时间为 12 h/12 h。

1.2.1 水培处理 先用 75% 乙醇和 0.5% 次氯酸钠溶液分别浸泡玉米种子 2 min 和 10 min,再用灭菌蒸馏水冲洗 5 遍,然后播种到硫酸钙饱和的石英砂中培养。幼苗二叶一心时选择生长一致的健壮苗,剥去胚乳后,在完全营养液中预培养 3 d,再转入缺氮营养液中处理 3 d 后取材。营养液组成为 (mmol/L): K₂SO₄ 0.75, KH₂PO₄ 0.25, MgSO₄ · 7H₂O 0.65, EDTA-NaFe 0.1, H₃BO₃ 1.0 × 10⁻², MnSO₄ · H₂O 1.0 × 10⁻³, ZnSO₄ · 7H₂O 1.0 × 10⁻³,

CuSO₄ · 5H₂O 1.0 × 10⁻⁴, Na₆Mo₇O₂₄ · 4H₂O 5.0 × 10⁻⁶, 氮以 Ca(NO₃)₂ · 4H₂O 供给。试验设定 2 个氮浓度, NO₃⁻-N 2 mmol/L (对照) 和 NO₃⁻-N 0.2 mmol/L (胁迫质量浓度)。参考孙健等^[9]的方法进行。

1.2.2 SRAP 分析 将水培的玉米幼苗的根和叶分别提取 RNA,并反转录成 cDNA 第 1 链。以合成的 cDNA 第 1 链为模板,用 SRAP 引物进行 PCR 扩增。PCR 程序为: 94℃ 5 min; 94℃ 1 min, 35℃ 1 min, 72℃ 1 min, 5 个循环; 94℃ 1 min, 50℃ 1 min, 72℃ 1 min, 30 个循环; 72℃ 5 min。PCR 体系为: 10 × PCR Buffer 2 μL, dNTP 1 μL, Sense primer 1 μL, Antisense primer 1 μL, cDNA 模板 1 μL, Taq 酶 0.5 μL, ddH₂O 13.5 μL, 总体积为 20 μL。PCR 产物通过聚丙烯酰胺凝胶电泳分离。

SRAP 上游引物:

me1 5'-TGAGTCCAAACCGGATA-3'

me2 5'-TGAGTCCAAACCGGAGC-3'

me3 5'-TGAGTCCAAACCGGAAT-3'

me4 5'-TGAGTCCAAACCGGACC-3'

me5 5'-TGAGTCCAAACCGGAAG-3'

SRAP 下游引物:

em1 5'-GACTGCGTACGAATTAAT-3'

em2 5'-GACTGCGTACGAATTTGC-3'

em3 5'-GACTGCGTACGAATTGAC-3'

em4 5'-GACTGCGTACGAATTTGA-3'

em5 5'-GACTGCGTACGAATTAAC-3'

em6 5'-GACTGCGTACGAATTGCA-3'

1.2.3 差异条带的回收、克隆 选择聚丙烯酰胺凝胶上的差异条带,用刀片切下,放入含有 50 μL 灭菌超纯水的 1.5 mL 离心管中,煮沸 10 min,离心,取上清作为 PCR 的模板,用扩增出该条带的引物进行 2 次扩增。将扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,回收目的条带,连接到 pMD18-T 载体上,热激转化大肠杆菌 DH5α,挑选阳性克隆在华大基因公司进行测序。

1.2.4 Real-time PCR 鉴定差异条带的真实性 以公司测序得到的序列,BLAST 比对 NCBI 数据库,并进行序列的电子延伸,用延伸后的序列设计 Real-time PCR 引物。以玉米 UBQ2 基因(TC305418)作为内参基因。用 2^{-ΔΔt}法确定基因表达差异的相对量。

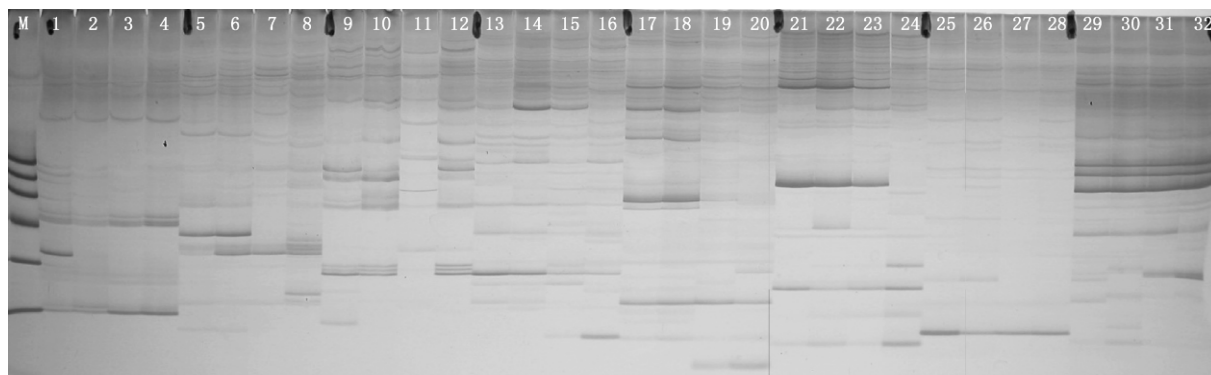
2 结果与分析

2.1 不同供氮水平下玉米基因表达的差异

为了找到玉米氮素状况的分子诊断候选靶标,

以对照处理和缺氮处理的玉米幼苗的叶片和根 cDNA 为模板,用所有 30 个 SRAP 引物对进行 PCR 扩增,扩增产物用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,银染后部分结果如图 1 所示。从图 1 可以看出,不同的引物

扩增效率不同,不同氮素水平下玉米的基因表达存在明显的差异性,能够从中分离出差异表达基因的片段。



M. DL600 Marker; 1 5 9 13 17 21 25 29. 对照叶; 2 6 10 14 18 22 26 30. 缺氮叶;
3 7 11 15 19 23 27 31. 对照根; 4 8 12 16 20 24 28 32. 缺氮根。
M. DL600 Marker; 1 5 9 13 17 21 25 29; Control leaf; 2 6 10 14 18 22 26 30. Nitrogen-shortage leaf;
3 7 11 15 19 23 27 31. Control root; 4 8 12 16 20 24 28 32. Nitrogen-shortage root.

图 1 不同供氮水平下玉米 cDNA-SRAP 的部分结果

Fig 1 Partial results of cDNA-SRAP on maize of different nitrogen nutritional status

2.2 差异条带的克隆测序

为了进一步了解差异片段所代表的基因,从聚丙烯酰胺凝胶上回收差异明显的清晰条带,克隆后送公司测序。测序结果如下:

> N1:

GACTGCGTACGAATTTGCAGATCATTGTGGTGGTCT
CATCACCCAAATCAACATTCCGGTTTGGACTCA

> N6:

TGAGTCCAAACCGGATACCAAAGAGGGCCTTGTTT
TACCATGCAGGTACACAGCAAAATTCGTACGCAGTC

> N9:

TGAGTCCAAACCGGAGCAAAATGTCTTCTTCAAAC
AAGGCTAACCTATCCATTCCTCTATCTATCCATTCT
CTATCGCCTCCTACTTGCAATTCGTACGCAGTC

> N20:

GACTGCGTACGAATTTGACAGGCCTGGTGGAGATG
TACGGCAAGAACGCGCGCCTGAGGGAGCTGGCGA
ACCTCGTGATCGTTGCCGCGCACACGGCAAGGAG
TCCAAGGACAGGGAGGAGCAGGCGGAGT-
TCAAGAA

GATGTACAGCCTCATCGACGAGTACAAGTTGAAGG
GCCATATCCGGTTTGGACTCA

> N30:

TGAGTCCAAACCGGATATTCCAAAGCAAGGGTTAT
GAATCAAAAAGAGAAGTGCCAGCTGGATCTCTGGTT
CAAAGTTCAGGGCATGGAATTGATTTCGTATGCTCG
TTCTCTCGCTGAGCAGAACCATCTCTGTCTGAGAA

GACCCAGTCTCCCAGTGTTCCTAGAAAAGGAAATC
CCATTCGTCAACCTAAATGGAAGGGCAGGTAAGG
GAAGGCCAGCAGGAAATTCAGTAAGTAAGGTATC
TCAGTGCCAGTGCTCTCCGGTTTCAAGTTAATTTCG
TACGCAGTC

> N32:

TGAGTCCAAACCGGATATGGACCGAACTGTCTCAC
GACGTTCTGAACCCAGCTCACGTACCGCATTAAATG
GGCGAACAGCCCAACCCCTTGGAACACCTACAGC
TCCAGGTGGCGAAGAGCCGACATCGAGGTGCCAA
ACCTTCCCGTCCATGTGGACTCTTGCGGAAGATCA
GCCTGTTATCCCTAGTTAATTTCGTACGCAGTC。

2.3 Real-time PCR 鉴定差异条带的真实性

用测序得到的序列对 NCBI 数据库进行 BLAST 比对,并进行电子延伸。根据延伸的序列设计 Real-time PCR 的引物。引物序列如下:

UBQ-sense: 5'-CTTTGCTGCTGCACGGGAGGAATG-3'

UBQ-Antisense: 5'-ATGGACGCACGCTGGCTGACTA-3'

N1-sense: 5'-TTCTTCTAAGCCCTTCCATCAA-3'

N1-Antisense: 5'-TGGTCTCATCACCCAAATCAA-3'

N6-sense: 5'-CTGGAGGAACAGATTGAGAAGA-3'

N6-Antisense: 5'-GAGCTAAGCCACCGTTACACT-3'

N9-sense: 5'-TGTGGGTTTCATGTTCTTTGTTT-3'

N9-Antisense: 5'-TTTATAGGACGAGTGCAGGTGT-3'

N20-sense: 5'-CATCGACGAGTACAAGTTGAAGGG-3'

N20-Antisense: 5'-ATGATCTCAGCAGGGCCACC-3'

N30-sense: 5'-ATTGATTCTGATGCTCGTTCT-3'

N30-Antisense: 5'-CTTACCTGCCCTTCCATTAG-3'

N32-sense: 5'-GGAGCGACAGAAGTATGAAA-3'

N32-Antisense: 5'-GAACAATGAAGATAGATGGCAAG-3'.

Real-time PCR 定量结果如图 2 和图 3 所示。从图 2 和图 3 可以看出, N1、N9、N20、N30 在缺氮条件下玉米的叶和根中表达量升高达到 2 倍以上, 可以作为分子诊断的候选靶标; N32 在根中表达量升高达到 2 倍以上, 而叶中的差异不明显; N6 的表达基本不受供氮水平的影响, 推测为假阳性。

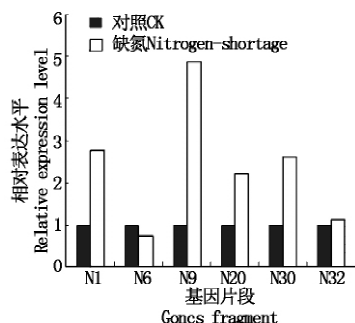


图 2 不同氮素水平对玉米叶片基因表达的影响

Fig. 2 N-level effect on gene expression in maize leaf

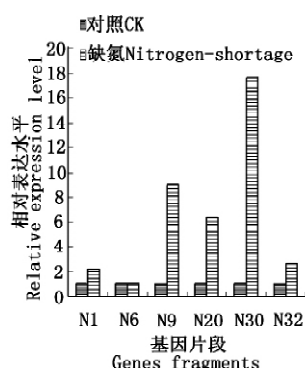


图 3 不同氮素水平对玉米根基因表达的影响

Fig. 3 N-level effect on gene expression in maize root

3 讨论

硝态氮是植物的主要氮源, 绝大多数有机氮均来源于硝态氮的同化。 NO_3^- 既作为营养, 又作为信号, 对植物的代谢和生长有重要的影响^[10]。因此本研究采用硝态氮的形式为水培玉米幼苗供氮。

笔者采用了 cDNA-SRAP 的方法来分离不同供氮水平下玉米差异表达片段, cDNA-SRAP 引物设计针对表达序列, 操作简单、安全, 成本低^[11]。本研究中所克隆的差异条带较少, 序列较短, BLAST 结果没有发现与氮吸收代谢和信号相关的基因, 应该增加引物来扩增出更多的差异条带, 从而得到更好的分子诊断候选靶标; 所克隆的差异条带从凝胶图上呈现的是有和无的差异, 从荧光定量 PCR 的结果分析, 则可辨别量的差异。试验结果表明, 这些差异

片段的真实性是可靠的, 大多数克隆的片段在不同供氮水平下的表达存在差异, 可以作为玉米氮素营养状况分子诊断的候选靶标。

在施氮量相同的条件下, 氮肥后施处理玉米穗位叶 MDA 含量明显降低, SOD、POD 和 CAT 活性显著提高, 玉米产量也显著提高^[12]。这种复杂的需氮规律使营养诊断和指导施肥更加困难。目前, 分子诊断还没有非常理想的靶标, 本研究所得到的差异表达片段的特异性和时空性, 还需要在大田条件下进一步进行筛选和验证。特异性强、稳定性好的靶标还需要进一步的发掘、筛选和鉴定。

参考文献:

- [1] 姚启伦, 胡芳, 许江. 低氮胁迫下玉米地方品种形态特征和光合特性的变化[J]. 河南农业科学, 2011, 40(5): 37-41.
- [2] 刘武仁, 郑金玉, 罗洋, 等. 概述氮肥水平对玉米生理及产量性状的影响[J]. 华北农学报, 2010, 25(S1): 239-242.
- [3] 马国瑞, 石伟勇. 农作物营养失调症原色图谱[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002.
- [4] 郭建华, 王秀, 孟志军, 等. 主动遥感光谱仪 Greens-eeker 与 SPAD 对玉米氮素营养诊断的研究[J]. 植物营养与肥料学报, 2008, 14(1): 43-47.
- [5] Crawford N M. Nitrate: nutrient and signal for plant growth[J]. Plant Cell, 1995, 7(7): 859-868.
- [6] 张书芬, 傅廷栋, 李媛媛, 等. SRAP 标记分析甘蓝型油菜多态性[J]. 华北农学报, 2006, 21(1): 50-54.
- [7] Li G, Quiros C F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP): a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2001, 103(2-3): 455-461.
- [8] 乔燕春, 吕德国, 郭栋梁, 等. 山楂果实不同组织 RNA 提取方法比较及 cDNA-SRAP 分析体系的建立[J]. 果树学报, 2009, 26(6): 915-919.
- [9] 孙健, 冯汉宇, 周顺利, 等. 玉米自交系 7922 苗期耐低氮胁迫原因探讨[J]. 玉米科学, 2007, 15(3): 22-25.
- [10] 印莉萍, 黄勤妮, 吴平. 植物营养分子生物学及信号转导[M]. 北京: 科学出版社, 2006.
- [11] 马爱芬, 李加纳, 谌利, 等. 甘蓝型油菜种皮色泽相关基因的 cDNA-SRAP 差异显示[J]. 作物学报, 2008, 34(3): 526-529.
- [12] 李佩艳, 尹飞, 王俊忠, 等. 施氮量和氮肥后施对夏玉米叶片衰老生理的影响[J]. 河南农业科学, 2010(10): 26-29.