

doi:10.7668/hbxb.2014.05.006

# 利用 cDNA-SRAP 分离结球甘蓝抗黑腐病 相关基因的研究

张云霞<sup>1,2</sup>, 宋立晓<sup>2</sup>, 曾爱松<sup>2</sup>, 高 兵<sup>2</sup>, 严继勇<sup>2</sup>

(1. 南京农业大学 园艺学院, 江苏 南京 210095; 2. 江苏省农业科学院 蔬菜研究所, 江苏 南京 210014)

**摘要:**为了挖掘抗病基因, 探寻甘蓝抗黑腐病机制, 选取抗性材料 C7, 在幼苗 4~5 片真叶期, 喷施菌液浓度为  $1.0 \times 10^8$  cfu/mL 的细菌悬浮液, 喷施蒸馏水作对照, 提取接种后 1, 3, 5 d 的总 RNA 进行等量混合, 获得 2 种不同处理的样品池。采用 SRAP 分子标记技术进行基因差异表达分析, 结果显示: 60 对 SRAP 引物组合共扩增出大小在 100~750 bp 的 685 条带, 平均每对引物扩增 11 条带, 共检测到 24 个多克隆位点。回收测序后, 将得到的 9 条差异表达片段 TDFs (Transcript derived fragments) 进行克隆和序列分析, 其中 3 条差异基因片段未搜索到任何同源蛋白, 其余 6 个基因均按功能分类, 可分为涉及能量代谢、植物细胞壁蛋白相关基因、液泡加工酶基因和未知功能基因。表明 cDNA-SRAP 方法简单、重复性好、试验成本低, 完全适用于差异表达分析, 从中获得一些与甘蓝抗黑腐病相关的差异基因片段, 可用于甘蓝抗黑腐病的分子机理研究。

**关键词:** 甘蓝; 黑腐病; cDNA-SRAP

中图分类号: S635.1; Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2014)05-0029-04

## Studies on Isolation of Resistance Related-genes to Black Rot by cDNA-SRAP in Cabbage

ZHANG Yun-xia<sup>1,2</sup>, SONG Li-xiao<sup>2</sup>, ZENG Ai-song<sup>2</sup>, GAO Bing<sup>2</sup>, YAN Ji-yong<sup>2</sup>

(1. College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Institute of Vegetable Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

**Abstract:** In order to explore the resistant disease gene and find out relative mechanisms, the suspensions with  $1.0 \times 10^8$  colony forming units/mL was sprayed to the resistant variety C7 of seedlings at four to five leaves, while the other group was sprayed distilled water as usual (Control, CK). Leaves were collected in 1, 3, 5 d time points after XCC and distilled water. A mixture of an equal amount total RNA from the above two groups as two gene pools. Different expression of the genes was analyzed by SRAP technique. The results showed: using 60 pairs of primers, about 685 cDNA fragments in size between 100~750 bp were amplified, averagely 11 bands per primer combination, there were 24 polymorphic loci in these two pool. They were sequenced and the Blast program was used to find out homology with reported genes. Sequence alignment indicated that 6 out of these 9 TDFS (Transcript derived fragments) showed homologies to certain genes from 43% to 59% in NCBI, while the other three showed no significant homology with reported gene. Based on their homologies, these genes were assumed to NADH dehydrogenase, vegetative cell wall protein, DELTA-VPE and unknown functional proteins. The results indicated that cDNA-SRAP method had several advantages over other systems: simplicity, reasonable throughput rate, highly reproducibility and inexpensiveness, and that the cDNA-SRAP technique was applicable to the analysis of gene different expression. Some fragments of differentially expressed genes associated with cabbage black rot were obtained, and may be used for investigating the molecular mechanism of cabbage black rot.

**Key words:** Cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*); Black rot (*Xanthomonas Campestris* pv. *Campetris*); cDNA-SRAP

收稿日期: 2014-07-27

基金项目: “十二五”农村领域国家科技计划项目(2012BAD02B00); 江苏省农业科技支撑计划重点项目(BE2013429); 江苏省农业科技自主创新资金项目(CX(13)2004)

作者简介: 张云霞(1987-), 女, 山西大同人, 在读硕士, 主要从事甘蓝遗传育种与生物技术研究。张云霞、宋立晓为同等贡献作者。

通讯作者: 严继勇(1963-), 男, 江苏姜堰人, 研究员, 博士, 主要从事蔬菜遗传育种与生物技术研究。

甘蓝黑腐病是由野油菜黄单胞菌野油菜致病变种(*Xanthomonas campestris* pv. *Campestris*)引起的一种毁灭性病害<sup>[1]</sup>,该病严重影响甘蓝的品质和产量。传统的抗病育种方法育种年限长,耗费大量的人力物力;分子标记辅助育种以其独特的优越性已广泛应用于植物的遗传育种中。1999 年张峰等<sup>[2]</sup>采用 AFLP 技术找到一个与黑腐病基因紧密连锁的分子标记;2010 年,朱妍和王超<sup>[3]</sup>采用抑制差减杂交(SSH)文库研究甘蓝对黑腐病抗性相关基因,共获得 87 条与信号转导、物质代谢和抗病防卫反应等基因相关的 EST。迄今,仍然未找到完全的甘蓝抗黑腐病基因序列。

SRAP(Sequence-related amplified polymorphism)分子标记技术因重复性好,产生条带丰富,可同时检测多个样本之间的基因表达差异,已成为目前进行基因差异表达分析的重要手段,在多种植物中得到应用。马爱芬等<sup>[4]</sup>曾用 cDNA-SRAP 分析甘蓝型油菜黄黑籽之间的种皮色泽差异表达,获得了 2 条可能与甘蓝型油菜的种皮色泽基因相关的差异表达片段。卢泳全等<sup>[5]</sup>利用 SRAP 引物分析盐胁迫条件下大米草(*Spartina anglica*)根基因差异表达,获得了一个编码的氨基酸序列与水稻的  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶之间存在 30% 相似性的差异片段。运用 SRAP 分子标记技术分离甘蓝抗黑腐病相关基因还未见报道。

本试验以抗黑腐病品种 C7 为材料,苗期喷施黑腐病菌液,并以蒸馏水作对照,提取接种 1,3,5 d 的样品 RNA 等量混合,构建接种黑腐病菌液和蒸馏水 2 个样品池,研究 C7 接种后基因差异表达情况,为进一步揭示甘蓝黑腐病菌侵染过程中植物对致病细菌防御作用提供理论基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

甘蓝抗黑腐病高代自交系 C7 由江苏省农业科学院蔬菜研究所甘蓝研究室提供。野油菜黄单胞杆菌野油菜致病变种,由西南大学植物保护学院惠赠。

### 1.2 方法

1.2.1 RNA 的提取及 cDNA 的合成 在甘蓝幼苗 4~5 片真叶期,将浓度为  $1.0 \times 10^8$  cfu/mL 的黑腐病菌液均匀喷施于 C7 植株上,喷施蒸馏水作对照,每株喷施 5 mL。分别于接种后的 1,3,5 d 取样,采用混合取样法,迅速在液氮中冷冻,  $-80^\circ\text{C}$  保存。使用植物总 RNA 提取试剂盒(购自天根生化科技有限公司)提取 RNA,利用紫外分光光度计分析浓度,琼脂糖凝胶电泳分析纯度。将各处理 RNA 调成

相同的浓度,取等量进行混合,形成 2 个样品池(接种菌液处理和接种蒸馏水处理),采用 Bio Take supermo III RT Kit 合成 cDNA,产物用无菌水 ddH<sub>2</sub>O 稀释 10 倍。存于  $-20^\circ\text{C}$  备用。

1.2.2 cDNA-SRAP 扩增 10  $\mu\text{L}$  PCR 扩增体系为:10 $\times$ PCR Buffer 5.0  $\mu\text{L}$ ,Forward primer 10  $\mu\text{mol/L}$  0.5  $\mu\text{L}$ ,Reverse primer 10  $\mu\text{mol/L}$  0.5  $\mu\text{L}$ ,稀释 10 倍的 cDNA 模板 2.0  $\mu\text{L}$ ,ddH<sub>2</sub>O 2.0  $\mu\text{L}$ ,Taq DNA 聚合酶(5 U)0.1  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件:94  $^\circ\text{C}$  5 min;94  $^\circ\text{C}$  1 min,35  $^\circ\text{C}$  1 min,72  $^\circ\text{C}$  1 min,5 个循环;94  $^\circ\text{C}$  1 min,50  $^\circ\text{C}$  1 min,72  $^\circ\text{C}$  1 min,35 个循环;72  $^\circ\text{C}$  10 min。

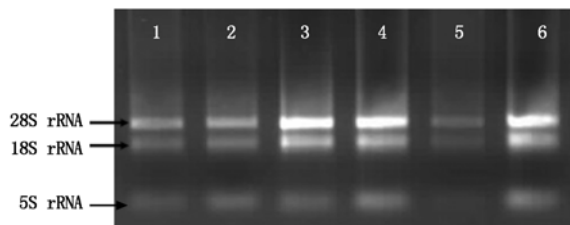
1.2.3 聚丙烯酰胺凝胶与割胶回收 PCR 扩增产物在 10% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶(30% 丙烯酰胺,0.32% 甲叉丙烯酰胺)中电泳分离。电泳结束后,小心取下凝胶,硝酸银染色。使用 Poly-Gel DNA Extraction Kit (OMEGA)回收差异片段。

1.2.4 克隆测序及序列比对 回收的差异 cDNA 片段与 pGEM-T Easy 载体连接后转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,通过蓝白斑筛选挑选阳性克隆,菌液 PCR 后用 1% 琼脂糖检测,挑取含有目的条带的单克隆菌液,委托 Invitrogen 公司测序。采用 NCBI 的 BlastX 工具进行序列同源性比较分析,使用 DNAMAN 6.0 进行编辑。

## 2 结果与分析

### 2.1 总 RNA 的提取

图 1 为提取的总 RNA 经 1% 琼脂糖电泳检测结果,28S、18S 和 5S 这 3 条带明亮清晰,且 28S 带亮度强于 18S 带,说明 RNA 完整性较好。紫外分光光度计测定  $A_{260/280}$  为 1.8~2.0,  $A_{260/230}$  为 2.1~2.2,表明所提取的 RNA 纯度良好,无降解,蛋白质污染少。



1,3,5. 接种蒸馏水 1,3,5 d(CK);2,4,6. 接种黑腐病菌液 1,3,5 d(T)。

1,3,5. Sprayed with distilled water;2,4,6. Sprayed with  $1.0 \times 10^8$  cfu/mL Xcc.

图 1 甘蓝叶片总 RNA 琼脂糖凝胶电泳图  
Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of total RNA from cabbage leaf

2.2 cDNA 特异片段筛选

采用 60 对 SRAP 引物组合对 C7 叶片接种蒸馏水和接种菌液进行 cDNA 差别显示分析,57 对引物组合成功扩增出稳定清晰的条带,另外 3 对引物组合无法扩增出条带或扩增条带极少。60 对引物组合共扩增出 685 条 100 ~ 750 bp 的条带,平均每对引物组合可扩增出 11 条清晰的条带,引物组合扩增最多的条带数为 17 条,最少的为 3 条。其中,差异条带数共 24 条,差异比率为 3.5%,图 2 为部分电泳结果,箭头所示条带为扩增的 cDNA 差异条带,5 条差异 cDNA 条带扩增产物大小分别为 250,280,230,150,300 bp 左右。

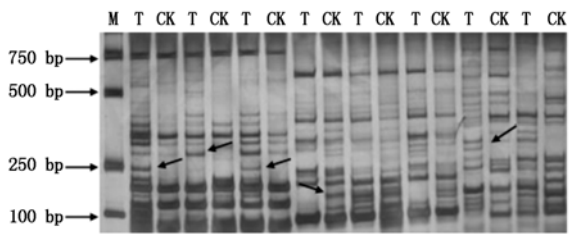


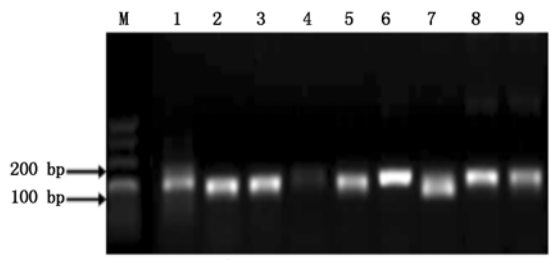
图 2 接种菌液和接种蒸馏水诱导的甘蓝 C7 叶片的 cDNA-SRAP 扩增特异片段

Fig. 2 The specific fragment of cDNA-SRAP amplification between C7 leaf under Xcc stress and distilled water stress

2.3 差异表达 cDNA 片段的回收、克隆和菌落 PCR

选取其中的 10 条差异条带用 OMEGA PAGE 胶回收试剂盒回收 (Poly-Gel DNA Extraction Kit), 仅获得 9 条稳定重复回收的差异条带。然后连接到 Pgem-T Easy (Promega) 载体上 4 ℃ 过夜连接, 转化

后挑取单克隆, 进行菌落 PCR 验证 (图 3)。



1 ~ 9. 差异表达条带; M. DL500 DNA Marker.  
1 - 9. Differential expression ESTs; M. DL500 DNA Marker.

图 3 差异表达片段重复单菌落 PCR 检测电泳图

Fig. 3 PCR detection of repeated single clone of differential expression ESTs

2.4 cDNA-SRAP 差异片段序列的分析比对

将测序后获得的 9 个核苷酸序列在 NCBI 的 Blastx 核酸蛋白质数据库进行比对, 结果如表 1 所示。除 3 个没有找到同源序列外, 其余 6 个都检索到了相似值为 43% ~ 59% 的同源序列, 将这 6 个基因按功能分类, 大致分为 4 类, 与物质和能量相关的 NADH 脱氢酶 NADH dehydrogenase ( GenBank: YP\_003734944. 1) 基因、与细胞壁结构相关的植物细胞壁合成蛋白 Vegetative cell wall protein ( GenBank: XP\_005179319. 1) 基因、与细胞程序性死亡 ( Programmed cell death, PCD) 相关的液泡加工酶 DELTA-VPE ( GenBank: XP\_002883236. 1) 基因和功能未知蛋白 ( Hypothetical protein) ( GenBank: Ej60870. 1、ETT03452. 1、AAP44644. 1) 基因, 对其中 2 个序列片段 TDF2 和 TDF6 使用 DNAMAN 编辑, 如图 4。

表 1 分离到的 cDNA-SRAP 差异片段的序列分析

Tab.1 Sequence analyses of specific fragments by cDNA-SRAP

差异片段 Specific fragment	长度/bp Length	同源基因 Homolog gene	物种来源 Organism	相似度/% Identify
TDF1	253	Hypothetical protein gene	<i>Thalassiosira oceanica</i>	43
TDF2	236	NADH dehydrogenase gene	<i>Sivaloka damnosus</i>	45
TDF3	165	Vegetative cell wall protein gene	<i>Musca domestica</i>	55
TDF4	162	Hypothetical protein gene	<i>Fusobacterium</i> sp. CM21	43
TDF5	175	Hypothetical protein gene	<i>Oryza sativa</i> Japonica Group	47
TDF6	237	DELTA-VPE	<i>Arabidopsis lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>	59



图 4 部分差异表达片段的同源性序列比对

Fig. 4 Alignment of deduced amino acids of parts of TDFs

3 结论与讨论

甘蓝黑腐病在甘蓝生产上危害严重, 药剂防治

容易对甘蓝的叶球品质 and 安全性产生影响。实践证明, 选育抗病品种是防治甘蓝黑腐病经济有效的途径, 而克隆抗病相关基因、培育抗源种质是选育抗病品种的基础。植物在受到病原物侵染后, 会发生一系列的生理生化变化<sup>[6]</sup>, 例如细胞壁变厚、产生植保素 (Phytoalexin) 并合成防御相关蛋白 (Defense-related proteins) 等, 这些变化都受到防卫基因的调控。参与植物防卫反应相关的基因包括: 苯丙氨酸裂解酶 (PAL)、查尔酮合成酶 (CHS)、脂氧合酶 (LOX)、几丁酶 (Chitinase, CHI)、D-1, 3 葡聚糖酶 (Glucanase, Glu)、β-淀粉酶、溶菌酶、富含羟脯氨酸糖蛋

白(Histadine-rich glycoprotein, HRGP)的基因、木质素合成有关酶基因以及核糖体失活蛋白(Ribosome-inactivating protein, RIP)基因等<sup>[7]</sup>。

本研究采用 cDNA-SRAP 技术对接种黑腐病病原菌和蒸馏水的甘蓝幼苗基因表达变化进行分析,对其中 10 个差异表达片段进行克隆和功能预测,只有 6 个差异片段找到了同源序列,将这 6 个基因进行了功能分类,发现甘蓝抗黑腐病的过程涉及能量代谢,植物细胞壁蛋白,液泡加工酶和功能未知基因。

NADH 脱氢酶活性的复合物广泛存在于植物线粒体和叶绿体中,是电子传递系统-呼吸链的重要组分,NADH 脱氢酶催化 NADH 的 2 个电子传递至辅酶 Q。研究表明,NADH 有关亚基表达基因上调,能够提高植物的呼吸代谢能力,增强植物的抗病性<sup>[8]</sup>。这可能是由于植物受到病原菌的侵染时,正常的生理代谢被破坏,需要产生更多的能量诱导机体产生防卫反应等来抵制这种胁迫。液泡加工酶(Vacuolar processing enzyme, VPE)是高等植物液泡中的一种具有天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶,通过激活植物液泡中的蛋白水解活性,发挥调控细胞程序性死亡(Programmed cell death, PCD)的功能<sup>[9-10]</sup>。多种环境胁迫都可以诱导植物发生 PCD,这在植物抗病防卫过程中起着重要的作用<sup>[11-13]</sup>。尽管逆境胁迫下的 VPE 在植物防御的信号以及参与信号通路的基因还不是很清晰,但是 VPE 在植物防御信号中的作用和遗传学分析已明确地显示 VPE 直接参与防御反应。植物在衰老过程或逆境下的组织中,VPE 的表达量均会上调,而且具有组织特异性。伸展蛋白(HRGP)是一种重要的植物细胞结构蛋白<sup>[14]</sup>,当植物遭受病原菌侵染时,一方面与木质素同时增加强化细胞壁的结构阻止病原菌的入侵,另一方面发挥类似细菌凝集素的特点,抑制病原菌的生长。Wei 等<sup>[15]</sup>在拟南芥中证实,伸展蛋白基因的过量表达能够限制病原菌丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae*) DC3000 的入侵。Cantu 等<sup>[16]</sup>研究番茄果实成熟过程对病原菌的响应发现,细胞壁伸展蛋白基因 *LeExp1* 在易感病的果实中表达上升。

甘蓝对黑腐病的抗性反应涉及的过程较为复杂,本试验分离得到的差异片段与植物防卫反应有关,还需要进行下一步验证,分析这些片段接种后不同时期相对表达情况,为进一步探索甘蓝抗黑腐病机理提供依据。

## 参考文献:

- [1] 李树德. 中国主要蔬菜抗病育种进展[M]. 北京:科学出版社,1995:598-608.
- [2] 张峰,宋文芹,李凌,等. 利用 AFLP-银染法筛选与抗甘蓝黑腐病性状连锁的分子标记[J]. 南开大学学报:自然科学版,1999,32(3):177-181.
- [3] 朱妍,王超. 利用 SSH 技术分离甘蓝抗黑腐病相关基因的研究[J]. 中国蔬菜,2010(10):20-24.
- [4] 马爱芬,李加纳,湛利,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.
- [5] 卢泳全,吴为人. 应用 SRAP 技术从大米草根中分离盐胁迫应答基因[J]. 浙江大学学报:农业与生命科学版,2006,32(5):511-514.
- [6] 许志刚. 普通植物病理学[M]. 2 版. 北京:中国农业出版社,1997:2-7.
- [7] 蓝海燕,陈正华. 植物与病原真菌互作的分子生物学及其研究进展[J]. 生物工程进展,2000,20(4):16-22.
- [8] 张明,刘国顺,沈笑天. 施用花生壳的烟草叶中基因差异表达分析[J]. 中国烟草学报,2009,15(5):73-77.
- [9] Shimada T, Yamada K, Kataoka M, et al. Vacuolar processing enzymes are essential for proper processing of seed storage proteins in *Arabidopsis thaliana* [J]. Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(34):32292-32299.
- [10] Buchanan B B, Gurissem W, Jones R L. Biochemistry and molecular biology of plants[M]. New York: American Society of Plant Physiologists, 2000:1250-1316.
- [11] Panter S, Dickman M. Programmed cell death in plants during development and stress responses[M]. The Netherlands: kluwer academic publishers, 2004:107-152.
- [12] Narcin U, Elif B, Mehmet A T. Programmed cell death in plants [J]. J Cell Mol Biol, 2005, 4:9-23.
- [13] Bouchez O, Huard C, Lorrain S, et al. Ethylene is one of the key elements for cell death and defense response control in the *Arabidopsis* lesion mimic mutant *vad1* [J]. Plant Physiology, 2007, 145(2):465-477.
- [14] 徐筱,徐倩,张镭,等. 植物扩展蛋白基因的研究进展[J]. 北京林业大学学报, 2010, 32(5):154-162.
- [15] Wei G, Shirsat A H. Extension over-expression in *Arabidopsis* limits pathogen invasiveness [J]. Molecular Plant Pathology, 2006, 7(6):579-592.
- [16] Cantu D, Blanco-Ulate B, Yang L, et al. Ripening-regulated susceptibility of tomato fruit to *Botrytis cinerea* requires NOR but not RIN or ethylene [J]. Plant Physiol, 2009, 150:1434-1449.