

玉米抗大斑病相关基因片段的表达研究

郝敏¹, 谷守芹², 张莹², 董金皋², 韩建民²

(1. 河北北方学院 医学技术学院, 河北 张家口 075000; 2. 河北农业大学 真菌毒素实验室, 河北保定 071001)

摘要:以玉米自交系 B37 *Ht1* 与玉米大斑病菌 0 号小种和 1 号小种构成非亲和性互作和亲和性互作体系, 利用 mRNA 差异显示 (DDRT-PCR) 技术研究了互作过程中玉米叶片基因表达的情况。结果表明, 非亲和性互作中特有的表达片段 7 条, 较亲和性互作及对照表达明显增强的片段 21 条, 表达明显减弱的 18 条。对非亲和性互作中特有的表达片段进行克隆、测序及同源性分析, 发现它们与已知抗病基因没有同源性。

关键词:玉米; 玉米大斑病; mRNA 差异显示; 抗病相关基因片段

中图分类号: S435.13 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2008)04-0085-04

Study on Expression of Corn Gene Fragments Related to Resistance to *Setosphaeria turcica*

HAO Min¹, GU Shou-qin², ZHANG Ying², DONG Jin-gao², HAN Jian-min²

(1. Medicine Technology College of Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China;

2. Mycotoxin Lab of Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China)

Abstract: The expression of gene fragments in the corn leaves were studied both in incompatible combination (B37 *Ht1* inoculated with race 0 of *Setosphaeria turcica*) and in compatible combination (B37 *Ht1* inoculated with race 1 of *Setosphaeria turcica*) by mRNA differential display PCR. The results showed that 17 gene fragments were expressed exclusively, 26 gene fragments expressed increasingly, and 20 gene fragments expressed decreasingly in incompatible combination compared with either in compatible combination or in control. Homology was not found between gene fragments expressed exclusively in incompatible combination and known R genes.

Key words: Corn; Northern corn leaf blight; mRNA differential display reverse transcription PCR (DDRT-PCR); gene fragments related to disease resistance

玉米大斑病是由玉米大斑病菌 (*Setosphaeria turcica*) (Luttrell) Leonard & Suggs (无性态: *Exserohilum turcicum*) (Pass) Leonard & Suggs 所引起的玉米叶部主要病害^[1]。玉米与大斑病菌不同生理小种之间的抗/感关系 (非亲和性互作或亲和性互作) 可以通过毒力公式来表示, 如 1 号小种的毒力公式为: *Ht2*, *Ht3*, *HtN*/*Ht1*, 0 号小种的毒力公式为: *Ht1*, *Ht2*, *Ht3*, *HtN*/0, 即含主效抗病基因 *Ht1* 的玉米自交系对玉米大斑病菌 0 号小种表现抗病, 但对 1 号小种则表现感病。抗/感的结果取决于玉米与大斑病菌的相互识别, 以及识别后引起的一系列信号转导和寄主防卫基因的表达, 因此抗病相关基因 (抗病基因、信号转导基因、防卫基因) 的获得对进一步研究

玉米与大斑病菌间的互作机理就显得尤为重要。

到目前为止, 一些抗大斑病的主效基因 (*Ht1*、*Ht2*、*Ht3*、*HtN*、*Htn1*) 已被初步定位^[2-5], 而且经研究发现 *Ht1*、*Ht2*、*HtN* 对大斑病的抗性表现不同: *Ht1*、*Ht2* 基因均能明显地减小病斑面积和病斑中病菌的产孢量, 其中 *Ht1* 基因效应明显大于 *Ht2* 基因; *HtN* 基因能显著地延长病害潜育期, 推迟病害的发生和发展。同时对苯丙解氨酶基因 (*PAL*)、胞液抗坏血酸过氧化物酶基因 (*apx*) 和过氧化物酶 K 基因 (*POXK*) 等防卫基因与玉米对大斑病菌抗性的关系进行了初步研究^[6]。

在以上研究成果的基础上, 本试验以含抗大斑病主效基因的玉米自交系 B37 *Ht1* 与玉米大斑病菌

收稿日期: 2008-04-11

基金项目: 河北省自然科学基金项目 (302333)

作者简介: 郝敏 (1979-), 女, 河北张家口人, 硕士, 助教, 主要从事分子植物病理学研究。

通讯作者: 韩建民 (1962-), 男, 河北保定人, 教授, 主要从事分子植物病理学研究工作。

0号和1号生理小种分别构成非亲和性互作体系和亲和性互作体系,利用 mRNA 差异显示技术研究互作过程中玉米叶片基因表达情况,以明确有多少个基因可能与玉米抗大斑病有关,为进一步分离、克隆这些基因奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料及处理

1.1.1 菌种繁育 选用玉米大斑病菌 01-27(0号小种),01-23(1号小种)2个菌株在 PDA 培养基上扩繁,于 25℃ 生化培养箱内培养。将培养 10 d 的玉米大斑病菌洗下分生孢子配成孢子悬浮液,浓度为

锚定引物:B0327:5'-AAGCTTTTTTTTTTTA-3',B0328:5'-AAGCTTTTTTTTTTTG-3',B0329:5'-AAGCTTTTTTTTTTTC-3'
随机引物:
B0301:5'-TACAACGAGG-3',B0302:5'-TGGATTGGTC-3',B0303:5'-CTTICTACCC-3',B0304:5'-TTTTGGCTCC-3'
B0305:5'-GGAACCAATC-3',B0306:5'-AAACTCCGTC-3',B0307:5'-TCGATACAGG-3',B0308:5'-TGGTAAA GGG-3'
B0309:5'-TCGGICATAG-3',B0310:5'-GGIACATTGG-3',B0311:5'-TACCTAAGCG-3',B0312:5'-CTGCTTGATG-3'
B0313:5'-GTTTTCGCAG-3',B0314:5'-GATCAAGTCC-3',B0315:5'-TGGTAAA GGG-3',B0316:5'-TCGGICATAG-3'
B0317:5'-GGIACATTGG-3',B0318:5'-TACCTAAGCG-3',B0319:5'-CTGCTTGATG-3',B0320:5'-GATCAATCCG-3'
B0321:5'-GATCTAACCG-3',B0322:5'-GATCGCATTG-3',B0323:5'-GATCTGACTG-3',B0324:5'-GATCATGGTC-3'
B0325:5'-GATCATA GCG-3',B0326:5'-GATCTAAGGC-3'。

1.2 RNA 的提取和 cDNA 第一链的合成

在接种 0,1,2,3 d 和亲和性组合发病时剪取同一部位叶片,采用 UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒提取玉米叶片总 RNA,利用 M-MLV 反转录酶将其中的 mRNA 反转录为第一链 cDNA,用 1% 琼脂糖电泳检测 cDNA 的浓度和质量。

1.3 mRNA 差异显示

按照 Govanna Visioli 等^[7]的方法进行,采用 3 种锚定引物(目录号 B0327-B0329)和 26 种随机引物(目录号 B0301-B0326)。25 μL 扩增体系:10 ×PCR buffer(含 Mg²⁺) 2.5 μL,2.5 mmol/L dNTPs 2.0 μL,10 μmol/L 锚定引物 2.5 μL,10 μmol/L 随机引物 2.5 μL,30 ng/μL cDNA 反应物 2.0 μL,5 U/μL Taq DNA 聚合酶 0.2 μL,补水至 25 μL。PCR 扩增程序为:95℃ 3 min;94℃ 30 s,48℃ 2 min,72℃ 30 s,共 30 个循环;72℃ 10 min;4℃ 保温。

1.4 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳及银染

参照梁得勇等^[8]方法进行。采用 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶,于室温下聚合 2.5 h,75 W 恒功率电泳。银染参照张义平等^[9]的方法进行。

1.5 差异表达片段回收及二次扩增

切下差异条带,放入 1.5 mL 离心管中,加入 30 μL 的 TE 缓冲液,采用煮沸法对微量 DNA 进行洗脱回收,然后 10 000 r/min 离心 10 min,上清液即为回

10^{5,6}个孢子/mL。

1.1.2 玉米幼苗培养及接种 将饱满、无伤的玉米种子摆放在在垫有湿滤纸的培养皿中,于 25℃ 培养箱中催芽,然后播种于花盆中,约 20 d 幼苗长至 5~6 叶期时,用新鲜配制的加有 0.1% Tween-80 的孢子悬浮液喷雾法接种,同时作不接种对照。置黑暗条件下保湿 24 h,然后转入 18~25℃、光照时间 10~14 h 的温室内培养。在接种 0,1,2,3 d 和亲和性组合发病时剪取叶片,用于提取植物叶片组织总 RNA。

1.1.3 引物 3 种锚定引物(目录号 B0327-B0329)和 26 种随机引物(目录号 B0301-B0326)购于上海生物工程公司。

收的 DNA 溶液。利用与回收条带相匹配的随机引物和锚定引物进行二次扩增,25 μL 扩增体系中含有:10 ×PCR buffer(含 Mg²⁺) 2.5 μL,2.5 mmol/L dNTPs 2.0 μL,10 μmol/L 锚定引物 2.0 μL,10 μmol/L 随机引物 2.5 μL,回收 DNA 溶液 5 μL,5 U/μL Taq DNA 聚合酶 0.5 μL,补水至 25 μL。PCR 扩增程序为:94℃ 3 min;94℃ 30 s,47℃ 2 min,72℃ 30 s,共 35 个循环;72℃ 10 min;4℃ 保温。利用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测二次扩增产物。

1.6 反式 Northern 杂交检测阳性片段

按 Roche Applied Science 公司生产的地高辛标记和检测试剂盒使用说明书进行。首先标记不同处理获得的第一链 cDNA 作探针,放于杂交液中,再将同一时间点的差异表达基因片段的回收溶液 1 μL 点于尼龙膜上,于 Biometra compact line OV4 分子杂交炉中进行反式 Northern 杂交。

1.7 阳性条带的克隆测序

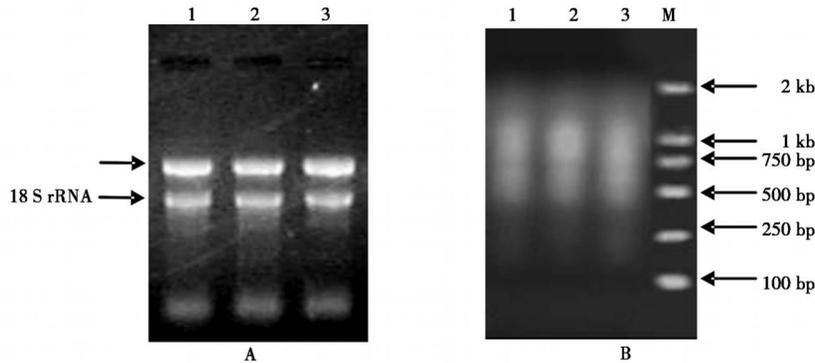
阳性差异条带连接到 pMD-18 vector 上,用热激法转化至大肠杆菌 XL-1 Blue (proAB⁺,lacI^q,lacZ M15,Tn10,tet^r)中,利用含 100 mg/L 氨苄青霉素的 LB 琼脂培养基筛选转化子并酶切鉴定插入片段。利用 ABI PRISM 377 DNA Sequencer-E 测序仪,对含有插入片段的质粒进行测序(委托上海生物工程公司进行),利用 NCBI 网站上的 BLAST 软件与 Gen-

Bank 中的已知基因或蛋白进行同源性分析。

2 结果与分析

2.1 玉米叶片 RNA 提取和第一链 cDNA 合成

本试验中采用 UNIX-10 柱式总 RNA 抽提试剂盒提取总 RNA,并用于第一链 cDNA 的合成,经 1.0% 琼脂糖电泳检测,所得 cDNA 大小范围在 300 ~ 2 000 bp(图 1),符合试验要求。



1. B37 *Ht1* 48 h CK; 2. B37 *Ht1* 接 0 号小种后 48 h; 3. B37 *Ht1* 接 1 号小种后 48 h; M. marker。
1. B37 *Ht1* 48 h CK; 2. 48 h after inoculation with race 0; 3. 48 h after inoculation with race 1.

图 1 玉米自交系总 RNA(A)和第一链 cDNA(B)的电泳结果

Fig. 1 Result of agarose electrophoresis of total RNA and the first strand of cDNA synthesized

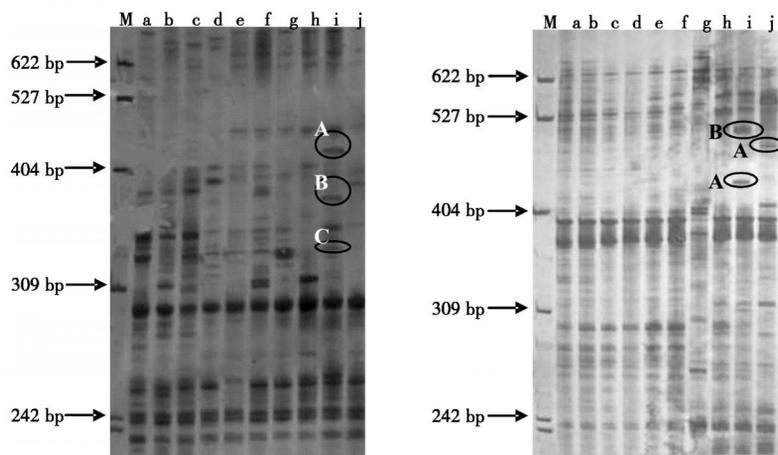


图 2 (1) 引物 B0326

图 2 (2) 引物 B0316

a ~ d. 不接菌对照; e ~ g. B37 *Ht1* 与 1 号小种构成的亲和性交互; h ~ j. B37 *Ht1* 与 0 号小种构成非亲和性交互; a. 0 h CK; b. 24 h CK; c. 48 h CK; d. 72 h CK; e. 1 号 - 24 h; f. 1 号 - 48 h; g. 1 号 - 72 h; h. 0 号 - 24 h; i. 0 号 - 48 h; j. 0 号 - 72 h M. Marker: pBR322/ *Msp*I; A. 非亲和性交互中特有的表达片段; B. 较亲和性交互及对照表达量明显增加的片段; C. 较亲和性交互及对照表达量明显减少的片段。

a - d. B37 *Ht1* with no inoculation (CK); e - g. B37 *Ht1* inoculated with race 1; h - j. B37 *Ht1* inoculated with race 0; a. 0 h CK; b. 24 h CK; c. 48 h CK; d. 72 h CK; e. Race 1-24 h; f. Race 1-48 h; g. Race 1-72 h; h. Race 0-24 h; i. Race 0-48 h; j. Race 0-72 h; M. Marker: pBR322/ *Msp*I; A. Gene fragments expressed exclusively; B. Gene fragments expressed increasingly; C. Gene fragments expressed decreasingly.

图 2 (1,2) 筛选差异条带

Fig. 2 (1,2) Examination of differential fragments

2.2 mRNA 差异显示

利用 3 个锚定引物和 26 个随机引物构成 78 个引物组合,对获得的 cDNA 进行 PCR 扩增。经聚丙烯酰胺凝胶电泳和银染检测,获得差异片段 107 条(图 2),对其进行回收和二次扩增,得到扩增条带 98 条(图 3),回收率为 92.0%。将这些片段进行反式 Northern 杂交,得到阳性片段 46 条(图 4)。其中仅在非亲和性交互中表达,亲和性交互及对照中不表达的片段 7 条;较亲和性交互及对照表达量明显增加的片段 21 条;较亲和性交互及对照表达量明显

减少的片段 18 条。

2.3 阳性片段的克隆测序和同源性分析

对所获得的非亲和性交互中特异表达的 7 条基因片段进行克隆测序及同源性分析,结果发现它们的长度分布在 213 ~ 516 bp,均含有 poly(A) 结构和可阅读框架(ORF)。利用 DNASTar 软件得到上述片段的可阅读框架(ORF)和蛋白质序列,通过 NCBI 网站的 GenBank 数据库对这些基因片段及蛋白质序列进行 BLAST 分析,结果表明它们与已知抗病基因没有同源性,可能为未知基因。

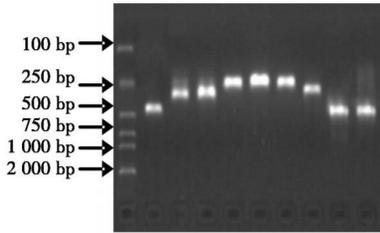


图3 部分回收片段二次扩增产物的电泳检测结果

Fig. 3 Results of agarose electrophoresis of secondary amplification

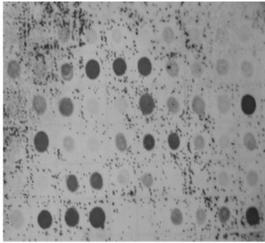


图4 反式 Northern 杂交检测结果

Fig. 4 Results of the reverse Northern blotting detection

3 讨论

自从 Liang 和 Pardee^[10] 在 1992 年创立 mRNA 差别显示技术 (mRNA differential display) 以来, 利用此项技术已成功分离了许多与植物发育、植物激素调控以及与植物抗病性相关的基因或基因片段, 该方法特别适用于多种平行材料之间基因表达的比较研究。本试验选用玉米抗大斑病自交系 B37 *Ht1* 及玉米大斑病菌 0 号小种 01-27 和 1 号小种 01-23 作为试验材料, 利用 mRNA 差异显示技术从基因表达整体水平上, 研究了非亲和与亲和相互作用中基因表达的差异, 发现在非亲和性相互作用中表达, 亲和性相互作用及对照中不表达的片段 7 条; 较亲和性相互作用及对照表达量明显增加的片段 21 条; 较亲和性相互作用及对照表达量明显减少的片段 18 条。并对所获得的非亲和性相互作用中特异表达的 7 条基因片段进行克隆测序及同源性分析, 尽管结果表明与已知抗病基因间没有同源性, 但它们为非亲和相互作用中所特有, 因此, 有必要通过 RACE 技术获得这些基因的全长, 阐明这些基因的身份及在玉米抗病过程中所起的作用。

mRNA 差异显示技术的主要问题之一是假阳性, 即聚丙烯酰胺凝胶 (PAG) 上显示的信号差异并非真正的基因表达的差异。目前解决此问题的主要方法

之一就是运用反式 Northern blot 分析鉴定扩增出的信号差异, 由此本试验最终共获得 7 条非亲和性相互作用中特异表达的差异片段。

经过克隆测序及同源性分析, 发现上述 7 条片段与目前已知基因同源性很低, 可能为未知基因, 而且利用 mRNA 差异显示技术获得的 cDNA 片段往往只位于 3' 端的非编码区。为了进一步确定它们在玉米抗大斑病过程中的功能及其调控机制, 需要继续通过筛选 cDNA 文库和 RACE 方法来获得这些基因片段的全长序列。

参考文献:

- [1] 王庆华, 杨继良, 尹小燕, 等. 玉米大斑病抗性基因的 DNA 分子标记研究进展 [J]. 玉米科学, 2002, 10(2): 93 - 96.
- [2] 王静辉, 宋运淳, 杭超, 等. 玉米大斑病抗性基因 *Ht2* 的原位杂交物理定位 [J]. 武汉大学学报, 1998, 44(4): 465 - 468.
- [3] 李立家, 宋运淳, 鄢慧民, 等. 染色体定位两个与玉米大斑病抗性基因 *Ht1* 连锁的 RFLP 标记 [J]. 植物学报, 1998, 40(12): 1093 - 1097.
- [4] 李立家, 宋运淳, 鄢慧民. 两个与玉米大斑病抗性基因 *Htn1* 连锁的 RFLP 标记的原位杂交定位 [J]. 植物病理学报, 1998, 28(2): 117 - 121.
- [5] 杨继良, 王斌. 玉米大斑病抗性遗传的研究进展 [J]. 遗传, 2002, 24(4): 501 - 506.
- [6] 尚俊军, 余潮, 邹燕, 等. 玉米对大斑病菌抗性中防卫基因的 RT-PCR 研究 [J]. 南昌大学学报, 2002, 26(2): 138 - 142.
- [7] Visioli G, Maestri E, Mammiroli N. Differential display-mediated isolation of a genomic sequence for a putative mitochondrial LMW HSP specifically expressed in condition of induced thermotolerance in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh [J]. Plant Mol Biology, 1997, 34: 517 - 527.
- [8] 梁德勇, 王晓民, 崔振中, 等. 银染 mRNA 差异显示方法的条件优化 [J]. 中国神经科学杂志, 1999, 15(2): 151 - 155.
- [9] 张义平, 陈学峰, 熊建华. 运用银染同 RNA 差异显示方法分析杂交水稻红莲优 6 号基因表达差异 [J]. 江西农业大学学报, 2003, 25(4): 493 - 497.
- [10] Liang P, Pardee A B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction [J]. Sci, 1992, 257: 967 - 970.