

文章编号: 1003-8701(2015)04-0060-05

霜霉病菌诱导 PRs 基因在大白菜中的表达

陈晓峰¹, 马清华², 牟晋华¹, 王百川¹

(1. 中国农业大学烟台研究院, 山东 烟台 264670;

2. 南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室, 南京 210095)

摘要:为研究病程相关蛋白 (PRs) 基因与植物对霜霉病原菌抗性关系, 本研究以大白菜抗病品种为材料, 采用实时定量 PCR 技术检测接种 *Peronospora parasitica* 后 4 种 PRs 基因的表达。结果表明, *P. parasitica* 接种处理显著诱导了 PR-4 和 class IV 几丁质酶基因在大白菜抗病品种中的表达, β -1,3-葡聚糖基因的表达却呈现双峰曲线特点, PR-1 基因表达量没有变化。PRs 基因的表达特点表明其在大白菜对霜霉病害抗性中起到了不同的作用。

关键词: 大白菜; 病程相关蛋白; 霜霉病菌; 实时定量 PCR

中图分类号: S634.1

文献标识码: A

PRs Genes Expression in Chinese cabbage Induction by *Peronospora parasitica*

CHEN Xiao-feng¹, MA Qing-hua², MU Jin-hua¹, WANG Bai-chuan¹

(1. Yantai Research Institute of China Agricultural University, Yantai 264670;

2. State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: In order to investigate the relationship between pathogenesis-related proteins (PRs) genes and plant resistance against *Peronospora parasitica*, four PRs genes expression were examined after inoculation with *Peronospora parasitica* in resistant Chinese cabbage variety by using real-time quantitative PCR (RT-PCR) technology. Results showed that PR-4 gene and class IV chitinase genes expression were significantly induced by inoculation treatment, β -1,3-glucanase gene expression showed two single peaks, but PR-1 gene expression showed no change by inoculation treatment. PRs genes transcription in resistant variety showed they may play different roles in Chinese cabbage resistance against *Peronospora parasitica*.

Key words: Chinese cabbage; Pathogenesis-related proteins (PRs); *Peronospora parasitica*; Real-time quantitative PCR (RT-PCR)

霜霉病原菌 (*Peronospora parasitica* Pers. Ex Fr.) 可侵染多种芸薹属作物, 也是大白菜霜霉病主要致病菌。该病原菌在春秋两季可迅速侵染大白菜叶片, 造成蔬菜产量损失^[1]。由于该病菌生理小种进化迅速, 常规抗性育种和化学药物防治效果不太明显^[2-3], 通过远缘杂交或抗病转基因是增强作物对真菌生理小种抗性有效的方法^[4]。多年的生产实践得知, 大白菜抗病品种“新烟杂 3 号”

是烟台地区一种优良的抗真菌病害材料, 对真菌病害具有广谱抗性, 其特异的抗病性状已经通过杂交手段转移到其他的感病品种中, 获得了一批对真菌病害表现出不同抗性的近等位基因系, 这些材料也成为研究大白菜霜霉病抗性最好的遗传材料。

植物抵抗病原菌的侵染方式主要包括结构抗性、生理生化抗性以及分子抗性等几种途径。分子抗性主要是指基因抗性, 它是病原菌在侵染过程中, 寄主植物体内通过抗病基因与感病基因的相互作用所激发起的抗病性^[5]。抗性基因分为微效基因和主效基因, 由于抗性微效基因研究存在

收稿日期: 2014-12-28

基金项目: 山东省自然科学基金项目 (ZR2012cq019)

作者简介: 陈晓峰 (1979-), 男, 助理研究员, 博士, 主要研究方向为植物分子生物学。

较大困难,因此当前研究主要是集中在抗性主效基因的鉴定、克隆及表达,并在此基础上深入研究抗性基因的功能及其作用机制^[6]。植物抗病性表达的主效基因,主要是防卫素和病程相关蛋白(pathogenesis-related proteins, PRs)基因^[7]。各种病原菌均可诱导 PRs 基因的产生,且 PRs 基因不但在侵染组织表达,在未侵染的其他组织上也出现累积,可在较长时间内有效抵抗该病原菌侵染或其他病原物侵染,使整个植株产生系统的抗性,即系统获得抗性 SAR(Systemic acquired resistance, SAR)^[7-8],因此关于 PRs 基因的诱导表达和转 PRs 基因增强植物抗病性就成为当前研究热点。由于不同植物中 PRs 基因受病原菌或者外源物质诱导表达特点各有不同,因此本文对 4 种 PRs 基因诱导表达特点进行了研究,为深入了解病原菌与寄主之间的相互作用机制,利用 PRs 基因等方面奠定理论基础。

本文对大白菜中 4 种重要的 PRs 基因与真菌病原菌抗性关系进行了初步研究,为未来利用这些基因培育抗真菌病害的大白菜新品种奠定了理论基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

供试材料为大白菜抗病品种“新烟杂 3 号”,由中国农业大学烟台研究院提供。大白菜种子经 0.1% HgCl₂ 消毒后,种植于人工气候箱中,培养条件为温度 20~25℃,光周期 12 h/12 h,相对湿度 60%,待幼苗长至 4~6 片真叶时取材接种。

1.2 真菌接种液的制备和接种程序

霜霉病菌(*P. parasitica*)接种液的制备参照王彦华^[9]的方法,最终配成 1×10⁵ 个/mL 孢子囊悬浮液。处理组每个单株叶片用棉棒涂抹约 100 μL 的悬浮液,对照组用纯水代替。诱导处理后植株需遮光、保湿处理 24 h,然后揭掉遮光物,于人工气候箱在 20~25℃、12 h/12 h 光周期、相对湿度(85±5)% 条件下培养,直至采样结束,每个处理设 3 个重复。

1.3 实时定量 PCR 检测 *P. parasitica* 诱导 PRs 基因表达特征

1.3.1 引物设计

在大白菜数据库中选取所需的 PR-1 基因、PR-4 基因、几丁质酶 CHB4 基因和 β-1,3-葡聚糖酶基因,以肌动蛋白 Actin 基因作为内参,利用 Primer 5.0 软件进行引物设计,引物序列见表 1。

表 1 用于实时定量 PCR 检测的引物

PRs 基因和登陆号	引物	引物序列
PR-1 (GenBank: AY623008)	F	5'-GCTCACAACCAAGCAGCAG-3'
	R	5'-TGCCACATCCGATTCTCACAG-3'
PR-4 (GenBank: AF528181)	F	5'-GTTGCTATGTGCCTTTGCTGC-3'
	R	5'-CGTATCCCTGCCCTCTGTAT-3'
β-1,3-葡聚糖 (GenBank: X77990)	F	5'-TTCTTCTCAGCCTTCTAATGG-3'
	R	5'-CCTGGTTTCACCTCGTTTCC-3'
几丁质酶 (CHB4) (GenBank: AB257452)	F	5'-ATGTTTGCTCATTTACCCAC-3'
	R	5'-CACCGTTACACTCCATTCCA-3'
Actin (GenBank: JN120480)	F	5'-GTGACAATGGAAGTGAATGGT-3'
	R	5'-AGACGGAGGATAGCGTGAGG-3'

1.3.2 总 RNA 提取和 cDNA 合成

用 *P. parasitica* 侵染处理大白菜叶片,处理时间分别为 0 h、6 h、12 h、24 h、36 h、48 h、72 h 和 96 h,纯水处理作为对照。利用 Trizol reagent (Invitrogen, 上海)试剂盒分别提取不同处理的大白菜叶片总 RNA,然后逆转录成 cDNA。

利用 Trizol reagent (Invitrogen, 上海)分别提取 *P. parasitica* 侵染处理和纯水处理 0 h、6 h、12 h、24 h、36 h、48 h、72 h 和 96 h 的大白菜叶片,利用

逆转录酶将 mRNA 合成为 cDNA。

1.3.3 实时定量 PCR 反应体系和反应程序

采用 Bio-Rad CFX96 型荧光定量 PCR 仪检测 PRs 基因转录表达情况。RT-PCR 反应总体体系为 20 μL (见表 2)。具体反应程序为:95℃ 变性 3 min;95℃ 10 s,54.8℃ 30 s,40 个循环;95℃ 10 s;53.8℃ 10 s;融解曲线测定从 65℃到 95℃。每个处理设 3 次重复,试验数据分析采用 2^{-ΔΔCT} 法进行相对表达量分析^[10]。

表2 实时定量PCR反应体系 μL

SYBR Premix ExTag TM II	10
上游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$)	0.5
下游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$)	0.5
cDNA 模板	2.0
ddH ₂ O	7.0
总体积	20

2 结果与分析

2.1 *P. parasitica* 侵染对大白菜几丁质酶基因表达的影响

从图1中可以看出, *P. parasitica* 可明显诱导 CHB4 基因在大白菜叶片中的表达。诱导处理 6 h 后几丁质酶 CHB4 基因表达量明显增加, 此后该基因表达量急剧上升, 诱导处理 24 h 后达到最高, 与对照相比表达量增加了 135 倍。诱导处理 36 h 后 CHB4 基因表达量迅速下降, 36 h 处理组只有对照组表达量的 26 倍左右, 48 h 后处理组几丁质酶基因 CHB4 表达量略有升高, 72 h 后表达量迅速降低, 仅为对照组的 9.8 倍, 此后处理组基因

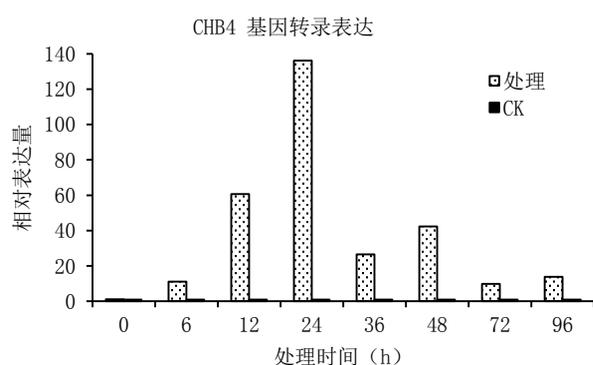


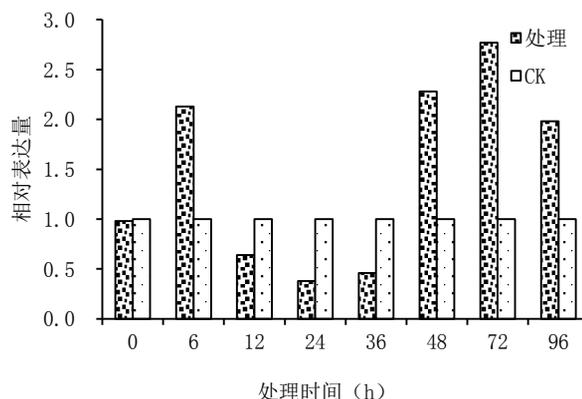
图1 实时定量PCR检测大白菜几丁质酶基因表达

注: 每个柱形图表示 3 次测量, 每次测量为 3 个重复的平均值, 不同处理时间对照组叶片中几丁质酶基因转录表达量设为 1.0。下同

表达量一直维持在一个平稳的水平。

2.2 *P. parasitica* 侵染对大白菜 β -1,3-葡聚糖酶基因表达的影响

从图2可以看出, 霜霉病原菌侵染后 β -1,3-葡聚糖酶基因呈现双峰表达特点, 即表达量先升高后降低再升高。接种 6 h 后, β -1,3-葡聚糖基因表达量与对照相比增加 100%, 诱导处理 12 h 表达量与对照相比降低了大约 35%, 处理 12 h 后达到最低表达量, 只有对照的 38%, 此后 β -1,3-葡聚糖基因表达量开始升高, 侵染处理 48 h 至 96 h 后 β -1,3-葡聚糖基因表达量均比对照高大约 100%,

图2 实时定量PCR检测大白菜 β -1,3-葡聚糖酶基因表达

且最高点出现在诱导处理 72 h。

2.3 *P. parasitica* 侵染对大白菜 PR-1 基因表达的影响

从图3可以看出, PR-1 基因转录表达量在处理组和对照组相差不大, 并未受到霜霉病原菌侵

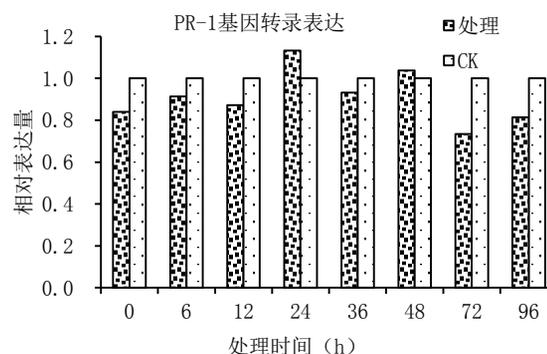


图3 实时定量PCR检测大白菜 PR-1 基因表达

染的影响。

2.4 *P. parasitica* 侵染对大白菜 PR-4 基因表达的影响

从图4可以看出, 霜霉病原菌侵染可明显诱导 PR-4 基因表达。与对照相比, PR-4 基因从诱

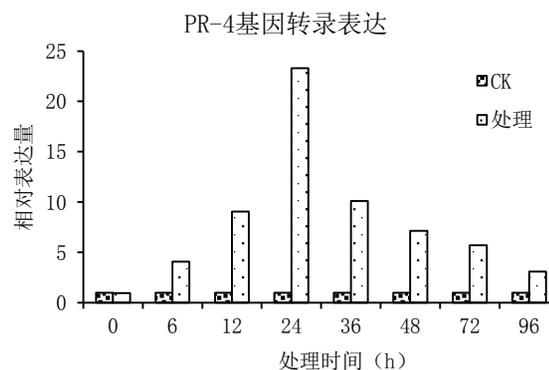


图4 实时定量PCR检测大白菜 PR-4 基因表达

导处理 6 h 就呈现明显的升高趋势,此后表达量迅速升高,在诱导处理 24 h 后达到最高表达量,此时处理组是对照组表达量的 23.28 倍。诱导处理 36 h 后 PR-4 基因表达量缓慢下降,96 h 后处理组 PR-4 基因表达量仅为对照组的 3.08 倍。

3 讨论

PR 蛋白最早是在病原菌侵染的烟草中发现的,所以它的主要功能与植物的抗病性相关。本研究中采用 *P. parasitica* 侵染处理观察 PRs 基因表达情况,结果发现 *P. parasitica* 可明显诱导几丁质酶 CHB4 基因转录表达水平的提高,且 CHB4 基因表达量一直处于较高的水平,这与霜霉病菌诱导不结球白菜 *Bechi* 表达特点相似^[11],但大白菜 CHB4 基因在转录表达达到最高点后,呈现轻微波浪状降低趋势,也有研究者发现几丁质酶基因呈现双峰曲线表达特点^[12],这可能是不同的病原菌侵染或者不同信号传导途径导致。本研究中的 CHB4 基因属于 class IV 几丁质酶,在水杨酸诱导处理的不结球白菜中 class IV 几丁质酶基因表达量增加明显,参与 SAR 抵御 *Alternaria brassicicola* 的侵染^[13],这些都说明大白菜 CHB4 基因与 SAR 必然存在一定的关联性。

本研究中发现 β -1,3-葡聚糖酶基因转录表达呈现双峰表达特点,且表达量较对照增加不明显,而在 *P. parasitica* 侵染的不结球白菜^[9]和青花菜^[14]抗病品种中 β -1,3-葡聚糖酶基因呈现单波表达特点。在番茄和烟草中 β -1,3-葡聚糖酶基因均容易受到真菌病原菌诱导,且表达量较正常植株有明显的增加^[15-16]。本研究中 β -1,3-葡聚糖酶基因转录表达不明显,有研究者认为可能是由于葡聚糖酶在植株中以低水平组成性表达^[17],且 β -1,3-葡聚糖酶的表达受限于宿主或品种专一性^[18],在烟草中就发现对 TMV 高度敏感基因型可明显诱导该基因的表达^[17],也有研究者发现 β -1,3-葡聚糖酶表达具有组织特异性,在幼嫩的茎叶表达量较少,在老叶中表达量较高^[19]。是否存在对真菌病原菌侵染敏感程度不同的大白菜抗性材料,以及 β -1,3-葡聚糖酶基因是否具有组织表达特异性都是需要重点研究的方面。

PR-1 蛋白是最早发现与病原菌抗性相关的 PR 蛋白,参与植物对多种生物和非生物逆境胁迫反应,植物 SAR 的标志基因^[20],其在植物体存在酸性和碱性两种异构体,碱性 PR-1 蛋白的抗真菌特性相对较强。通过转基因研究发现转 PR-1 基因

烟草增强了对两种真菌病原菌侵染的抗性^[21],说明 PR-1 基因参与植物对真菌病害的抗性反应。本研究中 PR-1 蛋白为碱性异构体,且 PR-1 基因在抗病大白菜品种中并未受到 *P. parasitica* 诱导表达。葡萄和小麦中真菌病原菌侵染均能够诱导 PR-1 基因的表达^[20,22],抗病品种中该基因表达量增加较为迅速,丰度较高。李雪姣等^[23]发现水稻 PR-1 蛋白在植物体内有一定的组成性表达且与发育阶段有一定关系,绝大部分类型的 PR-1 蛋白受到病原菌诱导表达上调,部分 PR-1 蛋白表达量不受影响。胡宗利等^[24]研究也发现 PR-1 基因在番茄中具有组织表达特异性,在叶片中的表达量较少,这些研究也印证了本试验中所发现 PR-1 基因诱导表达不明显的现象。

本研究同样对 *P. parasitica* 诱导大白菜 PR-4 基因的诱导表达特点进行了分析,结果发现霜霉病菌可以明显诱导该基因的表达,PR-4 基因呈现单峰表达特点,这与真菌病原菌诱导大白菜和不结球白菜 PR-4 基因表达特征相符^[25]。有研究者发现在真菌病原菌侵染的初始阶段,PR-4 基因发挥了几丁质类似物结合能力的作用,促进了真菌细胞壁几丁质的降解与死亡,因此 PR-4 基因在一些作物中也归于内源几丁质一类,从表达特点也可以看出 PR-4 基因与几丁质酶基因表达特点相似,对病毒侵染表达不明显,没有明显抗性^[26]。水杨酸 SA 可诱导 PR-4 基因表达,参与植物对 SAR 对真菌病原菌的抗性,因此 PR-4 基因也是参与植物 SAR 的标志基因^[27]。

本研究对 4 种 PRs 基因与霜霉病菌互作中的相互关系进行了研究,为研究 PRs 基因在大白菜抗病中的作用做进一步的阐述,为未来基因改造、转基因研究提供理论基础。未来对 PRs 基因的调控机理,包括组织表达特异性和发育阶段的调控的研究仍然是需要重视的一个方面,对大白菜 SA 和 MeJA 信号传导途径在 PRs 基因的调控中所起到的作用需要更深入研究。

参考文献:

- [1] Monot C, Pajot E, Le Corre D, et al. Induction of systemic resistance in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) against downy mildew (*Peronospora parasitica*) by a virulent isolates [J]. *Biological Control*, 2002(24): 75-81.
- [2] Gunn N D, Beynon J L, Holub E B. Outcrossing of two homothallic isolates of *Peronospora parasitica* and segregation of avirulence matching six resistance loci in *Arabidopsis thaliana*[A]. *Proceedings of the 7th International Congress of Plant Pathology* [C]. Edinburgh, Scotland, 1998.
- [3] Lucas J A, Crute I R, Sheriff C, et al. The identification of a

- gene for race specific resistance to *Peronospora parasitica* (downy mildew) in *Brassica napus* spp. *oleifera* (oilseed rape)[J]. *Plant Pathol*, 1998, 37(4): 538-545.
- [4] Muthukrishnan S, Liang G H, Trick H N, et al. Pathogenesis-related proteins and their genes in cereals[J]. *J Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2001(64): 93-114.
- [5] 李 森, 檀根甲, 承河元, 等. 植物抗病性研究现状与前景展望[J]. *江西农业大学学报(自然科学版)*, 2002, 24(5): 731-736.
- [6] 董继新, 董海涛, 李德葆. 植物抗病基因研究进展[J]. *植物病理学报*, 2001, 31(1): 1-8.
- [7] 张 玉, 杨爱国, 冯全福, 等. 植物病程相关蛋白及其在烟草中的研究进展[J]. *生物技术通报*, 2012(5): 20-24.
- [8] 刘红霞, 赵晨辉, 刘 洋, 等. 植物系统获得抗病性及其信号调控[J]. *吉林农业科学*, 2012, 37(2): 38-41, 51.
- [9] 王彦华, 侯喜林, 申书兴. 不结球白菜 β -1,3-葡聚糖酶基因 cDNA 全长的克隆与表达分析[J]. *农业生物技术学报*, 2006, 14(6): 917-921.
- [10] Pfaffl M W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR[J]. *Nucleic Acids Research*, 2001, 29(9): 45.
- [11] Chen X F, Hou X L, Zhang J Y, et al. Molecular characterization of two important antifungal proteins isolated by downy mildew infection in non-heading Chinese cabbage[J]. *Molecular Biology Reports*, 2008, 35(4): 621-629.
- [12] Busam G, Kassemeyer H H, Matern U. Differential expression of chitinases in *Vitis vinifera* L. responding to systemic acquired resistance activators or fungal challenge[J]. *Plant Physiol*, 1997, 115(33): 1029-1038.
- [13] 王利英, 侯喜林, 陈晓峰. 水杨酸诱导不结球白菜抗黑斑病机制的探讨[J]. *南京农业大学学报*, 2009, 32(4): 23-27.
- [14] 靳敏峰, 侯喜林. 青花菜 β -1,3-葡聚糖酶基因的克隆、表达分析及其植物表达载体的构建[J]. *南京农业大学学报*, 2008, 31(2): 27-31.
- [15] Young D H, Pegg G F. The action of tomato and *Verticillium albo-atrum* glycosidases on the hyphal wall of *V. albo-atrum* [J]. *Physiol Plant Pathol*, 1982(21): 411-423.
- [16] Van den L F R, Abelin C A E, Hesselings-Meinders A, et al. A putative β -1,3-glucanase pseudogene behind the potato GBSS gene[J]. *Plant Mol Biol*, 1993(21): 567-571.
- [17] Vogeli-Lange R, Hansen-Gehri A, Boller T, et al. Induction of the defense-related glucanohydrolases, β -1,3-glucanase and chitinase, by tobacco mosaic virus infection of tobacco leaves[J]. *Plant Sci*, 1988(54): 171-176.
- [18] 邢全华, 王 斌. 植物葡聚糖酶基因抗病作用的研究进展[J]. *遗传*, 2002, 24(6): 715-720.
- [19] Felix G, Meins F J. Developmental and hormonal regulation of β -1,3-glucanase in tobacco[J]. *Planta*, 1986(167): 206-211.
- [20] 侯丽霞, 高 超, 车永梅, 等. 葡萄病程相关蛋白1基因的克隆和表达分析[J]. *植物生理学报*, 2012, 48(1): 57-62.
- [21] Alexander D, Goodman R M, Gut-Rella M, et al. Increased tolerance to two oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis-related protein 1a [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993(90): 7327-7331.
- [22] 牛吉山, 刘 瑞, 郑 磊. 小麦PR-1、PR-2、PR-5基因的白粉菌和水杨酸诱导表达分析及白粉病抗性研究[J]. *麦类作物学报*, 2007, 27(6): 1132-1137.
- [23] 李雪姣, 范 伟, 牛东东, 等. 水稻病程相关PR1家族蛋白在叶片生长及与白叶枯病菌互作反应中的表达[J]. *植物学报*, 2014, 49(2): 127-138.
- [24] 胡宗利, 邓 磊, 姚 楠, 等. 番茄PR-1和PR-5基因的表达特性分析[J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2009, 31(8): 67-72.
- [25] 陈晓峰, 侯喜林, 刘 琳. 不结球白菜PR4蛋白基因的克隆与诱导表达分析[J]. *西北植物学报*, 2008, 28(1): 1-6.
- [26] 秦 朝, 王 斐, 刘 祥, 等. 蜡梅CpPR-4基因的克隆及植物表达[J]. *西南师范大学学报*, 2012, 37(12): 98-101.
- [27] Niu J S, Liu J, Ma W B, et al. The relationship of methyl jasmonate enhanced powdery mildew resistance in wheat and the expressions of 9 disease resistance related genes[J]. *Agricultural Science & Technology*, 2011, 12(4): 504-508.

(责任编辑:姜晓莉)