

水稻响应稻瘟病菌胁迫的 cDNA-AFLP 分析

张俊华¹, 常浩¹, 陈宇飞², 潘春清¹, 刘扬¹, 牟明¹, 李云鹏¹

(1. 东北农业大学农学院, 哈尔滨 150030; 2. 东北农业大学应用技术学院, 哈尔滨 150030)

摘要:本研究采用 cDNA-AFLP 技术建立了水稻与稻瘟病菌互作的基因表达图谱, 对差异表达基因功能进行分析。利用 64 对引物进行筛选, 共获得了 960 个转录衍生片段(transcript-derived fragment TDF)。回收测序 200 条片段, 获得 134 条可读序列, 通过 BLAST 比对分析, 得到 74 个不重复的差异 TDFs。对 74 个 TDFs 对应的聚丙烯酰胺凝胶上表达变化情况进行统计, 接种稻瘟病菌后基因诱导表达上调多余下调表达, 早期上调表达基因有 6 个, 晚期上调表达基因有 11 个, 其他形式上调表达基因 32 个, 各种下调表达基因 25 个。

关键词:水稻; 稻瘟病菌; 胁迫表达; cDNA-AFLP; TDF

中图分类号: S435.111.4*1

文献标识码: A

文章编号: 1003-8701(2016)04-0070-05

Analysis of the cDNA-AFLP on Rice Response to *Magnaporthe grisea* Stress

ZHANG Junhua¹, CHANG Hao¹, CHEN Yufei², PAN Chunqing¹, LIU Yang¹, MU Ming¹, LI Yunpeng¹

(1. College of Agronomy, Northeast Agricultural University, Harbin 150030; 2. College of Applied Technology, Northeast Agriculture University, Harbin 150030, China)

Abstract: In this study, the cDNA-AFLP technique was used to establish the gene expression profiles of rice infected by *Magnaporthe grisea*, and the function of differential display expressed genes was analyzed. Nine hundred sixty transcript derived fragments were obtained by using 64 pairs of primers. Two hundred fragments were recovered and sequenced, one hundred thirty four readable sequences were obtained. Seventy four non duplicated TDFs were gotten by BLAST analysis. Among the statistical expression of 74 TDFs corresponding on PAGE, the number of up-regulation genes was more than down-regulation genes after inoculated by *Magnaporthe grisea*, six were early up-regulation genes, eleven were late up-regulation genes, thirty two were other forms of up-regulation genes, the total number of down-regulation genes was 25.

Key words: Rice; *Magnaporthe grisea*; Stress-expression; cDNA-AFLP; TDF

稻瘟病是由稻瘟病菌(*Magnaporthe grisea*)侵染引起的一种真菌病害, 是水稻生产上最具毁灭性的病害之一, 对稻米的产量和品质均造成严重的影响^[1]。抗病品种的选育和利用是控制稻瘟病最经济有效的措施。研究水稻与稻瘟病菌互作的机理, 通过揭示水稻的抗稻瘟病机制, 将为抗病品种合理布局、培育高效广谱抗病品种提供重要的理论依据。研究水稻抗稻瘟病的分子机制已成

为水稻抗病育种工作者一个重要而又紧迫的任务。目前, 在抗病机制研究领域, 分子生物学能够从基因水平上直接了解抗病相关基因的表达种类和表达程度, 成为研究抗病机制准确、有效的方法。近几年, 涌现了许多基于 PCR 的寻找差别表达基因的新方法^[2], 其中, cDNA-AFLP(complementary DNA-amplified fragment length polymorphism)技术作为一种高通量的全基因组表达分析工具, 是分析基因表达水平及差异表达基因分离有力的手段, 已经成为一种重要的转录基因组学研究工具^[3]。其具有多态性高、信息量大, 可重复性高、灵敏度高、假阳性低、在一次试验中可以鉴定多组细胞群基因转录谱, 所需 RNA 量较小, 无需提前了解生物体序列信息、集中显示基因组表达序列差异性、对生物体转录组进行全面系统的分析等优点^[4], 在植物抗病、抗逆、植物生长发育

收稿日期: 2016-03-05

基金项目: 哈尔滨市应用技术研究与开发项目(2014AB6BN036); 黑龙江省粮食作物新品种选育及持续增产栽培技术创新平台项目(2011 计划项目); 黑龙江省教育厅科学技术研究项目(11551041); 博士后研究人员落户黑龙江科研启动资助项目(LBH-Q09172)

作者简介: 张俊华(1973-), 男, 教授, 博士研究生导师, 主要从事寄主与病原物互作研究。

研究及转录图谱构建等领域被广泛用于对基因差异表达的研究^[5-8]。本研究以探讨水稻与稻瘟病菌互作的分子机制为切入点,采用cDNA-AFLP技术建立与稻瘟病菌互作后水稻基因表达图谱,对差异表达基因进行了功能分析,以期获得水稻抗稻瘟病新基因,从抗病基因表达的水平上探索水稻对稻瘟病的抗病机制,为进一步培育抗病品种提供理论基础及技术依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

水稻材料:水稻抗病品种特特普(TeTep)由江苏省农科院馈赠。

供试病原菌:东北农业大学植物病研究室于2008年分离保存致病性较强的稻瘟病菌菌株py0821。

1.2 试验方法

1.2.1 接种及取样

采用常规方法育苗,当水稻幼苗长到4叶期时,用小喷雾器将浓度为 1×10^5 个/mL孢子悬浮液进行隔离喷雾接种^[9],将接种后的水稻幼苗置于保湿棚内,分别在接种稻瘟病菌0 h、4 h、8 h、12 h、16 h、20 h、24 h后取样,每次约0.2 g叶片,样品经液氮处理后置于 -80°C 冰箱保存备用。

1.2.2 总RNA提取和双链cDNA合成

采用德国Qiagen公司RNeasy Plant Mini Kit试剂盒提取叶片RNA,采用1.0%琼脂糖凝胶电泳检测RNA完整性。双链cDNA的合成按照TaKaRa公司M-MLV RTase cDNA Synthesis kit试剂盒提供的方法,cDNA的纯化按照TakaRa公司的DNA Fragment Purification kit试剂盒的说明书进行,离心干燥后溶于水中, -20°C 保存备用。

1.2.3 双链cDNA酶切和连接

参考刘冬梅^[10]的方法,采用Taq I/Ase I酶切组合对所获得的ds cDNA进行双酶切。首先用Taq I酶进行第一次酶切,反应体系为20 μL :cDNA 10 μL ,Taq I (10U) 1.0 μL ,10 \times Buffer 2.0 μL ,100 \times BSA 0.2 μL ,ddH₂O 6.8 μL ,65 $^\circ\text{C}$ 水浴4 h。用Ase I酶进行第二次酶切,反应体系为25 μL :上述溶液20 μL ,Ase I (10U) 1.0 μL ,10 \times Buffer 0.5 μL ,ddH₂O 3.5 μL ,37 $^\circ\text{C}$ 水浴2 h, -20°C 保存备用。连接体系:10 μL 酶切产物,Taq I接头1.0 μL ,Ase I接头1.0 μL ,T₄DNA连接酶0.2 μL ,10 \times 连接酶Buffer 4.0 μL ,ddH₂O 23.8 μL ,16 $^\circ\text{C}$ 连接8 h,分装后, -20°C 保存。

1.2.4 cDNA-AFLP分析

参考许锦彪^[11]的方法,利用经过优化的体系和程序进行cDNA-AFLP分析。预扩增反应体系25.0 μL :模板5.0 μL ,Taq I预扩增引物1.0 μL ,Ase I预扩增引物1.0 μL ,dNTP Mix 2.0 μL ,10 \times PCR Buffer 2.5 μL ,Taq酶0.5 μL ,ddH₂O 13.0 μL 。PCR扩增程序如下:首先94 $^\circ\text{C}$ 5 min,然后94 $^\circ\text{C}$ 30 s,55 $^\circ\text{C}$ 30 s,72 $^\circ\text{C}$ 1 min,25个循环;最后72 $^\circ\text{C}$ 10 min。将预扩增产物稀释40倍,用于选择性扩增模板。选用10个Taq I引物和10个Ase I引物,组合成100对选择性扩增引物,进行PCR选择性扩增,反应体系25.0 μL ,预扩增产物稀释物5.0 μL ,Taq I选择性扩增引物1.0 μL ,Ase I选择性扩增引物1.0 μL ,dNTP Mix 2.0 μL ,10 \times PCR Buffer 4.0 μL ,Taq酶0.5 μL ,ddH₂O 11.5 μL 。PCR扩增程序如下:首先94 $^\circ\text{C}$ 300 s;然后94 $^\circ\text{C}$ 30 s,65~56 $^\circ\text{C}$ ($-0.7^\circ\text{C}/\text{循环}$)30 s,72 $^\circ\text{C}$ 60 s,12个循环;随后94 $^\circ\text{C}$ 30 s,接着56 $^\circ\text{C}$ 30 s,72 $^\circ\text{C}$ 60 s,72 $^\circ\text{C}$ 600 s,24个循环;最后4 $^\circ\text{C}$ 保存。扩增产物在6%的聚丙烯变性凝胶上电泳,银染检测^[12]。

1.2.5 差异片段二次扩增和回收

参考刘雪梅^[13]的方法,用乙醇灭菌后刀片将差异片段从聚丙烯酰胺凝胶上切下,将其放入1.5 mL灭菌的离心管中,加入60 μL 灭菌蒸馏水,100 $^\circ\text{C}$ 煮沸20 min,13 000 r/min离心15 min,吸收上清液 -20°C 保存。取上清液5 μL 进行PCR扩增,扩增条件同前面相应的选择性扩增条件。扩增产物在1.0%琼脂糖凝胶上电泳,采用DNA纯化回收试剂盒进行纯化回收。

1.2.6 差异片段的克隆及序列分析

将回收的差异cDNA片段克隆到PMD-18T载体上(TaKaRa,Japan)由上海生工生物有限公司测序。将TDF测序结果在NCBI(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)的数据库中上进行BLAST分析比对,找出同源性高的片段推测其蛋白质功能并对基因进行分析 and 归类^[14]。

2 结果与分析

2.1 水稻叶片总RNA提取

用紫外分光光度计测定提取得到的水稻RNA的吸光度, A_{260}/A_{280} 的比值介于1.81~2.19之间。经1%琼脂糖凝胶电泳检测(图1),有3条较亮的条带,接着下一步进行反转录试验。

2.2 将mRNA反转录为cDNA

mRNA直接用来反转录合成cDNA,并将合成

后的双链 cDNA 取 4 μ L 用于 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,电泳结果可以清楚地看到 500 ~ 4 000 bp 范围内均匀弥散带(如图 2),结果说明水稻叶片 mRNA 的反转录效果较为理想,所获得的水稻叶片 cDNA 可用于下一步的酶切以及扩增试验。

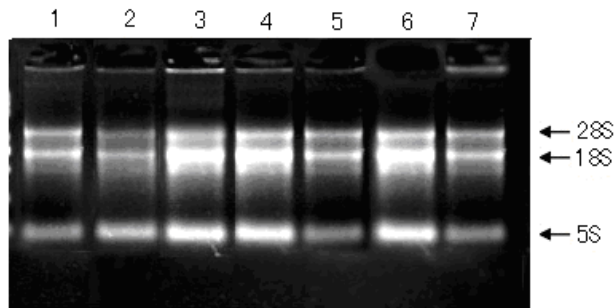


图1 琼脂糖凝胶电泳检测水稻叶片总 RNA

1~7泳道分别为接菌处理 0 h, 4 h, 8 h, 12 h, 16 h, 20 h, 24 h 后样品提取的 RNA

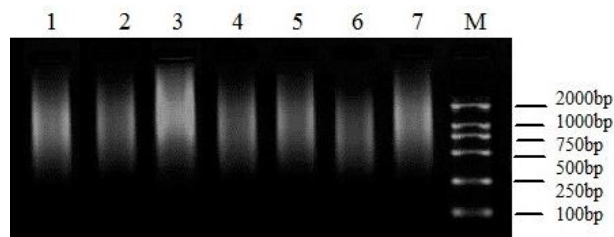


图2 水稻叶片 cDNA 电泳

1~7 分别为接菌处理 0 h, 4 h, 8 h, 12 h, 16 h, 20 h, 24 h 的样品, M 为 DNAMarker

2.3 PCR 预扩增

用预扩增引物对反转录得到的双链 cDNA 进行预扩增,增加片段的特异性。预扩增片段经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测(如图 3),预扩增产物片段均匀分布在 50 ~ 2 000 bp 之间,未出现大于 2 000 bp 的条带,点样口没有残留物。多态性较为丰富,用于进一步的选择性扩增。

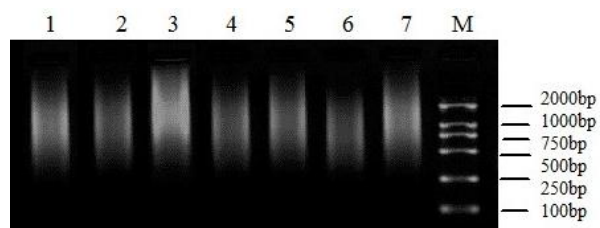


图3 PCR 预扩增电泳条带

1~7 分别为接菌处理 0 h, 4 h, 8 h, 12 h, 16 h, 20 h, 24 h 的样品, M 为 DNA Marker

2.4 聚丙烯酰胺凝胶差异 TDFs 的选取

采用 cDNA-AFLP 技术,共选用 64 对引物组合对稻瘟病菌互作后水稻叶片不同处理时间的表

达差异基因进行了分析,银染后可以观察到 TDFs 片段大小介于 50 ~ 900 bp 之间。每一对选择性引物可以平均获得 15 条差异条带,共观测到 960 条差异条带(如图 4)。选取 300 条差异条带进行回收,并经特异性扩增和琼脂糖凝胶电泳回收纯化,其中 235 个差异片段回收效果较好、浓度较高,将其中 200 条片段送到上海生工生物有限公司进行测序分析。

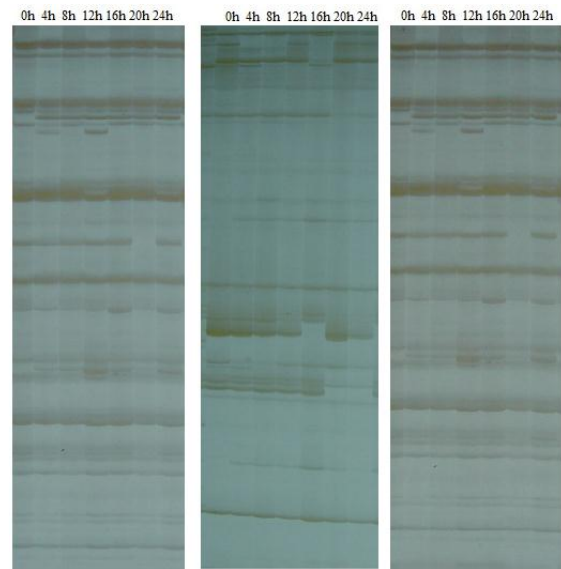


图4 部分选择性扩增产物的聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

2.5 TDF 序列的查询分析

对回收得到的 cDNA 片段进行了 PCR 扩增和琼脂糖回收纯化,其中 200 个回收后浓度高、效果好的 TDFs 送往上海生工生物有限公司进行序列测定。获得 134 个测序结果,将上述测序结果在 NCBI 网站中用 BALST 分析,寻找在 GenBank 中的同源序列,通过 NCBI 进行同源性分析比对,找到 98 个相应的同源序列,得到 74 个不重复的差异 TDFs。综合整理得到基因在 NCBI 上的 ID 号和功能注释结果,并根据大板胶图谱找出对应 TDFs 的表达情况,建立水稻响应稻瘟病菌侵染的转录表达谱。

对 74 个不重复的 TDFs 对应的大板胶上 TDFs 表达变化情况进行统计,接种稻瘟病菌后基因诱导表达上调多余下调表达,其中,各种下调 25 个、早期上调 6 个、晚期上调 11 个、其他形式上调 32 个。其中表达发生上调的基因主要有生长素输出载体家族蛋白、伴侣蛋白、早期应答脱水蛋白、液泡质子-ATP 酶、转录因子 BTF3、防卫免疫蛋白、PHD 锌指蛋白、RNA 聚合酶 beta 亚基、类脯氨酸羧基酶蛋白、NB-ARC 结构域蛋白、铁氧还蛋白以

及早期应答脱水蛋白、生长素抑制蛋白等,发生下调的主要基因有类枯草杆菌蛋白酶、病程相关蛋白5前体、核酮糖磷酸盐羧化酶主链蛋白前体、热激蛋白等。本研究通过对cDNA片段回收测序和序列分析,测序结果中共74个片段序列可以使用,分析后其中47个功能未知,27个功能已知或有可能功能(如表1所示)。

表1 试验所得基因的预测功能

cDNA片段代表基因的可能功能	互动中的表达状况
生长素输出载体家族蛋白	上调表达
伴侣蛋白	上调表达
早期应答脱水蛋白	上调表达
PHD 锌指蛋白	上调表达
防卫免疫蛋白	上调表达
液泡质子-ATP酶	上调表达
转录因子 BTF3	上调表达
蛋白激酶	上调表达
甲基丙二酰半醛脱氢酶	上调表达
细胞凋亡抗性蛋白	上调表达
乙醛酸还原酶	上调表达
RNA聚合酶 beta 亚基	上调表达
NB-ARC 结构域蛋白	上调表达
类脯氨酸羧肽酶蛋白	上调表达
铁氧还蛋白	上调表达
早期应答脱水蛋白	上调表达
生长素抑制蛋白	上调表达
类枯草杆菌蛋白酶	下调表达
病程相关蛋白5前体	下调表达
核酮糖磷酸盐羧化酶主链蛋白前体	下调表达
热激蛋白	下调表达

3 讨论

cDNA-AFLP技术是分析植物差异表达基因的一种有力工具^[15],其主要优点是可以同时比较一系列不同时间点内基因表达谱的变化情况,而且不需要进行反转录PCR和Northern杂交。另一个优点就是从聚丙烯酰胺凝胶上得到的片段是很容易纯化的,这样一来重新扩增后得到的片段可直接用于测序。而通过其他普通差异显示技术获得的片段则通常需要克隆,并且要进一步验证那些片段是否为差异表达的片段^[6]。另外,cDNA-AFLP技术在缺少特殊仪器设备和基因组信息量未知的情况下依然可以用于多种生物体差异表达基因的检测^[16]。鉴于上述优点,cDNA-AFLP技术在马铃薯、玉米、小麦、白菜等作物基因表达差异分析方面已经得到了广泛的应用^[3,17-19]。在植物

与病原物互作的过程中,张伟等以抗枯萎病的中棉12为材料,选用64对选择性扩增引物对诱导处理和对照的cDNA进行了AFLP分析,得到了25个阳性差异片段,其中24个片段在Genbank数据库中发现了同源序列^[20]。张岗等采用cDNA-AFLP技术,对抗条锈小麦品种兴资9104在成株期受条锈菌生理小种CY32侵染后5d内9个时间点的基因表达谱进行了分析,经大规模克隆和测序分析,最终获得330个差异TDF,聚类分析得到259个EST,经Blastx比对和功能分类分析,其中95条ESTs主要涉及能量、基础代谢、转录调控、抗病与防御、蛋白质运输和储存、蛋白质合成和细胞生长以及信号转导等^[21]。刘丽等以纹枯病菌AG1-1A诱导玉米高耐纹枯病自交系R15,采用cDNA-AFLP技术分析其基因差异表达谱,用56对AFLP选扩增引物对处理和对照的cDNA进行AFLP分析,得到87个差异片段,克隆获得18条阳性差异条带(TDFs)。Blastx比对结果表明,其中可以找到同源序列的有13个TDFs,按其功能可分为信号传导、抗病与防御基因、转录调控、能量代谢等^[22]。陈荣平等以烤烟品种龙江925接种TMV的叶片为材料,选用240对引物组合的扩增,获得约9500个转录基因片段,经过克隆测序最终获得了12个诱导表达片段,与核酸代谢、蛋白质合成与修饰、能量代谢、胁迫响应、细胞内运输、糖代谢等相关^[23]。

本试验采用cDNA-AFLP技术对水稻Tetep品种响应稻瘟病菌胁迫的基因表达谱进行了分析,共选用64对引物组合对稻瘟病菌侵染后水稻叶片不同处理时间的表达差异基因进行了分析,获得134个测序结果,通过NCBI进行同源性分析比对,找到98个相应的同源序列,去除重复,得到74个不重复的差异TDFs。对74个不重复的TDFs对应的大板胶上TDFs表达变化情况进行统计,接种稻瘟病菌后基因表达上调的比下调的多,各种下调25个、早期上调6个、晚期上调11个、其他形式上调32个。获得了一些与抗性相关的差异表达TDFs,说明水稻在稻瘟病菌胁迫下发生了一系列复杂的生理生化反应,诱导或抑制了水稻中一些特定逆境应答基因的表达,调整了部分代谢途径,使水稻应答稻瘟病菌的抗性得以改变。这些大量的差异基因参与了信号传导、防御反应及植物代谢,今后课题组将对这些TDFs所代表的基因进行进一步的研究和利用,并克隆部分代表性的基因,进一步确定这些基因功能,深入研究这些基因的结构与功能,阐明其作用机制,对进一步

了解水稻抗稻瘟病机理,为水稻抗病品种的合理利用以及稻瘟病的可持续控制提供理论和实践指导。

参考文献:

- [1] 卞景阳, 矫江, 许显滨, 等. 黑龙江省水稻稻瘟病的分析与对策[J]. 北方水稻, 2007(3): 140-142.
- [2] 周国岭, 杨光圣, 傅廷栋. 基因克隆技术[J]. 华中农业大学学报, 2001, 20(6): 584-592.
- [3] Christian W B, Bachem Rutger S, Van Der Hoeven, et al. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: Analysis of gene expression during potato tuber development[J]. Plant Journal, 1996, 9(5): 745-753.
- [4] Fu F L, Li W C. Genome transcriptome map construction with cDNA-AFLP techniques[J]. Molecular Plant Breeding, 2003, 1(4): 523-529.
- [5] Wu M S, Tian F, Qi F J, et al. cDNA-AFLP analysis of gene expression response to *X. anthomonas oryzae* pv. *oryzae* and identification of genes expressed differentially during this compatible interaction in rice suspension cultured cells[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2007, 40(2): 377-382.
- [6] 郭秀林, 张正斌, 李景娟, 等. cDNA-AFLP技术在植物抗逆性相关基因表达研究中的应用[J]. 西北农林科技大学学报, 2006, 34(11): 87-92.
- [7] 韩亚利, 任妍, 程西永, 等. 小麦穗发育障碍的遗传及cDNA-AFLP分析[J]. 河南农业大学学报, 2015, 49(3): 292-300.
- [8] 赵瑞丽, 钟凤林, 林义章, 等. 铜胁迫下小白菜叶片基因表达谱的cDNA-AFLP分析[J]. 中国生态农业学报, 2014, 22(4): 480-490.
- [9] 孙洪利, 潘春清, 刘洋大川, 等. 2008-2009年黑龙江省稻瘟病菌生理小种鉴定[J]. 东北农业大学学报, 2010, 41(12): 15-20.
- [10] 刘冬梅, 吴才君, 范淑英, 等. 葛根膨大相关基因表达的cDNA-AFLP分析[J]. 江西农业大学学报, 2012, 34(2): 369-374.
- [11] 许锦彪, 段彪, 邵园元, 等. 水稻叶片cDNA-AFLP技术体系的建立和优化[J]. 种子, 2012, 31(6): 35-39.
- [12] 张俊华, 屈淑平, 崔崇士. 大白菜抗芜菁花叶病毒的QTL分析[J]. 植物病理学报, 2008, 38(2): 178-184.
- [13] 刘雪梅, 刘瀛, 宋福南, 等. 白桦雄花突变体早期发育差异表达基因的cDNA-AFLP分析[J]. 林业科学, 2012, 48(5): 20-28.
- [14] 韩清, 冯森, 刘辰, 等. 利用cDNA-AFLP技术研究辣椒核雄性不育两用系的基因差异表达[J]. 农业生物技术学报, 2012, 20(10): 1117-1125.
- [15] 韩斌, 彭建营. cDNA-AFLP技术及其在植物基因表达研究中的应用[J]. 西北植物学报, 2006, 26(8): 1753-1758.
- [16] 王超, 曲晓军, 崔艳华, 等. cDNA-AFLP技术及其在基因差异表达中的应用[J]. 安徽农业科学, 2014, 42(21): 6937-6940.
- [17] 吴敏生, 高志环, 戴景瑞. 利用cDNA-AFLP技术研究玉米的基因差异表达[J]. 作物学报, 2001, 27(3): 339-342.
- [18] 郑宏远, 任妍, 吴少辉, 等. 小麦K型不育系育性恢复基因的cDNA-AFLP分析[J]. 河南农业大学学报, 2014, 48(2): 117-122.
- [19] 许愿超, 顾爱侠, 轩淑欣, 等. 大白菜-结球甘蓝易位系AT4系列抽薹相关基因表达差异的cDNA-AFLP分析[J]. 农业生物技术学报, 2016, 24(1): 26-34.
- [20] 张伟, 郑丽玲, 韩璐, 等. 利用cDNA-AFLP技术分离棉花抗枯萎病相关基因[J]. 生物技术, 2011, 21(5): 48-50.
- [21] 张岗, 董艳玲, 夏宁, 等. 利用cDNA-AFLP技术分析小麦成株抗条锈性差异基因表达特征[J]. 作物学报, 2010, 36(3): 401-409.
- [22] 刘丽, 马永毅, 张志明, 等. 利用cDNA-AFLP分析纹枯病菌诱导的玉米差异表达基因[J]. 植物病理学报, 2009, 39(4): 385-391.
- [23] 陈荣平, 刘磊, 万秀清, 等. TMV侵染烟草基因差异表达的cDNA-AFLP分析[J]. 作物学报, 2012, 38(1): 62-70.

(责任编辑: 范杰英)