

抗玉米灰斑病相关基因的 DDRT-PCR 分析

贾 娇, 马莹莹, 苏前富, 孟灵敏, 张 伟, 李 红, 晋齐鸣*
(吉林省农业科学院/农业部东北作物有害生物综合治理重点实验室, 吉林 公主岭 136100)

摘 要:为深入了解玉米抗灰斑病的分子机理, 本试验以抗/感玉米灰斑病自交系 78599-1、OH43HtN/掖 478、K12 为试验材料, 利用 DDRT-PCR 方法筛选玉米 6 叶期时接种玉米灰斑病菌粗毒素 0、5、7 和 9 d 时玉米叶片中差异表达的 mRNA 并通过反式 Northern 进行验证。结果发现在抗/感材料 78599-1、OH43HtN/掖 478、K12 中分别分离到 6、5、5 和 3 条差异表达片段; 对 19 条差异表达片段进行测序和 blast 分析, 得到 6 个候选基因片段, 它们与玉米中 MTN3、CONS TANS-CO5 家族的基因、脱落酸受体基因和酰基辅酶 A 结合蛋白基因同源性分别为 97%、99%、97% 和 100%; 另外获得 2 个基因片段与未知功能基因同源性均为 99%。研究结果将为深入研究抗灰斑病分子机理提供理论依据。

关键词:玉米灰斑病; 抗性基因; DDRT-PCR; 抗/感自交系

中图分类号: S435.131

文献标识码:

文章编号: 1003-8701(2016)00-

Analysis of Corn Gray Leaf Spot Resistance Related Genes with DDRT-PCR

JIA Jiao, MA Yingying, SU Qianfu, MENG Lingmin, ZHANG Wei, LI Hong, JIN Qiming

(Jilin Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Integrated Pest Management on Crops in Northeast, Ministry of Agriculture, Gongzhuling 136100, China)

Abstract: In order to investigate the resistant molecular mechanism of corns against gray leaf spot, resistant inbred 78599-1, OH43HtN and susceptible inbred Ye478, K12 were used to screen differential expression gene through DDRT-PCR when 6 leaf stages inoculated. The differential expression genes were tested by RT-Northern and the positive clones were sequenced. Results showed that there were 6, 5, 5 and 3 positive genes in 78599-1, OH43HtN and Ye478, K12, respectively. The 6 differential expression genes were selected as candidate genes through the blast analysis of the 19 differential expression genes. The homology research indicated that candidate genes were highly homological to *Zea mays* MTN3, CONS, TANS-CO5, abscisic acid receptor (PYL) and CoA with 97%, 99%, 97% and 100% identity, respectively. The two unknown candidate genes were highly homological to *Zea mays* hypothetical protein with 99% identity. This study would provide some useful information for molecular breeding resistant to gray leaf spot.

Key words: Corn gray leaf spot; Resistance gene; DDRT-PCR; Resistant/susceptible inbred

玉米灰斑病(Gray leaf spot)是由玉蜀黍尾孢菌(*Cercospora zae-maydis*)和玉米尾孢(*Cercospora zeina*)引起的玉米叶部病害。其中,*Cercospora zae-maydis*是在世界各个玉米产区引起玉米灰斑病的主要病原菌,我国仅在云南省和四川省部分玉米产区发现*Cercospora zeina*^[1]。苏前富等调查发现玉米灰斑病在吉林省玉米产区发病率达 90%,已上升为玉米主要叶部病害^[2]。李红等研

究发现东北春玉米区杂交种对玉米灰斑病的抗性存在显著差异,灰斑病抗性资源匮乏^[3]。因此,通过分子生物学技术筛选和克隆抗病基因,明确植物的抗病机制,对培育抗玉米灰斑病品种具有重要的意义^[4]。

国内外关于玉米抗灰斑病基因筛选和定位研究报道较多。吕香玲等利用 BSA 法在抗/感玉米灰斑病自交系齐 319 和 Ye478 中研究发现利用二者构建的重组自交系中抗病基因来源于齐 319,加性效应达到了-7.8175^[5]。王平喜等整合 65 个抗玉米灰斑病的 QTL,将 324 个基因分别与水稻和拟南芥基因组进行同源比对,在 bin1.05 和 bin1.06 内分别确定了 7 个和 3 个基因作为玉米抗灰斑病

收稿日期: 2016-01-11

项目基金: 国家玉米产业技术体系(CARS-02)

作者简介: 贾 娇(1981-),女,助理研究员,博士,从事玉米病虫害综合防治研究。

通讯作者: 晋齐鸣,男,研究员,E-mail: qiming1956@163.com

候选基因^[6]。Shi等在41101个SNPs中筛选获得51个抗玉米灰斑病相关的SNPs,发现了3个抗玉米灰斑病相关基因^[7]。Dave等在CML444和SC Malawi的杂交后代中筛选到7个抗玉米灰斑病的QTL位点^[8]。DDRT-PCR技术由于其具有操作简便、快捷且灵敏度高的优点,经过引物不断优化后应用该技术已成功分离出许多与植物发育、抗病相关的基因或基因片段^[9]。晋海军等利用DDRT-PCR技术发现4个差异表达基因通过调控蛋白质代谢、DNA复制和糖代谢等途径来应答镉胁迫^[10]。本试验应用成熟的差异显示技术在不同抗/感自交系中筛选抗玉米灰斑病的差异表达基因,并利用生物信息学技术对筛选的差异表达基因进行功能预测,为进一步揭示玉米抗灰斑病的机理提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

抗/感玉米灰斑病自交系78599-1、OH43HtN/掖478、K12和玉米灰斑病原菌玉蜀黍尾孢菌(*Cercospora zeaе-maydis*),由吉林省农业科学院植物保护研究所农作物综合防治研究室提供。

1.2 供试培养基

V8培养基:V8汁350 mL, CaCO₃ 3 g,琼脂15 g,加蒸馏水至1 000 mL,121℃高压灭菌20 min。

V8液体培养基:V8汁350 mL, CaCO₃ 3 g,加蒸馏水至1 000 mL,121℃高压灭菌20 min。

1.3 试验方法

1.3.1 供试菌株的培养

供试菌株接种在V8固体培养基上25℃黑暗培养5 d后,挑取菌丝接种在V8液体培养基中25℃180 r/min培养2周,产生大量菌丝和少量分生孢子,经1层滤纸过滤后,在10×10倍显微镜下观察到3~5个分生孢子,留滤液待用。

1.3.2 接种和取样

将4个玉米自交系种子播种在直径15 cm的花盆中,每盆播种3粒种子。将花盆放置于12 h光周期的培养箱中,白天25℃、夜晚20℃。待玉米苗长至6叶期时,将玉米灰斑病菌的培养滤液均匀喷洒在玉米叶片上,25℃黑暗保湿24 h,将花盆转移至光照培养箱中正常培养。分别在接种后0、5、7和9 d剪取第五片玉米叶片,-80℃保存待用。

1.3.3 RNA的提取和检测

参照sigma公司植物总RNA提取试剂盒

(STRN50)说明书提取接种玉米灰斑病菌粗毒素的玉米叶片总RNA,利用琼脂糖凝胶电泳检测其完整性和浓度后,置于-80℃保存备用。

1.3.4 第一链cDNA的合成

采用TAKARA公司的反转录试剂盒,5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'为特异引物,以总RNA为模板合成第一链cDNA。

1.3.5 DDRT-PCR

以反转录合成的第一链cDNA为模板,以锚定引物和随机引物(见表1)为引物对进行PCR扩增,基本反应体系:10×PCR Buffer(含Mg²⁺)2.5μL, dNTP 10 mmol/L 2.0μL,锚定引物10 mmol/L 2.0μL,随机引物10 mmol/L 2.0μL,50 ng/μL cDNA 2.0μL, Taq酶0.3μL,双蒸水至25μL。采用二步扩增法:第一步扩增程序为:95℃预变性3 min;94℃变性30 s,47℃2 min,72℃延伸1 min,重复35个循环;72℃延伸10 min。第二步扩增体系中,将第一步PCR扩增产物稀释5倍并作为模板,其他与第一步扩增相同,扩增程序为:95℃预变性3 min;94℃变性30 s,54℃1 min,72℃延伸1 min,重复35个循环;72℃延伸10 min。

表1 mRNA差异显示中所用的锚定引物和随机引物

序号	随机引物名称	序列(5'-3')	锚定引物(5'-3')
1	B0303	CTTTCTACCC	AAGCTTTTTTTTTTTTC
2	B0310	GGTACATTGG	
3	B0311	TACCTAAGCG	
4	B0313	GTTTTCGCAG	
5	B0314	GATCAAGTCC	
6	B0316	GATCACGTAC	
7	B0318	GATCTCAGAC	
8	B0319	GATCATAGCC	
9	B0323	GATCTGACTG	
10	B0324	GATCATGGTC	
11	B0325	GATCATAGCC	
12	B0326	GATCTAAGCC	
13	B0323	GATCATGGTC	AAGCTTTTTTTTTTTTC
14	B0324	GATCATGGTC	
15	B0325	GATCATAGCC	
16	B0326	GATCTAAGCC	

1.3.6 差异表达条带的回收和二次扩增

切下4个自交系接种玉米灰斑病原菌0、5、7和9 d中差异条带,采用DNA回收试剂盒(上海生物工程有限公司)回收差异表达条带,然后以回收产物为模板进行2次扩增,扩增体系和反应条件同1.3.5。

1.3.7 反式 Northern blot 验证

采用 DIG 试剂盒 (Roche, Germany) 对二次扩增产物进行标记, 取 20 μ L 标记产物点于尼龙膜上, 进行反式 northern 试验。

1.3.8 差异表达条带的克隆、测序和序列分析

将反式 northern 验证获得的阳性片段再次进行 PCR 扩增, 回收 PCR 产物送上海生工测序。通过 NCBI 的 blast 软件对差异表达片段进行生物信息学分析。

2 结果与分析

2.1 不同抗/感玉米自交系接种玉米灰斑病菌后相关基因差异表达产物的 DDRT-PCR 分析

分别以玉米抗/感灰斑病自交系 78599-1、OH43HtN/掖 478、K12 为试验材料, 在玉米 6 叶期时接种玉米灰斑病菌粗毒素, 分别提取接种病菌 0、5、7 和 9 d 时的总 RNA, 以其反转录获得 cDNA 为模板, 用 16 个随机引物和 2 个锚定引物共 32 对引物组合进行 DDRT-PCR 扩增。图 1 为其中 1 对引物

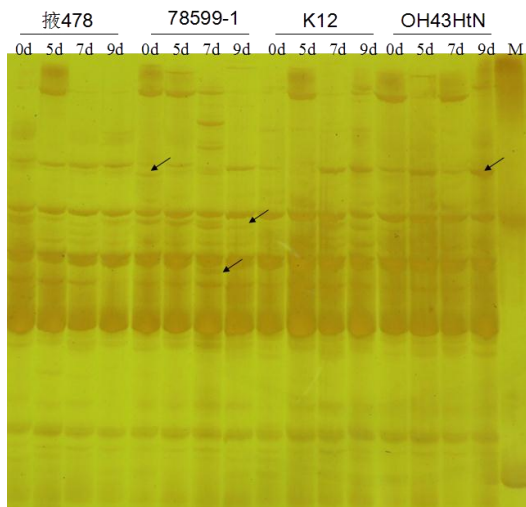


图1 B0323引物的 DDRT-PCR 扩增

扩增获得的差异表达基因片段结果。根据接种玉米灰斑病菌后, 4 份材料在电泳图谱上同一位置条带的有无及表达的强弱, 将差异条带分为 7 类, 分别为: I 类为抗病品种接种后条带表达量逐渐增加; II 类为抗病品种接种后条带表达量逐渐减弱; III 类为感病品种接种后条带表达量逐渐增加; IV 类为感病品种接种后条带表达量逐渐减弱; V 类为感、感品种间出现的差异条带; VI 类为抗、抗品种间出现的差异条带; VII 类为感、抗品种间出现的差异条带。结果共筛选获得了 46 个差异条带。其中 I 类片段有 15 条, 占 32.6%; II 类片段有 4 条, 占 8.7%; III 类片段有 6 条, 占 13.0%; IV 类片段有 13

条, 占 28.3%; V 类片段有 2 条, 占 4.3%; VI 类片段有 3 条, 占 6.5%; VII 类片段有 3 条, 占 6.5%。

2.2 差异表达产物的回收和反式 Northern 验证

以回收的 46 条差异表达片段为模板, 进行重新扩增后, 经 1% 琼脂糖凝胶检测, 发现其中有 40 条差异表达片段能重新扩增得到明亮的条带, 表明成功回收差异条带的比率为 87% (图 2)。将接种了玉米灰斑病菌后获得的差异表达片段经二次扩增, 然后将纯化的 PCR 产物纯化后点于尼龙膜上, 以未接种的 4 个自交系掖 478、78599-1、K12、OH43HtN 的总 RNA 反转录合成第一链 cDNA 为探针做反式 Northern 点杂交 (图 3), 获得阳性片段 26 条, 阳性率为 65%。其中从 78599-1、OH43HtN 中分离的差异表达片段共计 17 条, 从掖 478、K12 中分离获得 9 条差异片段, 且感病材料差异表达条带的数目比抗病材料少 8 条。



图2 部分差异条带回收后再次扩增电泳检测结果

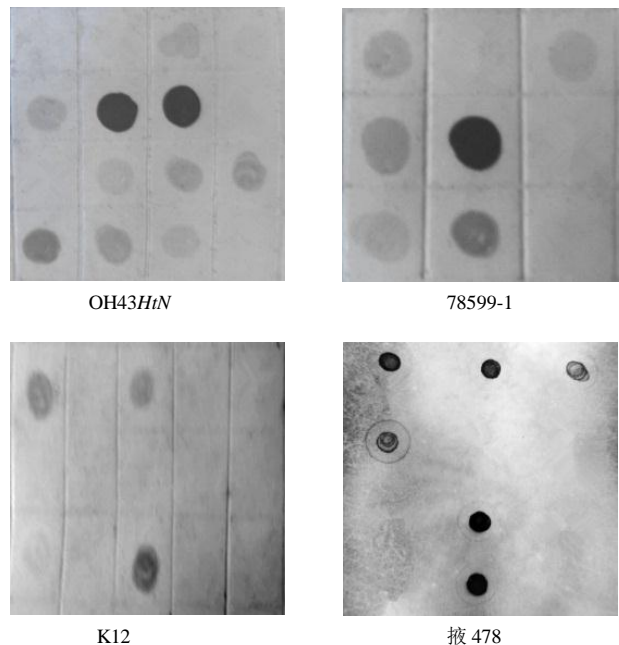


图3 反式 Northern 杂交结果检测

2.3 差异表达片段的生物信息学分析

从 4 个自交系材料在接种玉米灰斑病菌粗毒素不同时间的差异表达产物中, 共获得的 40 个差异表达片段, 经测序最后获得 19 个差异表达片段, 其中 78599-1、OH43HtN、掖 478 和 K12 中分别有 6、5、5 和 3 条片段。对其进行 blast 序列分析表

明,4个材料中的EST片段多数来自不同的基因片段,但在抗/感材料78599-1/掖478中均发现玉米酰胺基释放酶基因,在OH43*HtN*/掖478中均发现光诱导蛋白基因。根据所得阳性基因片段在GenBank中与已知基因进行同源性比对分析确定6个候选基因,其中在掖478、K12、78599-1和OH43*HtN*中分别获得与在玉米*MTN3*、CONS

TANS-*CO5*家族的基因、假定蛋白基因和酰基辅酶A结合蛋白基因同源性分别为97%、99%、99%和100%的基因片段;在掖478和OH43*HtN*中均发现了与玉米脱落酸受体基因的片段同源性为97%的基因片段;在掖478和78599-1中分离获得了与未知基因同源性为99%的基因片段(表2)。

表2 差异表达序列的Blast比对结果

序列	长度(bp)	同源序列	一致性
EST-1(掖478)	336	膜整合糖转运蛋白 <i>MTN3</i> [玉米](NM_001155615.1)1 422 bp	97%
EST-2(K12)	359	CONSTANS- <i>CO5</i> 家族的基因[玉米](NM_001154207.1)1 364 bp	99%
EST-3(78599-1)	418	假定蛋白基因[玉米](XM_008678232.1)1 664 bp	99%
EST-4(OH43 <i>HtN</i>)	328	酰基辅酶A结合蛋白基因[玉米](NM_001309876.1)700 bp	100%
EST-5(掖478和OH43 <i>HtN</i>)	446	脱落酸受体基因[玉米](XM_008656398.1)1 356 bp	97%
EST-7(掖478和78599-1)	455	未知基因[玉米](NM_001158286.1)2 743 bp	99%

3 讨论

本试验利用玉米抗/感灰斑病自交系材料78599-1、OH43*HtN*/掖478、K12,在接种玉米灰斑病菌粗毒素不同时间的条件下获得了6个抗灰斑病相关基因,分别是膜整合糖转运蛋白*MTN3*、CONSTANS-*CO5*家族的基因、酰基辅酶A结合蛋白基因*ACBP*、脱落酸受体基因和2个未知的新基因。*MtN3*基因家族成员广泛存在于真核生物中,是能够调控含有2个*MtN3*/*saliva*跨膜结构域的膜整合蛋白^[11]。Liu等研究发现*MtN3*/*saliva*家族基因与抗水稻白叶枯病相关^[12]。*CO*是调控植物光周期开花途径中的一个关键基因家族。近几年来,在拟南芥、水稻等植物中*CO*家族的研究已获得很大的进展,*CO*基因在不同的植物中均有保守的锌指结构和核定位区域^[13]。Kazan等研究发现植物在遇到病菌或其他胁迫条件时通过调整开花时间来达到增加产量的目的^[14]。酰基辅酶A结合蛋白基因是细胞膜的重要组成部分。研究发现,*ACBP6*基因在拟南芥中过量表达可以显著提高植物的耐寒性。王铭等研究发现,玉米在遭受盐、脱水和高温胁迫情况下,酰基辅酶A结合蛋白基因表达量未发现明显的变化;在低温胁迫条件下,*ZmACBP*基因表达量增加,胁迫24 h *ZmACBP*基因出现最大值,表明该基因表达与盐、脱水和高温胁迫无关,但其表达受低温胁迫诱导^[15]。Xiao等研究报道,酰基辅酶A结合蛋白在植物发育、应激反应和脂质代谢中发挥作用,其中酰基辅酶A结合蛋白基因还可以影响植物生长发育,

包括早期胚胎发育和叶片衰老,以及植物应激反应(包括重金属抗性、抗氧化性、抗寒性和抗病性)^[16]。Sanchez-vallet等报道植物脱落酸信号系统功能丧失可诱导植物增强对短小芽孢杆菌的抗性^[17]。本试验在K12中分离到CONSTANS-*CO5*家族的基因片段,在掖478中发现玉米*MTN3*基因片段,推测这2个基因与玉米灰斑病菌侵入相关;从玉米抗病自交系OH43*HtN*中分离获得与酰基辅酶A同源的差异表达基因片段,推测其可能与玉米抗灰斑病相关。

本研究接种玉米灰斑病菌后,抗性自交系的差异表达基因数量明显高于感病自交系,且抗性自交系OH43*HtN*中发现了抗逆相关基因*ACBP*,而在感病自交系掖478中发现与细胞膜机构相关的*MTN3*,推测灰斑病菌侵染后抗性自交系内抗性基因表达增加,感病自交系的细胞膜修护能力降低,研究结果为进一步研究玉米抗灰斑病分子机制提供理论参考。

参考文献:

- [1] 赵立萍,王晓鸣,段灿星,等.中国玉米灰斑病发生现状与未来扩散趋势分析[J].中国农业科学,2015,48(18):3612-3626.
- [2] 苏前富,张伟,宋淑云,等.2007年吉林省玉米主要病害调查及其发生趋势预测[J].玉米科学,2008,16(5):135-137.
- [3] 李红,晋齐鸣,孟灵敏,等.东北春玉米区主推玉米品种抗玉米叶斑病鉴定与评价[J].吉林农业科学,2012,37(6):39-41.
- [4] 张国锋.吉林省玉米综合生产能力变异及影响因素分析[J].吉林农业科学,2015,40(4):101-103.

- [5] 吕香玲,郑克志,李元,等.利用BSA法发掘玉米抗灰斑病主效QTL[J].玉米科学,2015,23(5):16-20.
- [6] 王平喜,简银巧,张红伟,等.基于元分析的抗玉米灰斑病QTL比较定位[J].玉米科学,2014,22(1):56-61,66.
- [7] Shi L Y, Lv X L, Weng J F, et al. Genetic characterization and linkage disequilibrium mapping of resistance to gray leaf spot in maize(*Zea mays* L.) [J]. The crop journal, 2014(2): 132-143.
- [8] Dave K B, Maryke C, Jeanne N K, et al. Mapping QTL conferring resistance in maize to gray leaf spot disease caused by *Cercospora zeina*[J].BMC genetics, 2014(15): 60.
- [9] 谷守芹,范永山,韩建民,等.利用DDRT-PCR技术分离和克隆玉米抗大斑病相关基因片段[J].河北师范大学学报(自然科学版),2005,29(5):503-507.
- [10] 晋海军,胡洪利,陈惠,等.DDRT-PCR技术分析籽粒菟葜胁迫下相关基因的差异表达[J].农业环境科学学报,2015,34(9):1659-1664.
- [11] Nakai A, Yamauchi Y, Sumi S, et al. Role of acylamino acid-releasing enzyme/oxidized protein hydrolase in sustaining homeostasis of the cytoplasmic antioxidative system[J].Planta, 2012, 236(2): 427-436.
- [12] Liu Q S, Yuan M, Zhou Y, et al. A paralog of the MtN3/saliva family recessively confers race-specific resistance to *Xanthomonas oryzae* in rice[J].Plant, cell&environment, 2011(34): 1958-1969.
- [13] Guan Y F, Huang X Y, Zhu J, et al. RUPTURED POLLEN GRAIN1, a member of the MtN3/saliva gene family, is crucial for exine pattern formation and cell integrity of microspores in Arabidopsis[J].Plant physiology, 2008, 147(2): 852-863.
- [14] Kazan K, Lyons R. The link between flowering time and stress tolerance[J].Journal of experimental botany, 2016, 67(1): 47-60.
- [15] 王铭.玉米中酰基辅酶A结合蛋白基因的克隆、表达分析及真核表达载体构建[D].乌鲁木齐:新疆农业大学,2012.
- [16] Xiao S, Chye M L. New roles for acyl-CoA-binding proteins (ACBPs) in plant development, stress responses and lipid metabolism[J]. Progress in lipid research, 2011, 50(2): 141-151.
- [17] Sánchez-vallet A, López G, Ramos B, et al. Disruption of abscisic acid signaling constitutively activates Arabidopsis Resistance to the necrotrophic fungus *Plectosphaerella cucumerina* 1 [J].Plant physiology, 2012, 160(4): 2109-2124.

(责任编辑:范杰英)