

玉米自交系 I18 人工接种大斑病菌的 mRNA 表达分析

柳 兵, 张 辰, 王宇琪, 赵仁贵*

(吉林农业大学农学院, 长春 130118)

摘要:本研究对高感玉米自交系 I18 人工接种大斑病菌, 经叶片表型鉴定, 叶片病斑呈现增多且扩大的趋势。结果表明, 对照与处理检测的表达基因与新基因数目不同, 新基因占表达基因比例范围是 11.95% ~ 12.87%。自交系 I18 处理 1、处理 2、处理 3 共检测到 1 401 个共表达基因, 上调基因 926 个, 下调基因 429 个。从韦恩图可以看出, 玉米接种大斑病后的基因共表达以上调为主, 呈现被诱导激活的趋势, 小部分基因表达受到抑制。随着大斑病感染时间的增加, 上调的基因数目呈现先增加后降低的趋势, 下调的基因数目呈现升高的趋势, 通过使用 BLAST 软件, 对 8 大数据库进行序列比对, 发掘 1 个下调的新基因, 5 个上调基因。经 GO 基因库进行功能注释, 本试验检索检测到 33 370 个基因, 分类得到 32 048 个注释基因, 注释率达到 96%。

关键词:玉米; 大斑病菌; mRNA

中图分类号: S513

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2019)05-0043-05

Analysis of mRNA Expression of Maize Inbred Line I18 after Artificial Inoculating with *Setosphaeria Turcica*

LIU Bing, ZHANG Chen, WANG Yuqi, ZHAO Rengui*

(College of Agronomy, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract: A high-sensitivity maize inbred line I18 was artificially inoculated with northern corn leaf blight, and the leaf phenotype identification showed that the leaf macular degeneration increased and expanded. The results showed that the number of the expressed genes was different from that of the new genes, and the proportion of new genes in the expressed genes ranged from 11.95% to 12.87%. A total of 1 401 coexpressed genes, 926 up-regulated genes and 429 down-regulated genes were detected in inbred lines I18 and treatment 1, 2 and 3. As can be seen from the Venn diagram, the gene co-expression of corn after inoculation with macular disease was dominated by the above regulation, showing a trend of induced activation, and a small part of gene expression was inhibited. As the infection time of macular disease increased, the number of up-regulated genes increased at first and then decreased, and the number of down-regulated genes showed a trend of increase. The sequence alignment of 8 major databases was conducted by blast software, one down-regulated new gene and five up-regulated genes were founded. After functional annotation by GO analyzed that 33 370 genes were retrieved and detected, 32 048 annotated genes were obtained by classification, with the annotation rate reaching 96%.

Key words: Maize; *Setosphaeria turcica*; mRNA

玉米大斑病是由大斑刚毛座腔菌(*Setosphaeria turcica*)¹引起的叶枯性病害, 其中 1 号生理小种分布最广、危害最重。在我国东北地区、华北北部和西南地区等气候凉爽玉米种植区大发生, 大

斑病菌是侵染叶片并导致大幅度减产的重要病害之一, 一般年份减产 20% 左右, 严重流行年份减产可达 50% 以上^[1]。

玉米对大斑病的抗性表现为单基因+多基因调控, 单基因表现为垂直抗性, 多基因表现为水平抗性。垂直抗性是由单基因或寡基因控制的, 是由主效基因独立起作用的, 抗性遗传表现为质量遗传^[2-3]。玉米大斑病质量抗性基因现有报导, 包括 Ht1、Ht2、Ht3、HtN(Htn1、Htm1)、ht4、HtP(rt)和 Bx, 定位于 2.07、8.05、7.04、8.06、1 号染色体短臂、

收稿日期: 2019-02-10

基金项目: 吉林省农业委员会育种项目(nyz1605)

作者简介: 柳 兵(1989-), 男, 在读硕士, 研究方向: 玉米遗传育种。

通讯作者: 赵仁贵, 男, 博士, 教授, E-mail: zhaorengui@sina.com

2.08和4号染色体短臂,质量抗性基因只对大斑病菌的特定生理小种表现抗病性,而我国大斑病生理小种易变异,使得这些基因在我国大部分玉米产区应用受到限制,数量抗病性在抗病育种中有更广阔的应用前景^[4]。玉米对大斑病的水平抗性是由多基因控制的,是由多微效基因综合作用,对所有大斑病菌的生理小种均有效,抗性遗传表现为数量遗传,大斑病数量抗性基因对目前已知不同生态地理区域的大斑病各生理小种均有效,并具有高度遗传特性,不易受到新的生理小种克服而丧失抗病性^[5-6]。

目前,玉米大斑病抗性基因进行了大量的QTL研究,但由于使用材料的不同,发病条件不易控制,症状难以测定等因素,导致QTL定位结果不尽相同。本研究通过大斑病菌液处理下玉米自交系转录组测序分析,初步研究在大斑病菌胁迫下的差异表达基因和基因表达模式,并对大斑病处理下上调表达的基因进行功能注释。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

高感玉米大斑病自交系I18,由吉林农业大学农学院提供,病原菌由植物病理实验室提供。

1.2 试验方法

1.2.1 材料的处理

将自交系I18种子经1%次氯酸钠消毒处理20 min,蒸馏水冲洗后播种于营养钵内,营养土(草炭、蛭石、土壤体积比为1:1:3)经高温消毒处理,将I18播种后放置人工气候室内,气候箱内温度为25℃,相对湿度为90%(适宜大斑病发生),每天光照16 h,浇灌无菌水,4叶期用 1×10^6 个/mL大斑病菌孢子悬浮液(加少量1%吐温)喷雾接种48 h,之后正常管理,分别在接种0 d(ck)、6 d、9 d、12 d选取幼嫩叶片(表1),3个生物学重复,通过表型观察叶片斑点大小、斑点数量确定接种菌液,12 d后取样结束。

表1 材料及处理

试验材料	类群	接种大斑病处理			
		0 d(ck)	6 d(处理1)	9 d(处理2)	12 d(处理3)
I18	Lancaster	I18-1	I18-2	I18-3	I18-4

1.2.2 菌株培养

田间采集大斑病叶,挑单孢法获得病原菌,将大斑病混合菌接种于PDA培养基进行培养。25℃黑暗培养7 d作为接种菌株。大斑病病菌经高粱粒培养基扩繁后,配制成孢子悬浮液备用。PDA配制:马铃薯200 g,葡萄糖20 g,琼脂12 g,加水定容至1 000 mL。

1.2.3 mRNA的提取

各取样时期,取不同植株叶片的同一部位,并迅速置于液氮,样品保存于-80℃冰箱中备用。按照TRIzol试剂盒(Invitrogen公司,美国)说明书提取叶片总RNA,并用RNeasy Mini试剂盒(Qiagen公司,荷兰)处理。用Nanodrop分光光度计和1%琼脂糖凝胶检测所提取总RNA的浓度和质量。将所得的RNA样品送至北京百迈克生物技术有限公司进行RNA-Seq测序。

1.2.4 数据处理与分析

1.2.4.1 基因表达定量分析:采用FPKM(Fragments Per Kilobase of transcript per Million fragments mapped)作为衡量转录本或基因表达水平的指标,FPKM^[7]计算公式如下:

$$FPKM = \frac{cDNA \text{ Fragments}}{\text{Mapped Fragments (Millions)} \times \text{Transcript Length (kb)}}$$

1.2.4.2 差异基因分析:以基因组B73_RefGen_v3ftp://ftp.ensemblgenomes.org/pub/plants/release-24/fasta/zea_mays/进行序列比对分析,本试验所选参考基因组组装能满足信息分析的需求。差异表达基因检测过程中,将差异倍数(Fold Change) ≥ 2 且错误发现率(False Discovery Rate, FDR) < 0.01 作为筛选标准。差异倍数表示两样品间表达量的比值。错误发现率是通过差异显著性p值(p-value)进行校正得到的^[8]。最终采用FDR作为差异表达基因筛选的关键指标。

1.2.4.3 差异表达基因GO分类^[9]:使用BLAST软件将差异表达基因进行GO数据库序列比对,将获得新基因的注释信息。注释系统是一个有向无环图,包含三个主要分支,包括生物学过程、分子功能和细胞组分。

1.2.4.4 新基因挖掘:使用BLAST软件^[9],检索数据库病害关键词,通过GO、KEGG、KOG、NR、Pfam、Swiss-Prot、eggNOG、COG等8大数据库进行序列比对,以FPKM ≥ 0 为阈值对共表达基因进行注释。

2 结果与分析

2.1 基因表达量分析

自交系 I8 接种大斑病 6 d 后,叶片出现病斑,随着侵染时间的延长,叶片病斑增多且面积呈扩大趋势(图 1)。4 份 RNA 样品经 Nanodrop 检测,试

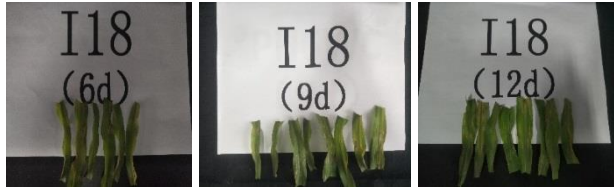
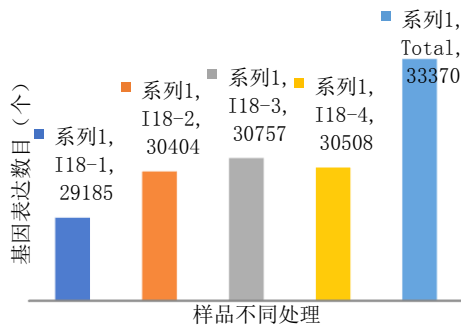


图 1 自交系 I18 人工接种大斑病的叶片

验样品符合测序标准,对试验样品进行稀释,最后进行测序分析完成 4 个样品的转录组分析,Q30 碱基百分比在 94.42% 及以上。分别将各样品



Clean Reads 与指定的参考基因组进行序列比对,比对效率从 88.88% 到 89.90% 不等。

本试验以 B73 作为参考基因组,采用 FPKM≥0 为阈值,I18-1(ck)共检测到 29 185 个基因表达(图 2),检测到 3 623 新基因,占基因总数的 12.41%;I18-2(处理 1)共检测到 304 04 个基因表达,检测到 3 818 个新基因,占基因总数的 12.56%;I18-3(处理 2)共检测到 30 757 个基因表达,检测到 3 959 个新基因,占基因总数的 12.87%;I18-4(处理 3)共检测到 30 508 个基因表达,检测到 3 647 个新基因,占基因总数的 11.95%。3 个处理共计检测到 33 370 个基因表达,检测到 4 379 个新基因,占基因总数的 13.12%。4 个样品新基因占表达基因比例范围在 11.95% ~ 12.87% 之间。

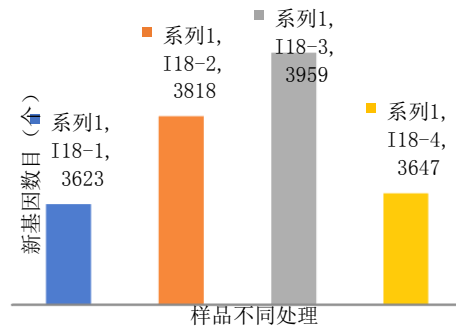


图 2 基因表达数目

2.2 大斑病响应差异表达基因分析

本试验在差异表达基因(表 2)检测过程中,将差异表达变化倍数≥2, P<0.01 作为筛选标准。自交系 I18 的对照(I18-1)与处理 1、处理 2、处理 3

共检测到 1 401 个共表达基因,将差异表达基因分为上调基因和下调基因的 2 种表达模式,I18-1 与 I18-2 共表达基因 3 669 个,上调基因 2 303 个,下调基因 1 366 个;I18-1 与 I18-3 共表达基因 4 362 个,上调基因 2 750 个,下调基因 1 612 个;I18-1 与 I18-4 共表达基因 4 424 个,上调基因 2 559 个,下调基因 1 865 个。从韦恩图(图 3)可以看出,参与差异表达基因 7 515 个。与对照相比,处理 2、3、4 共同参与表达基因 1 401 个,全部上调基因 926 个,全部下调基因 429 个。

表 2 差异表达基因数目

差异分组比较	差异表达基因	基因上调	基因下调
I18-1_vs_I18-2	3 669	2 303	1 366
I18-1_vs_I18-3	4 362	2 750	1 612
I18-1_vs_I18-4	4 424	2 559	1 865

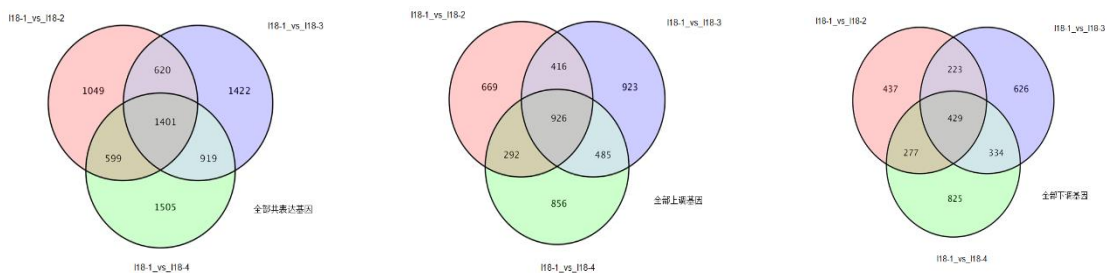


图 3 差异表达基因韦恩图

2.3 新基因分析

以1 401个共同表达基因为基础,使用BLAST软件,以disease关键词检索,通过GO、KEGG、KOG、NR、Pfam、Swiss-Prot、eggNOG、COG等8大

数据库进行序列比对,对共表达基因进行注释,以FPKM \geq 0为阈值,共筛选出7个基因ID,发掘1个下调的新基因,6个上调基因(表3)。log₂FC(log₂表达量差异倍数)范围是-1.94~5.28。

表3 关联基因信息

基因编号	染色体位置	基因起始位置	基因结束位置	表达量差异倍数的对数(处理1/对照)	表达量差异倍数的对数(处理2/对照)	表达量差异倍数的对数(处理3/对照)	基因上调/下调
New Gene_30863	9	84903719	84905251	-1.51	-1.66	-1.94	down
gene:Zm00001d003048	2	30338613	30343062	1.79	2.49	3.38	up
gene:Zm00001d011628	8	156687090	156694381	1.92	2.80	2.59	up
gene:Zm00001d028484	1	36588522	36592955	3.31	4.41	4.63	up
gene:Zm00001d036280	6	81597933	81614196	1.35	1.44	1.80	up
gene:Zm00001d047952	9	146068568	146070088	3.23	2.42	2.97	up
gene:Zm00001d048637	4	2421429	2434362	2.94	3.43	5.28	up

2.4 差异表达基因GO分类

对大斑病接种差异表达基因进行功能注释(表4),本试验检索检测到33 370个基因,经GO基因库分类得到32 048个注释基因,注释率达到96%,1 401个共同表达基。大斑病侵染后,生物体发生复杂的生物学、细胞组分、分子功能等过程。生物学过程主要表达模式:655个差异基因参与代谢过程,518个差异基因参与细胞生理过程,468个差异基因参与单一有机体反应,302个差异基因参与应激反应,190个差异基因参与生物调节反应,差异基因占注释基因的4.12%、

3.34%、4.06%、4.35%。细胞组分主要表达模式:619个差异基因参与细胞组成部分反应、619个差异基因参与细胞反应、499个差异基因参与细胞器反应、374个差异基因参与膜组成反应,差异基因占注释基因的3.21%、3.22%、3.11%、3.99%。分子功能主要表达模式:572个差异基因参与基因结合、652个差异基因参与催化活性反应、55个差异基因参与转运活性反应、44个差异基因参与核酸转录活性反应,差异基因占注释基因的3.52%、4.55%、3.19%、3.74%。

表4 GO分类基因注释

生理生化反应	生物学过程	基因数目	差异基因数目	差异基因百分率%
生物学过程	metabolic process	15 904	655	4.12
	cellular process	15 502	518	3.34
	single-organism process	11 534	468	4.06
	response to stimulus	6 948	302	4.35
细胞组分	cell part	19 281	619	3.21
	cell	19 234	619	3.22
	organelle	16 043	499	3.11
	membrane	9 376	374	3.99
分子功能	binding	16 251	572	3.52
	catalytic activity	14 329	652	4.55
	transporter activity	1 723	55	3.19
	nucleic acid binding transcription factor activity	1 175	44	3.74

3 结论与讨论

通过对自交系I18人工接种玉米大斑病表型鉴定,随着侵染的时间延长,叶片病斑呈现增多

且扩大的趋势,接种12 d完成接种,以表型鉴定确定时间节点,为转录组测序分析提供依据。本研究的对照与处理检测的表达基因与新基因数目不同,新基因占表达基因比例范围是11.95%~

12.87%。

自交系 I18 与处理 1、处理 2、处理 3 共检测到 1 401 个共表达基因,上调基因 926 个,下调基因 429 个。从韦恩图可以看出,玉米接种大斑病后的基因共表达以上调为主,呈现被诱导激活的趋势,小部分基因表达受到抑制。随着大斑病感染时间的增加,差异表达基因数目增多。上调的基因数目呈现先增加后降低的趋势,可能是由于接种时间较长,部分基因呈现被抑制的状态。下调的基因数目呈现升高的趋势,可能是基因被抑制的数目逐渐增多的原因。

通过使用 BLAST 软件,对 8 大数据库进行序列比对,对共表达基因进行注释,共筛选出 6 个基因 ID,发掘 1 个下调的新基因,5 个上调基因。可以看出,大斑病菌感染玉米,植物基因表达以上调为主,可见人工接种大斑病菌后基因表达呈现被诱导激活的趋势。

大斑病菌感染后,自交系 I18 生物体发生复杂的生物学、细胞组分、分子功能等过程。对大斑病接种差异表达基因进行功能注释,本试验检索检测到 33 370 个基因,经 GO 基因库分类得到 32 048 个注释基因,注释率达到 96%。不同基因参与不同生物学过程,本研究初步探讨了大斑病感染转录组机理。但未进行 RNA 差异表达量分析验证,后续试验将继续开展。大斑病的研究多是以产量为核心,结合分子标记展开,SNP 分子标记广泛应用到大斑病基因挖掘及检测中^[11-12]。但玉米大斑病基因遗传转化方面报导较少^[13-14],因此,玉米抗大斑病基因表达验证和遗传转化方面研究有待进一步开展。

参考文献:

- [1] 王慧慧,张文忠,芦 明,等.玉米大斑病的研究进展[J].天津农业科学,2016,22(12):133-136.
- [2] 肖明纲,宋风景,孙 兵,等.玉米大斑病广谱抗性外引自交系的发掘与抗病基因初步鉴定[J].作物学报,2018,44(4):614-619.
- [3] 马 骏,刘欣芳,齐 欣,等.基于 SALF-seq 的玉米抗大斑病基因 QTL 分析[J].辽宁农业科学,2018(2):8-13.
- [4] 马 骏,朱迎春,王延波,等.玉米大斑病抗性基因研究进展[J].辽宁农业科学,2014(3):66-69.
- [5] 郑 飞,崔亚坤,王 森,等.玉米大斑病抗性育种研究进展与展望[J].安徽农业科学,2018,46(4):15-18.
- [6] 鄂 洋,林 凤.分子标记技术在玉米大斑病抗性基因研究中的应用[J].玉米科学,2009,17(3):64-67.
- [7] Florea L, Song L, Salzberg S L. Thousands of exon skipping events differentiate among splicing patterns in sixteen human tissues[J]. F1000 Research, 2013, 2:188.
- [8] Wang L, Feng Z, Wang X, et al. DEGseq: an R package for identifying differentially expressed genes from RNA-seq data[J]. Bioinformatics, 2010, 26: 136-138.
- [9] Altschul S F, Madden T L, Zhang J, et al. Gapped BLAST and PSI BLAST: A New Generation of Protein Database Search Programs[J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(17): 3389-3402.
- [10] Ashburner M, Ball C A, Blake J A, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology[J]. Nature genetics, 2000, 25(1): 25-29.
- [11] 孙丽萍,张思奇,赵同雪,等.2016 年黑龙江省玉米大斑病调查与分析[J].东北农业科学,2017,42(4):36-38.
- [12] 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.
- [13] 田秀艳,陈 鑫,王振东.分子标记技术在玉米大斑病抗性基因研究中的应用[J].现代农业科学,2008(11):18-20.
- [14] 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(2):93-96.
- [15] 邱鹏程,张闻博,蒋洪蔚,等.大豆芽期耐盐和耐低温位点的遗传重叠[J].中国农业科学,2011,44(10):1980-1988.
- [16] 曾乃燕,何军贤,赵 文,等.低温胁迫期间水稻光合膜色素与蛋白水平的变化[J].西北植物学报,2000,20(1):8-14.
- [17] 赵明辉,张文忠,马殿荣,等.水稻耐冷基因研究进展[J].沈阳农业大学学报,2012-12,43(6):711-718.
- [18] 纪素兰,江 玲,王益华,等.利用回交重组自交群体检测水稻耐低温发芽数量性状基因座[J].南京农业大学学报,2007,30(1):1-6.
- [19] 刘海龙,陈小妹,杨富军,等.花生种质资源耐低温表型鉴定研究[J].花生学报,2017(3):20-25.
- [17] 赵秀琴,张 婷,王文生,等.水稻低温胁迫不同时间的代谢物谱图分析[J].作物学报,2013,39(4):720-726.
- [19] 郭彦斌.花生含油量及脂肪酸组成的 QTL 分析[D].武汉:华中农业大学,2016.
- [20] Qin H D, Feng S P, Chen C, et al. An integrated genetic linkage map of cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.) constructed from two RIL populations[J]. Theor Appl Genet, 2012, 124: 653-664.
- [21] Shirasawa K, Bertoli D J, Varshney R K, et al. Integrated consensus map of cultivated peanut and wild relatives reveals structures of the A and B genomes of *Arachis* and divergence of the legume genomes[J]. DNA Res, 2013, 20: 173-184.

(上接第 11 页)