

文章编号:1009-038X(2004)01-0025-05

BTH 诱导水稻对稻瘟病系统获得抗性的 mRNA 差别显示分析

饶志明^{1,2}, 董海涛³, 庄杰云², 柴荣耀⁴, 李德葆³, 郑康乐²

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036; 2. 中国水稻研究所国家水稻改良中心, 浙江 杭州 310006; 3. 浙江大学 农业部植物病理学重点实验室, 浙江 杭州 310029; 4. 浙江省农业科学院植物保护研究所, 浙江 杭州 310021)

摘 要: 运用 mRNA 差别显示技术对水稻感病品系 G71 受苯并噻二唑(Benzothiadiazole, BTH) 诱导 3 d 的应答反应进行了分析, 从抗病及其相关基因保守结构域设计的 10 个引物组合的反应中获得了 11 个受 BTH 诱导的 cDNA 差异片段. 反向 Northern 鉴定其中 3 个为阳性片段. Northern 证实 G71NBS14BI2 的表达确实受 BTH 和稻瘟病菌的诱导. RFLP 分析将 G71NBS14BI2 定位于水稻的第 11 条染色体上, 且该片段座落于控制水稻穗瘟部分抗性的 QTL 区间.
关键词: 水稻; 系统获得抗性; mRNA 差别显示; 基因定位; 稻瘟病
中图分类号: Q 37 **文献标识码:** A

mRNA Differential Display of Systemic Acquired Resistance Induced by BTH in Rice against Blast Caused by *Magnaporthe grisea*

RAO Zhi-ming^{1,2}, DONG Hai-tao³, ZHUANG Jie-yun²,
CHAI Rong-yao⁴, LI De-bao³, ZHENG Kang-le²

(1. School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036; 2. China National Center for Rice Improvement, China National Rice Research Institute, Hangzhou 310006, China; 3. Key laboratory of Chinese Ministry of Agriculture on Plant Pathology and Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou, 310029, China; 4. Institute of Plant Protection, Zhejiang Academy of Agriculture Sciences, Hangzhou, 310021, China)

Abstract: The expression profiles a line G71 susceptible to isolate 92-183in response to Benzothiadiazole(BTH) were investigated using mRNA differentially display (DD). The leaves were sprayed with BTH for 3 days at 4-leaf stage. A total of 11 differentially expressed cDNA fragments were obtained with 10 combinations of primers designed according to the conserved domains of resistance or resistance related genes. Reverse Northern identified that 3 cDNA fragments were up-regulated by spraying of BTH. Northern blot confirmed the expression of G71NBS14BI2 was induced by BTH and *Magnaporthe grisea*. G71NBS14BI2 was mapped on chromosome 11 by RFLP analysis and located in the interval where QTL controlling partial resistance to neck blast was detected.

Key words: rice; systemic acquired resistance (SAR); mRNA differential display (DD); gene mapping; *Magnaporthe grisea*

稻瘟病是由稻瘟病菌 *Magnaporthe grisea* 引起的广泛发生在世界各稻区的最重要的水稻病害之一. 由于该病菌的生理小种复杂且变异快, 通过常规育种方法来获得持久抗性较为困难, 因此通过分子生物学技术对病原菌和植物互作机制的深入了解及分离参与该互作的基因对改良水稻抗瘟性具有重要意义.

苯并噻二唑 (Benzothiadiazole, BTH) 是一类能够诱导水稻产生系统获得性抗性的化学药品, 而 BTH 本身却并不具备杀灭稻瘟病菌及其孢子的能力^[1]. 开展 BTH 对水稻诱导稻瘟病系统获得性抗性的研究, 对深入了解水稻系统获得性抗性的分子机理及其在作物抗病育种上的应用具有重要意义.

自从 mRNA 差别显示技术 (mRNA differential display, DD) 诞生以来^[2], 该技术已被广泛用于植物的激素调控、细胞分化和生长发育、生理生化体系、病理过程及抗病逆境性、基因突变等分子生物学分析, 并已显示出了其广泛的应用范围. 在水稻上也有成功的例子, 如水稻抗盐胁迫基因^[3] 和水稻抗稻瘟病相关基因 (片段)^[4] 的检出和克隆.

作者选用对稻瘟病具有持久抗性的谷梅 2 号, 与一个具有高产潜力但不抗穗瘟的品种中 156 配组, 建立了由 304 个株系组成的重组自交系 (RIL) 群体, 构建了含 168 个标记座位的分子图谱, 将一个抗叶瘟但不抗穗瘟的主效基因 *Pi-24(t)* 定位在第 12 染色体上, 抗性等位基因来源于中 156; 一个兼抗叶瘟和穗瘟的主效基因 *Pi-25(t)* 定位在第 6 染色体上, 抗性等位基因源于谷梅 2 号^[5]. 最近, 应用 cDNA 微阵列对来源于中 156/谷梅 2 号重组自交系的水稻抗稻瘟病近等基因系 G205 和 G71 的稻瘟病菌胁迫基因表达谱进行了分析, 获得了一些有意义的结果^[7,8]. 作者以感病品系 G71 为材料进行 BTH 诱导的系统获得抗性的 mRNA 差别显示研究, 进而定位差异表达片段, 并对差异表达片段所在区间进行穗瘟部分抗性 QTL 的检测, 初步验证了差异表达片段的功能.

1 材料与方法

1.1 水稻材料

感病品系 G71, 根据与 *Pi-24(t)* 和 *Pi-25(t)* 紧

密连锁的分子标记的基因型, G71 在 *Pi-24(t)* 和 *Pi-25(t)* 上的等位基因分别来源于谷梅 2 号和中 156.

由于本群体有多个主基因控制对菌株 92-183 (ZC15) 的叶瘟抗性, 整个群体只有 1/8 的株系对菌株 92-183 (ZC15) 在苗期表现为感病, 无法对叶瘟部分抗性的遗传进行分析, 因而对本群体同一菌株的穗瘟部分抗性进行了分析. 为了避免主基因对微效多基因的覆盖效应, 应用 74 个不具主基因 *Pi-25(t)* 侧翼标记基因型、对菌株 92-183 (ZC15) 表现为感病的株系进行对穗瘟部分抗性 QTL 的分析.

1.2 主要试剂

总 RNA 抽提液为 Trizol™ Reagent, 逆转录试剂盒购自 GIBCO-BRL 公司. dNTPs、Taq DNA 聚合酶、RNasin 为 Promega 公司产品. 所用引物序列见文献^[6], 委托上海生工生物工程公司合成. [α -³²P]-dATP (dCTP) (3 000 μ Ci/mmol) 购自北京亚辉生物工程公司.

1.3 稻瘟病菌的接种和 BTH 的处理及样品采集

稻瘟病菌 (菌株为 92-183) 及其分生孢子培养和接种在浙江省农科院植保所进行, 稻瘟病菌接种量为 $2 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 个/mL, 添加 0.2% Tween-20, 苗期喷雾接种. 对照植株仅喷无菌水.

BTH (50% 可湿性粉剂; Novartis Crop Protection Inc., Research Triangle Park, NC, USA) 溶于无菌水制成终浓度为 0.3 mmol/L 的水溶液. 每盆幼苗 (约 33 株) 约喷雾 15 mL BTH 溶液, 对照植株喷无菌水.

在接种病原菌和无菌水后不同时间 (0, 6, 12, 24, 36 h), BTH 和无菌水处理不同时间 (1, 3, 5, 7 d), 以叶片作为样品, 立即在液氮中速冻, 并保存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中备用. 其中 BTH 处理 3 d 后及相应对照样品用于差别显示分析.

1.4 穗瘟部分抗性鉴定

穗瘟鉴定按文献^[5]的方法进行^[5]. 穗颈接种 10 d 后考察每一株系 12 个穗颈的病斑长度 (Lesion length, LL); 随机挑选其中 6 个放到装有适量无菌水的 15 mL 无菌试管中, 剧烈震荡 1 min 后, 用血球计数器确定孢子数 (Conidium amount, CA), 以 LL 和 CA 作为穗瘟部分抗性的参数.

1.5 总 RNA 的提取及逆转录反应

方法按试剂盒说明书进行,中间增加一次 Trizol 抽提。甲醛变性琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA。DnaseI 处理去除 DNA 污染。20 μ L 反应体系中含有 2 μ g 总 RNA, 0.01 mol/L DTT, 1 倍 RT 缓冲液, 40 U RNasin, 200 U 逆转录酶 M-MLV, 200 μ mol/L dNTPs, 0.1 μ g 引物。42 $^{\circ}$ C 反应 1 h, 65 $^{\circ}$ C 保温 15 min 灭活酶, -20 $^{\circ}$ C 保存; 稀释 50 倍后取 2 μ L 作 DD-PCR 反应的模板。

1.6 DD-PCR 反应及差异片段重扩增

根据文献[2]略作调整,即 20 μ L 体系中含 1 倍 PCR 缓冲液, 1.25 mmol/L Mg^{2+} , 20 μ mol/L dNTPs, 0.1 μ g 引物, 1 U Taq 酶, $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ -dCTP 2 μ Ci, 模板 2 μ L。PCR 程序如下: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 92 $^{\circ}$ C 1 min, 56 $^{\circ}$ C 2 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 循环 40 次后, 72 $^{\circ}$ C 保温 5 min。反应结束后, 每管加入 10 μ L 终止反应液, 经煮沸变性, 取 3 μ L 在 6% 聚丙烯酰胺凝胶上, 60 W 恒功率电泳约 4 h, 揭胶后 80 $^{\circ}$ C 真空抽干, -70 $^{\circ}$ C 放射自显影 12~24 h 后冲片, 用煮沸法回收差异带。取适量作模板, 在相应的 DD-PCR 反应条件下重新扩增, 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.7 cDNA 第一链探针制备和反向 Northern 杂交

取 5 μ g 经 Dnase I 处理的总 RNA 样品进行逆转录反应, 方法按试剂盒操作指南进行。分子杂交、洗膜等方法按 Sambrook 等[9]所述进行。

1.8 Northern 分析

总 RNA 定量后于 -20 $^{\circ}$ C 保存, 将 30 μ g 总 RNA 在甲醛变性胶中电泳后转移至尼龙膜。80 $^{\circ}$ C 烤膜 2 h 固定 RNA, 用随机引物标记法制备同位素标记的探针标记, 在 65 $^{\circ}$ C 杂交 16 h 后洗膜, 方法按 Sambrook 等[9]所述进行, 同一杂交膜洗去探针后用 rDNA 探针进行杂交。Phosphoimager 扫描并测定灰度值。

1.9 差异片段的基因定位和 QTL 分析

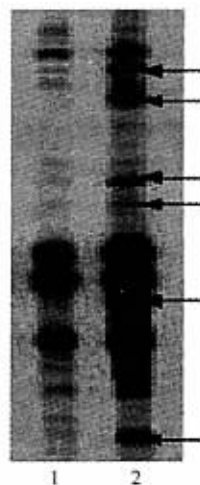
以阳性差异表达片段为探针, 结合 *Bam*HI、*Dra*I、*Eco*R I、*Eco*R V、*Hind*III 和 *Xba*I 共 6 种限制性内切酶, 与亲本杂交, 对呈现多态的探针/酶组合检测 RIL 群体各个体的基因型。采用 MAPMAKER/EXP3.0[10]进行连锁分析, 重组值用 Kosambi 函数转换成遗传图距(cM)。

应用 QTLMAPPER 1.0[11]对所定位的阳性差异表达片段所在区间检测穗瘟部分抗性 QTL, 分别选用 $\text{LOD} > 2.4$, $p < 0.005$ 为阈值。QTL 的命名按 McCouch 等进行。

2 结果与分析

2.1 DD-PCR 扩增筛选差异 cDNA 片段

在 10 个引物组合的 DD 分析中, 有 7 个引物组合没有扩增出任何差异带, 另外 3 个引物组合共扩增出 11 个差异 cDNA 片段, 其中引物组合 NBS14、NBS15 和 NBS24 扩增的差异片段数分别为 8 个、2 个和 1 个。图 1 显示了 G71 对照和 BTH 处理部分引物组合扩增的结果。



1, 2 分别是 G71(CK), G71(BTH) 的 RNA 样品, 箭头所示为差异带

图 1 mRNA 差异显示结果

Fig. 1 Results of mRNA differential display

回收的差异片段经纯化后, 在相应的组合和反应循环条件下, 经过一次 PCR 扩增, 绝大多数的扩增产物为单一条带, 说明扩增特异性较好。

2.2 Reverse Northern 分析

将上述 11 个差异 cDNA 片段分别进行二次 PCR 扩增, 反应体积为 100 μ L, 各取 10 μ L PCR 产物以 1% 琼脂糖凝胶电泳分离, 转移到尼龙膜上, 并制备 2 份拷贝。将 G71 对照和 BTH 处理材料的总 RNA 分别进行逆转录反应, 同时掺入放射性同位素制备成第一链总 cDNA 探针, 再分别与上述 2 张尼龙膜杂交。结果在 11 个差异 cDNA 片段中, 鉴定出 3 个阳性 cDNA 片段, 它们分别是引物组合 NBS14 扩增的 G71 受 BTH 诱导的 2 个, 以及引物组合 NBS15 扩增的 G71 受 BTH 诱导的 1 个, 分别暂时将其命名为 *G71NBS14BI1*, *G71NBS14BI2* 和 *G71NBS15BI1*。部分 Reverse Northern 杂交结果见图 2。

而其它 8 个 cDNA 片段在 2 个相互比较的材料中表现出相似强度的杂交带型, 它们均被视为假阳性而未作进一步分析。

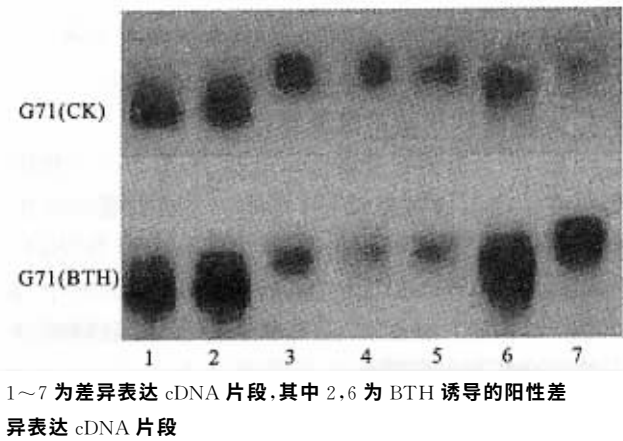


图 2 Reverse Northern 分析结果

Fig. 2 Results of Reverse Northern

2.3 G71NBS14BI2 的 Northern 表达分析

为了进一步验证筛选结果的可靠性,经 BTH 处理 0,1,3,5,7 d 的 G71 总 RNA 经甲醛变性胶分离后转膜,以 G71NBS14BI2 为探针进行了 Northern 杂交,结果表明, BTH 处理后 G71NBS14BI2 的表达从 1 d(1.4 倍)至 7 d(2.7 倍),一直在增强(见图 3),而该基因的表达在相应无菌水处理的情况下则基本无明显变化(见图 4),说明该基因的表达的确受 BTH 的诱导。

为了探讨 G71NBS14BI2 的表达与稻瘟病菌诱导之间的关系,将探针 G71NBS14BI2 与转有稻瘟病菌处理 0,6,12,24,36 h 的总 RNA 的膜进行杂交,结果表明,该 cDNA 片段的表达也受稻瘟病菌的诱导,且在病原菌处理后 24 h 表达水平最高,至 36 h 时已经下降(见图 5),在相应无菌水处理的情况下也基本无明显变化(见图 6)。这个结果说明了该 cDNA 片段的表达确实也受到稻瘟病菌的诱导。

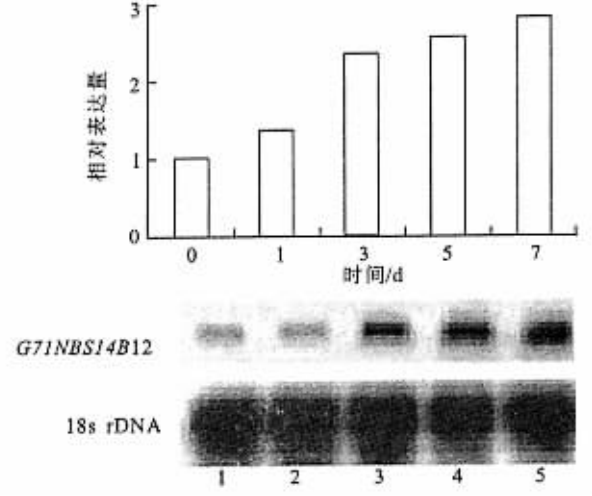


图 3 G71NBS14BI2 cDNA 片段受 BTH 诱导的表达模式

Fig. 3 Expression mode of G71NBS14BI2 induced by BTH

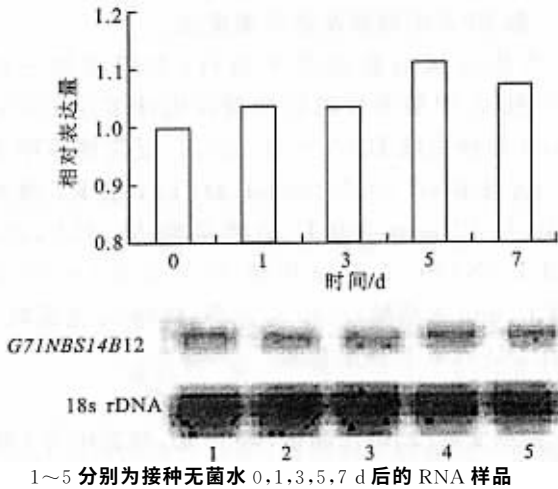


图 4 G71NBS14BI2 cDNA 片段受无菌水诱导的表达模式

Fig. 4 Expression mode of G71NBS14BI2 induced by sterilized water

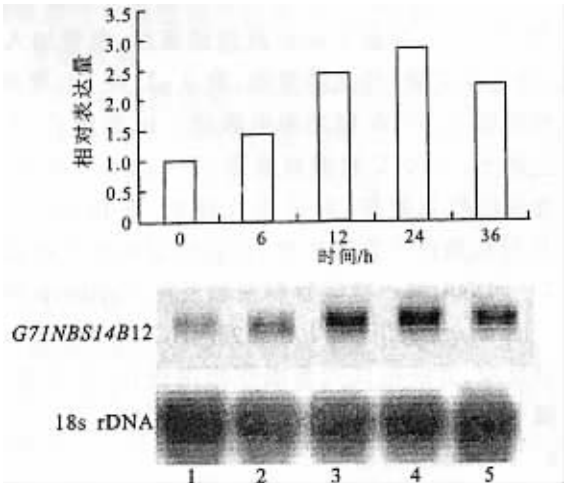


图 5 G71NBS14BI2 cDNA 片段受稻瘟病菌诱导的表达模式

Fig. 5 Expression mode of G71NBS14BI2 induced by Magnaporthe grisea

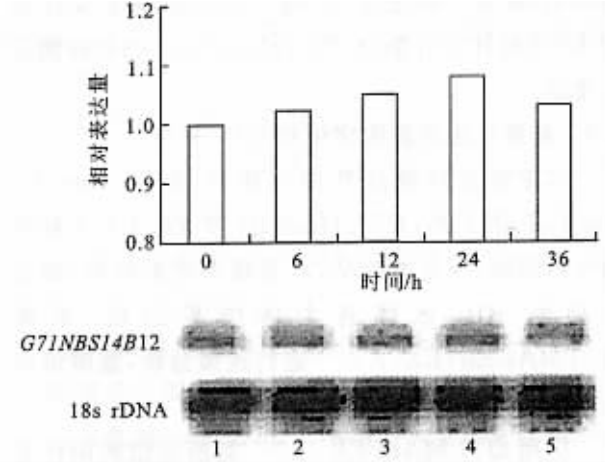
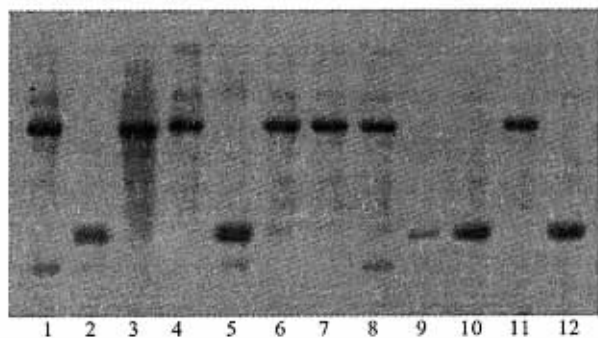


图 6 G71NBS14BI2 cDNA 片段受无菌水诱导的表达模式

Fig. 6 Expression mode of G71NBS14BI2 induced by sterilized water

2.4 *G71NBS14IB2* 的定位

以这 3 个阳性 cDNA 片段为探针分别与重组自交系亲本进行 Southern 杂交, 结果仅发现 *G71NBS14IB2* 在亲本间呈现多态性, 并在基因组中以单拷贝形式存在(见图 7). 在 304 个 RIL 株系中, 它们的分离比均符合 1:1(p 值为 0.326), 经连锁分析, 将其定位于水稻第 11 条染色体上的 S2A1-8 和 R5 区间, 距离 S2A1-8 和 R5 的距离分别为 8.5 cM 和 21.4 cM.



1, 2 分别为亲本 156 和谷梅 2 号, 3~12 分别为 RIL 1-RIL12
图 7 *G71NBS14IB2* cDNA 片段在 156/谷梅 2 号 RIL 群体中的部分 Southern 杂交结果

Fig. 7 Southern bolt of cDNA fragment *G71NBS14IB2* in Zhong 156/Gumei 2 RIL population

2.5 *G71NBS14IB2* 所在区间穗瘟抗性 QTL 的检测

以阳性差异表达片段 *G71NBS14IB2* 所在区间进行对穗瘟部分抗性 QTL 的检测, 结果表明, 在 *G71NBS14IB2* 所在的染色体区间检测到一个控制穗瘟部分抗性性状 CA 的主效应 QTL, $qCA-11$ 的 LOD 值为 5.5, 能解释性状 CA 总变异率的 11.7%, 其抗性等位基因来源于感穗瘟亲本中 156.

3 讨论

DDRT-PCR 技术自创立以来, 由于其简单、快速和高效等特点而倍受分子生物学家的青睐, 然而

该技术最大的不足就是假阳性比例很高, 因此如何降低假阳性比例和有效地鉴定出阳性克隆就成了 DDRT-PCR 技术中最重要的环节. 作者根据植物抗病基因的保守结构域设计长度为 20 bp 左右的简并引物对总 cDNA 直接进行扩增, 代替常规 DDRT-PCR 中所用的锚定引物和 10 bp 的随机引物组合, 使 DDRT-PCR 反应中的退火温度由通常的 40 °C 左右提高到 56 °C, 增加了扩增反应的特异性, 当然, 这同时也意味着在扩增反应中遗漏了那些不具有保守域结构的信息, 虽然在一定程度上提高了阳性率(由通常报道的阳性率不到 10% 增加到近 30%). 但本研究的假阳性率仍然很高, 要更好地解决该技术的假阳性率高的问题仍有待于进一步的研究.

由于阳性差异表达片段在本群体的亲本间多态性较低, 因此本研究仅将其中一个阳性差异表达 cDNA 片段进行了定位. 定位结果表明, 这个阳性 cDNA 片段与主效基因 $Pi-24(t)$ 和 $Pi-25(t)$ 没有直接关系. Northern 杂交表明: 该阳性 cDNA 片段的表达受 BTH 和稻瘟病菌的诱导, 在相应无菌水处理的条件下均无明显变化, 提示这个阳性 cDNA 片段很有可能是作为抗病基因或抗病相关基因(cDNA 片段)而存在. 以这个片段所在的区间对同一菌株控制穗瘟的部分抗性 QTL 进行检测, 发现它位于控制穗瘟部分抗性 QTL 区间, 该结果一方面为这个假设提供了初步证据, 另一方面也提示控制水稻苗叶瘟与穗瘟的机制可能既有差别又有一定的联系. 此外, 作者在 *G71NBS14IB2* 所在的染色体区间检测到的一个控制穗瘟部分抗性性状 CA 的主效应 QTL 的抗性等位基因来源于感穗瘟亲本中 156, 表明感病亲本中也存在抗病基因, 这一现象 Wang 等^[13]也曾有过报道. 目前对这些差异表达片段的分析正在进行之中.

参考文献:

- [1] 葛秀春, 宋凤鸣, 郑重, 等. BTH 诱发水稻对稻瘟病的系统获得抗性[J]. 浙江农业学报, 1999, 11: 311—314.
- [2] Liang P, Pardee AB. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction[J]. Science, 1992, 257: 967—971.
- [3] 张驰, 陈受宜. 利用 DDRT-PCR 技术分析在盐胁迫下水稻耐盐突变体中特异表达的基因[J]. 中国科学(B 辑), 1995, 25(8): 840—847.
- [4] 何祖华, 董海涛, 程世军, 等. 水稻受稻瘟病菌诱导基因的分离和克隆[J]. 科学通报, 1997, 17(19): 1874—1875.
- [5] 吴建利, 庄杰云, 柴荣耀, 等. 水稻抗穗瘟基因的分子定位[J]. 植物病理学报, 2000, 30(2): 111—115.
- [6] 庄杰云, 柴荣耀, 吴建利, 等. 应用抗病基因同源序列定位水稻的抗稻瘟病基因[A]. 生命科学探索与进展[C]. 杭州: 杭州大学出版社, 1999. 126—132.

[5] 张惟杰. 糖类复合物生化研究技术[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 1994.

[6] 陈宗洪, 戴闰光. 胶体化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1984. 219—222.

[7] Owen R F. 食品化学(第三版)[M]. 王璋, 许时婴, 江波, 等译. 北京: 中国轻工业出版社, 2003. 175—176.

[8] Phillips G O , Williams P A. Handbook of hydrocolloids[M]. Cambridge : Woodhead Publishing Limited, 2000. 103—115.

[9] 何曼君, 陈维孝, 董西侠. 高分子物理[M]. 上海: 复旦大学出版社, 2000.

[10] Launay B, Doublier L, Cuvelier G. Flow peoperties of aqueous solutions and dispersions of polysaccharides[A]. Mitchell J R, Ldeward D A. Functional Properties of Food Macromolecules[M]. New York: Elsevier Applied Science Publishers, 1986.

[11] Fedeniuk R W, Biliaderis C G. Composition and physicochemical properties of linseed mucilage[J]. J Agric Food Chem, 1994, 42: 240—247.

[12] 谢良. 黄原胶的分离纯化及其在食品中的应用[D]. 无锡: 无锡轻工业学院, 1988.

[13] 罗昌荣. 高质量番茄粉的研制及其贮藏稳定性的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2001.

(责任编辑: 朱 明)

(上接第 29 页)

[7] 饶志明, 董海涛, 庄杰云, 等. 水稻抗稻瘟病近等基因系的 cDNA 微阵列分析[J]. 遗传学报, 2002, 29(10): 887—893.

[8] 饶志明, 董海涛, 庄杰云, 等. 水稻稻瘟病菌胁迫应答 cDNA 片段的表达及定位[J]. 中国水稻科学, 2003, 17(2): 105—108.

[9] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: Alaboratory Manual2nd[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

[10] Lander E, Green P, Abrahamson J, *et al.* Mapmaker: an interactive computer package for constructing primary genetic maps of experimental and natural population[J]. Genomics, 1987, 1: 174—181.

[11] Wang DL, Zhu J, Li ZK, *et al.* Mapping QTLs with epistatic effects and QTL(environment interactions by mixed linear model approaches[J]. Theor Appl Genet, 1999, 99: 1256—1264.

[12] McCouch SR, Cho YG, Yano M, *et al.* Report on QTL nomenclature[J]. Rice Genet Newsl, 1997, 14: 11—13.

[13] Wang GL, Mackill DJ, Bonman JM, *et al.* RFLP mapping of genes conferring complete and partial resistance to blast in a durably resistant rice cultivar[J]. Genetics, 1994, 136: 1421—1434.

(责任编辑: 李春丽)