

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2011.00389

花生抗青枯病相关基因的差异表达

彭文舫, 吕建伟, 任小平, 黄莉, 赵新燕, 文奇根, 姜慧芳

中国农业科学院油料作物研究所, 农业部油料作物生物学重点开放实验室, 武汉 430062

摘要: 以抗青枯病花生品种‘远杂 9102’和感病品种‘中花 12’为材料, 用高致病性青枯菌株对其进行接种处理, 利用 cDNA-AFLP 技术, 分析了侵染后 48 h 内 5 个时间点的基因表达情况。从 256 对引物组合中筛选到 119 对引物, 扩增出 709 条差异表达的转录衍生片段(Transcript-derived fragment, TDF), 包括抗病品种与感病材料的差异以及接种与未接种间的差异等 6 种差异表达模式。对其中 98 个 TDF 进行了克隆测序, 结果显示, 40 个 TDF 与 GenBank nr 数据库中已有序列同源, 功能涉及能量、代谢、信号转导、转录调控、逆境应答等等; 15 个 TDF 在数据库中找到同源序列, 但蛋白功能未知; 43 个 TDF 在数据库中未找到同源序列, 可能为一些新基因。对选取的差异表达 TDF 进行 qRT-PCR 分析, 结果与 cDNA-AFLP 表达谱一致, 其中 TDF 32-54-1 在前期构建的抗青枯病 SSH 文库中出现频次达到 47 次。文章推测, 花生青枯病抗性可能受抗病抗逆、转录调控、信号转导、蛋白质储存代谢以及非生物胁迫等多方面相关基因的协同调控, TDF 32-54-1 可能与花生青枯病抗性相关。

关键词: 花生; 青枯病抗性; 差异表达; cDNA-AFLP

Differential expression of genes related to bacterial wilt resistance in peanut (*Arachis hypogaea* L.)

PENG Wen-Fang, LV Jian-Wei, REN Xiao-Ping, HUANG Li, ZHAO Xin-Yan,
WEN Qi-Gen, JIANG Hui-Fang

Oil Crops Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory for Oil Crop Biology of Ministry of Agriculture,
Wuhan 430062, China

Abstract: Peanut bacterial wilt (BW) caused by *Ralstonia solanacearum* is one of the most devastating diseases for peanut production in the world. It is believed that breeding and subsequent planting BW-resistant cultivars of peanut (*Arachis hypogaea* L.) should represent the most effective and economic means of controlling the disease. To illustrate the molecular mechanism of peanut resistant to BW, a BW-resistant cultivar, ‘Yuanza 9102’, and a BW-sensitive one, ‘Zhonghua 12’, were infected with *Ralstonia solanacearum* and differential expression of the genes related to BW-resistance was analyzed using complementary DNA amplified length polymorphism (cDNA-AFLP) technique. The infected 3-leaflet seedlings were followed for 48 h and root samples were taken at 0, 2, 10, 24 and 48 h after inoculation, respectively. A total of 12596 transcript-derived fragments (TDFs) were amplified with 256 primer combinations, including 709 differential expressed TDFs, which were generated from 119 primer combinations. Ninety-eight TDFs were randomly chosen for DNA sequence analysis. BLASTx analysis of the obtained sequences revealed that 40 TDFs encoded gene products associated with energy, tran-

收稿日期: 2010-10-04; 修回日期: 2010-12-05

基金项目: 农作物种质资源保护项目(编号: NB07-2130135-35), 国家科技基础条件平台项目(编号: 2005DKA21002-13), 国家自然科学基金项目(编号: 30270840, 30571132)和国家科技支撑计划项目(编号: 2006BAD13B05-2)资助

作者简介: 彭文舫, 硕士, 专业方向: 花生分子生物学。Tel: 027-86711550; E-mail: pz1207@yahoo.com.cn

通讯作者: 姜慧芳, 博士, 研究员, 研究方向: 花生品种资源。E-mail: peanutlab@oilcrops.cn

scription, signal transduction, defense, metabolism, cell growth, cell structure or/and protein synthesis. Analysis of the expression of four genes by qRT-PCR verified the results from cDNA-AFLP. Strikingly, one of the identified TDFs, *32-54-1*, occurred for 47 times in a known BW-resistant SSH library. These results suggest that resistance to BW in peanut involves multifaceted biochemical and physiological reactions, including regulation of the genes involved in different pathways, such as defense, signal transduction, metabolism, transcription and abiotic stresses. The TDF *32-54-1* was predicted to be closely related to BW resistance in peanut.

Keywords: peanut; bacterial wilt resistance; differential expression; cDNA-AFLP

花生青枯病又称细菌性枯萎病(Bacterial wilt), 是由 *Ralstonia solanacearum* 引起的一种毁灭性土传病害, 是影响花生产量和品质的重要因素之一^[1]。培育和种植抗病品种是防治该病最安全、经济、有效的途径。然而由于已有的抗病育种研究所利用的抗源较少, 而且抗源种质的荚果小, 产量潜力低, 导致目前生产上应用的抗病品种产量水平普遍较低。尽管目前已经从种质资源中发掘出了大批抗病材料, 但这些抗病材料的抗性与不良农艺性状紧密连锁, 在育种中难以利用。因此, 发掘新的抗源、新的抗病基因和探索新的基因发掘技术已成为当务之急。

cDNA-AFLP技术是发掘植物新基因的一种快速有效的新技术, 已广泛应用于多种植物的基因差异表达研究中。Gabiéls等^[2]利用cDNA-AFLP技术, 成功分离得到与过敏性坏死反应相关基因。Oomen等^[3]利用RNA指纹技术, 获得了与初生细胞壁生物合成相关的基因。另外, 利用cDNA-AFLP分析技术, Mao等^[4]鉴定了与铝毒胁迫调控相关的 19 个基因。王文霞等^[5]利用cDNA-AFLP技术分析了经叶锈菌诱导的小麦抗叶锈近等基因系TcLr38 的基因表达情况, 获得了与抗病相关的基因。但是, 到目前为止, 利用cDNA-AFLP技术发掘花生抗病相关基因的研究报道很少。

本研究以抗青枯病花生品种‘远杂 9102’和感病品种‘中花 12’为研究对象, 探索利用 cDNA-AFLP 技术发掘花生抗青枯病相关基因或基因片段的有效性, 旨在为发掘花生抗病相关基因及青枯病抗性分子机制的研究以及抗青枯病育种取得突破奠定理论和实践基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 花生材料

抗青枯病品种‘远杂 9102’^[6-8], 感青枯病品种

‘中花 12’^[7,8]。

1.1.2 青枯菌

本研究所用青枯病菌种分离自红安花生青枯病圃^[9]。

1.2 方法

1.2.1 青枯菌接种

水培法^[10], 以清水处理为对照。

1.2.2 采样

接种后 0、2、10、24 和 48 h 剪取根样, 液氮速冻后于-80 °C 保存。

1.2.3 总 RNA 提取及 cDNA 合成

利用总 RNA 提取和纯化试剂盒(Clontech, 美国)提取各样品的总 RNA, 用 1.2%琼脂糖凝胶电泳鉴定总 RNA 完整性。利用 Super SMART™ PCR cDNA 合成试剂盒(Clontech, 美国)合成双链 cDNA。

1.2.4 cDNA-AFLP 分析

参照 Bachem 等^[11]所描述的方法并作适当修改^[12]。以 *EcoRI* 和 *MseI* 对双链 cDNA 进行酶切和酶连, 预扩增引物为 *E*_{pre} 和 *M*_{pre}, 用 *EcoRI* 引物和 *MseI* 引物各 16 条(分别为 E31~E46 和 M47~M62, 表 1)随机组合进行选择扩增, 扩增产物在 6%聚丙烯酰胺凝胶上 90 W 恒功率进行电泳分离(Sequi-Gen GT, Bio-rab), 银染后碱性显影。

表 1 cDNA-AFLP 引物序列

名称	序列 (5' 3')
<i>E</i> _{pre}	GACTGCGTACCAATTCA
E31~E46	GACTGCGTACCAATTCA+NN ^a
<i>M</i> _{pre}	GATGAGTCCTGAGTAAC
M47~M62	GATGAGTCCTGAGTAAC+NN ^a

注: ^aNN依次为: AA, AC, AG, AT, CA, CC, CG, CT, GA, GC, GG, GT, TA, TC, TG, TT。

1.2.5 条带回收、测序与序列分析

统计各处理材料之间的差异条带，参照 Leal-Bertioli 等^[13]的方法，将差异条带切出进行 PCR 扩增，用 QIAGEN 凝胶回收试剂盒(QIAGEN, 德国)回收，连接到 pGEM-T Easy 载体(Promega, 美国)，转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞。通过蓝白斑筛选和菌落 PCR 鉴定，挑取阳性克隆进行测序，采用 GenBank 的 BLASTx 工具在 nr 蛋白质数据库进行序列同源性检测，与已知蛋白比较，对其所代表的基因功能进行推测。

1.2.6 qRT-PCR 验证

以在 SSH 文库中出现频次较高的基因 32-54-1、35-54 和 36-48-4 为研究对象，由于 45-48-2 表达产物与来源于菜豆(*Phaseolus vulgaris*)的蛋白同源，鉴于菜豆与花生同属豆科植物，因此，也将 45-48-2 作为研究对象，进行 qRT-PCR 验证，3 次重复。分别提取抗、感青枯病花生品种 0、2、10、24 和 48 h 各时间点样品 RNA，以 oligo d(T)₁₈ 为引物，用 M-MLV 反转录酶(Progema, USA)合成 cDNA 第一链。用 Primer 5.0 软件设计荧光定量引物(表 2)，反应体系为：SYBR Green mixture (Toyobo, Japan) 15 μ L，cDNA 模板 1 μ L，5 pmol/ μ L 上游和下游引物各 1 μ L，以 ddH₂O 补充体系至 25 μ L。PCR 扩增程序为：95 3 min，95 15 s，60 15 s，72 45 s，40 个循环。反应结束后分析荧光值变化曲线和熔接曲线，每反应 3 次重复，计算 CT 值，采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 算法^[14]，以各时间点内参基因 *Ubiquitin*^[15] 的量为标准确定目标基因的量。

表 2 qRT-PCR 验证差异表达片段引物序列

片段名称	引物序列(5' 3')	产物大小 (bp)
32-54-1	F: GCTTCCGATTCCACCAAC R: ACGGCTTCAGTGATACGC	173
35-54	F: ATCATTTGTTTCGTCCTTCTTTG R: CACTTCTTCATGGTTGGCTTTGC	203
36-48-4	F: CAAACCAACCCAAAGCAGTAATA R: GACCCAGATGCAAGCATAGAATA	221
45-48-2	F: TAATGGCGGCAATGACATTTGTG R: TTATCTTGGCTACTGAAGGAGGG	226

注：F：正向引物；R：反向引物。

2 结果与分析

2.1 不同抗感材料的 cDNA-AFLP 多态性

根据 256 对(16 \times 16) *Eco*RI 和 *Mse*I 引物的扩增

结果，共获得 12 596 条转录衍生片段(Transcript-derived fragment, TDF)(100~700 bp)，平均每对引物产生 49 条 TDF，其中 119 对引物扩增出 709 条表现差异的条带，占总条带数的 5.62%。

对差异条带进行统计发现，E36/M47-750(引物 E36/M47 扩增得到的大小约 750 bp 条带)，E41/M57-330、E41/M58-400、E46/M55-350 等条带在抗病品种和感病品种受青枯菌侵染前均表达，受侵染后均消失或不表达。E36/M47-160、E37/M53-410、E45/M48-300 等条带在抗病品种接种青枯菌 24 h 后表达，在受青枯菌侵染前以及感病品种受青枯菌侵染过程中均不表达。E32/M55-550、E32/M57-300、E38/M55-750 等片段在感病品种接种青枯菌 24 h 后出现条带，在受青枯菌侵染前以及抗病品种受青枯菌侵染过程中均不出现。E34/M49-600、E38/M55-480、E44/M53-610、E44/M53-720 等条带在抗病品种接种青枯菌前后均出现表达条带，在感病品种接种青枯菌后期(24 h 后)条带消失。E36/M49-390、E42/M57-250、E45/M61-350、E45/M61-360 条带在抗病品种受青枯病侵染 24 h 前出现条带，之后条带消失，感病品种在接种青枯菌前后均有表达条带。E34/M51-330、E36/M47-380、E42/M47-300 等条带在抗病品种接种青枯病菌 10 h 后，感病品种未受青枯菌侵染以及侵染后 24 h 内有表达条带。E34/M58-150、E37/M60-550、E37/M61-700 等条带在抗病品种受青枯病菌侵染前后均出现，在感病品种接种青枯病菌前后均无条带。E37/M51-170、E45/M57-400 等条带在感病品种受青枯病菌侵染前后均无表达条带，E45/M56-200 在感病品种未接种青枯病菌前无条带，接种后则有条带，上述各条带在抗病材料中接种青枯菌后 10 h 均能出现。

综上所述，将差异表达的 TDF 总结为以下 6 种表达模式：(1) 无论是抗还是感青枯病品种在未接种时(0 h，对照)均出现表达条带，但接种后处理无表达条带或表达被抑制(图 1A)；(2) 抗青枯病品种接种后期(24~48 h)出现表达条带，而感青枯病品种无表达条带，或感青枯病品种在接种后期(24~48 h)出现表达条带，而抗青枯病品种无表达条带(图 1B)；(3) 抗青枯病品种在接种青枯病前后均出现表达条带，但感青枯病品种在未接种及接种前期有表达条带，接种后期(24~48 h)条带消失(图 1C)；(4) 抗青枯病品

种接种 10 h 后出现表达条带, 而感青枯病品种则在接种 10 h 后表达条带消失(图 1D); 5) 抗青枯病品种 0 h 对照和各处理均出现表达条带, 而感青枯病品种均无表达条带(图 1E); 6) 抗病品种只在接种后 10 h 时间点出现表达条带, 感病品种或全部无条带, 或接种前无条带, 接种后出现条带(图 1F)。

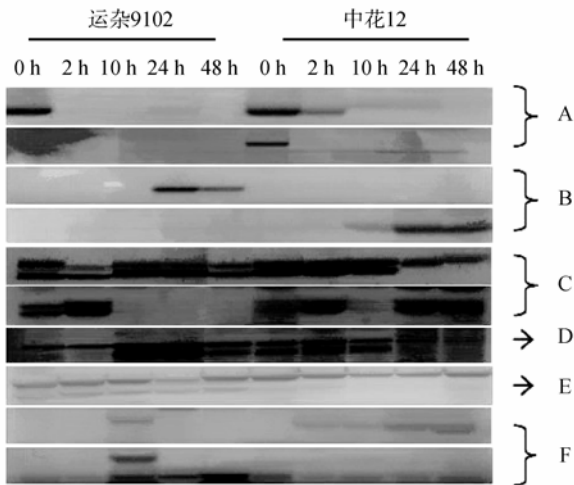


图 1 TDF 表达模式

A: 接种后表达被抑制; B: 接种后期表达增强; C: 感病品种接种前期表达, 后期被抑制; D: 抗病品种接种后期表达, 感病品种接种后期被抑制; E: 抗病品种完全表达, 感病品种完全不表达; F: 抗病品种特定时间点表达。

2.2 基因序列分析

从 709 条差异带中挑选出 98 条差异非常明显的条带进行回收、克隆和测序分析。与 nr 数据库序列比对结果显示, 40 个 TDF 在数据库中有较高同源性, 为蛋白功能已知的序列(表 3), 15 个 TDF 在数据库中

找到同源序列, 但蛋白功能未知, 其余 43 个 TDF 在数据库中未找到同源序列。根据 BLASTx 比对结果, 将上述 98 个 TDF 据其功能分成 11 类(图 2)。其中数据库中无匹配蛋白和未知功能蛋白以及蛋白/核酸修饰基因所占比例超过 10%, 分别为 43.88%、15.31%和 10.20%; 基础代谢和能量相关基因分别占 3.06%和 7.14%; 信号转导相关基因为 5 个, 占 5.10%; 细胞结构和细胞生长各占 2.04%; 蛋白质合成基因相对较少, 只有 1.02%; 转录调控类占 6.12%; 与抗病、抗逆相关基因占 4.08%。

结合本实验室前期构建的花生抗青枯病 SSH 文库^[8], 绝大部分差异片段均包含在文库中(表 3), 尤其是 32-54-1 基因, 在 SSH 文库中出现 47 次, 35-54 和 36-48-4 出现的频次也较高(13 次)。

2.3 qRT-PCR 验证

qRT-PCR 结果显示, 在抗病品种‘远杂 9102’中, 基因 32-54-1 呈上调表达, 至接种后 10 h 时间点表达量达到最大, 为对照的 5.06 倍; 而感病品种‘中花 12’接种后该基因的表达量始终低于未接种对照(图 3A)。基因 35-54 在抗病品种中呈表达上调, 至接种后 48 h 时间点达到最大表达量, 为对照 2.30 倍; 而在感病品种中, 在接种初期(2 h)呈现上调, 达到对照表达量的 1.21 倍, 之后表达被抑制, 至接种后 48 h 时间点仅为对照的 1/5(图 3B)。基因 36-48-4 和 45-48-2 在抗病品种中表达曲线相似, 均为初期(2 h)表达被明显抑制, 表达量分别为对照的 26.24%和 17.68%, 接种后 10 h 时间点表达量达到最大, 分别为对照的 3.94 和 3.48 倍, 在接种后 48 h 时间点基因

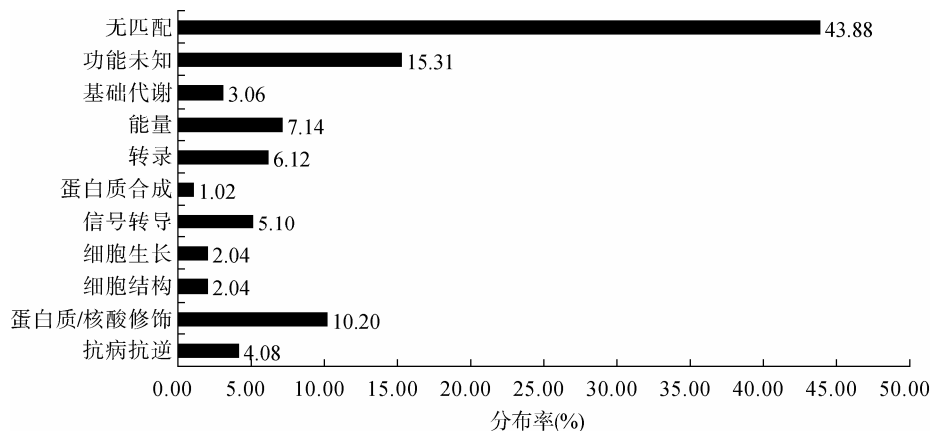


图 2 差异表达基因功能分布

表 3 差异基因序列与 nr 数据库的 BLASTx 比对结果

基因名称	GenBank 登录号	大小(bp)	一致性(%) ^b	描述 ^c	物种
32-54-1	AAD46412	253	71	乙烯响应蛋白 (47)	<i>Solanum lycopersicum</i>
32-55-1	YP_484720	142	83	磷酸丙酮激酶激酶 (4)	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>
32-57-5	NP_196113	215	89	组蛋白甲基转移酶 (0)	<i>Arabidopsis thaliana</i>
32-57-6	YP_003387797	302	87	-内酰胺酶 (19)	<i>Spirosoma linguale</i> DSM 74
33-55-1	AAR01227	204	52	APETALA1 (2)	<i>Citrus sinensis</i>
34-49-1	NP_001149074	146	58	核酸结合蛋白 (48)	<i>Zea mays</i>
34-52-3	XP_002873289	316	65	磺基转移酶家族蛋白 (3)	<i>Arabidopsis lyrata</i> subsp. <i>Lyrata</i>
34-61-1	XP_001689942	232	65	Nε-(4-氨基基)赖氨酸合成酶 1 (0)	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
35-49-1	ADD09604	179	64	铁氧还蛋白氢化酶 (17)	<i>Trifolium repens</i>
35-49-2	NP_001152099	167	59	羧基端肽 (25)	<i>Zea mays</i>
35-49-4	ACG41003	317	88	羧基端肽 (25)	<i>Zea mays</i>
35-54	EEY57597	255	95	-微管蛋白 (13)	<i>Phytophthora infestans</i>
35-59-2	XP_002864380	89	80	糖基水解酶 17 家族蛋白 (21)	<i>Arabidopsis lyrata</i> subsp. <i>Lyrata</i>
35-60-1	AAN85869	275	93	NADPH-P450 还原酶 (2)	<i>Glycine max</i>
35-60-2	AAK62358	88	89	丙二烯氧化催化酶 (11)	<i>Solanum lycopersicum</i>
36-47-4	AAW34136	167	59	半胱氨酸蛋白酶 gp3a (37)	<i>Zingiber officinale</i>
36-48-3	AAX37335	143	94	UDP-葡萄糖醛酸脱羧酶 2 (11)	<i>Populus tomentosa</i>
36-48-4	AAT80327	173	96	UDP-D-葡萄糖醛酸脱羧酶 (13)	<i>Hordeum vulgare</i>
36-53-1	AAD17352	214	47	逆转录病毒相关多聚蛋白类似内含物(1)	<i>Arabidopsis thaliana</i>
36-54-1	XP_001849234	242	52	绒膜过氧化物酶 (9)	<i>Culex quinquefasciatus</i>
36-54-2	EDL15836	159	65	嗜伊红血球过氧化物酶 (10)	<i>Mus musculus</i>
36-55-1	AAA32663	426	96	DEL (8)	<i>Antirrhinum majus</i>
36-56-2	ACF06492	292	57	核糖体 L9 类似蛋白 (17)	<i>Elaeis guineensis</i>
37-51-1	YP_001328014	179	59	二组分反应调节因子 (25)	<i>Sinorhizobium medicae</i> WSM419
37-53	YP_578692	172	74	转运促进主蛋白 (2)	<i>Nitrobacter hamburgensis</i>
37-60	XP_002299167	109	66	SET 结构域蛋白 (20)	<i>Populus trichocarpa</i>
38-55-2	YP_003088823	165	42	转录调节因子 (11)	<i>Dyadobacter fermentans</i> DSM 18053
38-55-3	ZP_06947416	198	50	pG1 蛋白 (17)	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>
39-50	ACY95307	447	68	核糖体蛋白 P0 (7)	<i>Manduca sexta</i>
40-53-1	BAD93968	292	94	ARF1 结合蛋白 (5)	<i>Arabidopsis thaliana</i>
42-53-1	XP_001935662	178	64	WD 结构域内含蛋白 (2)	<i>Pyrenophora tritici-repentis</i> Pt-1C-BFP
43-55-3	NP_001030735	162	88	结构分子 (7)	<i>Arabidopsis thaliana</i>
43-55-5	XP_513885	96	100	c-fos 启动子转录激活蛋白类似物 (0)	<i>Pan troglodytes</i>
45-48-1	ZP_03530359	201	46	趋性蛋白甲受体(2)	<i>Rhizobium etli</i> CIAT 894
45-48-2	AAR13310	180	66	B12D 蛋白类似物 (2)	<i>Phaseolus vulgaris</i>
45-52-1	BAF92783	221	80	RNA 酶 L 抑制蛋白同源物 (2)	<i>Brassica rapa</i> subsp. <i>Pekinensis</i>
45-53-1	AAL26865	291	97	NADH 谷氨酸盐合成前体 (3)	<i>Phaseolus vulgaris</i>
45-53-2	NP_353424	186	92	ABC 转运蛋白 (34)	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> str. C58
45-53-3	YP_001414893	210	79	赤霉素蛋白 (0)	<i>Parvibaculum lavamentivorans</i> DS-1
45-53-6	YP_001019886	136	60	转录调节因子 (11)	<i>Methylibium petroleiphilum</i>

注: ^b氨基酸一致性百分比; ^c括号中数字表示在 SSH 数据库中出现频次。

处于停止表达状态;而在感病品种中表达曲线却大不相同, 36-48-4 表达处于抑制状态, 最大表达量出现在接种后 10 h 时间点, 与对照持平, 45-48-2 在接种后 10 h 之内表达被抑制, 但在对照的 60%以上, 之后表达明显上调, 在接种后 24 h 和 48 h 时间点分别达到对照的 2.64 和 3.32 倍(图 3C, 图 3D)。

总体上看, 本试验获得的差异表达基因在抗病品种‘远杂 9102’中均为上调表达, 其最大表达峰大部分出现在接种后 10 h 时间点, 32-54-1、36-48-4 和 45-48-2 基因表达与模式 6)相符(图 1F)。而在感病品种‘中花 12’中只有 45-48-2 表现上调表达趋势。

3 讨论

分子标记技术是发掘植物新基因的有效方法之一, cDNA-AFLP适合差异表达基因的发掘和分离 [16], 已在番茄 [3]、马铃薯 [4]、大白菜 [17]、小麦 [6,18]、水稻 [5] 等植物中广泛应用。由于栽培种花生的DNA多态性相对较为贫乏, 通过基因组DNA分子标记技术发掘花生的抗病相关基因较为困难, 因此, 有必要通过 cDNA-AFLP 技术来发掘花生的抗病相关基因。

cDNA-AFLP技术在差异基因表达研究中具有明显优势 [19,20], 能在不预测基因表达是被诱导还是被抑制情况下, 只要这些基因序列中包含有适当的限制性酶切位点, 就能分析这些基因的表达变化情况。本研究通过cDNA-AFLP技术获得了 98 条花生抗感病青枯病材料间的差异表达片段, 测序得到的TDF 中有 40 条在nr数据库找到了同源序列。

对差异表达TDF进行分析, 推测很多TDF与植株抗病、抗逆相关。如TDF 45-53-3 编码产物同源蛋白(79%)为赤鲜素蛋白(ruberythrin), 该蛋白通过催化降低细胞内 H_2O_2 含量来保护细胞免受氧化毒害 [21], 参与植株抗逆反应。拟南芥ORE14 基因编码植物生长素响应因子 2(ARF2), 调控植物体内因生长素诱导发生的早期基因表达。该蛋白作为植物生长素信号传导抑制蛋白, 阻碍生长素信号的传导, 从而延缓植株叶片衰老 [22]。TDF 40-53-1 编码产物与拟南芥ARF2 氨基酸同源性达到 94%, 说明其可能参与调控植株防御反应。TDF 35-60-1 编码产物与豇豆NADPH-P450 还原酶(NADPH-P450 reductase)氨基酸同源性为 93%。Park等 [23]研究白假丝酵母时发现, NADPH-450 还原酶

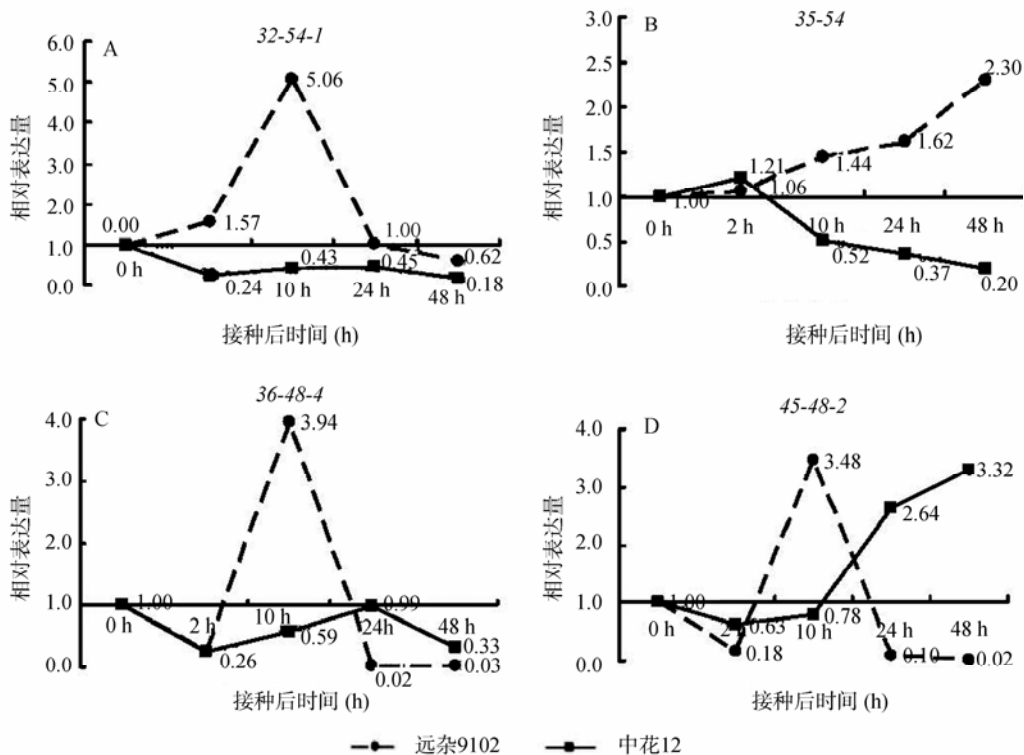


图 3 部分差异表达片段的 qRT-PCR 分析

A: TDF 32-54-1 相对表达谱; B: TDF 35-54 相对表达谱; C: TDF 36-48-4 相对表达谱; D: TDF 45-48-2 相对表达谱。

将NADPH产生的2个还原粒子通过FAD和FMN传递给细胞色素P450或者血红素氧化酶,两个来源于白假丝酵母的酶只有在NADPH-450还原酶存在条件下才具有活性^[23,24]。*CaHmx1*基因产物能在NADPH-450还原酶协助下将亚铁血红素转变成胆绿素^[25],而血红素氧化还原酶能使亚铁血红素活性降低,证明NADPH-450还原酶可能参与了真菌侵染过程中Fe的转变过程。在根瘤菌侵染豆科作物形成根瘤的过程中,CERBERUS蛋白起了关键性作用,该蛋白包含一个U-box区域和WD-40重复序列,其中WD-40重复序列可与多种蛋白和(或)小基团相互之间协调作用,参与根瘤的形成^[26]。本研究发现TDF 42-53-1编码WD域包含蛋白同源物,推测其可能在根瘤菌对花生根侵染过程中起了一定作用。

qRT-PCR结果显示,TDF 32-54-1编码产物(乙烯响应蛋白)表达量在抗病品种‘远杂9102’中,接种青枯菌后便持续上调,最高达到了对照的5倍以上,而在感病品种‘中花12’中表达始终处于抑制状态,而且表达水平极低,最大表达量不到对照的一半。据此推测,植株在受到外界生物胁迫时,大量表达的乙烯赋予了抗病品种一定的抗性,而感病品种则在与外界生物侵染的拮抗中处于劣势,致使与抗性相关的乙烯表达被抑制。当植物受到真菌、细菌和病毒等病原物侵染时,乙烯会作为一种毒力感应因子,参与抗病相关的信号调控^[27]。Dong^[28]研究发现,茉莉酸和乙烯能诱导植株产生对病害的抗性,本研究进一步验证了上述结果。TDF 35-54和36-48-4编码产物表达量均在抗病品种中上升,在感病品种中下降。微管蛋白(Tubulin)是广泛分布的一类球状蛋白质,作为亚基可以形成细胞骨架结构元件微管,有 α 和 β 两条链,两者可以组成一种稳定的存在形式。此外,还有 γ 、 δ 和 ϵ 微管蛋白。TDF 35-54所编码产物与致病疫霉 β -微管蛋白同源性达到了95%。而最近研究表明,微管蛋白可能与其它一些蛋白相互作用,在寄生菌侵染宿主后,调节寄生菌在宿主子细胞中的分配情况。另外,虽然45-48-2在抗、感病品种中均呈上调表达,但是在抗病品种中最大表达峰出现时间点(10 h)比感病品种(48 h)早。由此推测,这4个基因可能都参与了花生青枯病抗性相关的表达调控。结合qRT-PCR验证结果,可以初步判断这些基因对花生的青枯病抗性有潜在作用。序列

分析结果表明,上述基因均在花生抗青枯病SSH文库中多次出现,本研究得到的TDF与文库分析结果一致。可见,通过cDNA-AFLP技术发掘花生抗青枯病基因或片段是有效的。

青枯病抗性基因的相关研究在马铃薯、番茄、茄子等作物中均取得了一定的进展和成果。高媛媛等^[29]将抗菌肽Cecropin B基因转化到番茄,促进抗菌肽的分泌,在细胞表面建立青枯病防御机制,从而提高了番茄抗青枯病能力。虽然Cecropin B基因可转化到水稻、辣椒等不同作物,并使作物表现出对青枯病抗性不同程度上的提高,但该蛋白是从天蚕(*Hylophora cecropia*)血淋巴中诱导出的杀菌活性多肽,而非作物自身基因产物,将一种远源外源基因引入到作物中,其产生的其它未知效应,如转基因食品安全等问题,将是无法预测的。本研究从抗病花生品种自身基因组中发掘抗青枯病基因或片段,避免远源基因的转移,显得更有意义。Yuan等^[30]从马铃薯近缘栽培种富利亚的杂交后代材料MS-42.3中发现并分离纯化了一种抗青枯菌蛋白(API),梁成罡等^[31]进一步将该抗菌蛋白编码基因对感病马铃薯进行转化,使其对青枯病的抗性有了显著的提高。说明本研究得到的与花生青枯病抗性相关的基因或片段具有使感病花生品种抗青枯病能力增强的潜力,可进行更深入的研究分析。

参考文献(References):

- [1] 段乃雄, 谈宇俊, 姜慧芳, 胡端红. 花生种质资源抗花生青枯病鉴定. 中国油料, 1993, 15(1): 22–25, 29. [\[DOI\]](#)
- [2] Gabriëls SHEJ, Takken FLW, Vossen JH, de Jong CF, Liu Q, Turk SCHJ, Wachowski LK, Peters J, Witsenboer HMA, de Wit PJGM, Joosten MHAI. cDNA-AFLP combined with functional analysis reveals novel genes involved in the hypersensitive response. *Mol Plant-Microbe Interact*, 2006, 19(6): 567–576. [\[DOI\]](#)
- [3] Oomen RJFJ, Bergervoet MJEM, Bechem CWB, Visser RGF, Vincken JP. Exploring the use of cDNA-AFLP with leaf protoplasts as a tool to study primary cell wall biosynthesis in potato. *Plant Physiol Biochem*, 2003, 41(11–12): 965–971. [\[DOI\]](#)
- [4] Mao CZ, Yi KK, Yang L, Zheng BS, Wu YR, Liu FY, Wu P. Identification of aluminium-regulated genes by cDNA-AFLP in rice (*Oryza sativa* L.): aluminium-regulated genes for the metabolism of cell wall components. *J Exp Bot*, 2004, 55(394): 137–143. [\[DOI\]](#)
- [5] 王文霞, 褚栋, 高士刚, 闫红飞, 缙丽倩, 杨文香, 刘大

- 群. 小麦抗叶锈近等基因系 TcLr38 的 cDNA-AFLP 分析. 中国农业科学, 2010, 43(2): 293–303. [\[DOI\]](#)
- [6] 姜慧芳, 陈本银, 任小平, 廖伯寿, 雷永, 傅廷栋, 马朝芝, Mace E, Crouch JH. 利用重组近交系群体检测花生青枯病抗性 SSR 标记. 中国油料作物学报, 2007, 29(1): 26–30. [\[DOI\]](#)
- [7] 姜慧芳, 段乃雄. 花生种质资源描述规范和数据标准. 北京: 中国农业出版社, 2006. [\[DOI\]](#)
- [8] 吕建伟. 青枯菌诱导的花生 SSH 文库的构建及分析[学位论文]. 北京: 中国农业科学院研究生院, 2010. [\[DOI\]](#)
- [9] 晏立英, 黄家权, 雷永, 王圣玉, 廖伯寿. 花生青枯菌红安分离物的鉴定. 中国油料作物学报, 2010, 32(1): 144–146. [\[DOI\]](#)
- [10] 李乃坚, 黄爱兴, 袁四清, 王得元. 茄科作物抗青枯病水培法鉴定研究 II. 液体培养青枯菌的致病力. 广东农业科学, 2000, (3): 38–40. [\[DOI\]](#)
- [11] Bachem CWB, van der Hoeven RS, De Bruijn SM, Vreugdenhil D, Zabeau M, Visser RGF. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development. *Plant J*, 1996, 9(5): 745–753. [\[DOI\]](#)
- [12] 雷永, 廖伯寿, 王圣玉. 花生 AFLP——银染体系的建立与优化. 花生学报, 2003, 32 (增刊): 301–305. [\[DOI\]](#)
- [13] Leal-Bertioli SCM, José ACVF, Alves-Freitas DMT, Moretzsohn MC, Guimarães PM, Nielen S, Vidigal BS, Pereira RW, Pike J, Fávero AP, Parniske M, Varshney RK, Bertioli D. Identification of candidate genome regions controlling disease resistance in *Arachis*. *MBC Plant Biol*, 2009, (9): 112. [\[DOI\]](#)
- [14] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acid Res*, 2001, 29(9): e45. [\[DOI\]](#)
- [15] Luo M, Dang P, Bausher MG, Holbrook CC, Lee RD, Lynch RE, Guo BZ. Identification of transcripts involved in resistance responses to leaf spot disease caused by *Cercosporidium personatum* in peanut (*Arachis hypogaea*). *Genet Resist*, 2005, 95(4): 381–387. [\[DOI\]](#)
- [16] Simões-Araújo JL, Rodrigues RL, de A Gerhardt LB, Mondego JMC, Alves-Ferreira M, Rumjanek NG, Margis-Pinheiro M. Identification of differentially expressed genes by cDNA-AFLP technique during heat stress in cowpea nodules. *Federation Eur Biochem Soc Lett*, 2002, 515(1–3): 44–50. [\[DOI\]](#)
- [17] 邹艳敏, 于拴仓, 张凤兰, 余阳俊, 赵岫云, 张德双. 白菜抽薹性状相关基因的 cDNA-AFLP 分析. 遗传, 2009, 31(7): 755–762. [\[DOI\]](#)
- [18] Wang XJ, Tang CL, Zhang G, Li YC, Wang CF, Liu B, Qu ZP, Zhao J, Han QM, Huang LL, Chen XM, Kang ZS. cDNA-AFLP analysis reveals differential gene expression in compatible interaction of wheat challenged with *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *BMC Genomics*, 2009, (10): 289. [\[DOI\]](#)
- [19] McClelland M, Mathieu-Daude F, Welsh J. RNA fingerprinting and differential display using arbitrarily primed PCR. *Trends Genet*, 1995, 11(6): 242–246. [\[DOI\]](#)
- [20] Baldwin D, Crane V, Rice D. A comparison of gel-based, nylon filter and microarray techniques to detect differential RNA expression in plants. *Curr Opin Plant Biol*, 1999, 2(2): 96–103. [\[DOI\]](#)
- [21] Sztukowska M, Bugno M, Potempa J, Travis J, Kurtz DM. Role of rubrerythrin in the oxidative stress response of *Porphyromonas gingivalis*. *Mol Microb*, 2002, 44(2): 479–488. [\[DOI\]](#)
- [22] Lim PO, Lee IC, Kim J, Kim HJ, Ryu JS, Woo HR, Nam HG. Auxin response factor 2 (ARF2) plays a major role in regulating auxin-mediated leaf longevity. *J Exp Bot*, 2010, 61(5): 1419–1430. [\[DOI\]](#)
- [23] Park HG, Lim YR, Eun CY, Han S, Han JS, Cho KS, Chun YJ, Kim D. *Candida albicans* NADPH-P450 reductase: expression, purification, and characterization of recombinant protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 396(2): 534–538. [\[DOI\]](#)
- [24] Kim D, Cryle MJ, De Voss JJ, Ortiz de Montellano PR. Functional expression and characterization of cytochrome P450 52A21 from *Candida albicans*. *Archives Biochem Biophys*, 2007, 464(2): 213–220. [\[DOI\]](#)
- [25] Kim D, Yukl ET, Moënné-Loccoz P, Montellano PR. Fungal heme oxygenase: functional expression and characterization of Hmx1 from *Saccharomyces cerevisiae* and CaHmx1 from *Candida albicans*. *Biochemistry*, 2006, 45(49): 14772–14780. [\[DOI\]](#)
- [26] Yano K, Shibata S, Chen WL, Sato S, Kaneko T, Jurkiewicz A, Sandal N, Banba M, Imaizumi-Anraku H, Kojima T, Ohtomo R, Szczyglowski K, Stougaard J, Tabata S, Hayashi M, Kouchi H, Umehara Y. CERBERUS, a novel U-box protein containing WD-40 repeats, is required for formation of the infected thread and nodule development in the legume-*Rhizobium* symbiosis. *Plant J*, 2009, 60(1): 168–180. [\[DOI\]](#)
- [27] van Loon LC, Geraats BPJ, Linthorst HJM. Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. *Trends Plant Sci*, 2006, 11(4): 184–191. [\[DOI\]](#)
- [28] Dong XN. SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. *Curr Opin Plant Biol*, 1998, 1(4): 316–323. [\[DOI\]](#)
- [29] 高媛媛, 余文贵, 赵统敏, 张保龙, 倪万潮, 何晓兰, 姚姝. 抗菌肽 *Cecropin B* 基因导入番茄提高青枯病抗性. 江苏农业学报, 2007, 23(6): 652–653. [\[DOI\]](#)
- [30] Yuan F, He L. An anti-*Ralstonia solanacearum* protein from potato and its immunogold localization *in vivo*. Germany Springer Press, 1998, 209–217.
- [31] 梁成罡, 何礼远. 抗菌蛋白 AP1 编码基因对马铃薯的转化及其介导的青枯病抗性研究. 植物保护学报, 2002, 29(1): 51–56. [\[DOI\]](#)