

不同抗性种质上褐斑病菌诱导的苹果几丁质酶基因表达特征分析

张伟, 田义轲, 孔祥华, 侯董亮, 王彩虹

(青岛农业大学 园艺学院, 山东 青岛 266109)

摘要:植物几丁质酶通过降解真菌细胞壁起到抵抗真菌病害的作用,是一种重要的病程相关蛋白。现以苹果品种‘富士’、‘秦冠’及其杂交后代为试材,采用荧光定量 PCR 的方法,研究接种苹果褐斑病对苹果几丁质酶基因 *MdChi* 表达的影响。结果表明:褐斑病菌诱导下 *MdChi* 在 3 份种质的叶片中均有表达,感病品种‘富士’叶片中 *MdChi* 基因表达量明显高于抗病品种‘秦冠’及二者杂交后代‘FQ-2’。侵染后 24 h 时‘富士’叶片中的 *MdChi* 表达量明显上升,48 h 后表达量又迅速下降。而抗病品种‘秦冠’及抗病杂种‘FQ-2’中 *MdChi* 基因表达量在侵染后的 96 h 内未有较大幅度变化,均保持在较低水平。

关键词:苹果几丁质酶基因(*MdChi*);褐斑病菌;表达分析

中图分类号:S 436.611 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)17-0104-04

几丁质酶(chitinase EC,3,2,1,14)是一种以几丁质(β -1,4-乙酰葡萄糖胺线性同聚物)为底物的水解酶。研究表明真菌等病菌细胞壁中含有几丁质,但植物中含有几丁质酶却不含有几丁质^[1],因此普遍认为几丁质酶是一种与抗病相关的水解酶。几丁质酶作为一种诱导型表达的病程相关蛋白(pathogenesis related protein,即 PR 蛋白)已经在一些植物上表现出抗真菌的活性^[2-3]。

褐斑病(*Marssonina mali*)是苹果早期落叶病中导致落叶程度较重的真菌病害^[4],该病害通常在雨后及湿度较大的 6—7 月发生。调查表明,它在东亚(包括中国和日本)给苹果产量造成了很严重的损失^[5-6]。目前,控制该病害的方法主要以药物防治为主,但药物防治会造成很严重的环境污染及食品安全问题,因此,控制这种病害的最经济有效的方法是栽植抗性品种。党志国^[7]田间调查结果显示,‘秦冠’的抗病性显著高于‘富士’,‘富士’的褐斑病最高病情指数是‘秦冠’的 5.70 倍。李燕^[8]的研究也表明,‘秦冠’是抗病品种,‘富士’是感病品种。

荧光定量 PCR 技术具有定量精确、高灵敏度和高

通量的特点,已经被广泛应用于基因表达的分析^[9]。许多植物在遭受生物胁迫时防御机制的研究是在基因表达的基础上进行的^[10]。

该研究以褐斑病菌分生孢子侵染具有不同抗性苹果种质的叶片,并利用荧光定量 PCR 技术对侵染后不同时期 *MdChi* 基因的表达情况进行分析,以期为深入了解该基因在苹果褐斑病抗性方面的作用机制提供依据,并为以后利用生物技术提高果树的抗病性提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

植物材料为苹果(*Malus domestica* Borkh.)品种‘富士’和‘秦冠’以及二者杂交后代‘FQ-2’,褐斑病菌(*Marssonina coronaria*)孢子采自田间发病的苹果叶片。

1.2 试验方法

1.2.1 褐斑病菌接种 用柔软的毛刷,从田间采集的病叶上刷取病原菌分生孢子,用超纯水配制成浓度为 5×10^5 个/mL 的孢子悬浮液。从温室内盆栽的幼苗上选取发育程度一致的嫩叶,于傍晚时分用喷壶将病原孢子喷到其正、反面,立刻套上准备好的塑料袋保湿,并于第 2 天 10:00 前摘下袋子。连续 2 d 定时喷水保湿^[11]。在侵染后 0、24、48、72、96 h 分别取样,所有样品用液氮速冻后-70℃冰箱保存。

1.2.2 苹果叶片总 RNA 提取及反转录 利用 EASYspin 植物快速提取试剂盒(原平皓生物技术有限公司)提取样品总 RNA,按照说明书进行操作。提取后

第一作者简介:张伟(1988-),男,硕士研究生,研究方向为果树生物技术与遗传育种。E-mail:z20081288@126.com.

责任作者:田义轲(1967-),男,博士研究生,教授,硕士生导师,现主要从事果树遗传育种等研究工作。E-mail:yktian@qau.edu.cn.

基金项目:山东省科技发展计划资助项目(2014GNC110017)。

收稿日期:2015-05-19

在 1% 的琼脂糖凝胶上进行电泳检测,并用 NanoDrop 2000 超微量分光光度计测定 RNA 浓度。利用 Prime-Script™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)试剂盒(TaKaRa)进行反转录获得 cDNA 模板,具体操作步骤参照试剂盒说明书。

1.2.3 引物设计与荧光定量 PCR 分析 根据‘富士’叶片中已获得的苹果 *MdChi* 基因序列(GenBank accession No.:HQ416905)设计特异引物 CHIRT-F/CHIRT-R,用于荧光定量 PCR 分析。内参基因选 *GAPDH*。引物由上海生物工程有限公司合成,其序列见表 1。Real-time qPCR 扩增和分析在 Light-Cycler® 480II 荧光定量 PCR 仪(Roche)上进行。反应试剂来自 Light-Cycler® 480 SYBR Green I Master 试剂盒(Roche 产品)。反应体系为 20 μ L,内含:反转录的 cDNA 模板 2 μ L, Master Mix 10 μ L, 0.5 μ mol/L 的引物各 1 μ L, ddH₂O 6 μ L。样品检测设重复 3 次。PCR 反应程序如下:95℃ 5 min(预变性),然后按 95℃ 15 s(变性)→60℃ 30 s(退火)→72℃ 30 s(延伸)的程序进行 45 个循环。扩增产物的熔解步骤在 PCR 循环结束后立即进行,程序为:升温至 95℃ 5 s,然后降温至 65℃ 1 min。从 65℃ 连续升温至 97℃ 的

过程中进行荧光收集(5 次/℃)。最后,降温至 40℃。利用 LightCycler® 480II 的 Advanced Relative Quantification for All 软件进行分析,可得到目的基因和内参基因的循环阈值(Ct 值)。用 2^{-C_t} 方法^[12] 计算目标基因的相对表达量。

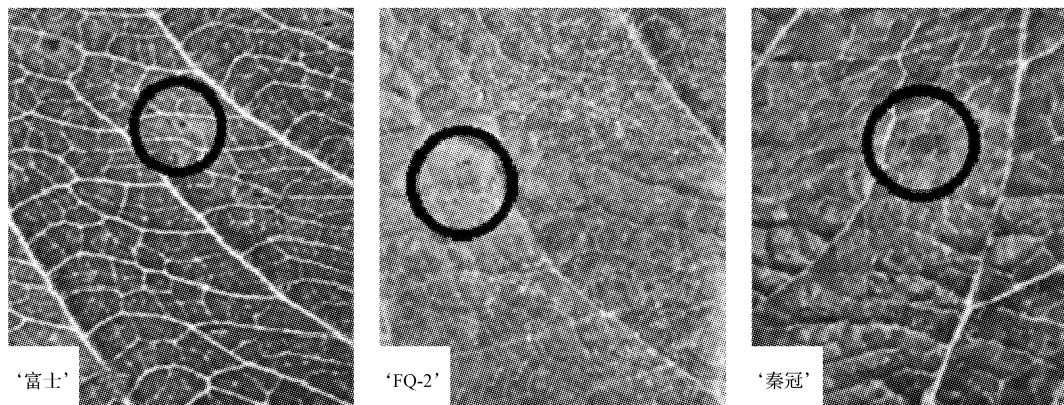
表 1 Real-time qPCR 分析中所用到的特异引物

基因	引物	序列	长度
Gene	Primer	Sequence(5'→3')	Length/bp
<i>MdChi</i>	CHIRT-F	CAGGGAAACAAGCCATCAAG	134
	CHIRT-R	TTGCCGCATTCAAGACCT	
<i>GAPDH</i> (CN494000)	GAPDH-F	GCTGCCAAGGCTGTTGGAA	104
	GAPDH-R	ACAGTCAGGTCAACAACGGAAAC	

2 结果与分析

2.1 褐斑病菌侵染后苹果叶片发病情况

喷雾接种褐斑病菌病原分生孢子后,随着时间的延长,先后在 3 份苹果种质的叶片上均观察到病斑(图 1),但出现病斑的时间有所不同。感病品种‘富士’出现病斑的时间较早,抗病品种‘秦冠’出现病斑的时间最晚。二者的杂交种‘FQ-2’(较抗病)出现病斑的时间也较晚。



注:‘富士’:接种后 7 d;‘FQ-2’:接种后 13 d;‘秦冠’:接种后 15 d。

Note: ‘Fuji’: 7 days after inoculation; ‘FQ-2’: 13 days after inoculation; ‘Qinguan’: 15 days after inoculation.

图 1 接种褐斑病菌分生孢子后叶片表面出现的病斑

Fig. 1 Disease spots appear on the apple leaves after spraying pathogenic conidium

2.2 *MdChi* 基因在褐斑病菌侵染后的相对表达量分析

从图 2 可以看出, *MdChi* 基因在褐斑病菌侵染不同时期的苹果叶片中均有表达。在试验的 3 份种质中, ‘富士’叶片中的表达量始终最高, ‘秦冠’叶片中的表达量始终最低。二者的杂交后代‘FQ-2’叶片中 *MdChi* 基因的表达量始终处于‘秦冠’与‘富士’之间,且在病菌侵染后的几个时间点没有较大幅度的变化。‘富士’叶片 *MdChi* 表达量在接种后的 24 h 上升约 2.5 倍,但在 48 h 又下降到了侵染时的表达水平。‘秦冠’中 *MdChi* 的表达水平在接种后的 96 h 内一直较低,且处于较为稳定的水平。

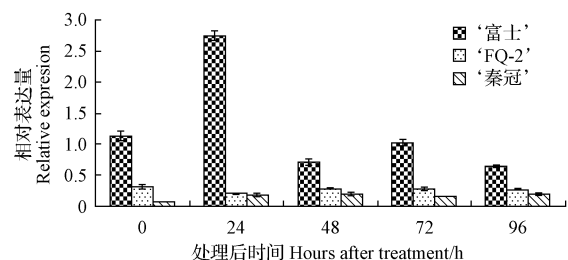


图 2 *MdChi* 基因在苹果叶片中的相对定量检测结果

Fig. 2 Relative quantification of *MdChi* gene expression in apple leaves

3 讨论

党志国^[7]田间发病情况调查发现,褐斑病病原菌在苹果品种‘富士’叶片上的发展速度远大于‘秦冠’。‘秦冠’的抗病性表现在抑制病菌侵染及侵染后阻止病菌扩展的能力。对褐斑病菌侵染后 CAT(过氧化氢酶)、HIR(过敏性诱导反应蛋白)的表达量分析也表明,‘富士’叶片中二者的表达模式较‘秦冠’更利于病菌快速侵入^[13]。

ZHAO 等^[14]以‘富士’为试材对褐斑病菌的侵染过程进行观察,发现在侵染 24 h 时就有吸器在表皮细胞中形成,侵染后第 3 天在表皮和叶肉细胞中观察到大量吸器,而真菌吸器不只具有获取细胞营养的能力,同时它还能抑制寄主的防卫反应并改写细胞的代谢流^[15-16]。‘富士’叶片在侵染后 24 h 时,*MdChi* 基因的表达水平急剧上升,48 h 后又出现迅速下降的现象,可能是因为感病初期叶片受到病菌侵染后,启动了防御机制来防御外来病菌的干扰和发作,同时提高自身的免疫系统来阻止病菌的侵入,但病菌在‘富士’叶片中生长快,很快侵入细胞,并形成大量吸器抑制了叶片防御系统的有关途径,最终导致了 *MdChi* 基因表达量的下降。

寄主植物细胞受病菌侵染诱导表达的 PR 蛋白分泌到细胞间隙后,就有可能直接与病菌侵染结构接触,干扰、破坏病菌生长发育,使植物表现为抗病。多数情况下,抗病品种几丁质酶的表达量要高于感病品种^[17]。褐斑病菌侵染苹果叶片时,病原菌与寄主的互作是非常复杂的,它是很多基因相互作用的过程^[13]。接种褐斑病原孢子后诱导 *MdChi* 表达量在感病品种‘富士’中的变化较大,表明该基因参与了苹果褐斑病菌侵染诱导的叶片抗性反应过程。‘富士’叶片中 *MdChi* 基因的表达量要远高于‘秦冠’,因此推测该酶可能在抗击病原入侵时起到一定作用,但不是‘秦冠’表现抗病的主要原因。

参考文献

- [1] VELUTHAKKAL R, DASGUPTA M G. Pathogenesis-related genes and proteins in forest tree species[J]. Trees-Structure and Function, 2010, 24(6):993-1006.
- [2] GUPTA P, RAVI I, SHARMA V. Induction of β -1,3-glucanase and chitinase activity in the defense response of *Eruca sativa* plants against the fungal pathogen *Alternaria brassicicola*[J]. Journal Plant Interactions, 2013, 8

(2):155-161.

- [3] OHNUMA T, TAIRA T, FUKAMIZO T. Antifungal activity of recombinant class V chitinases from *Nicotiana tabacum* and *Arabidopsis thaliana*[J]. Journal of Applied Glycoscience, 2012, 59(1):47-50.
- [4] JOHNSON R D, JOHNSON L, KOHMOTO K, et al. A polymerase chain reaction-based method to specifically detect *Alternaria alternata* apple pathotype (*A. mali*), the causal agent of *Alternaria blotch* of apple[J]. Phytopathology, 2000, 90(9):973-976.
- [5] 寿园园, 李春敏, 赵永波, 等. 苹果抗褐斑病离体鉴定的方法[J]. 果树学报, 2009(6):912-914.
- [6] 张坤, 党志国, 赵磊, 等. 富士、秦冠苹果对早期落叶病抗性的遗传分析[J]. 西北林学院学报, 2007(4):128-130.
- [7] 党志国. 秦冠、富士苹果早期落叶病抗性比较研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2006.
- [8] 李燕. 苹果主要生产品种和砧木对褐斑病和斑点病的抗性研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2011.
- [9] VANDESOMPELE J, DE PRETER K, PATTYN F, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes[J]. Genome Biology, 2002, 3(7):1-11.
- [10] DE LEON I P, MONTESANO M. Activation of defense mechanisms against pathogens in mosses and flowering plants[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2013, 14(2):3178-3200.
- [11] LEE D H, BACK C G, WIN N K, et al. Biological characterization of *Marssonina coronaria* associated with apple blotch disease[J]. Mycobiology, 2011, 39(3):200-205.
- [12] KENNETH J L, THOMAS D S. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J]. Methods, 2001, 25(4):402-408.
- [13] ZHOU Q, GAO H, WANG M, et al. Characterization of defense-related genes in the ‘Qinguan’ apple in response to *Marssonina coronaria* [J]. South African Journal of Botany, 2012, 80:36-43.
- [14] ZHAO H, HAN Q M, WANG M, et al. Cytology of infection of apple leaves by *Diplocarpon mali* [J]. European Journal of Plant Pathology, 2013, 136(1):41-49.
- [15] VOEGELE R T, MENDGEN K. Rust haustoria: nutrient uptake and beyond[J]. New Phytologist, 2003, 159(1):93-100.
- [16] VOEGELE R, MENDGEN K. Nutrient uptake in rust fungi: how sweet is parasitic life[J]. Euphytica, 2011, 179(1):41-55.
- [17] SHARMA I, KUMARI N, SHARMA V. Defense gene expression in *Sorghum bicolor* against *Macrophomina phaseolina* in leaves and roots of susceptible and resistant cultivars[J]. Journal of Plant Interactions, 2013, 9(1):315-323.

Expression Analysis of Apple Chitinase Gene Induced by *Marssonina mali* in Germplasms With Different Resistances

ZHANG Wei, TIAN Yike, KONG Xianghua, HOU Dongliang, WANG Caihong

(College of Horticulture, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109)

Abstract: Plant chitinase, one of the important pathogenesis-related (PR) proteins in plants, has the effect of resistance to fungal diseases by degradating the cell walls of fungi. In this study, leaves of apple cultivar ‘Fuji’, ‘Qinguan’ and one

六种药剂对棕榈蓟马的室内毒力及天敌敏感性测定

邵凡旭, 杨 栋, 李红玉, 任立云

(广西大学 农学院, 广西 南宁 530005)

摘 要:以棕榈蓟马 2 龄若虫和南方小花蝽为试材, 采用浸叶法, 研究 6 种药剂对棕榈蓟马 2 龄若虫的毒力及其天敌南方小花蝽对 6 种药剂的敏感性。结果表明: 6 种药剂对棕榈蓟马 2 龄若虫处理 24 h 后的 LC_{50} 大小依次为: 多杀菌素(1.500 3 mg/L) > 阿维菌素(1.628 5 mg/L) > 鱼藤酮(39.060 7 mg/L) > 吡虫啉(72.798 1 mg/L) > 苦皮藤素(215.200 3 mg/L) > 苦参碱(3 915.556 0 mg/L)。天敌南方小花蝽对 6 种药剂敏感性大小依次为: 阿维菌素(20.940 2 mg/L) > 多杀菌素(43.863 4 mg/L) > 吡虫啉(62.717 4 mg/L) > 鱼藤酮(806.230 5 mg/L) > 苦皮藤素(3 181.79 mg/L) > 苦参碱(12 532.7 mg/L)。

关键词:棕榈蓟马; 毒力测定; 敏感性

中图分类号:S 436.421.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)17-0107-03

棕榈蓟马 (*Thrips palmi* Karny) 属缨翅目 (Thysanoptera) 蓟马科 (Thripidae) 蓟马属 (*Thrips*), 又名棕黄蓟马、节瓜蓟马、瓜蓟马、南黄蓟马, 在世界上分布广泛, 也是我国南方危害较重的一种蔬菜害虫^[1]。棕榈蓟马最先于 1925 年在印尼苏门答腊岛的烟草上被发现, 20 世纪 70 年代后期, 棕榈蓟马已经在远东地区传布, 并造成了一定的经济损失。MEDINA 等^[2]报道, 1977 年菲律宾爆发棕榈蓟马, 在吕宋岛为害了 80% 的西瓜种植地。BOURNIER 1983 年报道, 在菲律宾棕榈蓟马已经发展成为重要的农业害虫。在随后的 10 年中, 棕榈蓟马从东南亚侵入到澳大利亚、美国的佛罗里达州、加勒比

地区、南美洲和非洲西部^[3-4]。在我国南至海南岛, 北到山东省莒县均有棕榈蓟马存在的报道, 主要分布地区为海南、广东珠江三角洲、湖南、广西、湖北、江苏、上海、浙江、台湾、山东、河南等^[5]。棕榈蓟马以成虫和若虫锉吸植物汁液, 嫩叶受害先呈银色斑点后硬化皱缩, 造成整个植株生长缓慢; 幼瓜受害后瘦小畸形, 严重时造成落果, 导致产量和品质受到影响。棕榈蓟马还可以以持久性的方式传播病毒, 如番茄斑萎病毒 (Tomato Spotted Wilt Virus, TSWV) 和花生黄斑病 (Peanut Yellow Spot Virus, PYSV)^[5-6]。目前, 在农业生产上防治棕榈蓟马很大程度上是依靠化学药剂, 长期大量使用化学农药不仅容易使棕榈蓟马产生抗药性, 增加防治该虫的难度, 而且还会造成环境污染, 恶化人类的生存环境; 作物上的农药残留量加大, 让人们心生恐惧, 并且杀伤天敌, 使自然控制能力减退。因此, 现选用生物农药, 通过室内毒力测定的方法对棕榈蓟马进行药剂筛选试验, 以期棕榈蓟马的防治筛选出较好的药剂, 为大田生产提供参考依据。

第一作者简介:邵凡旭(1989-), 女, 河南方城人, 硕士, 研究方向为昆虫毒理及抗药性。E-mail: 476438633@qq.com.

责任作者:任立云(1971-), 女, 河北唐山人, 博士, 副教授, 研究方向为农业昆虫与害虫防治。E-mail: liyun_ren@163.com.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31260436); 广西自然科学基金资助项目(2012GXNSFAA053046)。

收稿日期:2015-05-25

selection derived from their hybridization 'QF-2' were used as materials. With quantitative real-time PCR method, expression of apple chitinase gene *MdChi* in response to marssonina blotch was analysed. The results showed that *MdChi* gene was expressed in all these three germplasms. The expression quantity in the susceptible cultivar 'Fuji' was significantly higher than the resistant cultivar 'Qinguan' and their hybrid 'FQ-2'. Twenty-four hours after the inoculation, the expression level in 'Fuji' leaves increased obviously, and then sharply declined. However, the expression of this gene maintained at low levels and there was no significant change in both of the resistant cultivar 'Qinguan' and the resistant hybrid 'FQ-2' during 96 hours after the inoculation.

Keywords: apple chitinase gene *MdChi*; *Marssonina mali*; expression analysis