

# 感染青枯病病原菌 *R. solanacearum* 的茄子 酵母双杂交文库构建及评价

肖熙鸥<sup>1,2</sup>, 林文秋<sup>1,2</sup>, 李威<sup>1,2</sup>, 高晓敏<sup>1,2</sup>, 吕玲玲<sup>1,2</sup>

(1. 中国热带农业科学院 南亚热带作物研究所, 广东 湛江 524091;

2. 省级现代农业(重要热带作物)产业技术研发中心建设, 广东 湛江 524091)

**摘 要:**以高抗青枯病的茄子高代自交系‘Q31-1’为试材,采用同源重组法构建了感染青枯病原菌 *R. solanacearum* 的茄子根部酵母双杂交 cDNA 文库,以期为研究茄子(*Solanum melongena* L.)与青枯病病原菌 *R. solanacearum* 的互作机制奠定基础。结果表明:文库库容大于  $1.25 \times 10^7$  CFU,平均插入片段大于 1.5 kb,随机挑选 24 个单克隆进行 PCR 检测,阳性率为 100%。表明该文库可用于进行下一步互作蛋白筛选的研究。

**关键词:**茄子; *R. solanacearum*; 酵母双杂交; cDNA 文库

**中图分类号:**S 436.411 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)21-0102-04

茄子(*Solanum melongena* L.)是我国主要的栽培蔬菜之一。由青枯病病原菌 *R. solanacearum* 侵染引起的青枯病是茄子生产中的毁灭性病害,一般会导致茄子减产 20%~30%,严重时损失达 50%~60%<sup>[1]</sup>。由于缺乏有效的化学防治手段,抗病育种成为最经济有效的防治方法。目前茄子抗青枯病的研究主要集中在抗病材料的鉴定、抗性遗传规律的分析以及分子标记上<sup>[2-4]</sup>,而关于茄子抗病机理的研究相对较少。

根据“基因对基因”学说,寄主的 R 蛋白与 *R. solanacearum* 的 Avr 蛋白识别,寄主表现为抗病,反之则表现为感病。寄主识别病原菌的 Avr 蛋白后,抗病信号通过信号传导途径进行传导,产生一系列的生化反应,最终使寄主表现为抗病<sup>[5-8]</sup>。随着高通量技术和生物信息学的发展,目前已经完成了多个 *R. solanacearum* 菌株的基因组的测序<sup>[9-13]</sup>。生物信息学分析结果表明,约有 195 个基因与 *R. solanacearum* 的致病性相关<sup>[9]</sup>,其中大部分为二型或三型分泌因子<sup>[14-15]</sup>。同时也通过对侵染 *R. solanacearum* 的材料进行高通量测序,分离了一

部分与 *R. solanacearum* 抗性相关的基因<sup>[16-17]</sup>。这些研究为解析植物抗青枯病病原菌 *R. solanacearum* 奠定了良好的基础。然而关于这些基因的功能及其作用机理却鲜见报道。酵母双杂交技术是研究植物抗病机理的重要的方法之一,不仅能够筛选、验证植物-病原菌的互作<sup>[18-19]</sup>,也能研究植物体抗病信号的传导<sup>[20-21]</sup>,为植物抗病机理的研究做出了重要贡献。

该研究采用同源重组法,构建感染青枯病病原菌 *R. solanacearum* 的茄子的酵母双杂交均一化 cDNA 文库,以期为研究茄子抗青枯病机制以及进行茄子抗青枯病的遗传改良奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试茄子为课题组选育的高抗青枯病的高代自交系‘Q31-1’。

强致病力青枯病病原菌 *R. solanacearum* XL1-2,生理小种 1 号由课题组从田间发病植株中分离并保存。

pGADT7 载体购买自 Clontech 公司;Oligotex mRNA Kits 购自 Qiagen 公司;SuperscriptDouble Stand cDNA Kit 和 Trimmer-2cDNA Normalization Kit 购自 Invitrogen 公司。

### 1.2 试验方法

1.2.1 茄子苗的水培 将茄子种子表面消毒后置于 MS 基本培养基上萌发,当幼苗生长至 2 片真叶时移栽水培。水培装置为 240 mL 一次性水杯,放置 0.8~1.0 cm 直径的陶粒,每个一次性水杯中放置 2 株幼苗。

**第一作者简介:**肖熙鸥(1988-),男,硕士,研究实习员,研究方向为蔬菜遗传育种及生物技术。E-mail: xiao-forlearning@163.com.

**基金项目:**中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(中国热带农业科学院南亚热带作物研究所)资助项目(1630062015005);海南省自然科学基金资助项目(20153120);国家自然科学基金资助项目(31501774)。

**收稿日期:**2016-08-04

培养基为1/2MS液体培养基,每隔1 d根据小碗中水分残留情况添加水。当幼苗长至4片真叶时,接种 *R. solanacearum*,48 h后取茄子根部构建酵母双杂交文库。

1.2.2 病原菌的分离及接种 挑取青枯病病原菌单菌落,放入TZC液体培养基中28℃过夜培养,重悬浮至浓度为 $1.0 \times 10^8$  CFU $\cdot$  mL $^{-1}$ ,将茄子根部浸泡30 min后继续进行水培。

1.2.3 总RNA的提取及cDNA的合成 利用Trizol法提取根部总RNA,经过电泳检测合格后利用Oligotex mRNA Kit(Qiagen)分离纯化mRNA。以4.5  $\mu$ g mRNA为模板,L-RT(5'-TCATCTGCAGCTCGAGCACAACCTTTGTACAA-GAAAGTTGGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTNN-3')为引物,合成第1链cDNA。以第1链cDNA为模板,加入DEPC-treated water 92  $\mu$ L,5 $\times$  second strand buffer 30  $\mu$ L,10 mmol $\cdot$  L $^{-1}$  (each) dNTPs 3  $\mu$ L, *E. coli* DNA ligase(10 U $\cdot$   $\mu$ L $^{-1}$ ) 1  $\mu$ L, *E. coli* DNA Polymerase I 4  $\mu$ L, *E. coli* RNaseH(2 U $\cdot$   $\mu$ L $^{-1}$ ) 1  $\mu$ L,16℃反应2 h,加入T4 DNA polymerase 2  $\mu$ L,16℃反应5 min,合成第2链cDNA。

1.2.4 双链cDNA加5'接头 cDNA模板34  $\mu$ L,10 $\times$  T4 ligase buffer 5  $\mu$ L,5' Adapter (1  $\mu$ g $\cdot$   $\mu$ L $^{-1}$ )10  $\mu$ L,T4 DNA ligase(40 U $\cdot$   $\mu$ L $^{-1}$ )1  $\mu$ L,混匀后16℃孵化16~24 h,最后加入2  $\mu$ L 10 mmol $\cdot$  L $^{-1}$  dNTP,2  $\mu$ L T4 DNA聚合酶,16℃放置20 min,补平末端。3个读码框,每个读码框连接1份,共3份。5' Adapter序列:5'-CAGAT-TACGCTCATATGACAACCTTTGTACAAAAAAGTTGG(AA)-3'。

1.2.5 cDNA的均一化处理 将1.2.4获得的cDNA利用乙醇沉淀后加入4  $\mu$ L 4 $\times$ 杂交buffer,98℃2 min,68℃5 h,然后加入4  $\mu$ L 5 $\times$ DSN buffer,再加入0.2  $\mu$ L的DSN酶(1 U $\cdot$   $\mu$ L $^{-1}$ ),置于68℃反应3 min。加入10  $\mu$ L EDTA,混匀,加入等体积的酚氯仿抽提1次。将抽提产物进行乙醇沉淀,溶于80  $\mu$ L DEPC水中。取1  $\mu$ L保存。利用下列体系进行cDNA片段的扩增,cDNA DSN treatment 79  $\mu$ L,10 $\times$ PCR buffer 10  $\mu$ L,10 mmol $\cdot$  L $^{-1}$  (each) dNTPs 4  $\mu$ L,50 mmol $\cdot$  L $^{-1}$  MgSO $_4$  5  $\mu$ L,Primer F(100 ng $\cdot$   $\mu$ L $^{-1}$ ) 1  $\mu$ L,Primer R(100 ng $\cdot$   $\mu$ L $^{-1}$ ) 1  $\mu$ L, *Taq* DNA Polymerase 1  $\mu$ L。反应程序95℃1 min;95℃30 s,60℃30 s,72℃6 min,5个循环。采用1%质量浓度的低熔点琼脂糖胶电泳检测cDNA产物,切胶回收1 kb以上的片段。引物序列为Primer F:5' CAGAT-TACGCTCATATGACA 3', Primer R: 5' TCATCTG-CAGCTCGAGCACA 3'。

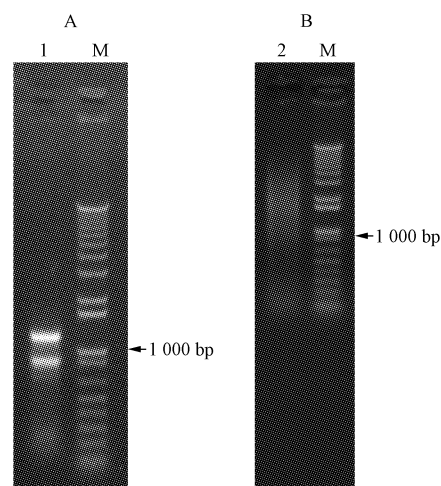
1.2.6 酵母双杂交文库的构建及鉴定 利用同源重组法构建文库。将1.2.5回收的7  $\mu$ L的产物分别与3  $\mu$ L

的经酶切(*Nde*I/*Xho*I)处理线性化的pGADT7载体混匀,加入5  $\mu$ L的Infusion重组酶,以及5  $\mu$ L的DEPC水,混匀,50℃反应1 h。将连接产物通过电转化大肠杆菌DH5 $\alpha$ 感受态细胞,置于37℃,225~250 r $\cdot$  min $^{-1}$ 培养至少1 h。取转化后细菌原液10  $\mu$ L稀释1 000倍后,从中取出10  $\mu$ L涂布LB平板(含50 mg $\cdot$  L $^{-1}$ 氨苄青霉素),37℃培养过夜,第2天计数。菌落数(CFU $\cdot$  mL $^{-1}$ )=平板上的克隆数 $\times$ 100 $\times$ 1 000/10  $\mu$ L;文库总菌落数(CFU)=菌落数(CFU $\cdot$  mL $^{-1}$ ) $\times$ 文库菌液总体积(mL)。随机挑取平板上的24个单克隆,PCR扩增,电泳检测PCR产物大小。PCR检测引物F:5'-TAATACGACT-CACATATAGGCGAGCG-3', R: 5'-GTGAAGTTGCGG-GGTTTTTCAGTAT-3'。

## 2 结果与分析

### 2.1 总RNA的提取及mRNA的分离

由图1A可知,用于建库的样品RNA条带清晰,无降解,无蛋白和DNA污染,且28S的亮度是18S的2倍。同时OD $_{260}$ /OD $_{280}$ 和OD $_{260}$ /OD $_{230}$ 值在1.8~2.0,因此RNA质量符合建库要求。利用Oligotex mRNA Kits试剂盒分离mRNA,电泳结果表明mRNA条带清晰,呈弥散状分布,无降解(图1B),质量合格,因此mRNA的质量可以满足建库需要。



注:1.总RNA;2.mRNA;M.1 kb Plus DNA Ladder。

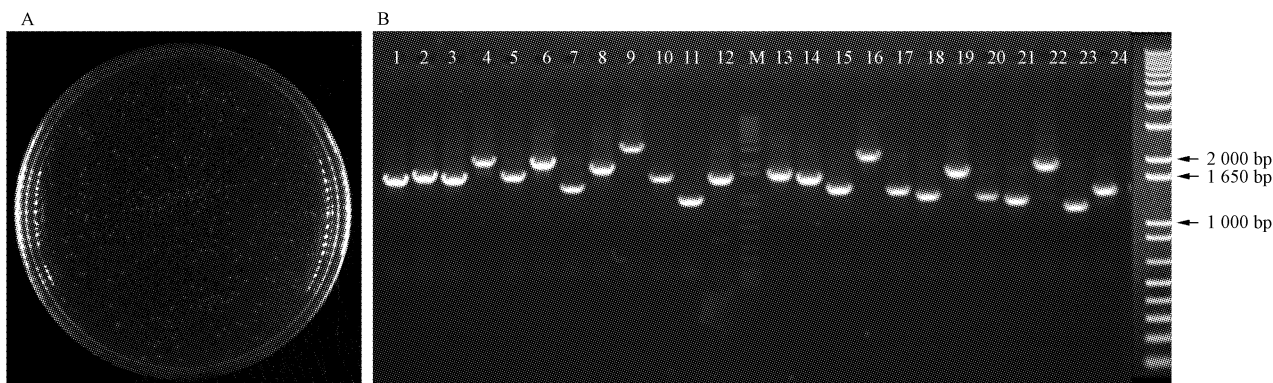
Note:1. Total RNA;2. mRNA;M. 1 kb Plus DNA Ladder.

图1 茄子根部总RNA(A)与mRNA(B)电泳结果

Fig.1 Electrophoresis result of total RNA(A) and mRNA(B) of eggplant root

### 2.2 文库质量的鉴定

由图2A可知,共获得约250个克隆子。库容量为 $2.5 \times 10^6$  CFU $\cdot$  mL $^{-1}$ ;转化后共计5 mL的原始菌液,所以总库容量为 $1.25 \times 10^7$  CFU。从平板中随机选取24个克隆进行PCR检测,PCR结果表明,其阳性率为



注:1~24. 重组质粒;M. 1 kb Plus DNA Ladder。

Note:1~24. The recombinant plasmid;M. 1 kb Plus DNA Ladder.

图2 酵母双杂交 cDNA 文库的检测

Fig. 2 Detection of yeast two-hybrid cDNA library

100%,插入片段主要分布在 1.0~2.0 kb,平均长度约为 1.5 kb,并且具有较好的多态性(图 2B)。

### 3 讨论

在自然条件下 *R. solanacearum* 主要是通过植物根部进入植物体内,阻塞水分的运输,最终导致植株萎焉。利用切片及化学染色等方法对 *R. solanacearum* 浸染过程进行分析,结果表明 *R. solanacearum* 通过根组织的皮层细胞间隙向木质部移动,并在移动的过程分泌各种酶破坏细胞壁<sup>[22-24]</sup>。*R. solanacearum* 进入木质部后,其在木质部内快速的增殖,阻塞水分的运输,从而导致植株的萎焉<sup>[24]</sup>。根组织是寄主防御 *R. solanacearum* 的第 1 道屏障,因此筛选茄子根部 *R. solanacearum*-茄子的互作蛋白对研究茄子与 *R. solanacearum* 的互作机制及茄子抗青枯病机理有着重要的意义。为了克隆和分离与青枯病抗性相关的基因,蒋晶等<sup>[25]</sup>以接种 *R. solanacearum* 后茄子叶片为材料构建了 cDNA 文库,但未见后续报道。DESLANDES 等<sup>[26-27]</sup>分离出第 1 个抗青枯病基因 *RRS-1R*,并且证明其能与 *R. solanacearum* 分泌的无毒因子 Popp2 产生互作,使拟南芥产生抗性,且其抗病信号途径部分依赖于水杨酸途径。XIAO 等<sup>[28]</sup>从茄子中分离的抗青枯病基因 *RE-bw* 也能与 Popp2 产生互作,使茄子产生抗性,并且 *RE-bw* 通过与多个信号蛋白互作,传递抗病信号。ANAND 等<sup>[29]</sup>利用同源 PCR 法克隆了 6 个可能与茄子抗 *R. solanacearum* 相关的 NBS-LRR 基因,虽然没有进行相关功能的验证,但为研究茄子的抗病机理提供了良好的基础。GUINARD 等<sup>[30]</sup>对 9 个从茄子上分离的 *R. solanacearum* 进行全基因组测序,分析结果表明 *ripAX2*, *ripA1*, *ripC2*, *ripE2*, *ripS6* 和 *ripP2* 等基因在可能与 *R. solanacearum* 的致病力有关。利用上述报道的 R 蛋白或者 Avr 因子筛选该文库,不但能够分析 R 蛋白或者 Avr 因子的功能和作用机理,而且还可解析茄子抗青枯病网络和抗病机制奠定理论基础。

文库的代表性和重组 cDNA 序列的完整性是检测文库质量的重要指标。在该试验中,利用置换合成法,在 RNA 酶 H、大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 和 DNA 连接酶的作用下,直接合成第 2 链 cDNA。与 PCR 法合成第 2 链 cDNA 相比,该方法能够有效的提高文库的代表性,尤其是保证低表达量的基因能够被覆盖。库容量检测结果表明,该文库总库容量为  $1.25 \times 10^7$  CFU,能够满足文库筛选要求,并且 PCR 检测结果表明,阳性率为 100%。同时为了保证基因的完整性,采用同源重组的方法构建文库,避免了因为酶切而使基因断裂的问题。构建文库时,在双链 cDNA 的 5'端通过连接添加 3 种读码框,使基因能够在酵母体内得以表达。最后为降低高表达量基因对后续研究造成的不利影响,使用 DSN 法对其进行均一化处理,减少后续酵母筛选的工作量并提高筛选效率。综上所述该文库质量合格,适合进行文库的筛选。

### 参考文献

- [1] COELHO R, PEREIRA B, NODA H, et al. Murcha Bacteriana no Estado do Amazonas, Brasil[J]. Fitopatol Bras, 2004, 29: 21-27.
- [2] 封林林, 屈冬玉, 金黎平, 等. 茄子青枯病抗性的遗传分析[J]. 园艺学报, 2003, 30(2): 163-166.
- [3] 杨建国, 皮向红, 陈惠明, 等. 茄子 ER300 抗青枯病遗传及在育种中的应用[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2006, 32(3): 277-279.
- [4] LEBEAU A, GOUY M, DAUNAY M C, et al. Genetic mapping of a major dominant gene for resistance to *Ralstonia solanacearum* in eggplant[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2013, 126(1): 143-158.
- [5] LOAKE G, GRANT M. Salicylic acid in plant defence the players and protagonists[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2007, 10(5): 466-472.
- [6] KOORNNEEF A, PIETERSE C E M. Cross talk in defense signaling[J]. Plant Physiology, 2008, 146(3): 839-844.
- [7] RIVAS-SAN VICENTE M, PLASENCIA J. Salicylic acid beyond defence: Its role in plant growth and development[J]. Journal of Experimental Botany, 2011, 62(10): 3321-3338.
- [8] CHEHAB E W, BRAAM J. Jasmonates in plant defense responses bio-

- communication of plants[J]. Signaling and Communication in Plants, 2012 (14): 67-88.
- [9] SALANOUBAT M, GENIN S, ARTIGUENAVE F, et al. Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*[J]. Nature, 2002, 415 (6871): 497-502.
- [10] NORMAN D J, ZAPATA M, GABRIEL D W, et al. Genetic diversity and host range variation of *Ralstonia solanacearum* strains entering North America[J]. Phytopathology, 2009, 99(9): 1070-1077.
- [11] XU J, ZHENG H J, LIU L, et al. Complete genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* strain Po82[J]. Journal of Bacteriology, 2011, 193(16): 4261-4262.
- [12] REMENANT B, BABUJEE L, LAJUS A, et al. Sequencing of k60, type strain of the major plant pathogen *Ralstonia solanacearum*[J]. Journal of Bacteriology, 2012, 194(10): 2742-2743.
- [13] CAO Y, TIAN B Y, LIU Y X, et al. Genome Sequencing of *Ralstonia solanacearum* FQY\_4, isolated from a bacterial wilt nursery used for breeding crop resistance[J]. Genome Announcements, 2013(3): e00125-13.
- [14] SCHELL M A. Control of virulence and pathogenicity genes of *Ralstonia solanacearum* by an elaborate sensory network[J]. Annual Review of Phytopathology, 2000, 38: 263-292.
- [15] JACOBS J M, BABUJEE L, MENG F, et al. The *in planta* transcriptome of *Ralstonia solanacearum*: Conserved physiological and virulence strategies during bacterial wilt of tomato[J]. MBio, 2012, 3(4): e112-e114.
- [16] CHEN Y N, REN X P, ZHOU X J, et al. Dynamics in the resistant and susceptible peanut (*Arachis hypogaea* L.) root transcriptome on infection with the *Ralstonia solanacearum*[J]. BMC Genomics, 2014(15): 1078.
- [17] ZULUAGA A P, SOLÉ M, LU H B, et al. Transcriptome responses to *Ralstonia solanacearum* infection in the roots of the wild potato *Solanum commersonii*[J]. BMC Genomics, 2015(16): 246.
- [18] ZHOU J M, LOH Y T, BRESSAN R A, et al. The tomato gene *Pti1* encodes a serine/threonine kinase that is phosphorylated by *Pto* and is involved in the hypersensitive response[J]. Cell, 1995, 83(6): 925-935.
- [19] WEI H L, CHAKRAVARTHY S, MATHIEU J, et al. *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 type III secretion effector polymutants reveal an interplay between HopAD1 and AvrPtoB[J]. Cell Host & Microbe, 2015, 17 (6): 752-762.
- [20] AZEVEDO C, SADANANDOM A, KITAGAWA K, et al. The RARI interactor SGT1, an essential component of *R* gene-triggered disease resistance [J]. Science, 2002, 295(5561): 2073-2076.
- [21] FERRO E, TRABALZINI L. The yeast two-hybrid and related methods as powerful tools to study plant cell signaling[J]. Plant Molecular Biology, 2013, 83(4): 287-301.
- [22] VASSE J. Microscopic studies of intercellular infection and protoxylem invasion of tomato roots by *Pseudomonas solanacearum*[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 1995(8): 241-251.
- [23] VAILLEAU F, SARTOREL E, JARDINAUD M C C O, et al. Characterization of the interaction between the bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum* and the model legume plant *Medicago truncatula*[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2007, 20(2): 159-167.
- [24] DIGONNET C, MARTINEZ Y, DENANCÉ N, et al. Deciphering the route of *Ralstonia solanacearum* colonization in *Arabidopsis thaliana* roots during a compatible interaction: Focus at the plant cell wall[J]. Planta, 2012, 236(5): 1419-1431.
- [25] 蒋晶, 肖熙鸥, 曹必好, 等. 茄子青枯病诱导的 cDNA 文库构建与鉴定[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(4): 22-24.
- [26] DESLANDES L, OLIVIER J, THEULIERES F, et al. Resistance to *Ralstonia solanacearum* in *Arabidopsis thaliana* is conferred by the recessive *RRS1-R* gene, a member of a novel family of resistance genes[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002, 99(4): 2404-2409.
- [27] DESLANDES L, OLIVIER J, PEETERS N, et al. Physical interaction between *RRS1-R*, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003, 100(13): 8024-8029.
- [28] XIAO X O, LI G N, CAO B H, et al. Functional characterization of a putative bacterial wilt resistance gene (*RE-bw*) in eggplant[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2015, 33(4): 1058-1073.
- [29] ANAND C R, SUDARSHINI V S, ASWATH C, et al. Isolation, characterization and evolution of NBS-LRR encoding disease-resistance gene analogs in eggplant against bacterial wilt[J]. European Journal of Plant Pathology, 2015, 143(3): 417-426.
- [30] GUINARD J, VINATZER B A, POISSIER S, et al. Draft genome sequences of nine strains of *Ralstonia solanacearum* differing in virulence to eggplant (*Solanum melongena*) [J]. Genome Announcements, 2016, 4(1): e01415.

## Construction and Evaluation of Yeast Two Hybrid cDNA Library for Eggplant Root Inoculation With *R. solanacearum*

XIAO Xi'ou<sup>1,2</sup>, LIN Wenqiu<sup>1,2</sup>, LI Wei<sup>1,2</sup>, GAO Xiaomin<sup>1,2</sup>, LYU Lingling<sup>1,2</sup>

(1. South Subtropical Crop Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Zhanjiang, Guangdong 524091; 2. Construction on the Research and Development Center of Industry Technology for Provincial Modern Agriculture (Key Tropical Crops), Zhanjiang, Guangdong 524091)

**Abstract:** Taking 'Q31-1' eggplant as test material, the yeast two hybrid cDNA library was constructed after the eggplant inoculation with *R. solanacearum*, in order to research the interaction mechanism between the eggplant and *R. solanacearum*. The results showed that the library contained  $1.25 \times 10^7$  CFU with 100% recombination rate based on 24 randomly selected clones. The result of PCR showed that length of insert cDNA fragments was greater than 1.5 kb. The results demonstrated that the library could be used to screen the interaction protein.

**Keywords:** eggplant; *R. solanacearum*; yeast two hybrids; cDNA library