

芸薹链格孢菌与白菜互作基因表达谱芯片分析

刘 影^{1,2}, 徐文静¹, 杜 茜¹, 杨信东², 李启云¹

(1. 吉林省农业科学院 吉林 长春 130124; 2. 吉林农业大学 农学院 吉林 长春 130118)

摘 要: 利用拟南芥基因芯片, 对白菜经芸薹链格孢菌侵染前后的基因表达谱进行比较分析。结果表明: 差异表达基因 385 个, 其中上调基因为 280 个, 下调基因为 105 个。将所筛选出的差异表达基因分为 14 类, 即: 病程相关基因, 防御相关基因, 氧爆作用类, 信号转导类, 激素相关类, 运输类, 非生物胁迫类, 细胞维持与发育, 细胞壁修饰类, 次生代谢类, 代谢与合成类, 蛋白降解类, 及假想蛋白和未知功能蛋白。生物信息学分析显示, 检测到的信号转导类基因差异表达比例最高, 占 24%; 其次, 防御基因和代谢合成基因占的比例也较高, 分别达到 13% 和 14%。值得注意的是, 直接与病程发生相关差异表达的基因很少。同时, 在差异表达基因中, 未知蛋白和假想蛋白占有很大比例。

关键词: 白菜黑斑病; 基因芯片; 差异表达

中图分类号: S 949.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)07-0116-03

白菜黑斑病主要由芸薹链格孢菌(*Alternaria brassicae*)引起, 是一种世界性病害^[1-3]。主要通过种子传带形成异地扩散和蔓延, 危害叶片和整株植物, 全生育期均可发病, 严重影响白菜产量和质量, 在十字花科蔬菜生产上的危害性仅次于软腐病、霜霉病和病毒病。自 20 世纪 30 年代被发现以来, 分布已较为普遍。进入 21 世纪该病又有间歇性的流行, 已成为大白菜种植区的主要病害之一^[3]。

目前对有关白菜黑斑病的发生、发展的分子机理, 尤其是发病过程中发生的基因表达改变情况知之甚少, 且还没有白菜的基因芯片, 受到 2007 年赵建伟等发表的油菜与核盘菌互作的文章采用拟南芥的 cDNA 做芯片的启发, 以及目前十字花科中只有拟南芥芯片这一事实, 该实验采用拟南芥的 cDNA 芯片。现利用基因芯片(cDNA Microarray)技术^[4], 分析白菜接种芸薹链格孢菌的处理和对照(未接种)所表现的基因的差异表达^[5-8], 以期研究白菜黑斑病发生的基因调控机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

白菜品种: 农大 80; 病原菌来源: 白菜黑斑病叶, 由吉林农业大学植物病理实验室杨信东教授提供。

第一作者简介: 刘影(1975-), 女, 吉林梨树人, 博士, 副研究员, 现从事作物抗病虫性研究与利用工作。

通讯作者: 李启云(1974-), 男, 博士, 研究员, 现主要从事分子病理学方面研究工作。

基金项目: 吉林省农业科学院博士启动基金资助项目(20040801)。

收稿日期: 2009-12-31

1.2 试验方法

1.2.1 病原孢子培养 采用保湿培养法, 将白菜黑斑病叶片用清水浸泡 24 h, 待完全泡透后, 培养皿底铺 3 层滤纸, 将病叶剪成直径为 3~5 cm 的小块, 叶背朝上, 平铺于滤纸上, 喷水, 23℃保湿, 水面不超过叶厚为宜。24 h 后观察产孢情况。待 400 倍镜下每视野内有 3~5 个孢子或更多, 即可接种。

1.2.2 接种 采用涂抹法, 蘸取培养皿内孢子悬液, 涂抹于要接种的白菜叶面, 对照涂抹清水, 将接种后的白菜和对照分别置于 2 个托盘内, 内盛满水, 分别用塑料袋罩上, 并扎紧托盘底部, 以防水分蒸发。23℃连续培养 24 h, 观察叶面水渍是否干燥, 若发现叶面有水浸状透明斑块, 表明接种已经成功。

1.2.3 采样 接种后 3 d, 病斑表现为明显的黑斑病症状, 取处理叶片的黑斑部位, 对照取相同位置叶片和部位。

1.2.4 总 RNA 制备 采用一步法, 用 RNA 提取试剂盒 Trigol 提取总 RNA, 试剂盒购于北京鼎国生物技术有限公司。按试剂盒使用说明具体操作。

1.2.5 芯片制备 该试验采用拟南芥基因表达谱芯片分别与对照组白菜和黑斑病处理组白菜 cDNA 杂交, 芯片杂交和数据收集由上海晶泰生物技术有限公司完成。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 提取

试验中处理组 CJ 提取总 RNA OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的值 2.106; 对照组 c 提取总 RNA OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的值 2.112。电泳结果证实总 RNA 质量符合要求(见图 1)。

2.2 差异表达基因筛选

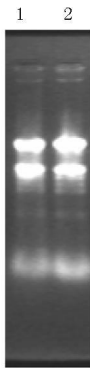


图1 总 RNA 提取电泳图谱
注: 1: C₆; 2: C₆ C 为对照, C₇ 为处理。

对得到的芯片数据,按照功能进行查找、分类、汇总。发现对照与芸苔链格孢菌接种处理的样品,表达差异的基因共有 385 个,其中表达上调的基因有 280 个,相对于对照表达上升 2 倍或 2 倍以上的基因有 223 个;表达下调的基因有 105 个,其中相对于对照表达下降 2 倍或 2 倍以上的基因有 81 个。

2.3 差异表达基因的分析

由表 1 可知,在筛选到的 385 个差异表达基因中,按照其功能分类,可以分为 14 类^[9-11],即病程相关类,防御相关类,氧爆作用类,信号转导类,与激素反应相关类,运输类,非生物胁迫相关类,细胞维护与发育类,细胞壁修饰类,次生代谢相关类,蛋白降解相关类,代谢与合成相关类,及假想蛋白和未知蛋白类。

表 1 上调基因和表达差异基因的种类比例

类别	上调基因数量	下调基因数量	表达差异基因数量	百分比 / %
病程相关基因	3	1	4	1
防御相关基因	41	10	51	13
氧爆作用	22	2	24	6
信号转导	66	28	94	24
激素相关类	6	4	10	3
运输类	28	3	31	8
非生物胁迫相关	15	4	19	5
细胞维持与发育	18	13	31	8
细胞壁修饰	8	6	14	4
次生代谢	5	0	5	1
代谢与合成类	36	17	53	14
蛋白降解类	3	1	4	1
假想蛋白	18	4	22	6
未知蛋白	11	12	23	6
合计	280	105	385	100

在上调基因当中,信号转导类基因数量最多,其次是防御相关类和代谢合成类;而数量最少的是病程相关类和蛋白降解相关类,只有 3 个。在所有上调基因中,未知蛋白和假想蛋白的数量分别是 11 个和 18 个。

在下调基因中,信号转导类基因数量最多,其次是

代谢与合成类,然后是细胞维持与发育类,仅随其后的是未知蛋白和防御相关类。

占差异表达基因比例最多的是信号转导类为 24%,而代谢合成类和防御相关类分别占 14% 和 13%,病程相关类和蛋白降解类为 1% 比例最小。氧爆作用类、未知蛋白和假想蛋白均占 6%。所有差异表达基因中,大部分差异表达基因,都是上调基因,而未知蛋白的上调和下调基因比例基本相同。

3 结论与讨论

该研究根据十字花科中只有拟南芥有基因芯片,且有人做过油菜与拟南芥的芯片杂交,所以首次尝试采用被芸苔链格孢菌侵染的白菜与拟南芥 cDNA 杂交的基因芯片,目的即为了寻找和筛选与黑斑病菌侵染相关的特异性基因。基因生物学信息分析显示,用 cDNA 芯片筛选出白菜与芸苔链格孢菌互作的差异基因中^[12-21],许多基因与抗病防御及信号转导相关。

结果分析表明,在上调表达基因中,抗病防御类和氧爆作用类占很大比重,这说明,白菜黑斑病菌的接种,对这些基因起到了诱导和加强表达的作用。表达差异最明显的是抗病类蛋白探针号为 260551_at 的 AT 2G43510, NM_129912 编码胰岛素抑制蛋白,对真菌有防御作用。其次是氧爆作用类的探针号为 248918_at 的 AT 5G45890, NM_123957 编码半胱氨酸蛋白酶,受植物激素的影响。氧爆作用 (Oxidative burst) 又叫氧化裂解,在各种有关植物防卫反应的模型中,氧化裂解是最初检测到的事件之一。一般认为,氧化裂解能够直接防御病原微生物对寄主植株的侵染,而且由氧化裂解所造成的细胞壁交联作用,同样也会使病原体的增殖活动受到抑制。这是因为这种交联作用减少了植物细胞营养物质的渗透程度,并干扰了病原体的蛋白酶对细胞壁的降解作用的缘故。在氧化裂解之后,寄主植株便合成出了抵抗病原微生物侵染的病程相关蛋白质,它们在系统获得抗性方面起到重要的作用。

下调基因中,与上调基因和总的差异表达基因相比,除了信号转导类仍占有最大的比例外,代谢合成类和细胞维持与发育类的比例有明显增大趋势,而防御相关类和氧爆作用类比例明显下降,同时,未知蛋白数量和比例明显增大。差异最明显的是具有转录因子功能的探针号为 265813_at 的 AT 2G18060, NM_127362 编码 NAM 家族蛋白,与细胞周期维持与发育有关,说明病菌的侵入,对细胞生长发育造成了阻碍,从而使此蛋白表达降低。

值得一提的是,信号转导类在整个差异表达基因中,所占比例最大。这说明,病菌的侵入,会引起植物各个生化途径的信号的变化,从而促使寄主产生相应的生理生化变化,但其具体途径和方式还需深入研究。与菜

蒴酸途径和乙烯代谢途径相关的基因被诱导,但是与水杨酸代谢途径相关的基因没有被发现。另外,在差异表达基因中,假想蛋白和未知蛋白共占 12%,且在下调基因中,未知蛋白占的比例更大,其相关机理和原因还有待于进一步研究。

参考文献

- [1] 肖长坤,李勇,李建强.十字花科种传蔬菜黑斑病研究进展[J].中国农业大学学报,2003,8(5):61-68.
- [2] 李明远.大白菜黑斑病的发生与防治[J].中国蔬菜,2006(7):49-50.
- [3] 董金皋,樊慕贞,韩建民,等.芸薹链格孢毒素对白菜细胞膜透性、SOD酶和POD酶活性的影响[J].植物病理学报,1999,29(2):138-141.
- [4] 张志刚,杨晓萍,梅正鼎,等.基因芯片技术在作物中的研究进展与展望[J].江西棉花,2006,28(2):3-5.
- [5] 高利宏,曹佳.基因芯片可靠性分析及数据处理[J].第三军医大学学报,2006,28(1):80-82.
- [6] 靳飞. 缺铁水稻根 cDNA 芯片分析及 CSN6 基因的克隆[D]. 北京:首都师范大学,2006.
- [7] 孙继勇.基因表达谱的数据分析[J].国际病理科学与临床杂志,2005,25(5):386-389.
- [8] Hu C G, Hao Y J, Chikako Honda, et al Putative PIP1 genes isolated from apple: expression analyses during fruit development and under osmotic stress[J]. Journal of Experimental Botany, 2003, 54(390): 2193-2194.
- [9] June M K, Izumi C M, Pei Z M, et al. NADPH oxidase AtrobohD and AtrobohF genes function in ROS-dependent ABA signaling in Arabidopsis[J]. European Molecular Biology Organization Journal, 2003, 22(11): 2623-2633.
- [10] Justin E P, Marjorie F O, Jeffrey D VanWye, et al. Funny Base: a systems level functional annotation of Fundulus ESTs for the analysis of gene expression[J]. BMC Genomics, 2004(5):96.
- [11] Lila O V, Anupama Khanna, Robin Shealy, et al. Microarrays for global expression constructed with a low redundancy set of 27,500 sequenced cDNAs representing an array of developmental stages and physiological condi-

tions of the soybean plant [J]. BMC Genomics, 2004(5): 73.

- [12] 瓮巧云.拟南芥抗葱链格孢侵染基因的差异表达[D].保定:河北农业大学,2006.
- [13] 许志茹,李玉花.利用 cDNA 微阵列分离津田芜菁花青素生物合成相关基因[J].遗传,2006,28(9):1101-1106.
- [14] Wu J M, Mao X Z, Cai T, et al. KOBAS server: a web-based platform for automated annotation and pathway identification[J]. Nucleic Acids Research, 2006, 34: 720-724.
- [15] Rablani M A, Kyonoshin Maruyama, Hiroshi Abe, et al. Monitoring Expression Profiles of Rice Genes under Cold Drought and High Salinity Stresses and Abscisic Acid Application Using cDNA Microarray and RNA Gel-Blot Analyses[J]. Plant Physiology, 2003, 133: 1755-1767.
- [16] Shenk P M, Kemal Kazan, Manners J M, et al. Systemic Gene Expression in Arabidopsis during an Incompatible Interaction with Alternaria brassicicola[J]. Plant Physiology, 2003, 132: 999-1010.
- [17] Cramer R A, Lawrence C B. Identification of Alternaria brassicicola genes expressed in planta during pathogenesis of Arabidopsis thaliana[J]. Fungal Genetics and Biology, 2004, 41(2): 115-128.
- [18] Sholpan Davletova, Karen Schlauch, Jesse Coutu, et al. The Zinc-Finger Protein Zat12 Plays a Central Role in Reactive Oxygen and Abiotic Stress Signaling in Arabidopsis[J]. Plant Physiology, 2005, 139: 847-856.
- [19] Svante Bohman, Jens Staak, Bart P H J, et al. Characterization of an Arabidopsis-Leptosphaeria maculans pathosystem: resistance partially requires camalexin biosynthesis and is independent of salicylic acid, ethylene and jasmonic acid signaling[J]. The Plant Journal, 2004, 37: 9-20.
- [20] Erwin Timothy A, Jewell E G, Christopher G L, et al. BASC: an integrated bioinformatics system for Brassica research[J]. Nucleic Acids Research, 2007, 35: 870-873.
- [21] Yoh Sakuma, Kyonoshin Maruyama, Yuriko Osakabe, et al. Functional Analysis of an Arabidopsis Transcription Factor, DREB2A, Involved in Drought-Responsive Gene Expression[J]. The Plant Cell, 2006, 18: 1292-1309.

Analysis of Gene Expression Profiles in Response to *Alternaria brassicae* in *Brassica rapa*.

LIU Ying^{1,2}, XU Wen-jing¹, DU Qian¹, YANG Xin-dong², LI Qi-yun¹

(1. Jilin Academy of Agricultural Sciences Changchun, Jilin 130124; 2. College of Agronomy, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118)

Abstract: We investigated gene expression changes associated with *Alternaria brassicae* infection in cabbage using a whole genome microarray from *Arabidopsis*. According to analysis of profiles, we obtained 385 differentially expressed genes, which included 280 up regulated genes and 105 down regulated genes. The putative functions of the differentially expressed genes included pathogenesis-related (PR) proteins, defense-related/anti-microbial genes, proteins involved in the oxidative burst, signal transduction pathway, genes related to hormonal responses, molecule transporters, cell maintenance and development, a biotic stress, cell structure modification, secondary metabolism, metabolic and synthetic process, protein degradation related, as well as proteins with unknown functions. The gene regulation patterns indicated that a large part of the defense response genes exhibited. In these differential expression genes, most of the detected genes are involved in transduction.

Key words: *Alternaria brassicae*; gene; microarray; differential expression