

4种信号分子处理后马铃薯 *Star* 基因表达的 RT-PCR 分析*

吴 田¹ 谢从华^{2**}

1. 西南林学院园林学院, 昆明 650224; 2. 华中农业大学园艺林学学院, 武汉 430070

摘要 以马铃薯叶片为试验材料, 其叶片分别经外源 SA、MJ、ETH、ABA 处理后, 在不同时间点取样, 提取总 RNA, 对 *Star* 基因的表达进行半定量 RT-PCR 分析。结果表明, *Star* 基因能够被 SA、MJ、ABA 迅速诱导表达, 而被 ETH 诱导表达的时间比较晚。可见, *Star* 基因被 4 种信号分子诱导表达之间存在广泛的重叠, 反映了在马铃薯抵御晚疫病病原菌侵染过程中 *Star* 基因参与了一个非常复杂的信号传递过程。

关键词 马铃薯; 富含锚蛋白重复结构域; 晚疫病; 基因表达

中图分类号 S 532.035.3 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2010)03-0268-04

马铃薯 (*Solanum tuberosum* L.) 在生产过程中常受到多种病害的严重为害, 而由致病疫霉 *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. 引起的晚疫病一直被认为是最具毁灭性的病害, 它能导致马铃薯的减产, 甚至绝产^[1]。马铃薯晚疫病抗性研究的一个重要方向是进行抗性相关基因的克隆和功能鉴定。*Star* (*Solanum tuberosum* ankyrin repeat-rich, GenBank 登录号为 EF646263) 基因是笔者所在的实验室在前期研究中用 RACE (rapid amplification of cDNA ends, cDNA 末端快速扩增) 技术从马铃薯叶片中克隆的 1 个富含锚蛋白重复结构域基因, 该基因能够被晚疫病病原菌显著诱导表达^[2]。锚蛋白重复 (ankyrin repeat, ANK) 序列模体是在 2 个酵母细胞周期调控蛋白中首次发现的^[3], 普遍存在于真核、原核及病毒中, 主要功能是参与蛋白质与蛋白质的相互作用^[4]。

为适应环境和抵御各种生物及非生物胁迫, 植物在自然进化过程中逐渐形成了一系列复杂而有效的防御机制, 而迅速地识别及传导这些胁迫信号是至关重要的第 1 步。在植物与病原互作过程中, 二者相互识别, 交换信息, 植物体内发生了一系列的信号传导过程, 各信号途径之间相互影响, 相互交叉, 形成了一种复杂的调控网络, 进而在防卫反应中起协调作用^[5]。马铃薯也不例外, 在其抵御晚疫病病原

菌侵染过程中, 也可能存在多条防卫信号传导途径, 或许它们之间存在着复杂的交叉互作。

在植物抗病反应过程中, 抗病信号必须由内源信号分子从受侵染部位传导至整株植物, 引起相应的抗性反应, 因而内源信号分子在植物抗病信号传导途径中起重要作用^[6]。目前研究较多的植物内源信号分子是水杨酸 (SA)^[7]、茉莉酸甲酯 (MJ)^[8]、乙烯利 (ETH)^[9]、脱落酸 (ABA)^[10] 等。为了分析 *Star* 基因在马铃薯晚疫病病原菌侵染后可能位于的信号传导途径, 本研究应用半定量 RT-PCR 技术, 以马铃薯水平抗性材料 386209.10 叶片为试验材料, 分别经外源 SA、MJ、ETH、ABA 处理后, 研究 *Star* mRNA 的表达情况。

1 材料与方法

1.1 植物材料

本研究所用的马铃薯材料为国际马铃薯中心 (CIP) 惠赠的水平抗性材料 386209.10, 该品系具有中等的晚疫病田间抗性, 其抗性等级为 5 (据 CIP 的 9 级分级标准)。用温室中生长 8 周的马铃薯进行诱导处理。

1.2 信号分子处理

采用活体诱导处理法, 即将顶端最小叶片以下第 3 片充分展开的马铃薯复叶在活体植株上进行处

收稿日期: 2009-11-25; 修回日期: 2010-03-22

* 国家“863”项目 (2006AA10Z149) 和西南林学院园林植物与观赏园艺云南省重点学科基金 (500974) 资助

** 通讯作者. E-mail: xiech@mail.hzau.edu.cn

吴 田, 女, 1980 年生, 博士, 讲师. 研究方向: 植物抗病分子生物学. E-mail: wutiantian@webmail.hzau.edu.cn

理。分别用 10 mmol/L SA、50 μ mol/L MJ、100 mmol/L ABA 和 200 μ mol/L ETH 溶液喷洒第 3 片复叶,处理完毕后用透明度良好的塑料袋迅速罩住该叶片,以保持湿度。清水喷洒叶片作为对照。分别于处理后 0、2、8、12、24、36 h 取样,液氮速冻,贮于 -70 $^{\circ}$ C 冰箱备用。SA、MJ、ABA 均购自美国 Sigma 公司,ETH 为国产分析纯。

1.3 马铃薯叶片总 RNA 的提取

用 TriZOL Regent (Invitrogen, 美国) 提取马铃薯叶片的总 RNA,得到总 RNA 后用不含 Rnase 的 DNase I (Promega, USA) 37 $^{\circ}$ C 处理 1 h,以除去可能存在的痕量 DNA。具体操作按照 Wu 等^[11]报道的方法进行。电泳检测总 RNA 完整度,紫外吸收法检测其纯度和浓度。

1.4 半定量 RT-PCR

不同诱导处理的叶片总 RNA 用于第 1 链逆转录合成 cDNA。第 1 链逆转录使用 TOYOBO 公司 (日本) 的逆转录酶,操作步骤参照说明书进行。合成的 cDNA 溶入一定体积的 H₂O,用看家基因 β -tubulin^[12] 的 1 对特异引物 TUB1 (5'-TTGGA-CAGTCTGGTGGCTGGGAATA-3')、TUB3 (5'-TG GCCAGGAATCTCAAACAGCAAG-3') 作为内参,进行 27 循环的 PCR 扩增,使将要分析的 cDNA 模板浓度调整一致。选择调至一致的 cDNA 模板,分别用 Wu 等^[2]报道的 *Star* 基因的特异性引物 F1 (5'-GCAGAAAATGTGAATGGGTGGAC-3') 和 R1 (5'-AACAAAAGGCAACGATAGACTC-3') 进行相应循环数的 PCR 扩增。扩增完毕后,PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳,照相保存。每个 PCR 重复扩增 3 次。PCR 扩增的 *Star* 基因的亮带和 β -tubulin 基因的亮带分别用 Quantity One 1-D 分析软件 (BioRad, 美国) 进行量化分析,*Star* 基因的相对表达量用该基因的量化值和 β -tubulin 基因的量化值的比进行计算。得到的比值在 Excel 中做折线图,误差线是 3 次独立 RT-PCR 的标准误差。用统计分析软件 SPSS 10.0 进行 LSD 测验,折线图中“*”表示处理与对照在 0.05 置信水平上差异显著。

2 结果与分析

2.1 RNA 的抽提

总 RNA 提取后,用紫外分光光度计检测其在 260 nm 和 280 nm 下的吸光值 (OD 值),结果表明, D_{260}/D_{280} 均介于 1.8~2.0 之间,表明所提取总

RNA 纯度较高。电泳检测表明 (图 1),总 RNA 呈 3 条亮带,18S 和 28S 带型清晰,且亮度相似。上述检测表明,所提取的总 RNA 具有较高的纯度和完整性,符合后续实验要求。

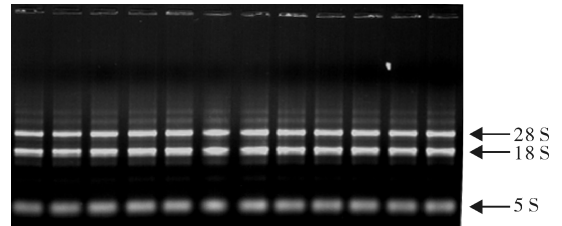


图 1 马铃薯叶片总 RNA 电泳图

Fig. 1 Electrophoresis profiling of total RNA of potato leaf samples

2.2 *Star* 基因在不同信号分子诱导时的表达

为初步了解信号分子对 *Star* 转录水平的影响,分别用 SA、MJ、ETH 和 ABA 处理马铃薯第 3 复叶,取样第 3 复叶,以 F1 和 R1 为引物,半定量 RT-PCR 的结果 (图 2) 显示,在 SA 处理的叶片中,*Star* mRNA 的表达水平从 2 到 36 h 一直显著高于对照 ($P < 0.05$),此外,24、36 h 的表达水平略低于 2 至 12 h 的表达水平。*Star* 基因能被 MJ 强烈诱导表达,虽然 8 和 24 h 的表达强度略低于其它 3 个取样点,但与对照相比仍呈显著性差异 ($P < 0.05$)。马铃薯叶片经 ABA 处理后,*Star* 的转录水平除在 12 h 有一个高峰外,基本呈平稳上升的趋势,且在 2 h 的表达量已显著高于对照 ($P < 0.05$)。*Star* 基因在 2~12 h 内基本不受 ETH 诱导表达,而 24、36 h 被 ETH 显著诱导表达 ($P < 0.05$)。综上所述,SA、MJ、ABA 在 2 至 36 h 内对 *Star* mRNA 的诱导表达量均显著性高于对照;而 ETH 从 24 h 时才开始诱导该基因表达。

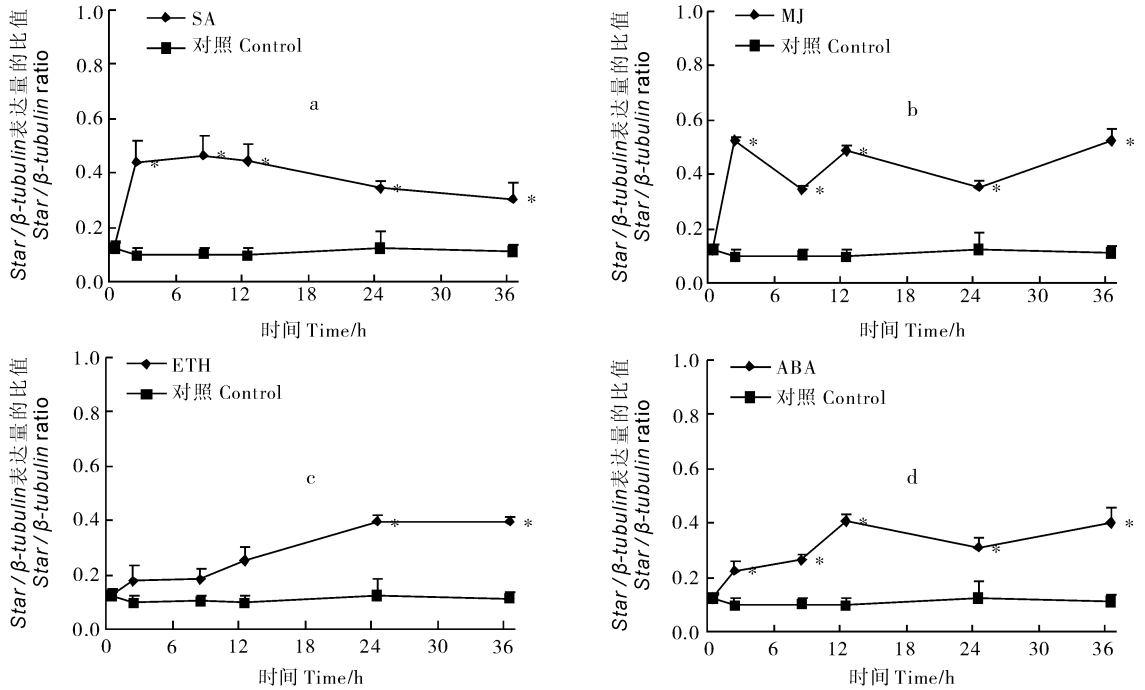
3 讨论

植物抗病信号途径并非孤立存在,各条途径之间相互交叉形成网络,彼此之间既有协同,也存在拮抗,但最终引起植物体对特定的病原菌作出最为合理的防卫反应^[13]。SA、MJ、ETH 和 ABA 是植物防卫反应信号传导链的重要信号分子,并且信号传导途径之间存在着广泛的交叉互动,从而实现植物防卫反应的精确调控^[5]。

本试验通过 *Star* 基因在外源 SA、MJ、ABA 和 ETH 处理的马铃薯叶片中的表达分析,为探讨 SA、JA、ABA 和 ET 信号途径在马铃薯晚疫病抗性

中的作用提供线索。本研究表明, *Star* 基因能够被 SA、MJ、ABA 迅速诱导表达, 而被 ETH 诱导表达的时间比较晚。倘若仅仅依据该基因被不同处理诱导表达的早晚进行评价, 可以推测, 当马铃薯植株被晚疫病原菌侵染后, *Star* 基因可能最先同时通过 SA、MJ、ABA 信号传导途径将感病信号进行传导; 随着马铃薯植株被晚疫病原菌持续侵染, 除了这 3

条信号传导途径外, 该基因又启动了 ETH 信号途径。而 SA^[14]、MJ^[15]、ABA^[16] 和 ETH^[17] 可诱导许多与植物抗病及其它逆境相关的基因的表达, 产生特异的蛋白质。 *Star* 基因被 4 种不同信号分子诱导表达之间存在广泛的重叠, 反映了在马铃薯抵御晚疫病原菌侵染过程中 *Star* 基因参与了一个非常复杂的信号传递过程。



误差线表明 3 个独立测量的标准差值, “*”表明处理与对照差异显著 ($P < 0.05$)。Error bars indicate standard deviation values of three independent concentration measurements and “*” means extremely significant at $P < 0.05$.

图 2 分别经 SA(a)、MJ(b)、ETH(c)和 ABA(d)处理后马铃薯叶片中 *Star* mRNA 的表达分析

Fig. 2 Expression pattern of *Star* in potato leaves treated with SA(a), MJ(b), ETH(c) and ABA(d), and water as control

结合前期该基因对晚疫病原菌迅速响应的试验结果^[2], 暗示着该基因在马铃薯晚疫病抗性过程中起重要的作用。在对 *Star* 基因的后续研究中, 将通过基因遗传转化的方法进一步研究其在马铃薯晚疫病抗性过程中的功能, 并进一步探索该基因在抵抗晚疫病侵染过程中所处的信号传导途径。

参 考 文 献

[1] GOODWIN S B, SUJKOWSKI L S, FRY W E. Rapid evolution of pathogenicity within clonal lineages of the potato late blight disease fungus[J]. *Phytopathology*, 1995, 85: 669-676.

[2] WU T, TIAN Z, LIU J, et al. A novel ankyrin repeat-rich gene in potato, *Star*, is involved in response to late blight[J]. *Biochemical Genetics*, 2009, 47: 439-450.

[3] BREEDEN L, NASMYTH K. Cell cycle control of the yeast

HO gene: *cis*- and *trans*-acting regulators[J]. *Cell*, 1987, 48: 389-397.

[4] MOSAVI L K, CAMMETT T J, DESROSIERS D C, et al. The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition[J]. *Protein Sci*, 2004, 13: 1435-1448.

[5] KUNKEL B N, BROOKS D M. Cross talk between signaling pathways in pathogen defense[J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2002, 5: 325-331.

[6] 陈英, 黄敏仁, 诸葛强, 等. 植物抗病信号传导途径及其相互作用[J]. *南京林业大学学报: 自然科学版*, 2002, 26(3): 85-90.

[7] DEMPSEY D A, SHAH J, KLESSIG D F. Salicylic acid and disease resistance in plants[J]. *Crit Rev Plant Sci*, 1999, 18: 547-575.

[8] TURNER J G, ELLIS C, DEVOTO A. The jasmonate signal pathway[J]. *Plant Cell*, 2002, 14(Supplement): 153-164.

[9] LU Y J, WANG X, LOU Y G, et al. Role of ethylene signaling in the production of rice volatiles induced by the rice brown pl-

- anthopper Nilaparvata lugens* [J]. Chin Sci Bull, 2006, 51: 2457-2465.
- [10] BIRKENMEIER G F, RYAN C A. Wound signaling in tomato plants-evidence that ABA is not a primary signal for defense gene activation [J]. Plant Physiol, 1998, 117: 687-693.
- [11] WU T, TIAN Z, LIU J, et al. A novel leucine-rich repeat receptor-like kinase gene in potato, *StLRPK1*, is involved in response to diverse stresses [J]. Molecular Biology Reports, 2009, 36: 2365-2374.
- [12] TAYLOR M A, WRIGHT F, DAVIES H V. Characterization of the cDNA clones of two beta-tubulin genes and their expression in the potato plant (*Solanum tuberosum* L.) [J]. Plant Mol Biol, 1994, 26: 1013-1018.
- [13] 王金生. 分子植物病理学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1999: 29-40.
- [14] CHEN Z, SILVA H, KLESSIG D F. Involvement of reactive oxygen species in the induction of systemic acquired resistance by salicylic acid in plants [J]. Science, 1993, 242: 883-886.
- [15] 马崇坚, 柳俊, 谢从华. 茉莉酸类物质的功能与胁迫防御 [J]. 华中农业大学学报, 2001, 20(6): 603-608.
- [16] LEE H, JULIE E G. ABA signaling: a messenger's FIERY fate [J]. Curr Biol, 2001, 11: 968-970.
- [17] LENOBLE M E, SPOLLEN W G, SHARP R E. Maintenance of shoot growth by endogenous ABA: genetic assessment of the involvement of ethylene suppression [J]. J Exp Bot, 2004, 55: 237-245.

RT-PCR Analysis of Expression of *Star* Gene in Potatoes Induced by Four Signal Molecules

WU Tian¹ XIE Cong-hua²

1. College of Horticulture and Gardening, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China;
2. College of Horticulture and Forestry, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract Potato plants were treated with signal molecules SA, MJ, ETH and ABA. The leaves were sampled at different time points and the total RNA was extracted for semi-RT-PCR analysis. The relative expressions of *Star* gene under the four signal molecules were analyzed. The results showed that *Star* gene could be rapidly induced by SA, MJ and ABA but slowly by ETH. The expressions of *Star* gene induced by the four signal molecules were widely overlapped, suggesting that this gene could take part in a very important process of signal transmission in response to *Phytophthora infestans* infest.

Key words potato; ankyrin-rich repeat gene; late blight; gene expression

(责任编辑: 杨锦莲)