

烟草糖基转移酶基因 *SM-Ngt1* 在拟南芥中抗菌核病的初步研究

秦汉花 谭艳平 王春台 刘学群

中南民族大学生命科学院/生物技术国家民委重点实验室, 武汉 430074

摘要 通过对转糖基转移酶基因 *SM-Ngt1* 的拟南芥 T_2 代阳性植株接种油菜菌核病菌, 鉴定其对菌核病的抗性, 并应用实时荧光定量 PCR (RT-PCR) 确定植株中 *SM-Ngt1* 的表达水平。结果表明, 拟南芥中 *SM-Ngt1* 基因对菌核病具有一定的抗性, 且抗性的高低与体内 *SM-Ngt1* 的表达量具有明显的一致性。

关键词 *SM-Ngt1*; 菌核病菌; RT-PCR; 转基因; 抗性; 烟草

中图分类号 Q 78 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2012)06-0668-04

糖基转移酶 (glycosyltransferase, GT) 催化活化的供体糖基转移到受体生成糖苷, 它广泛存在于生物体内^[1]。GTs 家族是 1 个超家族, 根据 GTs 的底物特异性和序列同源性以及糖苷键立体化学性质进行分类, GTs 可划分为 92 个家族 (<http://afmb.cnrmrs.fr/CAZY/>)。植物许多生理生化反应与糖基化有关, 如 GTs 能使一些信号分子或激素糖基化, 参与信号调节及植物激素平衡; 部分 GTs 参与的反应与植物抗性反应有关^[2]。

菌核菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*) 俗称核盘菌, 属于囊菌亚门, 核盘菌属, 是 1 种寄生真菌^[3]。它是油菜的主要病原菌。油菜及其近缘种中还没有发现高抗或免疫的品种, 抗性的遗传资源有限, 很难采用经典的育种方法来提高作物的抗性。

笔者所在的实验室从烟草中克隆到 1 个受甲基茉莉酸 (MeJA) 和水杨酸 (SA) 双重诱导的新糖基转移酶基因, 以植物表达载体 pCambia1305.1 构建了 35S 启动的 *sm-Ngt1* 超表达载体并转化拟南芥, 获得一定数量的阳性转基因植株, 部分植株表现出矮化等症状^[4]。

本研究以转 *SM-Ngt1* 基因的 T_2 代植株为材料, 初步研究了其对油菜菌核病的抗性, 以期对油菜菌核病的抗性研究提供新的途径。

1 材料与方法

1.1 试验材料

SM-Ngt1 转拟南芥 T_1 代种子由中南民族大学生物技术国家民委重点实验室保存, 油菜菌核菌由中国农业科学院武汉油料作物研究所刘胜毅研究员提供。

1.2 试验试剂

DNA 聚合酶 (*rTaq*) 及其缓冲液、dNTP、DNA Marker (DL 2000 及 250 bp Marker) 购自 TAKARA 公司; Trizol 购自 Invitrogen 公司; 反转录试剂盒 ReverTra Ace α -、荧光定量试剂盒 SYBR Green-Realtime PCR Master Mix QPK-201 购自 TOYOBO 公司; 潮霉素 B (Hygromycin, hpt II) 购自 Roche Diagnostics Corporation Indianapolis 公司, 其他试剂均为分析纯。

1.3 试验方法

1) 转基因植株的培养及阳性鉴定。将 *SM-Ngt1* 转拟南芥 T_1 代种子经潮霉素 (100 mg/L) + 1/2 MS 培养基筛选培养 1 周后转入 1/2 MS 培养基, 1 个月后转营养土: 蛭石 (3:1) 培养, 培养条件同文献^[4]。植株生长 40 d, 采用 CTAB 法提取叶片 DNA, 用 *SM-Ngt1* 特异引物检测植株阳性, 阳性植株用于接种菌核病菌。

收稿日期: 2012-06-14

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31170296)

秦汉花, 硕士研究生, 研究方向: 生化与发展生物学, E-mail: kange_524721605@qq.com

通讯作者: 刘学群, 博士, 教授, 研究方向: 遗传学, E-mail: xqliuw@yahoo.com.cn

2)病原菌的培养与接种。从 4 °C 保存的菌核菌平板菌落外缘用灭菌的打孔器切取 1 块直径为 6 mm 的菌丝块,移至 PDA 培养基平板中央,在 25 °C 人工气候箱活化培养,2 d 后再接至新鲜 PDA 培养基平板中央,3 d 后从菌落边缘新生的菌丝中用灭菌的打孔器切取 1 块直径为 6 mm 的菌丝块,按 5 块/50 mL 加入到液体培养基中,在 25 °C、180 r/min 振荡培养 4 d 左右^[5]。对阳性转基因植株和哥伦比亚野生型对照植株叶片注射接种,每个株系接种 4 片叶子,每片叶子主叶脉左侧接空培养基对照,右侧接种病原菌,每片叶接 100 μL 菌液。阴性对照则接种液体培养基。接种后 3 d 进行抗性鉴定。

3)RNA 提取与反转录。采用 Trizol 法提取总 RNA,经分光光度计测定 A_{260}/A_{280} 后,取 2 μL RNA 为逆转录模板,以 oligo(dT)为引物,逆转录体系为 20 μL,经逆转录酶合成 cDNA。

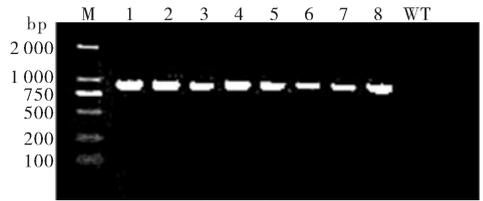
4)实时定量 PCR 检测 *SM-Ngt1* 基因在抗病植株中的表达水平。根据 *SM-Ngt1* 基因及 $\beta actin$ 基因序列,利用 Primer 5.0 设计引物,通过相对定量(与参照组比较)确定目的基因表达量的变化^[6]。取 1 个样品分别稀释 2、4、8、16、32 倍作为模板,分别用 *SM-Ngt1* 基因及 $\beta actin$ 基因特异引物来扩增,优化条件使 *SM-Ngt1* 基因及 $\beta actin$ 基因的扩增效率相等。扩增效率相等后对各样品用 $\beta actin$ 基因特异引物扩增来调整模板浓度,尽可能使每个样中所含起始模板量相同,再对各样品进行实时定量 PCR。反应体系(10 μL)为 SYBR® Green PCR Master Mix 5.0 μL,正向引物与反向引物各 0.2 μL,cDNA 模板 1 μL,补水至 10 μL。反应条件为

94 °C 预热 5 min,94 °C 30 s,61 °C 30 s,72 °C 30 s,共 40 个循环。在循环延伸过程(72 °C)收集荧光信号。PCR 完成后设置 57~99 °C 的熔解温度,每 1 °C 采集 1 次信号。每个样品做 3 个平行。对数据采用 $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-[(C-D)-(A-B)]}$ (C:干预后待测基因,D:干预后内参基因,A:干预前待测基因,B:干预前内参基因)方法进行统计学分析,试验采用统一参数(阈值:0.007)。

2 结果与分析

2.1 转基因植株的阳性鉴定

对经潮霉素筛选后成活的植株提取基因组 DNA 进行阳性检测,阳性植株能扩增出 800 bp 左右的特异条带,而野生型则没有(图 1)。



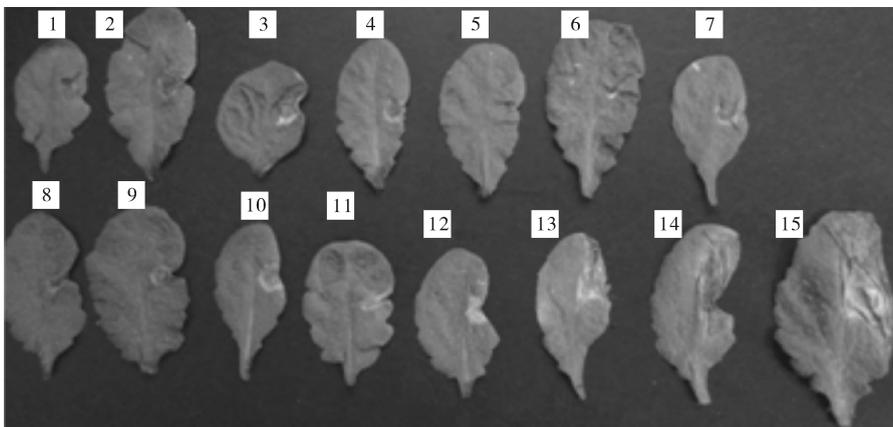
M:DL 2000 marker; 1~8:转基因植株 Transgenic plant; WT:哥伦比亚野生型对照植株 Col CK.

图 1 转基因拟南芥阳性植株基因组 DNA 的 PCR 检测

Fig.1 Identification DNA of the positive transgenic *Arabidopsis* plants by PCR

2.2 转基因植株抗菌核病鉴定

图 2 是不同株系叶片在接种 3 d 后的反应。接种结果表明,不同株系阳性植株在接种病原菌后反应不同,但与野生型相比,都具有抗性,但抗性水平不同。



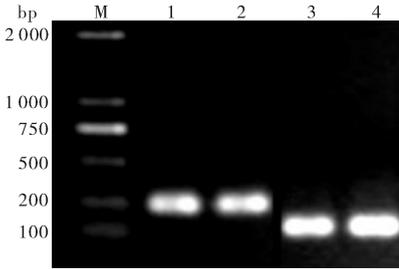
1~14:转基因植株 Transgenic plant; 15:哥伦比亚野生型对照植株 Col CK.

图 2 不同转基因植株对菌核病菌的反应

Fig.2 The reaction of different transgenic *Arabidopsis* on *Sclerotinia sclerotiorum* pathogen

2.3 定量 PCR 检测不同植株的 *SM-Ngt1* 表达水平

提取的 RNA 样品经紫外分光光度法检测,其 A_{260}/A_{280} 值在 1.8~2.1 之间,表明其质量高。将反转录的 cDNA 用定量引物来扩增,进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测其特异性,产物只有 1 条带,表明其特异性良好(图 3),可以用于荧光实时 PCR 相对定量来检测 *SM-Ngt1* 基因在拟南芥中的表达。



M: DL 2 000 marker; 1-2: β actin; 3-4: *SM-Ngt1*.

图 3 *SM-Ngt1* 基因及 β -actin 基因 PCR 产物的电泳检测
Fig. 3 Electrophoresis of the amplified PCR products of *SM-Ngt1* and β -actin

选取 1 个样本的 cDNA 进行梯度稀释后,分别用 *SM-Ngt1* 基因及 β actin 基因特异引物进行实时定量 PCR,计算出 *SM-Ngt1* 基因及 β actin 基因的平均 Ct 值和 Δ Ct 值,然后对 Δ Ct 值作图,所得函数斜率越接近于 0,则说明内参基因和目的基因的扩增效率基本相等,RT-PCR 条件良好,可以用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法来分析数据。用优化好的定量 RT-PCR 条件对各样本用 β actin 引物调整起始模板浓度,得出数据后再用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法来分析数据,结果较为可信(图 4)。

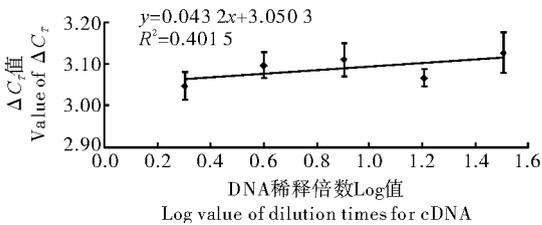
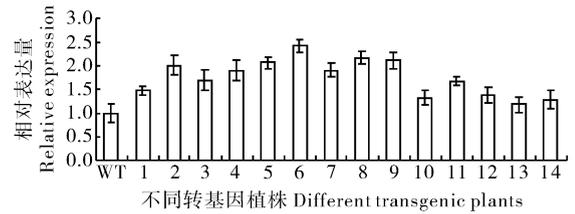


图 4 *SM-Ngt1* 基因及 β -actin 基因的扩增效率
Fig. 4 Amplification efficiency of *SM-Ngt1* gene and β -actin gene

对图 2 中的植株进行 RT-PCR 后,用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法来分析数据得出的结果如图 5。1~9、11 号植株中 *SM-Ngt1* 基因表达量相对较多,10、12~14 号植株中 *SM-Ngt1* 基因表达量相对较少。将图 2 与图 5 对比发现,1~9、11 号植株中 *SM-Ngt1* 基因表达

量比 10、12~14 号植株中 *SM-Ngt1* 基因表达量多,而 1~9、11 号植株对病原菌表现出的抗性较 10、12~14 号植株效果明显,由此推测植株中 *SM-Ngt1* 基因表达水平可能与植株对菌核菌抗性有关。



1~14: 转基因植株 Transgenic plant; WT: 哥伦比亚野生型对照植株 Col CK.

图 5 不同植株的 *SM-Ngt1* 基因相对表达量
Fig. 5 Relative expression quantity of *SM-Ngt1* in different plants

3 讨论

关于油菜菌核菌致病的生化机制,一般认为是菌核病菌分泌的草酸毒素引致发病^[7]。虽然至今没有研究证明糖基转移酶对菌核菌有抗性,然而近年来越来越多的糖基转移酶基因被报道与植物抗病性有关,并且大多是参与植物系统获得性防御反应(SAR)。在双子叶植物中 SAR 可被水杨酸(SA), 2,6-二异氯烟酸(INA)和苯并噻二唑(BTH)等有效的诱导^[8]。Chong 等^[9]发现了 2 个受 SA 和病原菌诱导的烟草 UDP-葡萄糖:类苯基丙烷葡萄糖基转移酶(ToGTs),下调 ToGT 的表达,东莨菪亭葡萄糖苷的积累减少了,烟草对烟草花叶病毒(TMV)的抗性减弱。SA 作为 1 种重要的内源信号分子可介导 SAR, Umemura 等^[10]研究发现水稻中存在 1 个 *OsSGT1*, 它催化水杨酸(SA)形成 SA-O- β -糖苷(SAG),并且通过上调 SAG 水平来参与 SA 信号途径,从而参与 SAR。另外有些糖基转移酶通过将病原菌分泌的毒素糖基化,使其失去活性从而参与抗病性,如 1 个 GT 基因 *UGT73C5*,在酵母中表达能赋予酵母对 DON 的抗性。这个 GT 催化转移葡萄糖基到 DON 的 3-OH 上,在植物中超表达也能使其产生对霉菌毒素的抗性^[11]。综上推测,烟草糖基转移酶基因 *SM-Ngt1* 可能作用于草酸,从而参与对菌核菌的抗病性。本试验证明来自烟草的糖基转移酶基因 *SM-Ngt1* 转化拟南芥的 T₂ 阳性植株中,当 *SM-Ngt1* 基因的表达量相对较多时,植株对菌核菌表现出高的抗性,而当阳性植株中 *SM-Ngt1* 基因的表达量相对较少时,植株对菌核病菌的抗性较弱,

推测植株中 *SM-Ngt1* 基因表达情况可能与植株对菌核菌抗性有关,具体的抗性机制正在研究中。

参 考 文 献

- [1] COUTINHO P M, DELEURY E, DAVIES G J, et al. An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases [J]. *J Mol Biol*, 2003, 328(2): 307-317.
- [2] LANGLOIS-MEURINNE M, GACHON C M M, SAINDRENAN P. Pathogen-responsive expression of glycosyltransferase genes *UGT73B3* and *UGT73B5* is necessary for resistance to *Pseudomonas syringae* pv *tomato* in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2005, 139(12): 1890-1901.
- [3] 双桑, 阮颖, 刘春林, 等. 油菜菌核病及抗病育种研究进展 [J]. *作物研究*, 2006(5): 552-556.
- [4] 尚书凤. 烟草糖基转移酶基因 *SM-Ngt1* 启动子功能及其在拟南芥中的过表达研究 [D]. 武汉: 中南民族大学生命科学院, 2009.
- [5] 臧宪朋, 徐幼平, 蔡新忠. 一种基于菌丝悬浮液的核盘菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*) 接种方法的建立 [J]. *浙江大学学报: 生命科学版*, 2010, 36(4): 381-386.
- [6] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25: 402-408.
- [7] CESSNA S G, SEARS V E, DICKMANN M B, et al. Oxalic acid, a pathogenicity factor for *Sclerotinia sclerotiorum*, suppresses the oxidative burst of the hostplant [J]. *Plant Cell*, 2000, 12: 2191-2199.
- [8] CHERN M S, FITZGERALD H A, YADAV R C, et al. Evidence for a disease-resistance pathway in rice similar to the *NPR1*-mediated signaling pathway in *Arabidopsis* [J]. *Plant J*, 2001, 27(2): 463-472.
- [9] CHONG J L, BALTZ R, SCHMITT C, et al. UDP-Glc: phenylpropanoid glycosyltransferase reduces scopoletin glucoside accumulation, enhances oxidative stress, and weakens virus resistance [J]. *Plant Cell*, 2002, 14: 1093-1107.
- [10] UMEMURA K, SATOU J, IWATA M, et al. Contribution of salicylic acid glycosyltransferase OsSGT1 to chemically induced disease resistance in rice plants [J]. *Plant J*, 2009, 35(2): 463-472.
- [11] POPPENBERGER B, BERTHILLE F, LUCYSHYN D, et al. Detoxification of the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol by a UDP-glycosyltransferase from *Arabidopsis thaliana* [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278: 47905-47914.

Preliminary study on the resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in *Arabidopsis* by a glycosyltransferase gene *SM-Ngt1* from tobacco

QIN Han-hua TAN Yan-ping WANG Chun-tai LIU Xue-qun

College of Life Science/Key Laboratory for Biotechnology of the State Ethnic Affairs Commission, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China

Abstract The resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* of the transgenic *Arabidopsis* T₂-positive plant with glycosyl transferase gene *SM-Ngt1* from tobacco was identified by inoculating of *Sclerotinia sclerotiorum* pathogen. The levels of expression of *SM-Ngt1* in the transgenic *Arabidopsis* T₂-positive was determined through real-time fluorescence quantitative PCR (RT-PCR). The results showed that *SM-Ngt1* was resistant to *sclerotium* disease in *Arabidopsis* and the level of resistance was obviously consisted with the expression of *SM-Ngt1* in the transgenic *Arabidopsis*.

Key words *SM-Ngt1*; *Sclerotinia sclerotiorum*; RT-PCR; transgenesis; resistance; tobacco

(责任编辑:杨锦莲)