

拟南芥受水杨酸下调的新基因的克隆及功能探究

詹 栎 胡贞洁

华中农业大学生命科学技术学院, 武汉 430070

摘要 以水杨酸处理后的拟南芥(Col-0)为材料,采用高通量测序技术分析拟南芥在水杨酸处理后的转录组变化,发现了12个受水杨酸下调的新基因。以Col-0幼苗的cDNA为模板克隆其中一个基因NG314,并对其功能进行研究。NG314的cDNA序列总长为1 097 bp,基因组DNA包含1个内含子。荧光定量PCR结果表明,NG314的表达量随着水杨酸处理时间延长而逐渐下降,病原菌侵染也能抑制NG314的表达。NG314可能是一个长链非编码RNA或新的miRNA基因,可能通过抑制其靶基因的表达调控植物的抗病反应。

关键词 拟南芥; 水杨酸; NG314基因; 病原菌; 非编码RNA; miRNA

中图分类号 S 432.2 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2017)05-0025-05

病原菌(如细菌、真菌、病毒)可以侵染植物,严重影响植物的生长和发育。在农业生产中,病害极大地影响农作物的产量和品质。植物在长期的进化过程中,产生了一系列复杂而精细的抗病机制,主要包括病原物相关分子触发的免疫反应(PAMP-triggered immunity, PTI)、效应子触发的免疫反应(effectort-triggered immunity, ETI)和系统获得性抗性(systemic acquired resistance, SAR)。

水杨酸(salicylic acid, SA)在植物免疫反应中起着核心作用^[1-4]。水杨酸羟化酶(NahG)能降解水杨酸。在含有NahG基因的转基因烟草和拟南芥中,水杨酸含量大大下降,抗病能力也相应地下降^[3,5]。由于水杨酸的合成受到阻碍,拟南芥突变体ics1对病原菌也非常敏感。另一方面,增加植物体内的水杨酸含量或者用外源水杨酸处理植物能显著增强抗病性^[6]。水杨酸在抗病反应中的功能在很大程度上是通过调控基因表达来实现的,通过生物芯片(microarray)分析,Wang等^[7]发现水杨酸处理后拟南芥中近10%基因的表达量发生显著变化。因此,水杨酸调控基因表达的机制一直是研究热点。近20年来,水杨酸的信号转导研究取得了较大的进展,发现了一系列重要的调控因子包括NPR1、NPR3和NPR4^[8-9]。

NPR1 (nonexpressor of pathogenesis-related

genes 1)是水杨酸信号通路中关键调控蛋白^[8]。Cao等^[10]、Ryals等^[11]、Shah等^[12]通过遗传筛选发现拟南芥npr1突变体对水杨酸的反应几乎完全丧失。在没有水杨酸的情况下,NPR1在细胞质形成多聚物,从而防止过早激活防御反应。在病原菌感染或在SA处理的情况下,细胞内的氧化还原状态发生改变,导致NPR1从多聚体转变成单体,从而被转移到细胞核中。在细胞核内,NPR1与TGA转录因子或者WRKY转录因子相互作用,调控抗病基因的表达。

NPR1的同源基因NPR3和NPR4是具有不同亲和力的水杨酸受体,它们作为泛素E3连接酶的亚基,在不同水杨酸浓度下调节NPR1的降解^[8]。以前的研究表明,病原菌侵染植物后,在侵染位点周围会形成SA浓度梯度^[13]。在受感染的组织中,SA浓度最高。高浓度的SA促进NPR3-NPR1的相互作用,从而降解NPR1,诱导ETI反应和细胞死亡。在侵染处周围的组织中,SA浓度较低。低浓度的SA破坏了NPR4-NPR1的相互作用,但不足以促进NPR3-NPR1的相互作用。在这些组织中NPR1不能被降解,NPR1的含量最高,从而诱导SAR和细胞生存。

RNA-Seq是一项基于高通量测序技术进行转录组分析的新方法。相比于DNA microarrays,

RNA-Seq有很多的优势,比如背景信号低、分辨率高、检测范围广等^[14]。特别是RNA-Seq能够检测未知基因,发现新的转录本。为了进一步解析水杨酸的作用机制,本研究通过RNA-Seq技术分析拟南芥在水杨酸处理后的转录组变化,旨在为植物抗病研究提供材料,同时对水杨酸介导的植物抗病机制研究提供思路。

1 材料与方法

1.1 材料

野生型拟南芥 Columbia(Col-0)、大肠杆菌菌株 Top10、丁香假单胞杆菌 Psm ES4326 均来源于美国杜克大学董欣年植物学实验室。

1.2 试剂

$2\times$ ES *Taq* Master Mix、反转录试剂盒、Q-PCR 试剂盒(Ultra SYBR Mixture)购于康为世纪公司, T_4 -DNA 连接酶购于 NEB 公司, pMDTM18-T 试剂盒购于 TaKaRa 公司, BP 反应试剂盒和 Trizol 购于 Invitrogen 公司。Phanta Max 购于 Vazyme 公司。水杨酸钠和植物培养基 MS 培养基购于 Sigma 公司。引物合成与一代测序由上海生工和北京擎科生物技术公司完成。

1.3 RNA Seq 材料的构建及测序

在 1/2MS 固体培养基上培养野生型(Col-0)的拟南芥,生长 10 d 左右,将培养基上的 Col-0 分别转移到含有和不含有 1 mmol/L SA 的 1/2MS 培养基上处理 24 h 后取样,−80 °C 保存,送到百迈客生物科技有限公司进行二代测序。

1.4 新基因的克隆

根据 RNA-Seq 的结果设计 NG314 的 PCR 扩增引物(表 1),以 Col-0 幼苗的 cDNA 为模板进行扩增。PCR 产物经平末端连接至 T 载体,具体步骤见 pMDTM18-T 试剂盒。

1.5 SA 和病原菌处理

拟南芥 Col-0 正常土培 21 d 后进行后续 SA 处理。配置终浓度为 1 mmol/L 的 SA 溶液,喷洒在 Col-0 的叶片上。

同时,拟南芥 Col-0 正常土培 21 d 后进行病原菌处理。将丁香假单胞杆菌 Psm ES4326 的稀释液($D=0.000\ 2$)注射到拟南芥的叶片中。经试验验证病原菌处理后,拟南芥体内 SA 含量升高,大概 6 h 后 SA 含量升到最高,9 h 后 SA 含量开始下降,所以选取 0、6、9 h 三个时间点取样。

表 1 本研究所用的引物

Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	序列(5'-3') Sequence(5'-3')
NG314-F	GGAGAAGAACATTATCACAAAC
NG314-R	TCCCTTCTGAAACGTCTCA
NG314-QPCR-F	AGTTGAGTTGCTCTGGTTTC
NG314-QPCR-R	GATTGCTTGATGGGCTGTG
UBQ5-qPCR-F	GACGCTTCATCTCGTCC
UBQ5-qPCR-R	GTAAACGTAGGTGAGTCCA

1.6 SA 和病原菌处理后 NG314 表达量分析

SA 和病原菌处理取样后,Trizol 提取 RNA,用康为世纪公司的反转录试剂盒得到 cDNA,设计检测 NG314 表达量的实时荧光定量 PCR(Q-PCR)引物以及 Actin 引物(表 1)。先以每个样的 cDNA 为模板,用引物 UBQ5 做 RT-PCR 检测 cDNA 质量。反应使用 $2\times$ ES *Taq* Master Mix,反应程序:94 °C 10 min;94 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C 20 s,30 个循环;72 °C 5 min。PCR 产物跑胶,如果条带很亮,cDNA 用于做 Q-PCR,检测 NG314 在 SA 和病原菌处理前后表达量的变化。

1.7 荧光定量 PCR

本研究选用的荧光定量 PCR 仪为美国伯乐荧光定量 PCR 仪 CFX96 Touch(TL988-IV)。每个样品 3 个重复,反应程序:95 °C 10 min;95 °C 10 s,55 °C 30 s,72 °C 32 s,40 个循环。获得的数据采用 delta delta CT 法分析。

2 结果与分析

2.1 受水杨酸下调新基因的鉴定

以 SA 处理 24 h 后的拟南芥幼苗为材料进行 RNA-Seq 分析,共发现了 12 个受水杨酸诱导下调的新基因。12 个新基因在 SA 处理前后的表达情况如表 2 所示,可以看出这些新基因的相对表达量受 SA 大幅下调。

2.2 NG314 的克隆

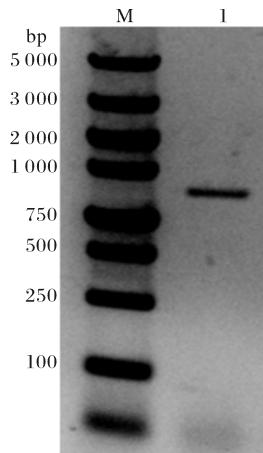
由 RNA-Seq 分析结果可知本研究得到了新基因的序列。为了进一步验证 RNA-Seq 结果的可靠性,以 Col-0 幼苗的 cDNA 为模板,试图克隆这 12 个新基因。本研究成功地克隆了 NG314,其 PCR 扩增结果如图 1。进一步将 NG314 的 PCR 产物克隆到 T 载体上,经过测序分析表明,通过克隆得到的基因序列与 RNA-Seq 获得的基因序列是一致的,其 cDNA 序列如图 2 所示。

表 2 新基因受 SA 下调的倍数

Table 2 The multiple of new genes down-regulated by SA

新基因编号 Gene number	对照 ¹⁾ Control	SA ²⁾ SA	SA/对照 SA/CK
newGene_10	1.96	0.13	0.07
newGene_12	6.81	0.00	0.00
newGene_42	6.93	0.53	0.08
newGene_107	1.21	0.00	0.00
newGene_123	7.90	1.47	0.19
newGene_180	34.98	12.92	0.37
newGene_201	2.70	0.30	0.11
newGene_216	2.61	0.43	0.16
newGene_217	1.91	0.12	0.06
newGene_265	18.04	4.37	0.24
newGene_310	2.39	0.10	0.04
newGene_314	8.65	1.00	0.12

注:1)未受 SA 处理的对照组相对表达量;2)SA 处理的实验组相对表达量。Note: 1) The relative expression of the control group without SA treatment; 2) The relative expression of the experimental group with SA treatment.



M: DL5000 marker; 1: NG314.

图 1 NG314 的 PCR 扩增

Fig.1 PCR amplification of NG314

```

GGAGAAGAACATTATCACACCACCAAACTTCAGATGTGATAAATTAGCCAAGA
AGTTCATCTTGTATACTCTTATAAACTCTCATCTAAATCAAATTGCGACGAAATACAT
TAGCTAAATCCGAAGAGTATACCGCGTTACCATCTGATTCTCCCTGACCATAT
CACTTCCACCTCGCCAAGCGGGGAGATTCTCACATCGATAGTCCAGACATGGTATCG
TGGCGTTCTTGGGTGAAAGCTAGGAAAAAAATGATTGCTCATAGTCGAAGTGAC
AATCCTTTTATGTGATACTCGTATTGAAATAACAATAACAAGGTTGCAGTTGAAG
TAACCTTTCAATCATCATATCCATTACAACGACCTTAAGTATAAGTAGATATATG
GGGATGTAACGCATGTTGTTCTCGGGGAAGCATTGCACATGTTCTGGAGAATG
AAATCACATTCCATACATGAATAATAATTACCTTTAGATAGAACATCGTACTGCTT
AAAAAACATGTTAATGTCATAAACTTATGATGAAAACACCTATAAAAGCGTTTTT
CAAGCATGTGCTATCTATGAAGGTAATTACTATTATGTATAAAATATGATTITATCC
TCCATAAAACATGTGCAAATGCTTCTACAGGAAACAATACGTTGCATCCCCATCT
ACTTACACTTAAGGTCGTTGCAATGAATGTGATATAATGTTACTTGACTGTAAAGC
TTGAGAGCAGTGGTTCATCTATGAGTGTGGCATAGATCCACGAATAATCCATCTGTG
CATGGTTAAAGATTGGAGCTTGATGGAGATCTAAAAGGCCATAGTTGAGTTGC
TCTGGTTTCAACATCTCATTGTAGGATTGACTACTGACTCATGCCTGGCTG
ATAATGATCTTATCTTATTTCTCATTACAGTTGGTCAGAAAATGTGTATAGTGTAT
TTACCCAATTATGAGTACATTAGGTTATTGTCACAGGCCATCAAGCAATCGCAACT
TTAAAAATAATCCACTAATTATTGATAAATTGAGACGTTTCAGAAAGGGA.

```

图 2 NG314 的 cDNA 序列

Fig.2 cDNA sequence of NG314

2.3 NG314 基因的结构和功能预测

NG314 的 cDNA 序列总长为 1 097 bp。比较 NG314 的 cDNA 序列和基因组序列发现,该基因含有一个 123 个碱基的内含子,第 1 个外显子有 220 个碱基,第 2 个外显子有 877 个碱基,其基因结构如图 3 所示。

在 TAIR 网站 (<https://www.arabidopsis.org/>) 上进行 BLAST 分析发现, NG314 的部分

cDNA 序列(380-716 碱基)与 AT5G03552 的 cDNA 序列(总长度为 337 bp)完全匹配。但是 NG314 比 AT5G03552 多出前后两段。AT5G03552 是一个 miRNA (MIR822A)。基于以上信息,推测 NG314 可能是一个 miRNA 或长链非编码 RNA(long non-coding RNA,lncRNA)。NG314 比 AT5G03552 更

长,有可能会合成更多的 pre-miRNA,进而形成更多种类的成熟 miRNA。



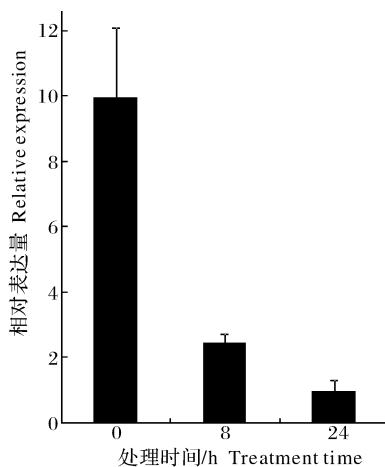
黑色方框表示外显子,方框间的黑线表示内含子。Black box represents exon, black line between the black boxes represents intron.

图 3 NG314 的基因结构

Fig.3 The genomic structure of NG314

2.4 NG314 在 SA 处理后的表达量变化

为进一步验证 NG314 是否被 SA 下调,并探究 NG314 表达量在 SA 处理后的动态变化,在 SA 处理拟南芥后 0、8、24 h 取样,并进行荧光定量 PCR(图 4),结果表明,NG314 的表达量随 SA 处理时间的增加而减少。



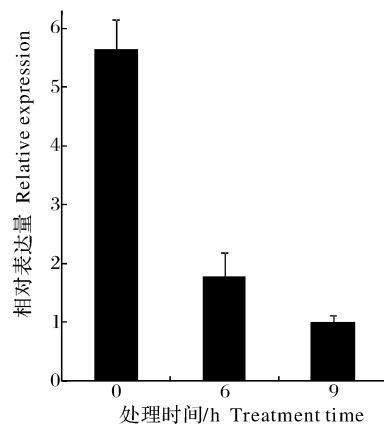
荧光定量 PCR 检测 SA 处理野生型拟南芥 0、8、24 h 后 NG314 的表达量,每个样品 3 个重复。Detecting the expression of NG314 in Col-0 under 0, 8, 24 h SA treatment by fluorogenic quantitative PCR, each sample repeated three times.

图 4 水杨酸处理后 NG314 表达量变化

Fig.4 Variation of NG314 expression after SA treatment

2.5 NG314 在病原菌处理后的表达量变化

植物在受到病原菌侵染后会增加体内的水杨酸含量,为了进一步探究 NG314 在抗病反应中的动态变化,用丁香假单胞杆菌 Psm ES4326 处理拟南芥,在处理后 3 个时间点(0、6、9 h)取样并进行荧光定量 PCR。结果(图 5)显示:NG314 的表达量在病原菌处理后减少,与 SA 处理后 NG314 的表达量变化一致,表明 NG314 很有可能参与植物对病原菌的抗性反应。



荧光定量 PCR 检测 Psm 处理野生型拟南芥 0、6、9 h 后 NG314 的表达量,每个样品 3 个重复。Detecting the expression of NG314 in Col-0 under 0, 6, 9 h Psm treatment by fluorogenic quantitative PCR, each sample repeated three times.

图 5 Psm 处理后 NG314 表达量变化

Fig.5 Variation of NG314 expression after Psm treatment

3 讨 论

病害严重影响植物的生长与发育,降低农作物的产量和品质。植物在长期的进化过程中产生了一系列复杂而精细的抗病机制,植物免疫激素水杨酸在抗病反应中起核心作用,调控大量抗病相关基因的表达。一直以来,SA 抗病通路中研究较多的都是正调控因子,本研究拟通过探究拟南芥中受水杨酸诱导下调的新基因,挖掘 SA 抗病通路中重要的负调控因子。本研究采用 RNA-Seq 技术克隆到一个新基因 NG314。

NG314 的表达量随 SA 浓度的增加而减少,与 RNA Seq 结果吻合,表明 NG314 确实受 SA 下调并可能通过抑制其靶基因的表达负调控植物的抗病反应。NG314 的表达量在病原菌处理后减少,这与 SA 处理后 NG314 表达量变化的结果吻合,进一步说明 NG314 可能通过抑制其靶基因的表达负调控植物的抗病反应。

根据本研究的结果,NG314 可能是一个长链非编码 RNA,它并不编码蛋白,而是以 RNA 的形式在转录调控以及转录后调控等层面调控基因的表达水平。NG314 可能通过结合到特定蛋白质上调节相应蛋白的活性,如结合到某个 SA 通路中的抗病因子抑制其活性调控植物的抗病反应;也可能通过与某个 SA 通路中的抗病因子的转录本形成互补双链,进一步在 Dicer 酶作用下产生内源性的 siRNA,抑制该因子的表达水平^[15]。同时,NG314 可能是

一个新的 miRNA 基因,会合成更多的 pre-miRNA,NG314 的基因组 DNA 包含一个内含子,利于 NG314 的可变剪接形成更多的前体 miRNA。

NG314 有可能通过抑制靶基因的表达负调控抗病反应,但是其具体的作用机制有待于进一步通过遗传学和生物化学等手段继续研究。阐明 NG314 的作用机制有助于揭示新的水杨酸作用机制,具有重要的理论意义和潜在的应用价值。

参 考 文 献

- [1] JONES J D G, DANGL J L. The plant immune system[J]. Nature, 2006, 444:323-329.
- [2] SPOEL S H, DONG X N. How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells[J]. Nat Rev Immunol, 2012, 12:89-100.
- [3] DELANEY T P, UKNES S, VERNOOIJ B, et al. A central role of salicylic acid in plant disease resistance[J]. Science, 1994, 266:1247-1250.
- [4] 汪尚,徐鹭芹,张亚仙,等.水杨酸介导植物抗病的研究进展[J].植物生理学报,2016,52(5):581-590.
- [5] GAFFNEY T, FRIEDRICH L, VERNOOIJ B, et al. Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance[J]. Science, 1993, 261:754-756.
- [6] 刘向阳,李英涛,高飞,等.外源水杨酸对毒死蜱胁迫下蔬菜上青抗防御反应的影响[J].华中农业大学学报,2014,33(4):66-71.
- [7] WANG D, AMORNSIRIPANITCH N, DONG X. A genomic approach to identify regulatory nodes in the transcriptional network of systemic acquired resistance in plants[J]. Plos Pathog, 2006, 2(11):e123.
- [8] 陆雯,潘璐琪,王雪艳.水杨酸及茉莉酸介导植物抗病性的研究进展[J].贵州农业科学,2013,41(10):40-43.
- [9] FU Z Q, YAN S P, SALEH A, et al. NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants[J]. Nature, 2012, 486:228-232.
- [10] CAO H, GLAZEBROOK J, CLARKE J D, et al. The *Arabidopsis* NPR1 gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats[J]. Cell, 1997, 88(1):57.
- [11] RYALS J, WEYMANN K, LAWTON K, et al. The *Arabidopsis* NIM1 protein shows homology to the mammalian transcription factor inhibitor I kappa B[J]. Plant cell, 1997, 9(3): 425-439.
- [12] SHAH J, TSUI F, KLESSIG D F. Characterization of a salicylic acid-insensitive mutant (sail) of *Arabidopsis thaliana*, identified in a selective screen utilizing the SA-inducible expression of the tms2 gene[J]. Molecular plant-microbe interactions, 2007, 10(1):69-78.
- [13] ENYEDI A J, YALPANI N, SILVERMAN P, et al. Localization, conjugation, and function of salicylic acid in tobacco during the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus[J]. P Natl Acad Sci USA, 1992, 89(6):2480-2484.
- [14] SNYDER M. RNA-Seq:a revolutionary tool for transcriptomics [J]. Nat Rev Genet, 2009, 10(1):57.
- [15] WILUSZ J E, SUNWOO H, SPECTOR D L. Long noncoding RNAs: functional surprises from the RNA world[J]. Genes Dev, 2009, 23(13):1494-1504.

Cloning and functional analyses of novel genes down-regulated by salicylic acid in *Arabidopsis*

ZHAN Li HU Zhenjie

College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract High-throughput sequencing was used to study the transcriptomic changes of wild-type *arabidopsis*(Col-0)after salicylic acid treatment. 12 novel genes down-regulated by salicylic acid were identified. Among them, NG314 was studied and cloned from the cDNA of Col-0 seedlings. The total length of NG314cDNA sequence is 1 097 bp. The genomic DNA of NG314 contains one intron. Results of fluorescence quantitative PCR analyses showed that the expression of NG314 gradually decreased under the salicylic acid treatment. Pathogen infection repressed the expression of NG314. It is indicated that NG314 may encode a long non-coding RNA or novel miRNA, and may regulate plant disease resistance through repressing the expression of its target genes.

Keywords *Arabidopsis*; salicylic acid; NG314; pathogen; non-coding RNA; miRNA

(责任编辑:张志钰)