

甲基茉莉酸和草酸诱导油菜 BN10 基因的表达

肖春芳 侯明生 蔡 丽

华中农业大学植物科学技术学院, 武汉 430070

摘要 利用实时荧光定量 PCR 方法, 观察油菜 BN10 基因在根、茎、叶中的表达差异, 并分析甲基茉莉酸 (MeJA) 和草酸 (OA) 对该基因的诱导表达的动态变化。结果表明: BN10 基因在油菜根、茎、叶中均能表达, 其中在根中的表达量最高, 茎中的表达量次之, 在叶中的表达量最低, 且在抗病毒品种苏油 1 号中的表达量高于感病品种中双 9 号; BN10 的表达受 MeJA 和 OA 的诱导影响。MeJA 诱导处理感病品种中双 9 号叶片后, BN10 基因表达先升后降, 在 24 h 时表达量最高, 为诱导前的 2.58 倍, 之后有所下降, 但诱导后的表达量始终高于诱导前, 72 h 时的表达量仍为诱导前的 1.13 倍; OA 诱导处理中双 9 号后, BN10 表达量也是先增加后降低, 在 12 h 时达到最大值, 为诱导前的 2.5 倍, 72 h 时下降至最低, 仅为诱导前的 25%。MeJA 诱导处理抗病品种苏油 1 号后, BN10 的表达趋势与中双 9 号相似, 但各时间点的表达量均高于中双 9 号; OA 诱导处理苏油 1 号后, 对 BN10 的诱导更强烈, 表达量在 6 h 时即达到峰值, 为诱导处理前的 3.05 倍, 之后逐渐下降。

关键词 油菜; 病毒; BN10 基因; 诱导表达; 实时荧光定量 PCR

中图分类号 S 432.4⁺1; S 435.654 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2012)05-0593-05

油菜是中国主要的油料作物之一。甲基茉莉酸 (methyl jasmonate, MeJA) 和乙烯 (ethylene, ET) 作为重要的植物激素和信号分子, 广泛分布在植物体中^[1]。据报道, MeJA 或 JA 在受伤或经病菌激发子诱导后的细胞培养物和植物中能大量积累。外源 MeJA 能够诱导植物特异基因的表达, 产生茉莉酸酯蛋白, 从而发挥抗病作用。在拟南芥中, 能诱导野生型植株对灰霉菌 (*Botrytis cinerea*) 的抗性, 病原体感染所诱导的 JA 可激活一些防御基因的表达, 如 PDF1.2、PR-3 和 PR-4 等, 以抵御某些病原菌的感染^[2]。通过对拟南芥突变体的研究, 现已得到了几种乙烯反应突变体, 这些突变体表现为对外源乙烯无反应或诱导抗性^[3]。草酸 (oxalic acid, OA) 是病原真菌分泌的一种致病因子^[4], 同时也是一种重要的非生物激发因子, 能提高植物中某些与防御反应相关的过氧化物酶的活性^[5]。通过组织培养试验发现, 低浓度 OA 能促进单倍体愈伤组织生长和植株再生^[6]。

BN10 基因为油菜的内源基因, 是与植物防御反应相关的基因, 是从水杨酸类似物 (benzothiadiazole, BTH)、甲基茉莉酸 (MeJA) 和乙烯 (ET) 诱导

处理油菜叶片制成的 cDNA 芯片中筛选获得的。将 BN10 基因的序列在 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> 网站上进行序列比对, 发现该基因与 GenBank 中拟南芥谷胱甘肽-S-转硫酶 (glutathione S-transferases, GST) 的基因同源性为 93.2%, 推测其功能与 GST 的基因类似。笔者从抗病防御途径的角度出发, 采用实时荧光定量 PCR 检测 BN10 基因在油菜不同营养器官中和植株受 MeJA、OA 诱导后的表达差异, 旨在为油菜 BN10 基因的功能研究提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试品种

油菜抗病毒品种苏油 1 号和双低品种中双 9 号 (感病品种) 种子由笔者所在实验室保存并提供。油菜播种出苗后进行盆栽, 置于光照培养间生长, 每盆留苗 3~5 株。

1.2 主要试剂

甲基茉莉酸和草酸购自 Sigma 公司; RNAprep pure 植物总 RNA 提取试剂盒购自 Tiangen Inc; 第一链 cDNA 合成试剂盒购自 Fermentas Inc; SYBR

收稿日期: 2011-12-30

基金项目: 湖北省自然科学基金项目 (2009CDA160) 和华中农业大学自主科技创新基金项目 (2010QC031)

肖春芳, 硕士研究生。研究方向: 植物病理学。E-mail: xiaochunfang22@163.com

通讯作者: 蔡 丽, 博士, 讲师。研究方向: 植物病理学。E-mail: caili@mail.hzau.edu.cn

Green Realtime PCR Master Mix 购自 Toyobo Inc; PCR Strip tubes 购自 Axygen Inc; 常规化学试剂购自武汉友媛生物科技有限公司。

1.3 植株的化学诱导

当油菜幼苗长到四叶一心期时,进行化学诱导处理。分别用 0.1 mmol/L MeJA 和 5.0 mmol/L OA 对四叶期植株的第三片真叶喷雾,用灭菌双蒸水喷雾相同苗龄的相应叶片为对照。喷雾至叶片上均匀布满液滴为止。每处理 15 株,3 次重复。将不同处理的植株分别放入不同的塑料密封间,轻缓操作以防止试剂滑落或接触到其他叶片^[7]。处理后的植株 23 °C 恒温保湿培养。

1.4 取样与保存

油菜幼苗经诱导处理后,依次在 0、6、12、24、48、72 h 取样,分别剪下诱导植株上部的非处理叶保存备用。在未处理的油菜长至十叶期分别剪下植株的根、茎、叶,用于检测目的基因在植株不同部位的表达情况。取样后用锡箔纸包住,编号之后快速用液氮速冻,于 -80 °C 保存备用。

1.5 总 RNA 的提取及反转录

总 RNA 提取参照 RNeasy spin 试剂盒说明的方法进行,反转录参照第一链 cDNA 合成试剂盒说明的方法进行。

1.6 荧光定量 PCR

以植物体内衡量表达的 *Actin* 基因作为内标,进行目的基因表达的实时荧光定量 PCR 检测,扩增使用 Cl0000™ Thermal cycler (BIO-RAD INC)。油菜 *Actin* 基因特异性扩增的上游引物序列为 5'-TTCTCTTTATGCCAGTGGTCGTA-3', 下游引物序列为 5'-CCCATCAGGTAGCTCGTAGTTC-3', 扩增片段为 300 bp^[8]。BN10 特异扩增的上游引物序列为 5'-TCAGCCATCCAGGTTTCAGT-3', 下游引物序列为 5'-CCTTCCTCTGTGCCTCGTA-3', 扩增片段 138 bp。引物由上海英骏生物技术有限公司合成。

实时荧光定量 PCR 反应体系为 20 μ L, 含有 SYBR Green PCR Master Mix 10 μ L、上下游引物各 0.5 μ L、cDNA 模板 1 μ L 和蒸馏水 8 μ L。扩增条件:95 °C, 3 min; 95 °C 10 s, 55 °C 15 s, 72 °C 30 s, 40 个循环;每个循环于 72 °C 复性末端进行荧光检测。反应结束后降温至 65 °C,以 0.5 °C 递增速度升温,记录荧光信号的变化,逐渐加热到 95 °C (5 s),最后降至 20 °C (5 s)。每组试验进行 3 次生

物学重复,每个生物学重复至少进行 3 次技术重复。

1.7 数据处理

首先以溶解曲线为标准,利用仪器所带软件 CFX96™ Real-Time System,优化内标基因和目标基因 PCR 反应条件,使之扩增产物特异。试验采用比较 Ct 法 ($\Delta\Delta Ct$) 计算基因的相对表达量。以油菜 *Actin* 为内标基因,分别测定 *Actin* 基因和目的基因的 Ct 值,取其平均值,然后通过内标基因对目的基因进行校正得到 $\Delta\Delta Ct$,最后通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 估算目的基因的相对表达量和系统误差^[8]。

在计算基因的相对表达量时,以对照植株作为参照,其表达量设为 1,其他检测样品再与参照比较,最后获得相对表达值^[9]。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 质量的检测

从油菜叶片、茎秆或根部提取总 RNA 并进行快速电泳检测,UV 下能看到非常明显的 2 条带,分别为 28S 和 18S rRNA,另一条带为 5S,片段最小,亮度最弱(图 1)。由图 1 可知,最大 rRNA 亮度为次大 rRNA 亮度的 1.5~2.0 倍,表示 RNA 样品完整性较好。使用分光光度计测得 RNA 的 D_{260}/D_{280} 读数为 1.8~2.1,表明没有蛋白质污染。RNA 质量浓度为 0.5~1.5 μ g/ μ L,表明 RNA 质量较好,可以用于后续反转录试验。

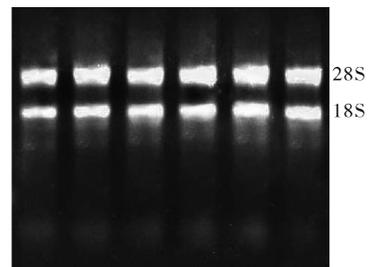


图 1 油菜总 RNA 质量检测

Fig. 1 Quality inspection for total RNA of oilseed rape

2.2 PCR 条件优化和特异性产物的扩增

实时荧光定量 PCR 所用的 SYBR Green I 荧光染料,在 PCR 反应中能够结合到 DNA 双链上。为了避免该染料与非目的 DNA 的非特异性结合,需要根据产物的溶解曲线对 Ct 值、退火温度、引物设计和使用浓度等条件进行优化,同时也要避免 PCR 反应过程中产生非特异性产物^[10]。分别用 *Actin* 基因和 BN10 基因的引物对扩增的溶解曲线进行分析,熔点峰值依次为 87.6 °C 和 85.5 °C。分

析结果显示,扩增的溶解曲线平稳,峰尖且窄,峰型单一,且每个峰的位置基本保持一致。这表明引物设计合理,扩增条件合适,扩增产物特异,可以采用此反应条件进行基因表达的相关分析。

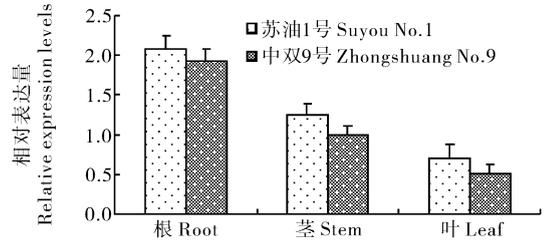
2.3 BN10 基因的相对表达水平

以油菜茎中 BN10 的表达量为参照,测定 BN10 基因在油菜品种苏油 1 号和中双 9 号的不同营养器官中的表达量(图 2)。由图 2 可知,BN10 基因在油菜根、茎、叶中均有表达,且在 2 个品种中的表达趋势相似,但表达量略有差异。BN10 基因在油菜根部的表达量最高,茎居中,叶中的表达量最低,仅相当于根中表达水平的 25%,但 BN10 在抗病品种苏油 1 号的表达量略高于中双 9 号。

2.4 诱导后 BN10 在叶片中的表达动态

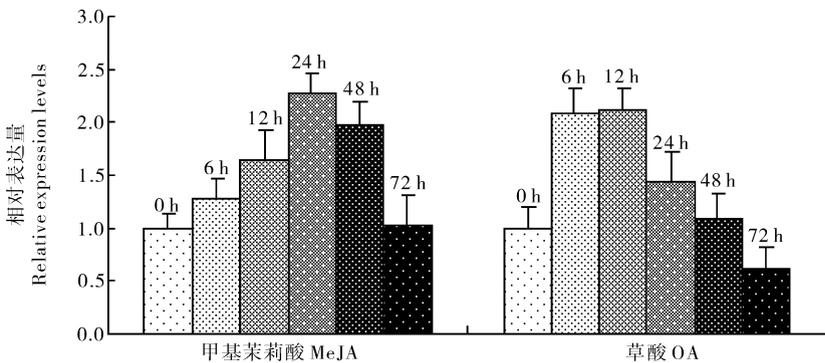
利用甲基茉莉酸和草酸 2 种化学物质诱导处理

油菜抗感病品种叶片,观察 BN10 在处理不同时间点的表达变化(图 3 和图 4)。



以中双 9 号茎中的相对表达量作为参照,设为 1;图中为 5%水平下的差异显著性分析。The relative expression was calibrated to stems as control samples and it was designated as 1. The significance of difference was analysed at the level of 5%.

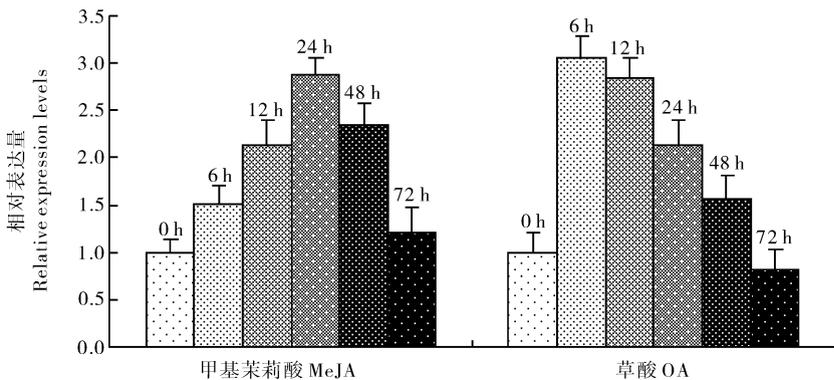
图 2 不同油菜营养组织中 BN10 的相对表达水平
Fig. 2 Relative expression levels of genes BN10 in different tissues of oilseed rape



分别以未诱导时的相对表达量作为参照,设为 1;图中为 5%水平下的差异显著性分析。The relative expression was calibrated to non-induced as control samples respectively and it was designated as 1. The significance of difference was analysed at the level of 5%.

图 3 甲基茉莉酸和草酸诱导处理中双 9 号叶片中 BN10 的相对表达量

Fig. 3 Relative expression levels of genes BN10 in Zhongshuang No.9 leaves induced by MeJA and OA



分别以未诱导时的相对表达量作为参照,设为 1;图中为 5%水平下的差异显著性分析。The relative expression was calibrated to non-induced as control samples respectively and it was designated as 1. The significance of difference was analysed at the level of 5%.

图 4 甲基茉莉酸和草酸诱导处理苏油 1 号叶片中 BN10 的相对表达量

Fig. 4 Relative expression levels of genes BN10 in Suyou No.1 leaves induced by MeJA and OA

由图 3 可知,在 MeJA 诱导感病品种中双 9 号后, BN10 基因的表达量先升后降。在 24 h 时表达量最高,上调到诱导前的 2.58 倍,在 48 h 时开始下降,但诱导后的表达量始终高于诱导前,72 h 时的表达量仍为诱导前的 1.13 倍。在草酸诱导处理中双 9 号后, BN10 的表达也是先增加后降低,12 h 时达到最大值(为诱导前的 2.58 倍),24 h 时的表达量骤降至与诱导前相近,72 h 时下降至最低,仅为诱导前的 25%。

由图 4 可知, MeJA 诱导处理抗病品种苏油 1 号时, BN10 基因的表达趋势与中双 9 号相似,但在各时间点的表达量均高于中双 9 号;但 OA 诱导处理苏油 1 号时,植株体内的 BN10 基因的表达迅速升高,在 6 h 时即达到峰值,表达量为诱导处理前的 3.05 倍,之后逐渐下降。

3 讨 论

序列比对发现 BN10 基因与 GenBank 中拟南芥谷胱甘肽-S-转移酶(GST)的基因同源性为 93.2%。拟南芥谷胱甘肽-S-转移酶基因在植物解毒和防御活性氧伤害中有重要作用,其主要功能之一是能提高植物细胞膜的修复能力,在基因工程中常用于提高植物的抗逆能力。研究表明,在高等植物中拟南芥谷胱甘肽-S-转移酶基因与植物对多种逆境的抗性密切相关,能抵御低温、盐、干旱、重金属、除草剂等非生物胁迫对植物造成的损伤,有促进植物损伤修复的作用^[11-12]。推测油菜 BN10 基因可能与拟南芥 GST 的基因具有相同的抗逆功能。

本研究对油菜类似 GST 的基因 BN10 在不同部位的表达量进行了检测,用甲基茉莉酸(MeJA)和草酸(OA)对 BN10 进行诱导。结果表明, BN10 基因在油菜的根、茎、叶中均有表达,表达量依次为根>茎>叶,且在抗性品种中的表达量高于感病品种。MeJA 和 OA 均能诱导 BN10 基因的上调表达,表达趋势均为先上升后下降,但表达峰值出现的时间点有所不同,且在抗病品种中各时间点的表达量均高于感病品种。

有研究表明,用 MeJA、OA 和水杨酸类似物 BTH 处理油菜,能诱导抗病基因的表达。冀瑞琴等^[7,13]用 MeJA、BTH 和 OA 处理诱导油菜后,防御信号传导途径中的标记基因如 PR-1 和 PDF1.2 等表达上调,且增强了对核盘菌的抗性。任秋红等^[14]利用荧光定量 PCR 技术,检测了甘蓝型油菜

中脂氧合酶基因 LOX2 在 MeJA 和 BTH 处理后的表达差异,结果表明 LOX2 基因的表达受 MeJA 诱导,而 BTH 则明显抑制了 LOX2 的表达。核盘菌接种也能明显诱导该基因的上调表达,且在抗病品种中的表达量高于感病品种。因此,初步推测 LOX2 基因的高表达在油菜对菌核病抗性中起重要作用,参与了茉莉酸介导的菌核病抗性防御反应。本试验结果表明,油菜类似 GST 的基因 BN10 表达受 MeJA 和 OA 的诱导,在不同组织中的表达量为根>茎>叶,且在抗性品种中的表达量高于感病品种。由此可知, BN10 基因可能与油菜的抗病和抗逆相关,但需要进一步研究证实。

参 考 文 献

- [1] GUNDLACH H, MULLER M J, KUTCHAN T M, et al. Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89: 2389-2393.
- [2] THOMMA B P H T, EGGERMONT K, PENNINCKX L A M A, et al. Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathway in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95: 1507-1511.
- [3] GUZMAN P, ECKER J. Exploiting the triple response of *Arabidopsis* to identify ethylene-related mutants [J]. Plant Cell, 1990, 2(6): 513-523.
- [4] REJANE L G, HENRIK U S. Oxalate production by *Sclerotinia sclerotiorum* deregulates guard cells during infection [J]. Plant Physiology, 2004, 136: 3703-3711.
- [5] MUCHARROMAH E K, KUC J. Oxalate and phosphate induce systemic resistance against disease caused by fungi bacteria and viruses in cucumber [J]. Crop Protection, 1991, 10(4): 265-270.
- [6] LIU S, WANG H, ZHANG J, et al. *In vitro* mutation and selection of doubled-haploid *Brassica napus* lines with improved resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* [J]. Plant Cell Reports, 2005, 24: 133-144.
- [7] 冀瑞琴. 油菜抗菌核病分子机制研究[D]. 武汉: 中国农科院油料作物研究所, 2006.
- [8] KENNETH J L, THOMAS D S. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method [J]. Methods, 2001, 25: 402-408.
- [9] 蔡丽. 油菜病毒株系鉴定和抗病相关基因研究及转基因飘逸评价[D]. 武汉: 华中农业大学图书馆, 2008.
- [10] DAVID G G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream [J]. Exp Hematol, 2002, 30: 503-512.
- [11] 王光勇, 刘迪秋, 葛锋, 等. GSTs 在植物非生物逆境胁迫中的作用[J]. 植物生理学通讯, 2010, 9(46): 890-894.

- [12] 宋长芹, 缪海飞, 朱斌, 等. 植物谷胱甘肽-S-转移酶在植物修复中的作用[J]. 安徽农学通报, 2010, 16(7): 56-57. (2): 184-188.
- [13] 冀瑞琴, 董彩华, 高荣村, 等. 甲基茉莉酸、苯丙噻重氮、草酸诱导油菜对菌核病的抗性[J]. 中国油料作物学报, 2006, 28
- [14] 任秋红, 黄军艳, 毛晗, 等. 甘蓝型油菜 *LOX2* 基因在 MeJA、BTH 和核盘菌诱导下的表达[J]. 河南农业科学, 2010(7): 22-25.

Gene expression of oilseed rape *BN10* induced by methyl jasmonate and oxalic acid

XIAO Chun-fang HOU Ming-sheng CAI Li

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

Abstract Using real-time quantitative PCR, the *BN10* gene expression in roots, stems and leaves of rape was detected. Its expression after the treatment with methyl jasmonate (MeJA) and oxalic acid (OA) was also analyzed. The results indicated that the expression of the *BN10* gene was detected in roots, stems and leaves of rape with the highest expression level in roots, whereas the lowest expression level in leaves. The expression level in the antiviral variety Suyou No. 1 was higher than that in the susceptible variety Zhongshuang No. 9. The *BN10* gene expression was induced by MeJA and OA in a similar mode. *BN10* was significantly induced after the treatment with OA and MeJA for 12 h and 24 h in Zhongshuang No. 9 respectively. The expression level was 2.50-folds and 2.58-folds higher than that before the induction, followed by a decrease. After induction for 72 h, the gene expression level in the treatment of OA was 75% lower than that of the untreated control, whereas was still 1.13-folds higher in the treatment of MeJA than that of the untreated control. The *BN10* gene expression in Suyou No. 1 was similar to that in Zhongshuang No. 9 induced by MeJA and OA excepted for that its expression level was higher than that in Zhongshuang No. 9. *BN10* was significantly induced after the treatment with OA for 6 h. The expression level was 3.05 folds higher than that before the induction, followed by a decrease.

Key words oilseed rape; virus; *BN10* gene; induced expression; real time quantitative PCR

(责任编辑: 陈红叶)