

寄主抗性胁迫下玉米弯孢叶斑病菌致病力相关蛋白与基因表达的分析^{*}

周斐红 刘力行^{**} 陈捷^{**} 姜雪 刘铜 黄秀丽 翟羽红

上海交通大学农业与生物学院资源与环境系, 都市农业(南方)重点开放实验室, 上海 200240

摘要 采用 RT-PCR 方法, 研究了玉米弯孢菌的弱致病性分化型 WS18 在抗性玉米自交系 Mo17, 沈 135, 78599-1 上分别继代接种后所得的各个世代菌株中 *Sod*, *Scd1*, *Brn1* 三种基因表达量的变化。*Sod* 基因变化比较灵敏, 继代前期有剧烈变化, 而后恢复与原始菌株相当; 而 *Scd1* 与 *Brn1* 基因表达量在继代前后均未发生显著性变化; 这与基因所编码蛋白的表达量变化趋势有所差异。因此, 在寄主一定程度的选择压力下病菌致病力相关蛋白的变化可能在 mRNA 水平并没有发生同步改变。

关键词 玉米弯孢病菌 mRNA 致病力

由新月弯孢菌 (*Curvularia lunata* (Wakk.) Boed.) 所引起的玉米弯孢菌叶斑病属世界性病害, 主要发生于热带、亚热带地区, 20 世纪 90 年代中后期在我国华北、东北玉米产区大面积爆发, 造成严重损失^[1], 种植玉米抗性品种是目前比较有效的防治措施。但我国玉米品种遗传背景相对单一, 抗性品种多数来源于热带与亚热带地区, 而玉米弯孢叶斑病菌又具有较强的适应性, 因此该菌存在致病性变异的风险。病原菌与寄主之间的互作引发微突变效应, 环境因素的定向选择模式已经为越来越多的研究者们所认识^[2]。孙国昌等^[3] 在研究水稻品种与稻瘟病菌群体互作的选择作用时发现当病菌群体中存在有对某一品种致病性强的菌株时, 经若干代后该品种有加重发病的趋势, 并且该强致病力菌株的频率在群体中会不断上升致使水稻品种的抗性丧失。近年来研究也证实玉米弯孢叶斑病菌存在明显的致病性变异现象, 不同的菌株致病力有明显差异, 同一生态环境下的菌株也存在明显的遗传多样性^[4], 因而该病菌极有可能形成与抗病品种适合度高的菌株, 存在引发玉米品种抗病性丧失的风险。

为了预防此种情况的发生, 需要建立一定的监测机制, 关注弯孢叶斑病菌致病力的变化情况。常规喷雾接种的方法虽能显示菌株的致病力变化, 但无法实现早期的预警功能, 因此需要从分子水平上找到特异的与致病力相关的变化, 在强致病力菌株形成初期做出预测, 从而预防此菌株在寄主的定向选择作用下大规模扩大。而目前揭示病菌不同致病力菌株分子水平上的差异, 常有从基因到蛋白, 和从蛋白到基因的两种方式。从基因到蛋白的手段通常运用于人工突变株的研究, Coulthurst 等^[5] 利用基因敲除获得 *LuxS* 基因缺失突变体后, 将突变体与原始菌株的蛋白进行 2-D 胶的分离与比较, 从而获得了所有与 *LuxS* 基因相关蛋白的整体变化趋势, 确定了 *LuxS* 基因在 *Erwinia carotovora* 中的作用。而从蛋白到基因的方式则常运用于研究致病菌在自然界中存在的不同致病力亚种的研究, Wu 等^[6] 利用蛋白质组学手段从 *Pantoea stewartii* 的两个致病亚种中找到了特异存在于致病亚种中的 21 个蛋白, 进而利用 Northern 及 Southern 技术确定了一些差异蛋白在基因水平上的变化。因此, 蛋白质组学能

2009-03-02 收稿, 2009-04-27 收修改稿

^{*} 国家科技支撑计划(批准号: 2006BAD08A06)和国家自然科学基金(批准号: 30871610)资助项目

^{**} 共同通信作者, E-mail: lixingliu@sjtu.edu.cn, jiechen59@sjtu.edu.cn

©1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

够从宏观上展示不同致病性菌株之间的差异, 而基因水平上的研究则能够确定这种差异的稳定性.

翟羽红等^[7]已经利用蛋白质组学手段研究了在抗性玉米自交系上的继代接种对玉米弯孢叶斑病菌的弱致病性分化型 WS18 蛋白质组产生的影响, 发现铁/锰超氧化物歧化酶(SOD)、小柱酮孢脱水酶(SCD1)、T3HN 还原酶(BRN1)等蛋白表达量均发生了变化. SOD 作为内源、外源活性氧的清除剂, 能够保护病原菌膜系统免遭活性氧的破坏, 对于病原菌适应抗性寄主的互作环境有着一定的作用^[8,9]. SCD1 与 BRN1 均与 DHN-黑色素合成相关, 有研究表明黑色素缺乏突变株的附着胞由于缺少足够的侵入寄主表皮的压力, 会导致致病性丧失^[10,11]. 但目前尚无研究表明这些相关差异蛋白的变化是否与基因水平的变化相关, 因此研究寄主诱导下的这些病菌差异蛋白在转录和翻译水平上的动态变化规律, 对于在基因水平上评价这些蛋白用于标记致病性分化的质量具有重要意义.

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株: 玉米弯孢叶斑病菌弱致病性分化型 WS18, 为第 0 代; WS18 分别在抗病玉米自交系 Mo17, 沈 135, 78599-1 上继代接种 1 次后分离所得菌株, 均为第 1 代; 第 1 代菌株分别在各自抗病玉米自交系上继代 1 次后分离所得菌株, 均为第 2 代; 依此类推, 所得菌株分别记为第 3, 4, 5 代.

所有菌株均保存于上海交通大学农业与生物学院植物病理系实验室.

1.2 方法

1.2.1 菌丝培养 菌株在马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基上培养 7 d 后, 取 3 个菌饼接种于 100 mL 马铃薯葡萄糖(PD)液体培养基中, 28 °C, 培养 5 d. 过滤收集菌丝, 用无菌水清洗后迅速放入液氮中速冻, 转移至 -80 °C 保存备用.

1.2.2 引物设计 根据翟羽红^[7]等的结果, 选取可能与致病性相关的 SOD, SCD1, BRN1 3 种差异蛋白点作为研究对象. *Gapdh* 为 RT-PCR 反应的内标基因. 实验共设计 4 对引物:

- (1) *Sod* (Accession No : gi | 37003419)
sense: ATGGAAC TGCATCACAGCAAG
anti sense: TTAAATAGACGCTTTGAGGATGC
- (2) *Scd1* (Accession No : gi | 32879677)
sense: ATGTTTGAGAAGAAAGAACTCCAGC
anti sense: ACTTCCA CTGCGGTCAATC
- (3) *Brn1* (Accession No : gi | 3425981)
sense: GTCAACTACGCCA ACGCCG
anti sense: GTTGTGAGGAG ACCATGTG
- (4) *Gapdh* (Accession No : gi | 2600)
sense: GACGGCAACAACCTGACT
anti sense: CAGTGCTGCTGGGAATGA

所有引物均由上海生工合成.

1.2.3 常规 PCR 检测 以 WS18 菌株 DNA 为模板, PCR 扩增使用 Takara 公司的 premix Taq 酶, 反应体系 25 μ L. PCR 扩增程序: 95 °C 5 min; 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min 35 个循环后, 72 °C 延伸 10 min. PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶上电泳后, 用 GenClean 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 (Geneyay 公司) 纯化. 纯化后的片段克隆到 pMD19-T 载体 (Takara 公司) 上, 送至上海桑尼公司测序. NCBI 比对, 确定与各自差异蛋白点所对应的基因序列高度同源.

1.2.4 RT-PCR 反应 菌株总 RNA 的抽提按 TrizolTM Reagent 试剂 (Invitrogen 公司) 说明书进行, 用 DNaseI (Takara 公司) 去除所含的 DNA 杂质. 根据 PrimeScriptTM RT Reagent Kit (Takara 公司) 的操作说明逆转录合成 cDNA 的一链.

以所得 cDNA 1st 为模板, 进行 PCR 反应, 扩增循环数为 30^[12]: 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min. 取 5 μ L 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 检测各基因的 IOD (积分光密度) 值. 目的基因 mRNA 的相对表达量 = 目的基因 IOD 值 / 内标基因产物 IOD 值. 整个实验重复 3 次.

2 结果与分析

2.1 病菌诱导下的差异蛋白分析

根据翟羽红等^[7]的研究, 将差异蛋白与病情指数的变化进行比较 (图 1). 发现随着病情指数的增

加, 在不同世代的菌株中几种特异变化的差异蛋白表现出非线性的变化规律: 诱导后 SOD 蛋白在其中一代时急剧变化(如在 Mo17 的第三代, 在沈 135 的第五代, 在 78599-1 的第四代), 而后恢复与原始菌株相当的水平; 诱导后的 SCD1 蛋白在 Mo17 和

78599-1 上均表现出先升后降的趋势, 到第五代时蛋白量不到原始菌株的一半; 而 BRN1 蛋白在 3 种抗性寄主上继代后均先降后升, 但仍远远低于原始菌株的表达量; 对同一种蛋白而言, 不同自交系对病菌特异蛋白表达丰度的影响规律基本相同。

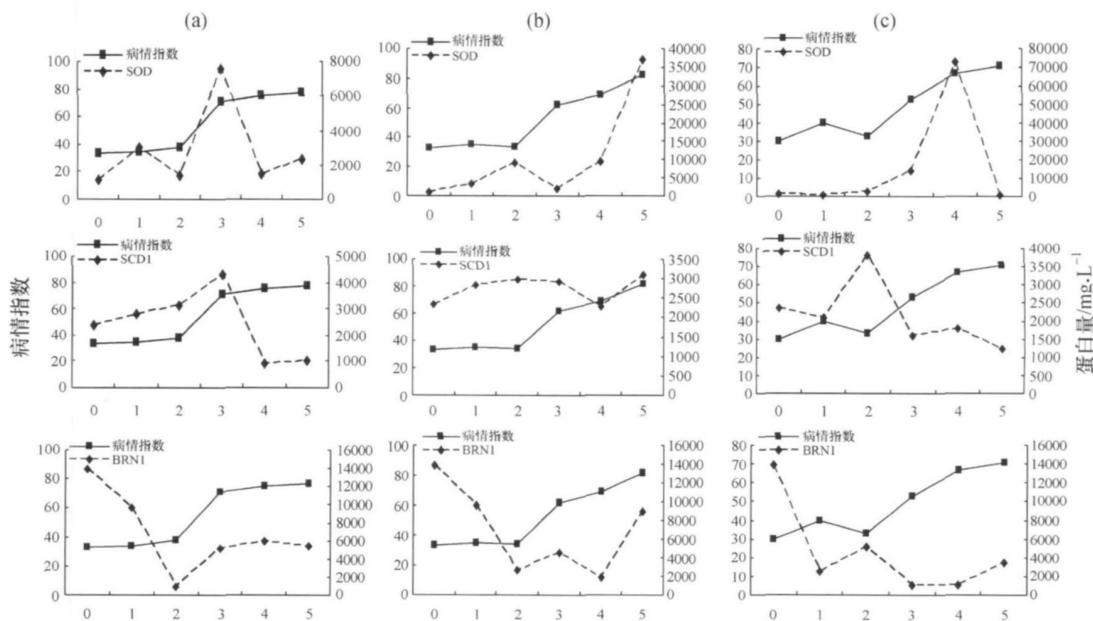


图 1 各世代蛋白表达量与病情指数

(a) WS18 在 Mo17 上继代接种; (b) WS18 在沈 135 上继代接种; (c) WS18 在 78599-1 上继代接种

2.2 *Sod* 基因表达量的变化

WS18 在抗病玉米自交系上继代接种后, *Sod* 基因表达量的变化表现出不同的趋势(图 2)。

从同一品种的不同接种代数来看: 在 Mo17 上继代接种后, *Sod* 基因的表达量在第一代时最高, 与第 0 代相比增加了 52%, 表现出极显著差异($P < 0.01$), 而后逐渐下降, 至第四代时仅为 0 代菌株的一半, 第五代时恢复到与 0 代菌株相当的水平; 在沈 135 上的继代接种结果表明, *Sod* 基因的表达量在第二代时最高, 与第 0 代相比较增加了 44%, 达到极显著差异($P < 0.01$), 但在第三代时急剧下降, 此后逐步回升到 0 代的水平; 78599-1 作为抗性诱导寄主时, *Sod* 基因的表达量在五代的范围内未超过第 0 代, 第一代时表达量下降为 0 代菌株的一半, 而后逐渐上升, 直至恢复到与 0 代菌株相类似的水平。从不同寄主的相同代数来看, 在三种抗性寄主上继代接种后, 一、二、四代时, 不同寄主上分离

的菌株 *Sod* 基因的表达量均表现出极显著差异。

由此可见, *Sod* 基因表达量的变化十分灵敏, 并且寄主对其影响显著, 寄主不同, 变化的趋势有所不同, 但均在致病菌与寄主互作的起始阶段有剧烈的改变, 随着互作代数的增加, 会逐渐恢复为与原始菌株相当的表达水平, 这可能与致病菌适应了互作环境有关。

2.3 *Scd1* 基因表达量的变化

从同一品种的不同接种代数来看, 沈 135 和 78599-1 的诱导作用均未使 *Scd1* 基因表达量发生明显的改变(图 3)。Mo17 对于 *Scd1* 基因表达量的影响较大, 第四代时的表达量与 0 代相比, 有显著性下降($P < 0.05$), 而沈 135 和 78599-1 对于 *Scd1* 基因表达量的影响则不显著。而从不同寄主的相同代数来看, 除第四代时的变化较大, 有极显著差异外, 寄主对于 *Scd1* 基因表达的影响较小。可见 *Scd1* 基因 mRNA 的表达比较稳定, 不易受到抗性寄主等外界环境的影响。

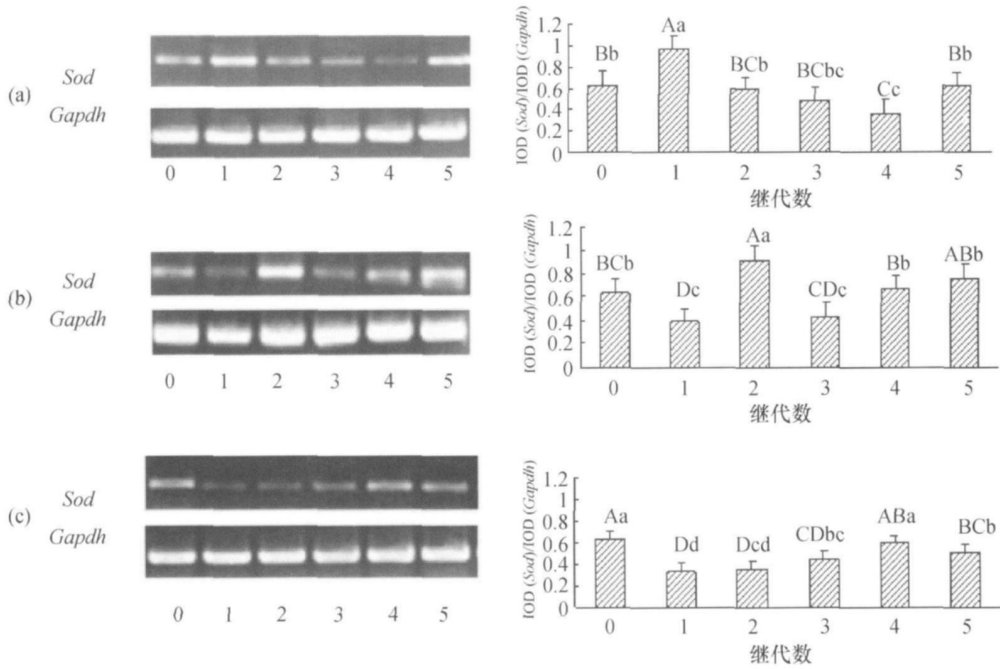


图 2 *Sod* 基因在不同世代中的表达

(a) WS18 在 Mo17 上继代接种；(b) WS18 在沈 135 上继代接种；(c) WS18 在 78599-1 上继代接种

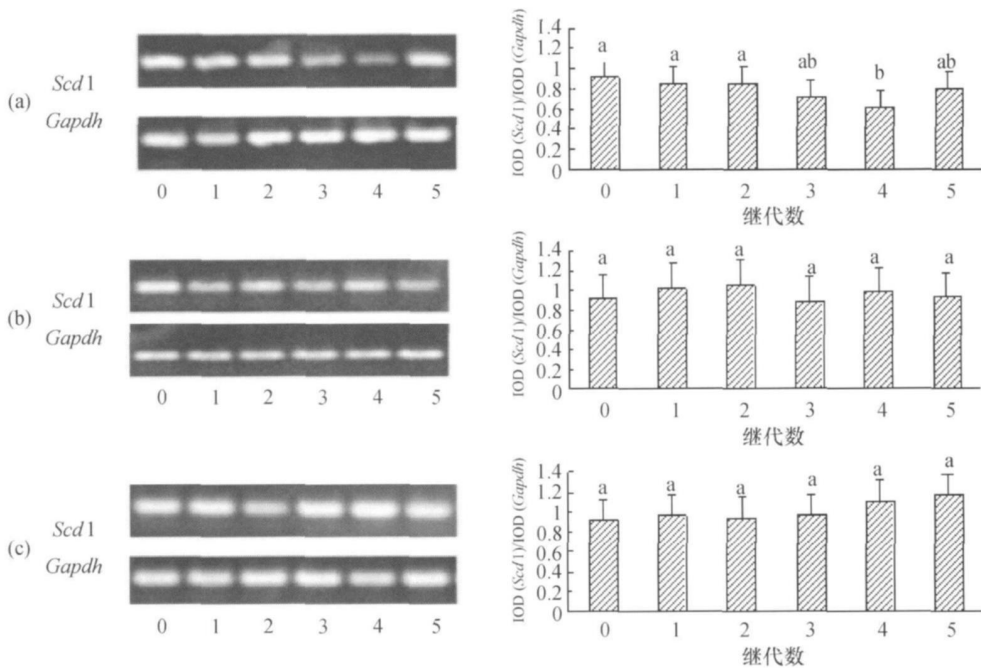


图 3 *Scd1* 基因在不同世代中的表达

(a) WS18 在 Mo17 上继代接种；(b) WS18 在沈 135 上继代接种；(c) WS18 在 78599-1 上继代接种

2.4 *Brn1* 基因表达量的变化

从同一品种的不同接种代数来看, *Brn1* 基因表达量受抗性寄主的影响不大(图 4). 沈 135 和 78599-1 两种抗性寄主对于 *Brn1* 基因表达量基本没有影响, 而 Mo17 的诱导作用, 使得 *Brn1* 基因的表达量从第三代起略有下降, 至第五代时与 0 代相

比有显著性差异($P < 0.05$). 而在同一世代时, 不同寄主对 *Brn1* 基因表达的影响很小. 从三种抗性寄主上分离所得的菌株, 同一世代时 *Brn1* 基因表达量的变化均未达到显著性差异. 因此 *Brn1* 基因在转录水平上变动较小, 并且不同自交系对其表达量的影响很小.

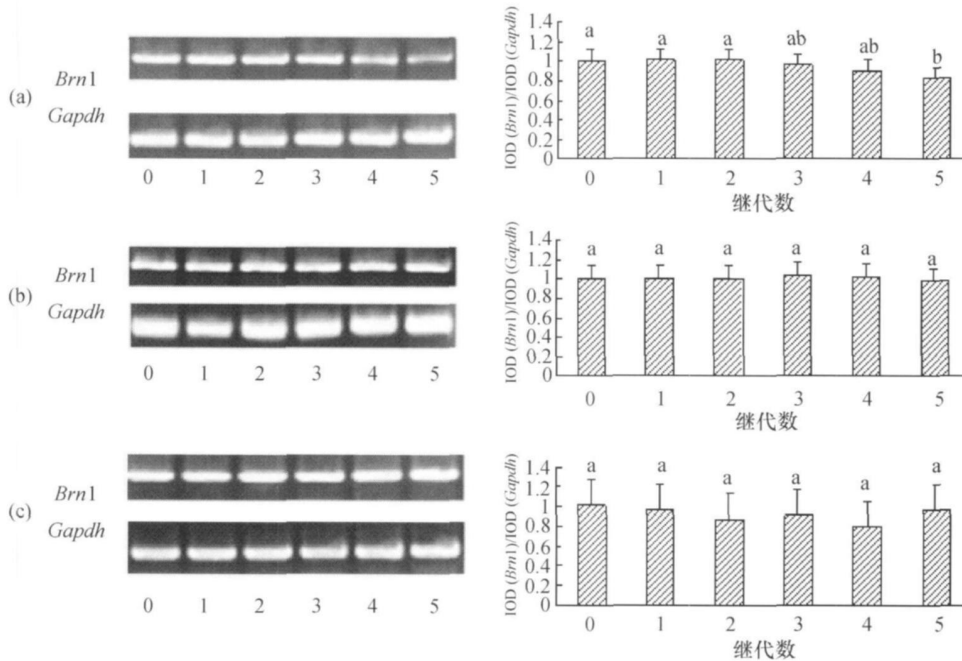


图 4 *Brn1* 基因在不同世代中的表达

(a) WS18 在 Mo17 上继代接种; (b) WS18 在沈 135 上继代接种; (c) WS18 在 78599-1 上继代接种

3 结论与讨论

从上述结果可以看到, 在同一世代菌株中 *Scd1* 与 *Brn1* 两种基因的表达量比较接近, 这可能与 *Scd1*, *Brn1* 基因都是 DHN-黑色素合成通路中的关键酶基因有关, Kimura 等研究发现在丝状真菌 *Alternaria alternata* 中, 这两个基因的同源基因在染色体上连锁^[13]; 同时这两种基因的表达量在继代前后并未发生极显著的变化, 推测这两种基因在自然界中可能并不容易发生突变, 更多时候是色素沉积部位发生改变, 譬如 *Alternaria alternata* 的孢子无色, 但菌丝亦产色素, 将其色素合成相关基因转入色素基因缺失的 *M. grisea* 突变体中却能够使突变体孢子恢复黑色, 重新拥有致病性^[13, 14].

而比较蛋白与基因的变化趋势可以发现, 抗性

自交系诱导后不同世代病菌的基因表达规律与蛋白质表达丰度的变化并不存在简单的对应关系. 翟雨红等^[7]研究表明玉米弯孢菌的弱致病性分化型 WS18 在抗性玉米自交系沈 135, Mo17 和 78599-1 上反复继代接种后, 菌株致病性会发生适应性变化, 即随着继代数的增加, 病情指数基本上与特异蛋白质点数量同步增加. 然而我们进一步研究发现对这些特异蛋白质点的表达丰度变化规律与相应的 mRNA 表达水平的变化不存在同步关系. 换言之, 抗性寄主诱导后病菌 SCD1, SOD, BRN1 蛋白的变化与它们各自在 mRNA 水平上变化不存在对应关系, 除 SOD 外, 其他两个蛋白的 mRNA 也没有表现出明显的时间动态.

导致上述结果的可能原因, 我们推测有以下 3 方面的原因: (1) 抗性寄主诱导下的病菌蛋白质与

mRNA 变化过程中均存在各种修饰、剪切和降解等各种复杂的作用, 因此两者不相关是非常正常的现象^[15, 16]。例如, 有人研究发现, 酵母的某些基因 mRNA 表达量相同, 蛋白表达量可能相差超过 10 倍, 而某些表达量相同的蛋白, 其 mRNA 表达量可以相差 30 倍以上^[17, 18]。(2) 差异蛋白点选择的不够多, 可能从蛋白和基因网络水平上寻找两者对应的关系会更为科学。一些蛋白合成后的定位, 或者蛋白的多点分布^[18], 会使得蛋白在胶上的位置发生改变, 而编码的基因表达量并未有大的变化。(3) 在抗性寄主选择压力下病菌致病力变化的早期反应可能仅是病菌适应抗性寄主的一种渐进变异的前兆反应, 或者是病菌发生明显遗传变异前的一种早期预警反应, 在这一时期病菌的致病性适应性变异的积累程度还未达到基因上可检测的水平, 需要较多世代微突变或微变异的累积。上述推论需要进一步在分子遗传学上进行印证。

参 考 文 献

- 李富华, 王玉涛, 潘开文. 玉米弯孢叶斑病研究现状、问题与展望. 植物保护, 2004, 30(6): 5—9
- Brown NF, Wickham ME, Coombes BK, et al. Crossing the line: Selection and evolution of virulence traits. PLoS Pathogens, 2006, 2(5): 346—353
- 孙国昌, 柴荣耀, 杜新法, 等. 水稻品种与稻瘟病菌群体互作的选择作用研究. 植物病理学报, 1999, 29(1): 45—49
- 龚国淑, 叶华智, 张敏, 等. 玉米新月弯孢菌 *Curvularia lunata* 的 RAPD 分析. 植物病理学报, 2005, 35(6): 22—27
- Coulthurst SJ, Lilley K, Salmon GPC, et al. Genetic and proteomic analysis of the role of *luxS* in the enteric phytopathogen *Erwinia carotovora*. Molecular Plant Pathology, 2006, 7(1): 31—45
- Wu Q, Jiang Z, Liao J, et al. Identification of genetic markers to distinguish the virulent and avirulent subspecies of *Pantoea stewartii* by comparative proteomics and genetic analysis. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 74(1): 186—193
- 翟羽红, 陈捷, 刘力行, 等. 寄主诱导下的玉米弯孢叶斑病菌致病性分化相关蛋白的动态变化研究. 植物病理学报, 2008, 38(2): 203—207
- Raychaudhuri S, Reddy MM, Rajkumar NR, et al. Cytosolic iron superoxide dismutase is a part of the triacylglycerol biosynthetic complex in oleaginous yeast. The Journal Of Biological Chemistry, 2003, 278: 587—594
- Frédalle E, Noël C, Viscogliosi E, et al. Manganese superoxide dismutase in pathogenic fungi: An issue with pathophysiological and phylogenetic involvements. FEMS Immunology & Medical Microbiology, 2005, 45: 411—422
- 曹志艳, 杨胜勇, 董金皋. 植物病原真菌黑色素与致病性关系的研究进展. 微生物学通报, 2006, 33(1): 154—158
- 曹志艳, 于清, 范永山. 玉米大斑病菌黑色素缺失突变体的获得及其生物学特性. 植物保护学报, 2007, 34(3): 268—272
- 白春艳, 孟和, 潘玉春. 单胺氧化酶 A 和 B 基因 mRNA 在仔猪各组织中的表达规律. 上海交通大学学报(农业科学版), 2005, 23(4): 348—352
- Kimura N, Tsuge T. Gene cluster involved in melanin biosynthesis of the filamentous fungus *Alternaria alternata*. Journal of Bacteriology, 1993, 175(14): 4427—4435
- Kawamura C, Moriwaki J, Kimura N. The melanin biosynthesis genes of *Alternaria alternata* can restore pathogenicity of the melanin-deficient mutants of *Magnaporthe grisea*. Molecular Plant-Microbe Interactions, 1997, 10(4): 446—453
- Anderson L, Seilhamer J. A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. Electrophoresis, 1997, 18: 533—537
- Griffin TJ, Gygi SP, Ideker T, et al. Complementary profiling of gene expression at transcriptome and proteome levels in *Saccharomyces cerevisiae*. Molecular & Cellular Proteomics, 2002, 1(4): 323—333
- Gygi SP, Rochon Y, Franza BR, et al. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. Molecular & Cellular Biology, 1999, 19(3): 1720—1730
- Futcher B, Latter GL, Monardo P, et al. A sampling of the yeast proteome. Molecular & Cellular Biology, 1999, 19(11): 7357—7368