

利用抑制性消减杂交技术分离草莓抗炭疽病相关基因

苗立祥¹, 张豫超¹, 杨肖芳¹, 张跃进¹, 王汉荣²,

吴延军¹, 张慧琴¹, 蒋桂华¹

(¹浙江省农业科学院园艺研究所, 杭州 310021; ²浙江省农业科学院植物保护与微生物研究所, 杭州 310021)

摘要: 利用抑制性消减杂交技术(suppression subtractive hybridization, SSH), 比较接种炭疽病菌与未接菌草莓之间的基因表达差异, 筛选抗草莓炭疽病菌的差异表达基因片段, 为草莓抗炭疽病遗传育种提供理论依据。分别提取接种草莓与未接种草莓叶片的总 RNA, 分离 mRNA, 逆转录成 cDNA, 利用 Rsa I 进行酶切, 然后以接种叶片酶切 cDNA 为试验方(tester), 以未接菌草莓叶片酶切 cDNA 为驱动方(driver), 构建了草莓抗炭疽病基因消减文库。菌落 PCR 结果表明, 插入片段大部分在 100~1000 bp 之间, 文库质量好。对文库中 1500 个阳性克隆进行测序, 共得到了 1377 个有效的 ESTs 序列。利用 NCBI 数据库进行 Blast 同源性比较发现, 这些 ESTs 可能与胁迫反应、信号转导、蛋白合成、蛋白相互作用、物质代谢、跨膜通道、转录因子、金属转运及未知或假定蛋白等有关, ESTs 序列的获得为后续草莓抗炭疽病相关基因的克隆、表达和转基因研究提供了参考。

关键词: 草莓; 抑制性消减杂交; 草莓炭疽病; cDNA 文库

中图分类号: S668.4

文献标志码: A

论文编号: 2010-3483

Isolation and Cloning of cDNA Induced by *Colletotrichum gloeosporioides* via Suppression Subtractive Hybridization in Strawberry

Miao Lixiang¹, Zhang Yuchao¹, Yang Xiaofang¹, Zhang Yuejian¹, Wang Hanrong²,

Wu Yanjun¹, Zhang Huiqin¹, Jiang Guihua¹

(¹Institute of Horticulture, Zhejiang Academy of Agricultural Science, Hangzhou 310021;

²Institute of Plant Protection and Microbiology, Zhejiang Academy of Agricultural Science, Hangzhou 310021)

Abstract: To uncover the mechanism of strawberry inoculated with *Colletotrichum gloeosporioides* and compare gene express difference of the treated and untreated leaves by using the suppression subtractive hybridization (SSH) so as to find the differential express related genes. The total RNA samples of strawberry leaves were prepared and mRNA samples were isolated. cDNA were synthesized and digested with Rsa I. One differential expressing cDNA library was constructed with the restriction enzymes cDNA of inoculated leaves as driver and the restriction enzymes cDNA of untreated as tester. PCR results suggested that the insertion segments were between 100 to 1000 bp and the library was suitable for the following work for isolation the full length of genes. 1500 clones were selected and sequenced, and 1377 unique ESTs were obtained. The ESTs were annotated by similarity to orthologs and paralogs detected with Blast in NCBI database. Some of the ESTs might be related closely with stress response, signal transduction, protein synthesis, protein-protein

基金项目: 浙江省自然科学基金“抑制消减杂交法分离草莓抗炭疽病致病菌 *C. gloeosporioides* 的候选基因”(Y3080471)和“草莓体细胞无性系变异调控研究”(Y3080175); 浙江省农科院科技创新能力提升工程“水果安全生产保障关键技术研究示范”(2009R05Y01D01); 浙江省优先主题“草莓育苗关键技术及高设栽培研究与示范”(2009C12073)。

第一作者简介: 苗立祥, 男, 1981 年出生, 助理研究员, 博士, 主要从事草莓瓜类遗传育种与生物技术研究。通信地址: 310021 浙江省杭州市石桥路 139 号 浙江省农业科学院园艺研究所, Tel: 0571-86419030, E-mail: mlx.123@163.com。

通讯作者: 蒋桂华, 男, 1964 年出生, 研究员, 主要从事草莓遗传育种与栽培技术研究。通信地址: 310021 浙江省杭州市石桥路 139 号 浙江省农业科学院园艺研究所, Tel: 0571-86417308, Email: jianggh@zaas.org。

收稿日期: 2010-12-01, **修回日期:** 2011-02-10。

interaction, metabolism, transmembrane, transcription factor, metal transporter or unknown. This study lays a foundation for the further study on isolation related genes in strawberry.

Key words: strawberry; suppression subtractive hybridization; *Fragaria ananassa colletotrichum*; cDNA library

0 引言

草莓是一种味道甘美的浆果类植物,有二倍体、四倍体、自然五倍体和八倍体等^[1],但现代草莓栽培品种均属于八倍体凤梨草莓(*Fragaria×ananassa*, $2n=8x=56$),是由2个八倍体草莓美洲种弗州草莓(*F. virginiana*)和智利草莓(*F. chiloensis*)偶然杂交得到的^[2]。近年来世界各国草莓种植业发展迅速,而各种病害的发生却制约了该产业的发展。草莓炭疽病(*Fragaria ananassa colletotrichum*)是草莓生产上的主要真菌病害之一,在南方草莓产区发生较为普遍^[3],近年来,随着主要栽培品种的变迁,该病的发生有上升趋势,给育苗带来了严重障碍。草莓炭疽病是半知菌类黑盘孢目黑盘孢科刺盘孢菌属(*Colletotrichum* spp.)真菌引起,目前已经明确的致病菌主要有3种,分别是胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)、光孢炭疽菌(*C. acutatum*)和草莓炭疽菌(*C. fragariae*)^[4],而在中国生产上以胶孢炭疽菌(*C. gloeosporioides*)为主^[5-7]。胶孢炭疽菌可危害植株的各个部位,而以嫩叶、短缩茎、匍匐茎和叶柄最易受害。草莓整个生长期均可受炭疽菌的危害,通常以育苗期^[8]、移栽成活期发病最重^[9]。不同草莓品种对炭疽病菌的抗性差异很大,其中‘红颊’最感病^[10]。

虽然国内外研究人员已经在病菌分离鉴定、发病规律、检测追踪、防治措施、栽培技术和分子标记等方面做了大量研究,取得了不菲的研究成果。然而,对草莓在受到炭疽病菌侵染后会诱导多少基因的表达、基因作用机制如何,还没有完全弄清楚。本试验利用SSH技术构建了草莓消减cDNA文库,旨在通过差异筛选消减文库获得炭疽病菌诱导的差异片段(expressed sequence tags, ESTs),为今后草莓抗炭疽病基因的克隆、表达分析、转基因研究及草莓分子辅助育种提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验时间、地点

研究田间试验于2009年6月在浙江省农业科学院园艺研究所花卉温室进行,室内试验在园艺所果树育种与遗传工程重点实验室进行。

1.2 试验材料

以经鉴定表现为抗炭疽病的草莓品种‘弗吉尼亚’(‘Virginia’)为试材,将种植于营养钵中的4叶1心的

草莓苗,分为2份:一份作为对照,另一份进行炭疽病菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)喷雾处理,接菌方法参照王丰等^[11]的方法。接种10天后采集草莓叶片,采后立即用液氮速冻,置于-70℃冰箱中保存备用。

1.3 试验方法

1.3.1 草莓叶片总RNA的提取与mRNA的分离 总RNA的提取用北京天恩泽基因科技有限公司的大提柱式植物RNAout试剂盒(CAT#80903-5),所提取的总RNA用Promega公司的PolyAtract® mRNA Isolation System III with Magnetic Stand试剂盒进行mRNA的分离。

1.3.2 cDNA第1链及第2链的合成 以分离的mRNA为模板,用AMV逆转录酶合成cDNA第1链,并立即合成第2链,具体参照Clontech PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit试剂盒说明书进行。合成好的cDNA第2链室温下分别用酚/氯仿/异戊醇和氯仿/异戊醇抽提一次,然后加入4 M NH₄OAc和95%的乙醇,立即在室温下高速离心,所得沉淀用80%乙醇洗涤1次,风干后用无菌水溶解。

1.3.3 消减cDNA文库的构建 利用抑制性消减杂交的方法构建cDNA文库,文库的构建方法参照Clontech PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit试剂盒说明书进行。以限制性核酸内切酶Rsa I在37℃消化等量的接种及对照草莓叶片cDNA并纯化和回收其产物,将接种叶片酶切cDNA作为试验方(tester),以未接菌草莓叶片酶切cDNA作为驱动方(driver),经过消减杂交和抑制性PCR,将正向消减产物与TaKaRa公司的pMD19-T载体在4℃连接过夜,热击转化到大肠杆菌DH5α感受态细胞,涂板,得到正向SSH文库。挑取培养于X-gal/IPTG/Amp琼脂平板上的白色菌落接种于液体LB/Amp培养基中,37℃培养过夜。

1.3.4 外源插入片段的检测 以消减杂交试剂盒提供的接头内侧巢式引物(Nested PCR primer 1: 5'-TCGAGC GGCCGCCCCGGGCAGGT-3'; Nested PCR primer 2R: 5'-AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT-3')进行PCR鉴定,PCR产物进行1.5%琼脂糖凝胶电泳。

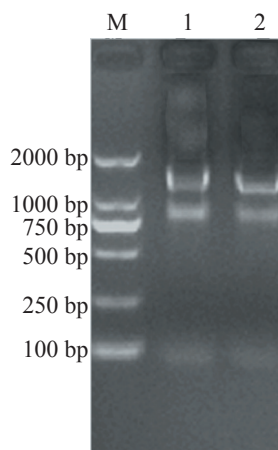
1.3.5 抑制性消减杂交产物的序列分析与同源性比较 随机挑取1500个阳性克隆送上海桑尼生物科技有限公司测序。测出的序列在经过切除载体和接头序列后在National Center for Biotechnology Information

(NCBI)核酸数据库网站进行检索序列比对。

2 结果与分析

2.1 草莓叶片总RNA的分离与检测

接种炭疽病菌草莓叶片与对照叶片总RNA的1%甲醛变性凝胶电泳检测表明,有明显的28 S和18 S 2条带,且28 S条带的亮度约是18 S条带亮度的2倍,2条带无弥散现象(图1)。说明所提取的RNA结构完整,未发生降解,RNA样品的紫外吸收值 A_{260}/A_{280} 均为2.0,满足文库构建的要求。



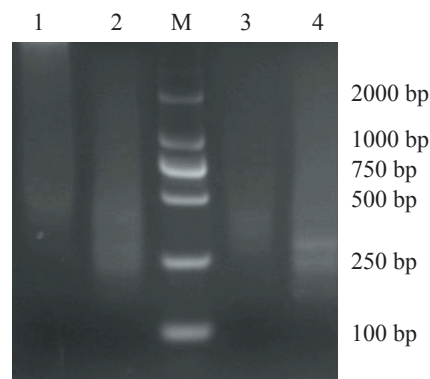
M: DNA Marker; 泳道1和2分别为接种和对照叶片总RNA

图1 草莓叶片总RNA的甲醛变性凝胶电泳

2.2 杂交后2次抑制性PCR对差异基因片段的扩增

差减效率是构建高质量消减杂交cDNA文库一个非常重要的指标。为了评价本次试验的消减杂交效

率,先用外侧共有引物进行第1次PCR扩增,然后再利用巢式引物进行第2次PCR扩增。由图2可以看出,消减杂交产物经过2轮的消减杂交和2次抑制PCR后,扩增出了弥散的条带,在第1次PCR后未见明显的特异性扩增条带,在第2次PCR后,消减杂交后的样品中出现了特异性明显的扩增条带。



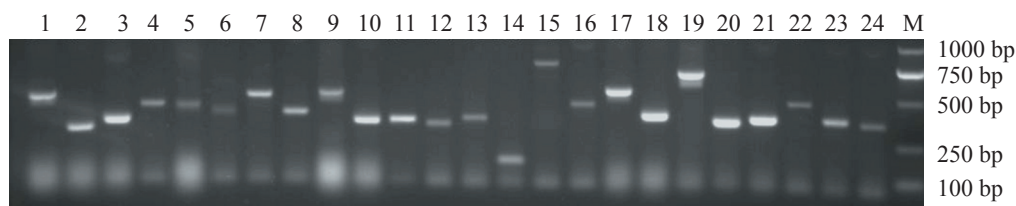
M: DNA marker; 泳道1和2分别为未消减杂交第1次及第2次PCR;

泳道3和4分别为消减杂交第1次及第2次PCR

图2 抑制消减杂交的2次PCR分析

2.3 转化阳性克隆PCR检测

将抑制性PCR第2次产物克隆到pMD19-T载体中,得到了2657个白色菌落,挑选其中的1800个菌落进行PCR检测,经扩增验证,筛选出1672个阳性克隆。插入片段的PCR扩增结果如图3所示,大部分片段的大小在100~1000 bp之间。



M: DNA marker; 1~24: 随机挑取克隆的PCR扩增片段

图3 消减文库部分克隆的PCR扩增结果

2.4 差异表达阳性克隆ESTs序列分析

挑选1500个阳性克隆进行测序,经序列比对分析,有123个序列为重复序列。测序结果表明,在所获得的ESTs中,文库插入片段多数集中在100~600 bp,最大片段为949 bp,最小仅13 bp。将1377个EST序列在NCBI数据库中进行Blast同源比较,所得结果按功能分为9大类:胁迫反应(678个ESTs)、信号转导(142个)、蛋白合成(19个)、蛋白相互作用(115个)、物质代谢(139个)、跨膜通道(36个)、转录因子(92个)、金属转运(2个)和未知或假定蛋白(154个)。其中胁迫反应(包括生物胁迫与非生物胁迫,如病菌侵染、水分胁迫、盐胁迫等)占49.24%,表明草莓在接种炭疽病菌后基因的表达与其他胁迫条件下基因的表达存在类似的机制。

3 结论

3.1 利用SSH技术分离草莓抗炭疽病相关基因

利用SSH技术分离了1377个草莓抗炭疽病相关基因差异表达片段,由于在文库构建过程中需要进行Rsa I限制性酶切,因此所得到文库插入片段比较小,多数集中在100~600 bp,最大片段为949 bp,最小仅

13 bp, 为了得到基因全长须利用 RACE 或同源基因克隆等技术进行基因分离。

3.2 抗炭疽病基因功能分析

将得到的差异表达基因片段测序后进行 Blast 分析发现, 这些基因按功能可以分为 9 大类, 其中 49.24% 的 ESTs 与胁迫反应有关。此外, 与其他作物在受到病菌侵染、干旱、温度等逆境胁迫下一样, 需要物质能量代谢、信号转导、转录因子等的共同参与。对这些基因的功能表达分析可以利用基因芯片和实时荧光定量 PCR 等技术来进行分析。

4 讨论

植物的抗病性通常由数量性状控制, 涉及复杂的生理生化过程, 因而, 对抗病性的研究需要选择能够对众多基因的表达进行研究的技术。抑制消减杂交技术是一种差减杂交技术, 用于分离 2 个 mRNA 群体间差异表达的基因片段。这种技术主要通过 2 轮消减杂交和 2 次抑制性 PCR, 可以选择性地扩增差异表达的目的 cDNA 片段, 抑制非目的片段的扩增, 使差异表达的基因得到有效富集, 富集程度高, 丰度相对一致。由于操作方便快捷、效率高、灵敏度高、假阳性低, 非常适合研究植物抗病性的技术。然而, SSH 技术也有缺点: (1)mRNA 需求量大, 一般需要几微克; (2)获得的 cDNA 片段一般较短, 要想获得全长序列就要用这些基因片段作为探针从 cDNA 文库中筛选出全长基因; (3)一次 SSH 反应只能比较 2 个 mRNA 池, 不适合研究多个材料或处理之间的差异, 要研究多个材料时只能混合成 2 个, 模糊了材料间细微差异。

SSH 技术已经在构建消减文库、分离基因上得到了广泛应用。Pimentel 等^[12]用 SSH 技术构建了 6 个文库研究了智利草莓 (*F. chiloensis*) 果实发育到成熟过程与果实软化相关的基因, 分离得到 1807 个基因, 其中 90% 的 EST 能与 NCBI 数据库中的序列比对上, 其主要功能可以分为蛋白相互作用、细胞转运、细胞壁相关蛋白以及信号转导等。谈安群等^[13]用 SSH 法构建了干旱胁迫下椪柑的消减文库, 得到的插入片段在 250~750 bp 之间, 将 EST 序列进行 Blast 比较发现, 50% 以上的序列与病菌侵染、水分胁迫、盐胁迫等生物与非生物过程相关。张宏等^[14]的研究结果也表明, 干旱处理诱导的基因表达序列与生物和非生物胁迫都有关, 主要涉及植物的信号传导、能量代谢、转录调控及防卫反应等。黄锦文等^[15]用 SSH 技术构建了高羊茅在低温处理下的正向差减 cDNA 文库, 挑选出 36 个低温处理下差异表达基因, 这些基因主要与植物信号转导、光合作用、糖代谢、物质运输以及抗逆性相关。Soto-Suarez 等^[16]用

SSH 技术研究了水稻白叶枯病菌和水稻条斑病细菌 2 个病菌的致病基因差异, 除了未知功能序列和假定蛋白外, 主要与 III 型分泌系统基因和其他一些致病基因相关。胡海燕等^[17]用 SSH 技术构建水稻-稻瘟菌非亲和/亲和互作消减 cDNA 文库, 共获得 25 个独立的差异表达 cDNA 克隆, 推测这些克隆可能参与了对病原菌的防卫反应、转录和蛋白合成与修饰等一些重要的生物学过程。吴金华等^[18]用 SSH 技术研究小麦抗白粉病的机制, 去除冗余和重复序列后得到了 94 条 ESTs, 其中 49 条与已知功能蛋白同源性较高, 主要涉及抗病与防御(包括生物胁迫与非生物胁迫)、能量代谢、细胞结构、蛋白质合成及加工、转运及信号转导等过程的相关蛋白。林凡云等用 SSH 技术构建小麦受赤霉病菌诱导表达的正向消减杂交文库, 所得 ESTs 序列进行蛋白序列同源性比对结果表明, 功能涉及能量代谢、物质代谢、病菌防御、转录及细胞结构等, 进一步的分析表明, 与抗病防御相关的 ESTs 功能主要涉及抗氧化、细胞解毒及相关物质的代谢^[19]。李星等^[20]为研究叶锈菌诱导小麦叶片的基因表达情况, 构建了叶锈菌诱导的小麦叶片 cDNA 文库, 一共得到了 3456 个阳性克隆, 比对结果表明, 已知功能的 ESTs 涉及植物的能量代谢、信号转导、转录调控及抗病防卫等多方面。这些研究结果都表明植物在胁迫反应中有明显的交叉适应性。

本试验用 SSH 技术分离草莓炭疽病相关差异表达基因, 成功构建了消减杂交文库, 得到了 1377 个差异片段, 将这些 ESTs 序列在 NCBI 数据库中进行 Blast 同源比较, 其中与胁迫反应相关的序列约占一半, 分离这些基因, 然后对草莓进行基因工程改造, 就有可能提高草莓的抗病性。然而, 植物的抗病性大多是由多基因控制的数量性状, 在受到病菌侵染后植株体内发生的生理生化过程是由多基因间相互协调作用的结果。本试验的比对结果也表明, 约一半的 ESTs 序列与信号转导、物质代谢、蛋白相互作用、跨膜通道、金属转运、蛋白合成等相关。说明草莓在受到炭疽病菌侵染后, 大量相关基因会协同表达, 有明显的交叉适应性。找到调控这些基因表达的转录因子, 对这些调控因子进行表达研究, 然后对草莓进行转基因研究, 就有可能比单纯的研究某一基因的效果更为有效。因此, 找到与草莓抗炭疽病相关基因表达的调控因子是后续工作的核心研究内容。

参考文献

- [1] 雷家军, 代汉萍, 谭昌华, 等. 中国草莓属 (*Fragaria*) 植物的分类研究 [J]. 园艺学报, 2006, 33(1): 1-5.

- [2] 王桂霞,张运涛,董静,等.中国草莓育种的回顾和展望[J].植物遗传资源学报,2008,9(2):272-276.
- [3] 姚红燕,张庆,张松柏.宁波地区草莓炭疽病菌株分离和生物学特性研究[J].浙江农业科学,2010(2):376-379.
- [4] Smith B J, Black L L. Morphological, cultural and pathogenic variation among *Colletotrichum* species isolated from strawberry [J]. Plant Disease, 1990,74(1):69-76.
- [5] Xie L, Zhang J Z, Wan Y, et al. Identification of *Colletotrichum* spp. isolated from strawberry in Zhejiang Province and Shanghai city, China[J]. Journal of Zhejiang University-Science B (Biomedicine&Biotechnology), 2010,11(1):61-70.
- [6] 叶正文,野口裕司.上海地区草莓炭疽病病原种类及品种抗性研究初报[J].上海农业学报,1997,13(2):75-80.
- [7] 张海英,张明会,刘志恒,等.草莓炭疽病病原鉴定及其生物学特性研究[J].沈阳农业大学学报,2007,38(3):317-321.
- [8] Sjulín T M. Special problems in nursery propagation of day-neutral strawberry cultivars susceptible to *Colletotrichum acutatum*[J]. Hortscience, 2008,43(1):78-80.
- [9] Curry K J, Abril M, Avant J B, et al. Strawberry anthracnose: histopathology of *Colletotrichum acutatum* and *C. fragariae*[J]. Phytopathology, 2002,92(10):1055-1063.
- [10] 韩国兴.杭州地区草莓炭疽病病原鉴定及防治研究[D].杭州:浙江大学,2009.
- [11] 王丰,马跃,高秀岩,等.草莓品种对炭疽病抗性的鉴定技术研究[J].果树学报,2008,25(4):542-547.
- [12] Pimentel P, Salvatierra A, Moya-Leon M A, et al. Isolation of genes differentially expressed during development and ripening of *Fragaria chiloensis* fruit by suppression subtractive hybridization[J]. Journal of Plant Physiology, 2010,167(14):1179-1187.
- [13] 谈安群,钟广炎,江东,等.用抑制性消减杂交法分离兴春椴柑干旱胁迫诱导表达的cDNA[J].湖南农业大学学报:自然科学版,2007,33(12):33-35.
- [14] 张宏,宋国琦,吉万全,等.小麦品种小偃22干旱诱导基因及其表达分析[J].农业生物技术学报,2009,17(4):670-676.
- [15] 黄锦文,骆娟,陈冬梅,等.低温胁迫下高羊茅抑制消减文库的构建与分析[J].中国生态农业学报,2009,17(6):1162-1167.
- [16] Soto-Suarez M, Gonzalez C, Piegú B, et al. Genomic comparison between *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, using suppression-subtractive hybridization[J]. FEMS Microbiol Lett, 2010,308(1):16-23.
- [17] 胡海燕,庄杰云,柴荣耀,等.水稻对不同小种稻瘟菌抗性差异表达基因的鉴定[J].中国水稻科学,2007,21(1):1-6.
- [18] 吴金华,胡银岗,张宏,等.小麦种质N9436抗白粉病的特异基因表达谱分析[J].作物学报,2008,34(7):1143-1152.
- [19] 林凡云,陆琼娴,徐剑宏,等.抑制差减杂交分离赤霉病菌诱导的小麦特异表达基因[J].西北植物学报,2008,28(3):433-439.
- [20] 李星,于秀梅,李亚宁,等.叶锈菌诱导的小麦叶片抑制差减杂交文库构建及其分析[J].中国农业科学,2008,41(12):4069-4076.