

## 拟南芥抗菌核病突变体 275-7 的初步研究

李丹<sup>1,2</sup>, 黄军艳<sup>2</sup>, 张学江<sup>2</sup>, 刘学群<sup>1</sup>, 覃瑞<sup>1</sup>, 刘胜毅<sup>2</sup>

(1. 中南民族大学生命科学院, 武汉 4300741; 2. 中国农业科学院  
油料作物研究所, 中国农业部油料作物生物学重点开放实验室, 武汉 430062)

**摘要:**草酸是核盘菌致病过程中产生的毒素因子。以菌核病菌毒素草酸(3 mmol/L)为筛选压,从 1 000 个拟南芥 T-DNA 插入突变体中筛选出了 1 个草酸不敏感突变体,命名为 275-7。通过拟南芥活体接种对突变体 275-7 进行菌核病抗性鉴定,与野生型相比,突变体 275-7 对菌核病的抗性显著增强( $P < 0.05$ );荧光定量 PCR 检测结果表明,275-7 中茉莉酸途径的标志基因 *PDF1.2* 的表达量是野生型的 12 倍,而水杨酸途径的标志基因 *PRI* 基因的表达量与野生型比较无差异。推测拟南芥突变体 275-7 可能通过增强水杨酸介导的防卫反应,从而表现出对菌核病的抗性。

**关键词:**拟南芥;突变体;菌核病;抗性;草酸

doi:10.3969/j.issn.1008-0864.2010.02.15

中图分类号:S432.4<sup>+</sup>4 文献标识码:A 文章编号:1008-0864(2010)02-0081-05

## Preliminary Studies on *Sclerotinia sclerotiorum* Resistant Mutant 275-7 of *Arabidopsis thaliana*

LI Dan<sup>1,2</sup>, HUANG Jun-yan<sup>2</sup>, ZHANG Xue-jiang<sup>2</sup>, LIU Xue-qun<sup>1</sup>,  
QIN Rui<sup>1</sup>, LIU Sheng-yi<sup>2</sup>

(1. College of Life Science, South Central University for Minority Nationalities, Wuhan 430074;  
2. Key Laboratory of Oil Crop Biology, Ministry of Agriculture; Oil Crops Research Institute,  
Chinese Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430062, China)

**Abstract:** Oxalic acid is a toxin produced when plant is attacked by *Sclerotinia sclerotiorum*. An oxalic acid insensitive mutant named 275-7 was screened from the T-DNA insertion mutant library of *Arabidopsis thaliana* (about 1 000 lines) using 1/2 MS with 3 mmol/L oxalic acid. *In vivo* leaf inoculation test was undertaken, in order to assess the resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* of mutant 275-7. The result indicated that mutant 275-7 exhibited a higher resistance to *S. sclerotiorum* than the wild type *Arabidopsis* ( $P < 0.05$ ). Fluorescence real-time quantitative PCR result showed that the expression of jasmonic acid (JA)-responsive marker gene *PDF1.2* in 275-7 were significantly up-regulated (12 fold) in comparison with the wild type plants, but the expression level of salicylic acid (SA)-responsive marker gene *PRI* was not significantly different from the wild type. This suggested that the enhanced resistance to *S. sclerotiorum* in mutant 275-7 might be mediated through JA signal pathway.

**Key words:** *Arabidopsis thaliana*; mutant; *Sclerotinia sclerotiorum*; resistance; oxalic acid

核盘病菌 [*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary] 是一种世界性分布的重要植物病原真菌,能引起油菜、大豆、向日葵和拟南芥等 75 个科 450 多种寄主植物发生菌核病<sup>[1]</sup>,该病是粮油作物、蔬菜等农作物上分布最广、为害最严重的病害之

一。迄今为止,在核盘菌寄主植物中还未发现免疫材料,使抗病育种面临严峻考验。虽然我国和世界其他国家均开展了抗菌核病基因工程研究,但由于转基因培育抗病品种受基因源的限制,尚无获得高抗品种的报道。

收稿日期:2010-02-01;修回日期:2010-03-01

基金项目:国家自然科学基金项目(30900934);国家 863 计划项目(2006AA10A112);公益性行业(农业)科研专项(3-21 油菜菌核病)资助。

作者简介:李丹,硕士研究生,研究方向为植物功能基因组学。E-mail:0703216lidan@163.com。通讯作者:刘胜毅,研究员,博士,主要从事植物抗病及分子生物学研究。Tel:027-86812896; E-mail:liusy@oilcrops.cn

拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 具有基因组小、形体小、生长周期短、繁殖系数高和自花授粉等优点<sup>[2]</sup>, 且基因组全序列已完成, 是研究植物与病原物相互作用的模式生物。通过创建拟南芥突变体库发掘重要的功能基因已成为功能基因组研究的一个重要内容和主要技术。目前利用拟南芥插入突变体已经克隆获得了大量与抗病、抗逆相关的功能基因, 开展了多种病原菌与拟南芥互作的分子机制的研究, 如拟南芥与霜霉病菌 (*Hyaloperonospora*)、拟南芥与白粉病菌 (*Erysiphe*)、拟南芥与灰霉病菌 (*Botrytis*) 等<sup>[3]</sup>。这些植物防御反应的主要分子机制涉及到水杨酸 (SA) 途径、茉莉酸 (JA)/乙烯 (ET) 途径和氧化爆发 (OB) 途径等<sup>[4,5]</sup>。

本研究以草酸 (oxalic acid) 为选择压, 从 1 000 个拟南芥 T-DNA 插入突变体筛选出抗菌核病突变体 275-7, 为进一步克隆抗病相关基因, 研究其抗菌核病分子机制提供基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 植物和真菌材料** 实验用野生型拟南芥生态型为 Col-0, 由本实验室保存。拟南芥突变体由中国科学院遗传与发育生物学研究所左建儒教授提供<sup>[6]</sup>, 此拟南芥突变体库为 T-DNA 插入突变体库, 筛选标记基因为卡那霉素抗性基因 *NPT II*。

核盘菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*) 菌核采自武汉大田油菜茎秆。

**1.1.2 主要试剂** 草酸溶于水配制成浓度为 126 mg/mL 的母液, 用 0.22 μm 滤膜抽滤后备用。TRIzol RNA 提取试剂购于 Invitrogen 公司; DNase I (RNase-free)、M-MLV 逆转录酶 (400 U) 和 RNase Inhibitor (50 U) 均购于 Promega 公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 突变体草酸筛选法** 筛选培养基为无  $Ca^{2+}$  的 1/2 MS 培养基 (即在大量元素中除去  $CaCl_2$ )。培养基灭菌并冷却到 50℃ 左右添加草酸 (终浓度为 3 mmol/L) 和卡那霉素 (终浓度为 50 mg/L)。将 1 000 个拟南芥 T-DNA 插入突变体株系消毒后播在含有 3 mmol/L 草酸和 50 mg/L 卡那霉素的无  $Ca^{2+}$  1/2 MS 培养基上。4℃ 春化

3 d, 然后置于 22℃, 16 h 光照, 8 h 黑暗条件下培养, 2 周后将存活的幼苗移栽到蛭石中。经 PCR 检测后, 阳性植株进行菌核病活体接种鉴定。

PCR 检测引物根据标记基因 *NPT II* 设计, 由上海英骏生物技术有限公司合成。引物序列为: 5'-GATGGATTGCACGCAGGT-3' 和 5'-TCAGAAG-AACTCGTCAAG-3', 扩增片断大小为 800 bp。

**1.2.2 菌核病菌活体接种** 选完好菌核, 消毒后接种到马铃薯培养基 (PDA 培养基) 上, 22℃ 恒温培养, 待菌丝长到培养皿边缘时用直径为 5 mm 的打孔器沿菌丝外缘打孔, 取菌丝块, 以菌丝块朝下方法接种于 Minimal 培养基<sup>[7]</sup> (NaOH 1.0 g/L, DL-苹果酸 3.0 g/L,  $NH_4NO_3$  2.0 g/L,  $MgSO_4 \times 7H_2O$  0.1 g/L, 细菌琼脂粉 39 g/L), 于 22℃ 培养至菌丝长到培养皿边缘时用于活体叶片接种。先用无菌水喷雾叶片表面, 用直径为 2.5 mm 打孔器沿菌丝外缘打孔, 取菌丝块, 以菌丝块朝下方法接种于叶片上, 接种位置为叶片中部稍稍偏离主脉的部位, 每叶只接种一个菌块。接种结束后将接菌的植株连盆移至一喷有水的塑料密封间, 以使其保湿。注意动作轻缓防止菌块滑落, 22℃ 保湿培养。

分别在接种后的 36 h、42 h、45 h、48 h 和 60 h 测量病斑大小 (长 × 宽), 实验结果用 SPSS 软件进行统计分析。

**1.2.3 荧光定量 PCR 检测** 用 TRIzol 试剂提取拟南芥突变体和野生型拟南芥 (Col-0) 幼嫩叶片 RNA, DNaseI 消化后按照 Promega 公司 AMV 反转录试剂盒说明进行逆转录反应, 得到的 cDNA 分装后于 -80℃ 保存备用。

荧光定量 PCR 实验使用 BIO-RAD 公司 IQ-5 实时荧光定量 PCR 仪, 方法参照 SYBR<sup>®</sup> Green Realtime PCR Master Mix-Plus 试剂盒 (Takara) 说明书。以拟南芥 *ACTIN2* (*At3g18780*) 作为内标基因, 检测基因 *PR1* (*At2g14610*) 和 *PDF1.2a* (*At5g44420*) 的相对表达量, 每组实验均完成 3 个生物学重复, 每个生物学重复至少做 3 次技术重复。

荧光定量 PCR 引物由上海英骏生物技术有限公司合成, 其序列详见表 1。

本实验以拟南芥 *ACTIN2* 作为内标基因, 采用比较 *Ct* 法 ( $\Delta\Delta Ct$ ) 计算目的基因 *PDF1.2a* 和 *PR-1* 的相对表达量, 即以野生型拟南芥 (Col-0)

表 1 荧光定量 PCR 引物及碱基组成  
Table 1 Oligonucleotide primers of Q-PCR.

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence	目的片段长度(bp) Product length(bp)	退火温度(°C) Annealing temperature(°C)
ACTIN2F	5'-CCCGCTATGTATGTCGCCA-3'	118	60
ACTIN2R	5'-AACCCTCGTAGATTGGCACAGT-3'		
PDF1.2aF	5'-CATCATCACCCCTTATCTTCGCCT-3'	97	60
PDF1.2aR	5'-CCCCTTGGCTTCTCGCA-3'		
PR1F	5'-TTCACAACCAGGCACGAGGA-3'	171	60
PR1R	5'-CGCCAGACAAGTCACCGCTA-3'		

样本为参照,将其值转换成 1,其他样品再与之比较,获得相对表达值。

## 2 结果与分析

### 2.1 毒素草酸筛选浓度的确定

为了确定草酸的筛选浓度,本研究中将野生型拟南芥种子消毒后播在含有不同浓度草酸(0, 1 mmol/L, 2 mmol/L, 3 mmol/L, 4 mmol/L 和 5 mmol/L)的无  $\text{Ca}^{2+}$  1/2 MS 培养基上,3 周后统计拟南芥苗的存活率和根长。每个处理约 100 粒种子,重复 3 次。

实验结果表明:低浓度(0~2 mmol/L)草酸对拟南芥存活影响较小,存活率为 85%~100%;草酸浓度为 3 mmol/L 时,存活率急剧降低;而草酸浓度 4~5 mmol/L 时,拟南芥全部死亡,3 mmol/L 是草酸影响种子萌发的一个重要拐点(图 1);随着草酸浓度的增加,拟南芥根的生长被显著抑制(图 2),在草酸浓度为 3 mmol/L 时仅有少数几株可以生根,且根短而粗,在 4 mmol/L 以及高于此浓度植株都没有根。

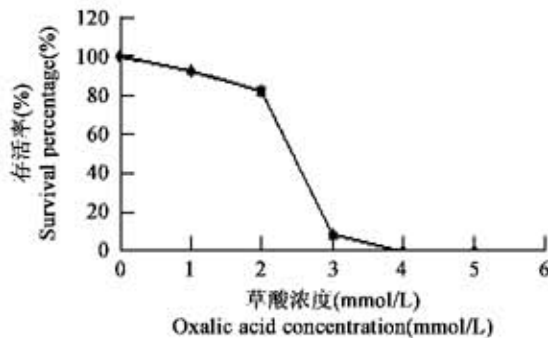


图 1 不同浓度草酸对野生型拟南芥存活率的影响  
Fig. 1 Effects of oxalic acid with different concentration on survival percentage of wild *Arabidopsis* seedlings.

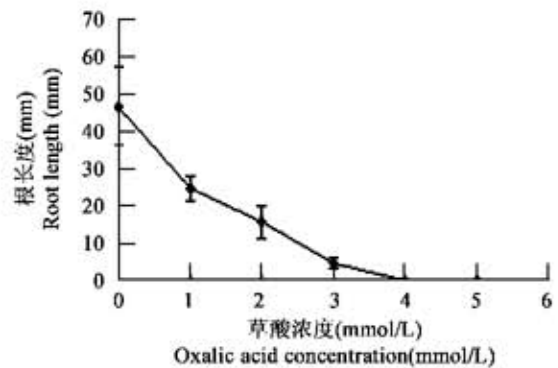


图 2 不同浓度的草酸对拟南芥根的影响

Fig. 2 Effects of oxalic acid with different concentration on root growth of wild *Arabidopsis* seedlings.

### 2.2 拟南芥突变体的草酸筛选

将 1 000 个拟南芥独立转化株系的种子( $T_3$ 代)在含有 3 mmol/L 的草酸和 50 mg/L 卡那霉素的无  $\text{Ca}^{2+}$  1/2 MS 培养基上进行筛选。结果显示:对照(野生型)全部死亡,只获得了 1 个对草酸不敏感的突变体株系,命名为 275-7(图 3)。对 275-7 株系的植株进行 PCR 筛选,结果表明:经过筛选后存活的 275-7 植株全为阳性植株(图 4)。

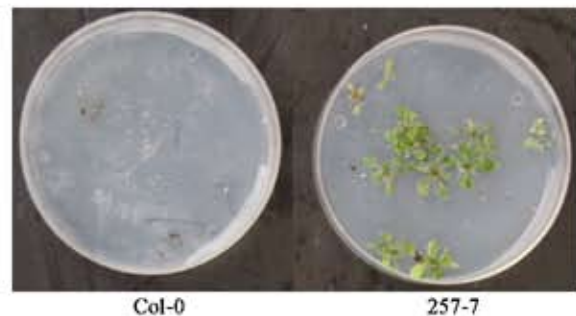


图 3 突变体 275-7 和野生型拟南芥在含有 3 mmol/L 草酸的 1/2MS 培养基上的生长情况

Fig. 3 Growth of mutant 275-7 and wild *Arabidopsis* on 1/2 MS medium with 3 mmol/L oxalic acid.

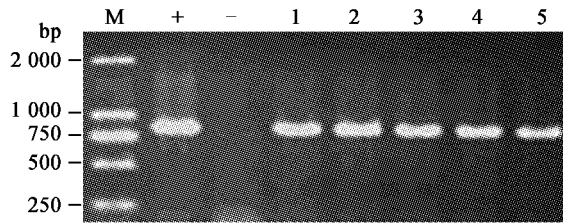


图4 拟南芥 275-7 突变体阳性苗的 PCR 鉴定结果

Fig. 4 PCR identification of *Arabidopsis* mutant

275-7 with *NPT II* primer.

注: M: DL2000 分子量标准; “+”: 阳性对照; “-”: 拟南芥野生植株, 作为阴性对照; 1~5: 突变体 275-7 植株草酸筛选后存活苗  
Notes: M: Marker DL2000; “+”: Positive control; “-”: *Arabidopsis* wild type as negative control; 1~5: Survival plants of *Arabidopsis* mutant 275-7 screened by oxalic acid.

### 2.3 275-7 植株抗菌核病鉴定

用菌核病菌活体接种法对突变体 275-7 存活植株及野生型对照进行接种鉴定, 分别于接种后 36 h、42 h、45 h、48 h 和 60 h 测量病斑大小, 并进行统计分析。结果显示: 突变体 275-7 比对照病斑面积小(图 5), 差异显著( $P < 0.05$ ), 表明 275-7 是一个菌核病抗性突变体。

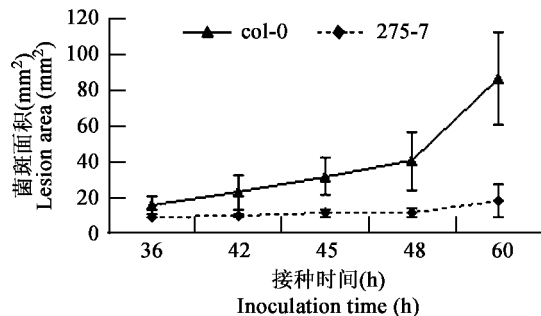


图5 拟南芥上菌核病菌病斑扩展情况

Fig. 5 Development of lesions caused by *S. clerotiorum* in leaves of *Arabidopsis*.

### 2.4 拟南芥突变体 275-7 中 *PR1* 和 *PDF1.2* 基因的表达

为了研究拟南芥突变体 275-7 中防卫途径标志基因的表达情况, 本研究利用实时定量 PCR 检测了茉莉酸途径标志基因 *PDF1.2* 和水杨酸途径标志基因 *PR-1* 的表达水平。结果表明: 拟南芥突变体 275-7 中 *PDF1.2* 基因的表达量是野生型的 12 倍, 而 *PR1* 基因的表达量与野生型比较基本无变化(图 6), 推测 275-7 可能增强水杨酸介导的防卫反应。

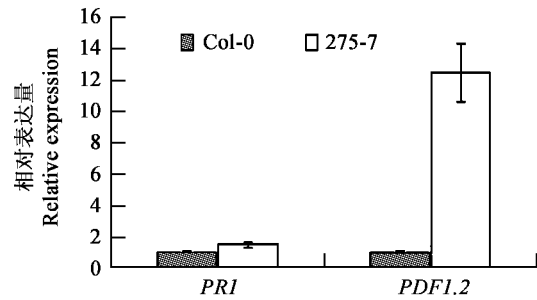


图6 荧光定量 PCR 检测拟南芥野生型 Col-0 及突变体 275-7 中 *PR1* 和 *PDF1.2* 的基因表达

Fig. 6 *PR1* and *PDF1.2* expression levels detected by real-time PCR in *Arabidopsis* wild type Col-0 and mutants 275-7.

## 3 讨论

草酸是核盘菌等多种真菌的致病因子。利用草酸筛选突变体已有若干报道, 如: 陈晓婷等<sup>[8]</sup>利用 1.2 mmol/L 草酸、高荣村等<sup>[9]</sup>用 2.0 mmol/L 草酸均筛选出拟南芥草酸不敏感突变体, 从而获得对菌核病具有抗(耐)性的突变体。不同的研究中草酸筛选浓度存在差异, 可能有以下原因: 其一, 草酸在高温下容易分解, 当草酸加入不同温度的培养基中时, 其浓度的变化将影响筛选突变体的最适草酸浓度; 其二, 草酸溶剂的不同也会影响筛选拟南芥突变体的适合草酸浓度, 例如用水和缓冲液做溶剂将会产生不同的草酸筛选浓度; 其三, 草酸加入方式的不同也会影响草酸的最终浓度, 一种方法是将草酸加入未凝固的培养基中混匀后铺平皿, 另一种方法是先铺平皿, 待培养基中培养基凝固后涂抹一定浓度的草酸。本研究用水溶解草酸, 培养基冷却到 50℃ 左右加入草酸, 让草酸和培养基完全混匀, 同时减少了高温对草酸的影响。用上述方法本研究获得了 1 株对草酸具有抗性的材料, 且表现出对菌核病的显著抗性。

为了进一步研究拟南芥突变体 275-7 可能的抗病反应机制, 本研究检测了突变体中茉莉酸途径标志基因 *PDF1.2* 和水杨酸途径标志基因 *PR-1* 的表达水平。研究表明: *PR1* 的表达与野生型拟南芥比较无明显变化, 而 *PDF1.2* 基因的表达量是野生型对照的 12 倍。因此推测, 该突变体的插

入位点可能位于茉莉酸途径上游,阻断了茉莉酸抗病信号途径,该位点是茉莉酸途径的负调控因子。突变体 275-7 的插入位点分析及抗病相关基因的克隆正在进行中。

#### 参 考 文 献

- [1] Boland G J, Webster S J, Walker L. Index of hosts of *Sclerotinia sclerotiorum* [J]. Can. J. Plant Pathol., 1994, 16: 93 - 108.
- [2] Weigel D, Glazebrook J. *Arabidopsis: a laboratory manual* [M]. New York: Cold Spring Harbor, 2002.
- [3] Glazebrook J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens [J]. Annu. Rev. Phytopathol., 2005, 43: 205 - 27.
- [4] Durrant W E, Dong X. Systemic acquired resistance [J]. Annu. Rev. Phytopathol., 2004, 42: 185 - 209.
- [5] Katagiri F. A global view of defense gene expression regulation - a highly interconnected signaling network [J]. Curr. Opin. Plant Biol., 2004, 7: 506 - 511.
- [6] Zhang J, Xu J X, Kong Y Z, et al.. Generation of chemical-inducible activation tagging T-DNA insertion lines of *Arabidopsis thaliana* [J]. Acta Genetica Sinica, 2005, 32(10): 1082 - 1088.
- [7] Guo X M, Stotz H U. Defense against sclerotinia sclerotiorum in *Arabidopsis* is dependent on jasmonic acid, salicylic acid, and ethylene signaling [J]. MPMI, 2007, 20(11): 1384 - 1395.
- [8] 陈晓婷, 陈芳芳, 陈立群, 等. 拟南芥草酸不敏感突变体的筛选与分析 [J]. 生物工程学报, 2008, 24(2): 203 - 208.
- [9] 高荣村, 董彩华, 胡胜武, 等. 拟南芥抗菌核病突变体的筛选 [J]. 中国油料作物学报, 2006, 28(4): 388 - 391.

#### 【863 课题介绍】

**课题名称:**油菜抗菌核病和抗逆相关基因的克隆与功能分析

**课题编号:**2006AA10A112

#### 课题目标、内容:

本项目由中国农业科学院油料作物研究所刘胜毅研究员主持,参加单位包括华中农业大学、湖南农业大学、中国科学院遗传与发育研究所和江苏省农业科学院经济作物研究所。

本项目主要通过功能基因组和比较基因组学等方法克隆油菜抗菌核病、磷高效、抗倒基因并研究这些基因的功能,获得有应用价值的功能基因。

#### 课题进展:

目前已克隆了 40 多个抗病相关的功能基因,初步明确了 6 个有重要潜在利用价值;获得了 5 个响应低磷特异的 QTL 区间的分子标记并克隆了相应的基因;克隆并功能验证了甘蓝型油菜矮秆突变体 *ds-1* 的矮秆基因 *BnRGA-ds*。本项目已发表高质量研究论文 14 篇,其中 SCI 影响因子大于 3 的论文 6 篇。获得授权专利 1 项,申请专利 7 项。