

黄萎病菌诱导下陆地棉抗病品种 SSH 文库的 EST 分析

张纯颖,王省芬,张桂寅,吴立强,迟吉娜,李志坤,马峙英*

(河北省作物种质资源重点实验室/河北农业大学,河北保定 071001)

摘要:对已构建的黄萎病菌诱导下陆地棉抗病品种冀棉 20 SSH 文库的 800 个阳性克隆进行了检测和筛选,将插入片段大于 400 bp 的克隆测序,获得非重复克隆的 EST 序列 203 条。通过同源比对和序列相似性分析,共有 170 条 ESTs 与已知基因同源。将获得的 ESTs 按比对推测的功能进行分类,主要包括代谢、防御、胁迫、信号转导、核糖体蛋白、细胞结构、细胞发育、能量、渗透调节以及蛋白质合成与分解等 10 类。功能未知的 ESTs 也占有不小比例,达 16.26%。共发现 66 条与抗病相关的 ESTs,约占全部 ESTs 的 33%。这些与抗病相关的同源序列涉及到与防御、次生代谢、胁迫及信号转导有关的基因,表明当黄萎病菌侵染棉花后,植物体内发生了一系列的反应,抗黄萎病是一个多途径作用的复杂过程。

关键词:棉花;黄萎病;SSH 文库;EST

中图分类号:S435.621 **文献标识码:**A

文章编号:1002-7807(2010)01-0017-06

ESTs Analysis of Suppression Subtractive Hybridization Library from Upland Cotton Resistant Cultivar Infected by *Verticillium dahliae*

ZHANG Chun-ying, WANG Xing-fen, ZHANG Gui-yin, WU Li-qiang, CHI Ji-na, LI Zhi-kun, MA Zhi-ying*

(Key Laboratory of Crop Germplasm Resources of Hebei/ Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071001, China)

Abstract: In the study, we screened the suppression subtractive hybridization (SSH) library of resistant upland cotton cultivar, named Jimian20 infected by *Verticillium dahliae*. More than 400 bp fragments were selected and sequenced from 800 positive clones. The results showed that 203 ESTs were unique. ESTs similarity analysis indicated that 170 ESTs were homologous to the known genes. According to the function of putative proteins, these homologous sequences were related to ten kinds of roles as reported, including metabolism, defense, stress, signal transduction, ribosomal protein, cell structures, cell development, energy, osmotic adjustment, protein synthesis and decomposition and so on. ESTs of unknown function were also a large proportion, accounting for 16.26%. Sixty-six ESTs were related to disease-resistance genes, accounting for 33% of all ESTs. Most of them had high similarity to the defense, secondary metabolites, stress and signal transduction. The above results would be helpful to understand the molecular mechanisms of *Verticillium* resistance in cotton.

Key words: cotton; *Verticillium* wilt; SSH library; EST

黄萎病(*Verticillium wilt*)是棉花生产上危害最严重的病害之一,严重影响着棉花的高产、稳产和优质。对棉花抗黄萎病的生理生化机制研究表明,抗病品种维管束的薄壁组织在病原菌侵染时得到加强^[1],一些凝胶、树胶、侵填体对病原菌的包围及对导管的封闭抑制了病原菌在维管束中的扩展。此外,植物还通过抗毒物质的合成和

积累、抗病相关酶活性的表达变化以及相应抗病蛋白的产生来抵抗病原菌的侵染。

随着生物技术的发展,一些抗病相关基因被克隆,研究者开始从抗病基因的相互作用关系入手来研究植物的抗病机制。如 3-羟基-3-甲基谷氨酰 CoA 还原酶基因受大丽轮枝菌诱导在抗性品种中表达的速度明显快于感病品种^[2];PGIP 基

收稿日期:2009-03-19

作者简介:张纯颖(1983-),女,硕士研究生;*通信作者,mzhy@hebau.edu.cn

基金项目:国家自然科学基金(30871562),河北省自然科学基金重大项目(C2006001034)和河北省科学技术厅重点项目(08965508D)

因能够抑制大丽轮枝菌多聚半乳糖醛酸酶的活性^[3];棉花抗病品种中获得的分属Ⅲ型和Ⅳ型的两个几丁质酶基因与病菌诱导相关,并在病原菌诱导后表达量明显增加^[4];还有一些对棉花类LRR抗病蛋白的研究^[5]等。棉花受黄萎病菌侵染后,一些防御反应被激活并瞬时发生变化,植物本身通过有关抗病基因的表达以抵御病原菌的入侵,而每一类基因都可能与棉花的抗病性相关。所以这些基因的克隆对从分子水平上探索棉花黄萎病的抗性机制,进而了解植物抗病的分子机制具有重要意义。但由于基因数量有限,部分基因在黄萎病菌诱导表达中的具体作用还不清楚,所以深入了解棉花的抗黄萎病机制,还需要大量的基因信息的积累。

本研究以黄萎病菌诱导下陆地棉品种冀棉20的差减文库为材料,对文库克隆进行筛选并测序,获得大量EST序列并对之分析,旨在了解这些基因的结构特点和相互关系,为进一步克隆抗黄萎病相关基因以及更深入地了解棉花抗黄萎病的分子机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 供试材料

以黄萎病菌诱导下陆地棉抗病品种冀棉20的差减文库为材料,由河北农业大学棉花遗传育种研究室提供。

1.2 实验方法

1.2.1 插入片段大小检测。从384孔板中依次吸取保存的阳性克隆甘油菌1~2 μL于3~5 mL LB液体培养基中,37℃,180 r·min⁻¹振荡培养过夜,



M: DNA 分子量标准 DL2000。

图1 PCR 扩增检测插入片段大小
(包括100 bp的载体序列)

Fig. 1 Insert size checked by PCR amplification
(including 100 bp vector sequence)

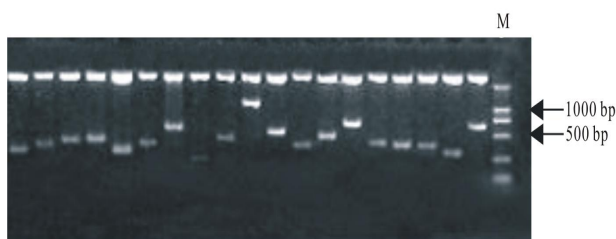
至菌液摇浑浊,采用SDS碱裂解法提取质粒。由于SSH文库所用克隆载体为pGEM-T载体,其上有T7、SP6通用引物序列及EcoRI酶切位点,因此采用PCR和酶切双重检测插入片段大小。取提取的质粒1 μL用通用引物T7、SP6进行PCR扩增插入片段;取提取的质粒5 μL使用EcoRI 37℃水浴酶切,用1.0%琼脂糖凝胶电泳检测插入片段的大小。

1.2.2 EST片段测序和序列分析。将插入片段大于400 bp的克隆送往上海生工生物工程技术有限公司进行测序,测序结果用DNASTar软件的SeqMan去除载体,将去载体后序列与GenBank的蛋白数据库和核酸数据库比对,进行序列同源性比较。判定标准参照水稻^[6]、拟南芥^[7]的EST研究,以BLASTx结果一致性大于40%,分值大于80;BLASTn结果一致性大于50%,分值大于80为依据进行筛选和功能注释。

2 结果与分析

2.1 棉花差减文库插入片段大小检测与EST测序

对已构建的黄萎病菌诱导下冀棉20差减文库中800个克隆进行筛选,为排除假阳性克隆和双克隆的干扰,依次对每一个阳性克隆提取质粒进行PCR扩增(图1)与酶切(图2)双重检测。将插入片段大于400 bp的克隆送往上海生工工程有限公司测序。通过检测插入片段大小、测序,本研究共得到237条序列,其中非重复克隆的序列数为203条。测序所得EST长度与酶切检测结果一致。



M: DNA 分子量标准 DL2000。

图2 酶切检测插入片段大小

Fig. 2 Insert size checked by restriction enzyme
cleavage

2.2 序列比对与功能分析

将测序结果去载体后,通过 NCBI 对 203 条序列进行 BLASTn 和 BLASTx 比对,结果有 170 条 ESTs 与已知基因同源。其中 BLASTn 比对结果中,功能已知的有 98 条,占全部 ESTs 的 48.3%;BLASTx 比对结果中功能已知的有 160 条,占全部 ESTs 的 78.8%;功能未知的 ESTs 有 33 条。

按照 Bevan 等^[8]的植物基因功能分类标准,进行有关的生物信息学分析,对得到的 203 条序列按比对推测的功能进行分类(图 3)。其中与代谢途径相关的 EST 序列占 31.03%,与防御相关的序列占 3.94%,与胁迫、信号转导有关的 EST 序列均为 15 条,各占 7.39%,核糖体蛋白占 6.90%,与细胞结构有关的序列占 2.96%,有 9 条 EST 与细胞发育有关,占 4.43%,与转运、转录相关的序列所占比例分别为 1.97%、3.45%。另外,还有部分 ESTs 和能量、蛋白质合成与分解、渗透调节以及多种调控基因高度同源,占 14.29%。功能未知的 ESTs 仍占有不小比例,达到 16.26%。

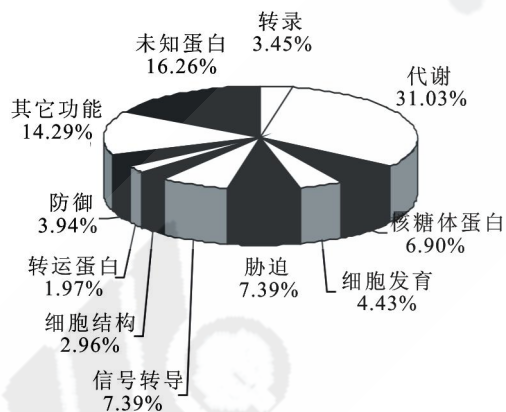


图 3 全部 ESTs 比对功能所占百分比

Fig.3 The percentage of functions about all of ESTs

在 203 条序列中,发现 66 条 EST 序列与抗病相关,主要集中在与防御、次生代谢物质合成、胁迫、信号转导相关四个方面(表 1)。在与抗病相关的 66 条 EST 序列中,35 条 ESTs 和次生代谢合成有关。次生代谢物质能降解植物体内由于受到外界胁迫所产生的有毒物质,抵御病原菌的入侵。木质素作为一种次生代谢物质,在植物的生长发育和抗性方面具有重要的生物学功能。咖啡酰辅酶 A 甲基转移酶(P22)、咖啡酸 -O- 甲基转移

酶(O1)、漆酶(A7)^[9],与参与调控木质素的生物合成有关。I4 与 3-脱氧-D-阿拉伯庚酮-7-磷酸合成酶(3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase, DAHPS)同源,DAHPS 也是合成木质素的关键酶类,已有研究证明 DAHPS 基因在生物和非生物胁迫下该酶的表达量都有增加^[10-11]。B19、D24、E17 和 H18 是与细胞色素 P450 同源的序列,细胞色素 P450 是一类参与植物防卫反应并抑制有致病作用的微生物生长的抗菌物质,基于基因结构和功能的多样性,来响应植物的抗病性反应^[12]。与细胞色素 P450 同源的序列与已知基因的同源性有些较高,有些较低,并在诱导的文库中多次出现,很可能是这类基因在受黄萎病菌诱导后大量表达,推测可能和黄萎病菌诱导相关。除了参与调控木质素生物合成的 4 条序列及与细胞色素 P450 基因同源的 4 条序列外,与次生代谢合成同源的 EST 还涉及与编码乙醇脱氢酶、苯醌还原酶、3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶、尿酸盐氧化酶,以及参与莽草酸途径、甲羟戊酸途径的酶类、ABC 转运蛋白等同源的序列。

除和次生代谢合成有关的 EST 外,其次是与胁迫反应、信号转导相关的 ESTs,如参与胁迫反应的广泛胁迫蛋白、热激蛋白、棉花的线虫诱导蛋白、Al-诱导蛋白、胚胎发育晚期丰富蛋白、谷胱甘肽 S 转移酶等;信号转导途径的相关蛋白,如丝氨酸/苏氨酸激酶、14-3-3 蛋白、非共生血红素蛋白、参与乙烯信号转导途径的乙烯诱导相关转录因子、ACC 氧化酶等。这些基因或许和其它基因协同作用,共同行使植物抵御病原物的入侵功能。

此外,还有一些与编码病程相关蛋白(Pathogenesis-related protein, PR 蛋白)基因同源的 ESTs,当植物受到病原菌感染或遭受病虫害时,在病原体刺激下植物体内都会伴有 PR 蛋白的累积,几乎每种 PR 蛋白都具有体外抑制病菌生长的作用,如 β -1,3 葡聚糖酶(N2)和 PR10(G16)。另外,还有与病程相关蛋白 Bet v I 家族同源的序列 M23,与半胱氨酸蛋白酶抑制剂同源的序列 F21 等。

表 1 部分抗病相关 ESTs 的比对结果

Table 1 The blast results of partial ESTs related with disease resistance

蛋白类别	样品代号	比对	分值	配准长度比	配准的同源基因	
次级代谢物质	P22	blastx	347	164/177(92%)	咖啡酰辅酶 A 甲基转移酶	
合成相关蛋白	O1	blastx	177	81/126(64%)	咖啡酸 -O- 甲基转移酶	
	A7	blastx	348	83/101(82%)	漆酶	
	I4	blastn	462	449/521(86%)	3- 脱氧 -D- 阿拉伯庚酮 -7- 磷酸合成酶	
	E17	blastx	186	86/162(53%)	E 级细胞色素 P450, 第一组	
	H18	blastx	202	90/132(68%)	细胞色素 P450	
	H10	blastn	218	209/242(86%)	3- 羟 -3- 甲基戊二酰辅酶 A 合成酶	
	G19	blastx	305	152/226(67%)	甲羟戊酸激酶	
	B17	blastx	118	55/82(67%)	短链脱氢酶 / 还原酶 1	
	C13	blastx	305	149/206 (72%)	丙烯醇脱氢酶	
	H4	blastx	330	55/82(67%)	短链脱氢酶	
	H7	blastn	139	271/338(80%)	假定醌氧化还原酶	
	E1	blastn	283	290/339(85%)	假定醌还原酶	
	P12	blastn	147	209/254(82%)	尿酸氧化酶	
	P18	blastx	183	79/100(79%)	ABC 转运蛋白	
	胁迫相关蛋白	B15	blastn	669	378/386(97%)	广泛胁迫蛋白家族
		P1	blastx	97.1	54/97(55%)	胚胎发育晚期丰富蛋白
M16		blastx	316	148/179(82%)	衰老相关半胱氨酸蛋白酶	
G7		blastx	121	55/103(53%)	谷胱甘肽 -S- 转移酶	
B23		blastn	180	98/99(98%)	A1- 诱导蛋白	
H21		blastx	226	121/160(75%)	病原诱导蛋白 2-4	
I3		blastn	680	382/395(96%)	根结线虫诱导蛋白	
信号转导相关蛋白	P6	blastn	579	298/300(99%)	非共生血红素蛋白	
	F1	blastx	266	128/140(91%)	乙烯诱导相关转录因子	
	F7	blastx	254	141/141(100%)	ACC 氧化酶	
	L23	blastn	270	319/380(83%)	14-3-3 蛋白	
防御相关蛋白	G16	blastn	369	225/238(94%)	PR10 蛋白	
	N2	blastx	338	169/242(69%)	β -1,3 葡聚糖酶	
	M23	blastx	171	84/120(71%)	病程相关蛋白 Bet v I 家族	
	E20	blastx	99.4	47/71(66%)	胁迫病程相关蛋白	
	F21	blastx	270	133/188(70%)	半胱氨酸蛋白酶抑制剂	

3 结论和讨论

本文通过对黄萎病菌诱导下冀棉 20 SSH 文库进行分析, 得到非重复克隆的序列 203 条, 其中有 170 条 ESTs 与已知基因同源, 占全部 ESTs 的 84%。生物信息学分析, 发现 203 条序列的比对结果中, 涉及到多种生物过程, 包括防御、胁迫、信号转导、核糖体蛋白、细胞结构、细胞发育、转运、转录、能量、蛋白质合成与分解、渗透调节以及多种调控基因相关的其它功能等。其中发现

与抗病作用相关的序列 66 条, 约占全部 ESTs 的 33%, 主要表现在与防御、次级代谢物质合成、胁迫和信号转导相关四个方面, 综合显示棉花抗黄萎病是个多种途径作用的复杂机制。

棉花在黄萎病菌诱导条件下所获得的抗病 ESTs 中, 如与病程相关蛋白、亲环素类蛋白等同源的序列, 其编码的产物也已证实与病菌诱导相关。PR10 蛋白属于病程相关蛋白, 在本 SSH 文库及棉花受枯萎病菌感染后均有 PR10 基因的发现^[13]。朱付龙等^[14]从海岛棉中分离得到棉花 PR10

基因相关的 10 条序列,其中包括了中棉和陆地棉对黄萎病抗病性反应相关的一系列同源但有差异的蛋白。A12 号序列经比对与马铃薯的亲环素类蛋白基因高度同源。研究显示,当植物暴露在低温、干旱、脱落酸及伤害条件下,亲环素类蛋白基因的 mRNA 量是显著增加的,并推测该基因在植物防御的多个方面起作用^[5]。已知功能的同源基因还涉及到信号转导途径,信号转导在棉花对黄萎病的抗性中有着重要作用。F1 号序列与乙烯诱导相关转录因子同源,其基因的启动子区 GCCbox 是细胞信号转录因子结合区,它们通过与抗病基因的顺式作用元件结合来调控抗病基因的表达^[6]。

对 ESTs 分析发现,一些基因往往共同参与多种生物途径以响应抗病反应。细胞色素 P450 在催化植素以及信号分子的合成等方面与病原菌诱导相关^[2]。研究报道在细极链格孢菌蛋白激发子诱导下,棉花细胞中产生多种防御蛋白,显示了它对诱导的交叉适应性^[7]。这说明植物对外界环境胁迫的防御机制是不同途径、不同水平交叉重叠组成。正是由于抗病机制的复杂性,加上未比对上的序列也存在一定的比例,对未知蛋白的了解还甚少,尚未发掘出未知蛋白中可能含有的大量信息。因此,要想充分了解黄萎病菌感染下棉花抗病机制的启动,还有待于结合其它试验方法来证明 EST 在代谢中的作用。目前本实验室正在构建不同棉花品种受黄萎病菌诱导的 cDNA 文库,为以后获取更多的与抗病相关的 EST 信息和抗病基因的克隆奠定基础,以便于从分子水平深入、全面地探索棉花抗黄萎病机制。

参考文献:

- [1] DAAYF F, Nicole M, Boher B, et al. Early vascular defense reactions of cotton roots infected with a defoliating mutant strain of *Verticillium dahliae* [J]. *European Journal of Plant Pathology*, 1997, 103 (2): 125-136.
- [2] JOOST O, Bianchini G, Bell A A, et al. Differential induction of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase in two cotton species following inoculation with *Verticillium*[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1995, 8(6): 880-885.
- [3] JAMES J T, Dubery I A. Inhibition of polygalacturonase from *Verticillium dahliae* by a polygalacturonase inhibiting protein from cotton[J]. *Phytochemistry*, 2001, 57 (2): 149-156.
- [4] 杨郁文,张保龙,倪万潮,等.两个棉花几丁质酶基因的克隆与表达分析[J]. *棉花学报*,2008,20 (2):88-93.
YANG Yu-wen, Zhang Bao-long, Ni Wan-chao, et al. Molecular cloning and expression analysis of two chitinase in upland cotton[J]. *Cotton Science*, 2008, 20 (2): 88-93.
- [5] 肖月华,罗明,侯磊,等.棉花类 LRR 抗病蛋白 (*GhLRR-RL*)基因的克隆及表达分析[J]. *遗传学报*,2002,29 (7):565-570.
XIAO Yue-hua, Luo Ming, Hou Lei, et al. Cloning and characterization of a LRR resistance like (*GhLRR-RL*) protein gene from cotton (*Gossypium hirsutum* L.)[J]. *Acta Genetica Sinica*, 2002, 29 (7): 565-570.
- [6] YAMAMOTO K, Sasaki T. Large-scale EST sequencing in rice [J]. *Plant Molecular Biology*, 1997, 35: 135-144.
- [7] HOFTE H, Desprez T, Amselen J, et al. An inventory of 1152 expressed sequence tags obtained by partial sequencing of cDNAs from *Arabidopsis thaliana* [J]. *The Plant Journal*, 1993, 4 (6): 1051-1061.
- [8] BEVAN M, Bancroft I, Bent E, et al. Analysis of 1.9Mb of contiguous sequence from chromosome 4 of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Nature*, 1998, 391: 485-488.
- [9] HATFIELD R, Vermerris W. Lignin formation in plants: the dilemma of linkage specificity [J]. *Plant Physiology*, 2001, 126: 1351-1357.
- [10] PINTO J E B P, Suzich J A, Herrmann K M. 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase from potato tuber (*Solanum tuberosum* L.) [J]. *Plant Physiology*, 1986, 82: 1040-1044.
- [11] SATO K, Mase K, Nakano Y, et al. 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase is regulated for the accumulation of polysaccharide-linked hydroxycinnamoyl esters in rice (*Oryza sativa* L.) internode cell walls[J]. *Plant Cell Reports*, 2006, 25 (7): 676-688.
- [12] 戴素明,周程爱,谢丙炎,等.细胞色素 P450 表达在植物防御反应中的作用[J]. *石河子大学学报:自然科学版*,2004,22(增刊):184-187.
DAI Su-ming, Zhou Cheng-ai, Xie Bing-yan, et al. Role of cytochromes P450 expression in plant defence responding to pathogens[J]. *Journal of Shihezi University: Natural Science*, 2004, 22 (Supp): 184-187.
- [13] DOWD C, Wilson L W, McFadden H. Gene expression profile changes in cotton root and hypocotyl tissues in response to infection with *Fusarium oxysporum* f. sp. *Vasinfestum* [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2004, 17 (6): 654-667.
- [14] 朱龙涂,涂礼莉,张献龙,等.黄萎病诱导的海岛棉抗病反应的 SSH 文库构建及分析[J]. *遗传学报*,2005,32(5): 528-532.

- ZHU Long-fu, Tu Li-li, Zhang Xian-long, et al. Construction and analysis of SSH library of *Gossypium barbadense* upon infection with *Verticillium dahliae*[J]. *Acta Genetica Sinica*, 2005, 32 (5): 528-532.
- [15] MEZA-ZEPEDA L A, Baudo M M, Palva E T, et al. Isolation and characterization of a cDNA corresponding to a stress-activated cyclophilin gene in *Solanum commersonii*[J]. *Journal of Experimental Botany*, 1998, 49 (325): 1451-1452.
- [16] OHME-TAKAGI M, Suzuki K, Shinshi H. Regulation of ethylene-induced transcription of defense genes[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2000, 41 (11): 1187-1192.
- [17] 张志刚, 邱德文, 杨秀芬, 等. 细极链格孢菌蛋白激发子诱导棉苗基因表达差减文库的构建及 EST 分析[J]. *棉花学报*, 2007, 19 (4): 248-254.
- ZHANG Zhi-gang, Qiu De-wen, Yang Xiu-fen, et al. Construction of suppression subtractive hybridization library with cDNA from seedling cotton induced by protein elicitor from *Alternaria tenuissima* and analysis of EST[J]. *Cotton Science*, 2007, 19 (4): 248-254. ●

中国棉花杂志社
China Cotton Magazine House

