

何佳! 葛露霞! 金魏佳! 等! 青花菜病程相关蛋白基因 $\langle\%@\%G\rangle$ 的克隆与表达分析 ", # 福建农业学报!) *-. ! // \$ %& / 1 %M! O1, ! \$1 2R! , 3 d% ! 89; ; ! " ; A@H: > Z 1[#FERRA> ACC99A-B-BBFB: 9Z CFAB> \$88' <%@G! @ <\$, , "+ / %5 / +5']: F! "3 (" + / ", #! - ' . " /) O% \$ / (%* 12\$ + (3 \$ (4 " 5 + 5 !) *-. ! // \$ %& / 1 %M!

青花菜病程相关蛋白基因 $\langle\%@\%G\rangle$ 的克隆与表达分析

何 佳, 葛露霞, 金魏佳, 范灵希, 章燕如, 叶佳燕, 郑 颖, 蒋 明*

台州学院生命科学学院! 浙江 椒江 /-. *** %

摘 要: 病程相关蛋白 $\langle\%@\%G\rangle$ 是参与植物抗病性的重要物质! 在诱导系统抗性过程中起着重要作用(本研究以青花菜为材料! 在克隆 $\langle\%@\%G\rangle$ 基因的基础上! 利用荧光定量 PCR 技术研究它们在根! 肿瘤和核盘菌侵染下的表达模式(序列分析结果表明! $\langle\%@\%G\rangle$ 基因组全长为 1288 bp! 无内含子! 编码 420 个氨基酸(具 1 个信号肽和 1 个保守基序)。

收稿日期: 2018-05-15 初稿日期: 2018-05-15 修改稿

作者简介: 何佳 女! 本科生! 研究方向: 植物分子生物学 E-mail: hejia@taizhou.edu.cn

* 通讯作者: 蒋明 男! 博士! 副教授! 研究方向: 植物逆境生物学及其分子调控 E-mail: jiangming@taizhou.edu.cn

基金项目: 浙江省大学生新苗人才计划 (2017ZCJY000001) 台州市科技计划项目 (2017YD001) 浙江省公益性技术应用研究计划项目 (2017C31001)

生素、矿物质、类黄酮和硫苷类等物质，深受消费者的青睐^[1]。浙江省是我国青花菜的主产省，年种植面积达一万余公顷，已成为菜农收入的重要来源^[2]。随着种植年限的不断增加，各种病害如根肿病和菌核病等日益严重，它们危害根、茎、叶或花球，造成青花菜的产量和品质下降。植物在长期的进化过程中，形成了一整套高度有效的防御机制，在与病原菌的互作过程中，植物通过启动抗病相关基因的表达以增强抵抗能力^[3]。病程相关蛋白（PRs）基因是参与这一过程的重要成员，在植物诱导抗性中起着重要作用^[4]。PRs基因的诱导、表达及其生物学功能的发挥是一个较复杂的过程，研究其在不同病原菌胁迫下的表现具有十分重要的意义^[5]。

植物在遭受病原菌侵染时，水杨酸（SA）、茉莉酸（JA）和乙烯（ET）等内源激素的含量选择性地升高，并作为信号分子激活植物抗病防卫途径，继而诱导相关PRs基因的表达

...用...进行序列的多重比对，利用...软件构建进化树，建树方法采用邻接法。

1.6 *BoPR* 基因的表达分析

根据测序结果，设计荧光定量 PCR 引物，上、下游引物... 以肌动蛋白基因为内标，上、下游引物... 基因的相对表达量通过公式... 计算得到。

2 结果与分析

2.1 *BoPR* 基因及其编码蛋白的特征

利用引物对 *BoPR* 进行 PCR 扩增，分别以叶

片基因组 DNA 和 cDNA 为模板进行 PCR 扩增，均获得单一的电泳条带... 测序结果表明，*BoPR* 的基因组 DNA 和编码区全长均为 1086 bp，分别以 ATG 与 TAA 为起始和终止密码子，该基因无内含子... 理论等电点为 4.8。利用 SignalP 在线工具可知，该蛋白具有 1 个信号肽和 1 个 PDZ 结构域，分别位于 1~27 和 27~108 处 (图)。

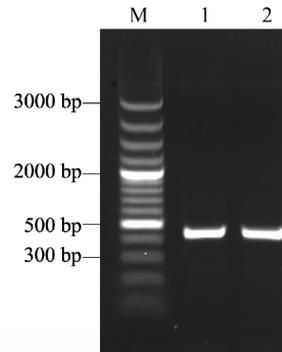


图- *BoPR* 基因的克隆

Fig- Isolation of *BoPR* gene

注：M 为标准分子量，1 和 2 为 cDNA 和基因组 DNA 模板。

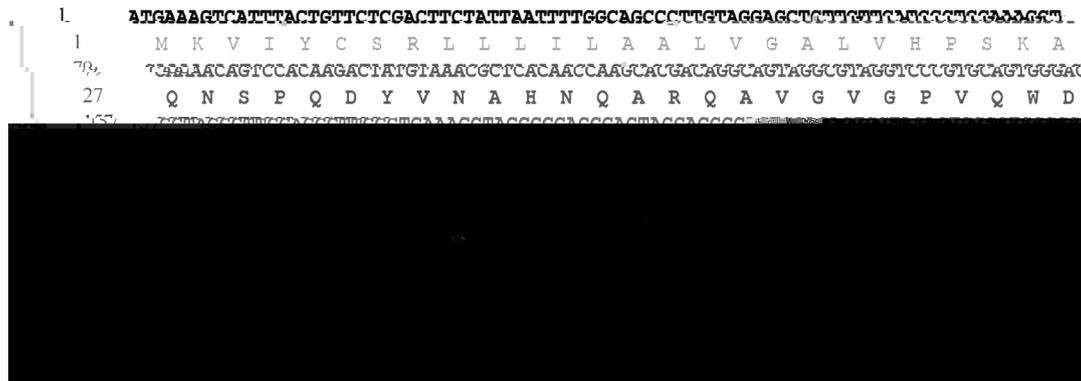


图) *BoPR* 基因及其编码蛋白序列

Fig) Sequences of *BoPR* gene and deduced protein

注：阴影部分为信号肽；划线部分为 PDZ 结构域。

2.2 *BoPR* 的进化分析

为明确 *BoPR* 的进化地位，用...进行序列的多重比对。结果表明，*BoPR* 与甘蓝型油菜的 PDZ 最为相似，仅存在 1 个氨基酸残基的差别，该位点处于氨基酸序列的 108 位，甘蓝型油菜 PDZ 在该位点的氨基酸残基为 D，*BoPR*

为 W。它们在 108 位各有一个高度保守的 PDZ 结构域，均在 108 处缺失 1 个氨基酸；与大白菜的 PDZ 相比，两者仅存在 1 个氨基酸的差异，它们分别在 108、109、110、111、112、113、114、115 和 116 处；与醉蝶花的差异最大，残基差异达 10 个 (图)。



图 / BoPR 及其同源序列的比较

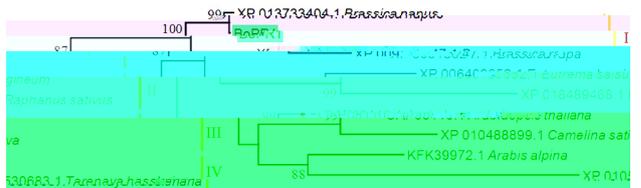
Fig / Comparison between BoPR and counterparts with homologous sequence

利用 MEGA 软件构建系统发育树，建树方法为邻接法（图M）。结果显示，BoPR 与甘蓝型油菜 BoPR 之间的遗传距离最小，仅 0.001，它们的亲缘关系最近；与白菜的 BoPR 次之，遗传距离为 0.002；与萝卜和醉蝶花的遗传距离最大，分别为 0.005 和 0.006，亲缘关系最远。K 个不同物种的 BoPR 在系统发育树上可分为 4 组，同为芸薹属的青花菜、甘蓝型油菜和白菜聚为一组（I），支持率为 100%；盐芥与萝卜聚于组 II，拟南芥与亚麻荠聚于组 III，支持率均为 88%；而高山南芥与醉蝶花聚为一组（IV），支持率稍低，为 80%。

2.3 BoPR 基因的表达分析

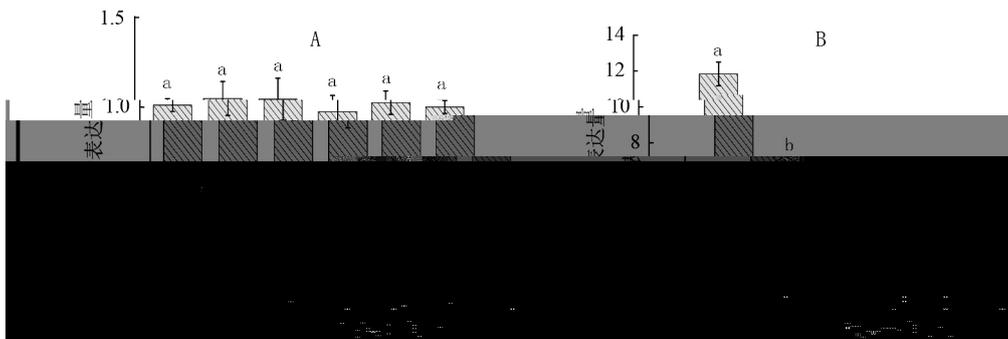
为明确核盘菌和根肿菌胁迫对青花菜 BoPR 基因表达的影响，采用荧光定量 PCR 检测基因的相对

表达量。结果表明，BoPR 基因的表达受根肿菌的诱导，表达量表现为先上升后下降，在接种 12h 时的表达量最高，为对照的 1.1 倍，24h 时次之，为对照的 0.8 倍（图 I）。但是，BoPR 基因的表达不受核盘菌的诱导，在 0~24h 时的表达量无显著变化。



图M BoPR 及其同源序列的系统发育树

FigM Phylogenetic tree of BoPR and counterparts with homologous sequence



图I 青花菜 BoPR 基因在病原菌胁迫下的表达

FigI Expression of BoPR gene challenged by pathogens

注：7 为接种核盘菌，P 为接种根肿菌。A、B、C 和 D：相同字母表示差异不显著，不同字母表示差异显著。

3 讨论与结论

CaG 基因是植物重要的病程相关基因，在逆境响应中起着关键作用，近年来，已从多种植物中克隆到 *CaG* 基因。张凯敏等^[1]从刚毛柞柳 *C. glauca* 中克隆到 *CaG* 基因，该基因的编码区长 1105 bp，编码 368 个氨基酸，具一个 4' 结构域。马立功等^[2]从向日葵 *S. oleracea* 中克隆到一个 *CaG* 基因，该基因的编码区全长为 1105 bp，编码 368 个氨基酸，具一个 4' 结构域。近年来，随着青花菜栽培面积的不断扩大，病害问题日益突出，通过挖掘抗病基因开展分子育种，是解决这一问题的重要途径^[-K*]。本研究以青花菜为材料，克隆了一个 *CaG* 基因，该基因的编码区全长为 1105 bp，编码 368 个氨基酸，与向日葵 *CaG* 的大小完全一致，此外，与 *ScCaG* 和 *CaG* 一样，*CaG* 也具有一个 4' 结构域。比对结果发现，*CaG* 与其他十字花科 *CaG* 序列的相似性较高，较高的蛋白同源性可能有相同的起源^[3]；*CaG* 蛋白的 pI 为 4.2，推测其为碱性蛋白，理论上具有较强的抑菌活性^[4]。

前人的研究表明，*CaG* 基因能被病原菌、干旱、盐和重金属等多种胁迫所诱导，它的高效表达提高了植物抵御病害和其他胁迫的能力^[5,6]。王瑞等^[7]在将 *CaG* 转入烟草，能显著增强烟草对烟草霜霉病菌 *Peronospora nicotianae* 和烟草黑胫病菌 *Botrytis tabaci* 的抵抗能力；4FAY: F 等^[8]将辣椒 *C. annuum* 的 *CaG* 转入烟草中过量表达，增强了烟草对烟草疫霉病菌 *Phytophthora nicotianae*、青枯雷尔氏菌 *G. glaberrima* 和烟草野火病菌 *Phytophthora parasitica* 的抗性。水稻 *O. sativa* *CaG* 基因的表达受纹枯病菌 *G. oryzae* 诱导，在接种 24 h 时开始表达，之后表达量显著增加^[9]。巴西橡胶树 *S. guineensis* *CaG* 基因的表达受 47 诱导，24 h 时显著增强，可作为系统获得抗性的标记基因^[-]。本研究中，用根肿菌处理青花菜，发现表达量呈现为先上升后下降，在接种 12 h 时的表达量最高，为对照的 1.5 倍，推测 *CaG* 基因与根肿菌抗性相关。植物对活体寄生菌的抗病反应采用 47 信号转导途径，而 *CaG* 是该途径的标志基因之一，它可以在活体寄生菌的侵染下表达^[-]；本研究中，根肿菌为活体寄生菌，青花菜 *CaG* 的表达受该菌的诱导，而核盘菌为死体寄生菌，*CaG* 的表达不受其诱导。

本研究以青花菜为材料，在克隆病程相关蛋白基因 *CaG* 的基础上，进行了序列分析、系统发育分析和表达分析，为该基因的功能验证奠定了基础。下一步将利用过量表达和抑制表达研究 *CaG* 在抗病反应中的功能，为抗病分子育种奠定基础。

参考文献：

[1] 林俊！青花菜标准化栽培关键技术研究 [J]！杭州：浙江大学，2008！

[2] 陈晓峰！不结球白菜抗真菌病基因的克隆与表达分析 [J]！扬州：南京农业大学，2008！

[3] 崔香仙！西兰花主要病害及其综合防治 [J]！特种经济动植物，2008，(1)：10-12！

[4] 陈海平！青花菜霜霉病原和流行因素研究 [J]！杭州：浙江大学，2008！

[5] 高婷婷！大白菜抗霜霉病防御信号途径中相关基因的表达分析 [J]！扬州：扬州大学，2008！

[6] 41Wod 72 ^ W, 23Q, 27 ^ 3, 8; ; ! ' @B B F B B B > 7 8 H B 8 : > ; A B (D \$ 7 B) @ # : > B [,] ! 3 9 B > 9 A > ; , A F > ; A C ^ A 8 > ; F 4 0 B > 7 B) * - 1 , - + () : - K M % - K * !

[7] \$ & e D (1 ^ , 21e 3 (1 7 ! S G B G # 4 B B B B 8 F B B A B B C 7 0 9 9 B # : > 9 @ C 3 9 A > E U 9 B > 8 F A F A C @ # 9 0 A B > 9 5 6 3 #) 5 5 [,] ! " # F 8 9 R A A H U) * * * , - * (- /) : J I - % J I J !

[8] 刘利华，林奇英，谢华安，等！病程相关蛋白与植物抗病性研究 [J]！福建农业学报，2008，(1)：1-4！

[9] 杨瑞瑞，易小娅，曾幼玲！*CaG* 的结构、信号转导以及功能的研究进展 [J]！中国农学通报，2008，(1)：1-4！

[-*] 王勇刚，曾富华，吴志华，等！植物诱导抗病与病程相关蛋白 [J]！湖南农业大学学报：自然科学版，2008，(1)：1-4！

[-] 杨德翠，张玉喜，郑国生！牡丹病程相关蛋白- 基因的克隆及表达分析 [J]！园艺学报，2008，(1)：1-4！

[-] 王燕华，何水林！植物诱导抗病性的分子生物学研究进展 [J]！应用与环境生物学报，2008，(1)：1-4！

[-/] 罗红丽，秦云霞，闫志辉，等！巴西橡胶树病程相关蛋白基因 (*CaG*) 的克隆及分析 [J]！热带作物学报，2008，(1)：1-4！

[-M] 60&f, ^, SD3x7 5, 432e7 0. 8; ; ! (C D 7 0 3 8 0 ; U @ 9 9 ; 7 9 Y 0 0 G L 8 L E 8 B B A C 9 0 B S \$ 7 / & P < C L @ U A C 9 ; > 8 F 0 9 A > C 7 9 A B 9 9 9 E 0 Z : > 8 8 L 8 9 A C 9 0 B C D ; H B 8 F B N 4 0 2 C F @ Z = 7 9 A > E U B ; @ U @ : 7 2 [,] ! ^ A 8 > ; F Q : > 9 L 0 F A E 8 3 9 8 ; 7 9 A B) * * * , - / () : - K % *) !

[-I] 张小丽，刘玉梅，方智远，等！青花菜及近缘种属种质资源抗根肿病鉴定 [J]！植物遗传资源学报，2008，(1)：1-4！

[-+] ' 12270&DS7 4 2, d & & , , 03' W4, P! 7 #: > 9' (7 L 0 @ F 8 ; F 9 A > ;] 8 F A > 3 [,] ! Q : > 9 ^ A 8 > ; F R A A H U D 8 ; A F 9 F , - K / , - (M : - K %) - !

[-J] 张凯敏，王玉成，杨桂燕，等！柞柳 *ScCaG* 基因的克隆与表达分析 [J]！南京林业大学学报：自然科学版，2008，(1)：1-4！

[.] 马立功, 张匀华, 孟庆林, 等! 向日葵病程相关蛋白 S/@G 基因的克隆与功能 [,]! 作物学报,)*-I, M (-): -. -K%-.)J!

[K] 姚红燕, 皇甫伟国, 赵海棠, 等! 青花菜几种病害的初步调查 [,]! 宁波农业科技,)**M: (M):)%M!

[*] 王汉荣! 青花菜褐茎病原鉴定及其防治技术研究 [']! 杭州: 浙江大学,)*-*!

[-] 2&&(2" e, D1Q ^, Q81S1D41 " ^, ! 4H@? >8AC @Z=7E8 Z8S-BBF8: 9Z #FA8@B @ @C39Z #: >B [,]! 7>>=: D3@Y ACCQJA# 9AAU,)**+, MM (-): -/1 %-+)!

[)] 侯丽霞, 高超, 车永梅, 等! 葡萄病程相关蛋白- 基因的克隆和表达分析 [,]! 植物生理学报,)*-), M (-): 1J%+)!

[/] 7\$D7d72 \$ W, (7^4&&, , D7Wd72 D! 7 >A]8 R@B (Of7/, /3& 2!): @@ OD- H8@GUF8B#A#89A?9- #G9GFLA>B: :>Z #FA8@ #GB/G9EB @GE9AB [,]! R@GB@; o R@V@G@; D8BF7G"ALL=>@. 9A-B,)***,)JM (-): -1J%-+!

[M] 赵淑清, 郭剑波! 植物系统获得抗性及信号转导途径 [,]! 中国农业科学,)**/, /+ U): J. - %J. J!

[I] 721R7(' 1D', \$&& ^7(D ^, \$fS%D1227 ^, 89;! 3:78BZ 9AF: >89A 9/A AALU88B # 9A-BB@ 9: >B-B@ 9E??A E #F88@H # 9A-B-BBF8: 9Z #FA8@ -: [,]! 0FA8BZ@HAC9B (: 9A>; 7?: ZBLUAC 4@>8AC 7L8@. , -KK/ .K* (-): J/J %J// -!

[+] 47D&d7D4, W3^ 5, , W3^ 1 (, 89;! &]8E #F88A>AC : #Q##E E @? # 9A-B-BBF8: 9Z #FA8@ - H88@ 9E??A #: >B 8G>7B F88@ >89A GB]U L89: :>Z # 9A-B-BBF8B [,]! Q: >9" 8 D8#AFB,)**I,)M (M): -+%)M!

[J] 赵长江, 鲁国东, 杜晓昱, 等! 水稻纹枯病发病过程 OD 和 CP6 的表达动态 [,]! 植物病理学报,)**+,)+ (M): /-J%)-!

(责任编辑: 柯文辉)