

PDF1.2 基因在转草酸氧化酶基因甘蓝型油菜中的表达

冀瑞琴^{1,2}, 董祥柏², 冯辉¹, MARTIN Barbetti³, 高荣村², 刘月英², 刘胜毅^{2,*}

¹沈阳农业大学园艺学院, 沈阳 110161; ²中国农业科学院油料作物研究所, 武汉 430062; ³School of Plant Biology, Faculty of Natural and Agricultural Sciences, the University of Western Australia, Crawley, WA, 60099, Australia

摘要: 采用 RT-PCR 方法检测茉莉酸(JA)/乙烯(ET)依赖性信号途径中关键基因 *PDF1.2* 在转草酸氧化酶基因(*OXO*)油菜株系与未转化对照中的表达差异。结果表明, 在转基因油菜不同株系中 *PDF1.2* 都有不同程度的上调表达, 预示着转 *OXO* 油菜对菌核病的抗性增强可能与激活 JA/ET 依赖性信号途径有关。

关键词: 甘蓝型油菜; 菌核病; *PDF1.2*

Expression of *PDF1.2* in Oxalate Oxidase Transgenic Oilseed Rape (*Brassica napus* L.)

Ji Rui-Qin^{1,2}, Dong Xiang-Bai², Feng Hui¹, Martin Barbetti³, Gao Rong-Cun², Liu Yue-Ying², Liu Sheng-Yi^{2,*}

¹College of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China; ²Oil Crops Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430062, China; ³School of Plant Biology, Faculty of Natural and Agricultural Sciences, the University of Western Australia, Crawley, WA, 6009, Australia

Abstract: The expressions of *PDF1.2*, a key gene in the jasmonic acid (JA)/ethylene (ET)-dependent signaling pathway, were measured in oxalate oxidase (*OXO*) transgenic and non-transgenic oilseed rapes (*Brassica napus*) by RT-PCR. The results showed that the expression of *PDF1.2* was up-regulated in different *OXO* transgenic oilseed rape lines, which indicated that the mechanism of disease resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* was related to the induction of the JA/ET-dependent signaling pathway.

Key words: oilseed rape (*Brassica napus*); *Sclerotinia sclerotiorum*; *PDF1.2*

由核盘菌引起的菌核病(*Sclerotinia sclerotiorum*)是世界范围内多种作物的严重病害(刘胜毅等1998; 黄剑华等 2001; 冀瑞琴等 2006)。培育抗病品种是防治菌核病的主要措施,但目前尚未见有高抗油菜新品种的报道。菌核病的致病作用与很多因素有关,其分泌的毒素草酸是一个主要因素(刘胜毅等 1998)。早在 1887 年, de Bary 就认为草酸与菌核病的发生密切相关。随后,这一观点被大量的研究者从各个方面得到证实,如草酸通过降低寄主组织中 pH 值而促进病菌水解酶降解寄主组织(Marciano 等 1983),抑制与抗性有关的酶和光合作用酶的活性或合成(刘胜毅等 1998),与钙结合生成草酸钙晶体而堵塞导管或维管束(刘胜毅等 1998)等机制而产生致病作用。

已有研究表明草酸氧化酶(oxalate oxidase, *OXO*)能降解草酸,并生成 H_2O_2 (Dong 等 2008)。转 *OXO* 基因油菜的抗草酸能力已从多方面得到证实(Thompson 等 1995; Donaldson 等 2001; Hu 等 2003; Livingstone 等 2005)。OXO 降解草酸生成的

H_2O_2 还是活性氧类的一种,它既具有直接的抑菌活性,又可作为信号分子诱发植物产生防御反应,增强植物的抗性。 H_2O_2 的产生是许多植物与病原体互作中产生过敏反应的一个早期事件(Hammond-Kosack 和 Jones 1996; Lamb 和 Dixon 1997),与诱导病程相关蛋白(pathogenesis-related proteins, PR)和植保素合成等有关(Hammond-Kosack 和 Jones 1996)。而过敏反应和 PR 蛋白产生是植物防御反应中水杨酸依赖性信号途径的重要特征,但 H_2O_2 的产生与防御反应的另一重要信号途径,即茉莉酸(jasmonic acid, JA)/乙烯(ethylene, ET)依赖性信号途径的关系尚不清楚。

研究已表明 *PDF1.2* (*plant defensin 1.2*)和 *Thi2.1* (*thionin 2.1*)基因特异地受 JA 或 ET 诱导,可作为

收稿 2009-03-09 修定 2009-04-28

资助 国家自然科学基金(30671344、30800748)和中国博士后科学基金(20070411080)。

* 通讯作者(E-mail: liusy@oilcrops.cn; Tel: 027-86812896)。

JA/ET 依赖性信号途径的标记基因(Penninckx 等 1998)。探明 *PDF1.2* 基因的表达变化则可明确转 *OXO* 油菜产生对菌核病的抗性是否与防御反应信号转导途径中 JA/ET 依赖性信号途径的激活有关。

本文以 T_0 代转小麦 *OXO* 基因油菜与转基因受体油菜 '84039M' 为材料, 研究 *PDF1.2* 基因的表达差异, 以此推测转基因油菜抗病性增强与防御反应中 JA/ET 依赖性信号途径的激活之间的关系。

材料与方 法

本课题组曾以农杆菌介导方法将小麦 *OXO* 导入甘蓝型油菜 (*Brassica napus* L.) '84039M' 品系中, 并通过加代扩繁获得了 T_0 代转 *OXO* 基因油菜株系 (Dong 等 2008)。本研究中, 以 T_0 代转 *OXO* 基因

油菜株系和未转化对照株系为试验材料进行研究。

T_0 代转 *OXO* 油菜种子在 25 °C 催芽后, 选露白种子播于 9 cm×9 cm 的钵中, 温室中土培(土:蛭石 = 5:1), 光周期为: 16 h 光照(25 °C)/8 h 黑暗(20 °C), 相对湿度 70%。当油菜幼苗长到四叶一心期用 CTAB 法提取叶片 DNA, 以 *OXO* 引物进行 PCR 扩增, 筛选阳性植株。*OXO* 引物序列如表 1。

RT-PCR 检测时, 分别以转 *OXO* 基因株系和未转化对照株系叶片为材料, 采用 TRIZOL (Carlsbad, CA) 试剂提 RNA (参照 TRIZOL 说明书进行), 采用 SuperscriptTM II (Invitrogen) 合成第一链 cDNA, 然后以第一链 cDNA 为模板, 不同基因的引物进行 PCR 扩增, 同时将 *ACTIN* 基因作为内参基因进行半定量 PCR, 相关参数见表 1。

表 1 RT-PCR 中相关基因的引物、退火温度及 PCR 循环数

Table 1 The primers, annealing temperature and the number of PCR cycles for RT-PCR

基因	NCBI 序列号	引物	序列(5'→3')	产物长度/bp	退火温度/°C	循环数/个
<i>ACTIN</i>	AF111812	F	TCTGGCATCACACTTTCTACAACGAGC	669	66	22
		R	CAGGGAACATGGTCGAACCACC			
<i>OXO</i>	AY884024	F	GTCCTGCAGCATGGGGTACTCCAAAAC	692	55	22
		R	CCGTCGACTTAAAACCCAGCGGCAAAC			
<i>PDF1.2</i>	AY884023	F	TCATGGCTAAGTTTGCTTCC	475	55	22
		R	CAAACCAACACAAACATATCTGC			

实验结果

1 T_0 代转 *OXO* 植株 PCR 检测

经过 5 年连续筛选, 随机抽取 T_0 代转 *OXO* 油菜 3 个株系(OX14、OX10 和 OX1)各 5 棵植株的

单株幼苗, 抽提幼苗叶片的 DNA, 以其作为模板进行 PCR 检测, 以含有 *OXO* 的重组载体质粒为阳性对照, 以未转化植株为阴性对照, 筛选转基因阳性植株。结果如图 1。以 PCR 检测阳性植株进行后续的研究。

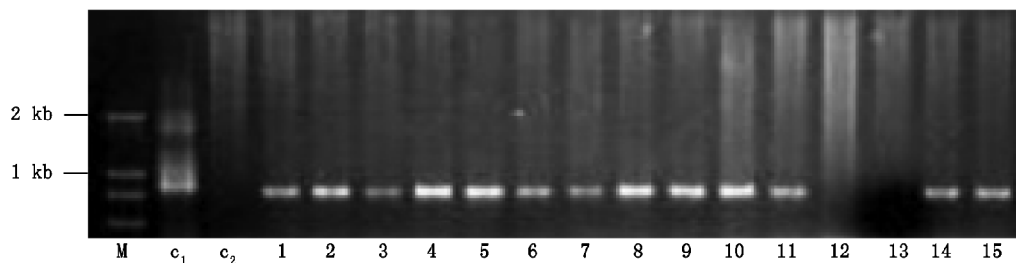


图 1 *OXO* 转基因植株的 PCR 检测

Fig.1 PCR identification of *OXO* transgenic plants

M: Marker; c_1 : 阳性对照; c_2 : 阴性对照; 1~5: OX14; 6~10: OX10; 11~15: OX1。

2 小麦 *OXO* 基因在油菜植株内正常转录

通过 RT-PCR 的方法检测了 T_0 代转 *OXO* 基因

PCR 检测阳性植株中 *OXO* 的表达, 以未转化植株为阴性对照, 结果表明 3 个转基因株系中 *OXO* 基因均

有不同程度的表达,在OX14中表达量最高,OX10次之,OX1中表达量最低,而对照中未见表达。

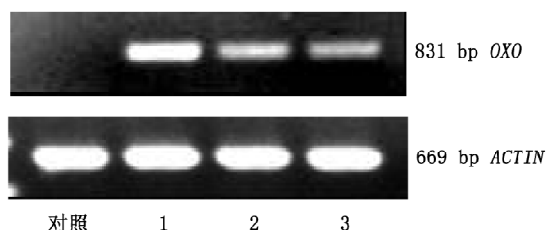


图2 RT-PCR 分析 *OXO* 基因在转基因株系与野生植株中的表达差异

Fig.2 RT-PCR of *OXO* expression in *OXO* transgenic plants and wild plants
1~3 分别为转基因株系 OX14、OX10 和 OX1。

3 JA/ET 依赖性信号途径中防御反应相关基因 *PDF1.2* 的表达分析

本研究以转*OXO*基因油菜和未转化对照为材料,采用RT-PCR方法检测了JA/ET依赖性信号途径中防御反应相关基因*PDF1.2*的表达变化情况。结果发现,在转基因株系中,*PDF1.2*在所检测的3个转基因株系中都有明显的上调表达(图3),在OX14中上调表达极显著,OX1中上调表达较弱。

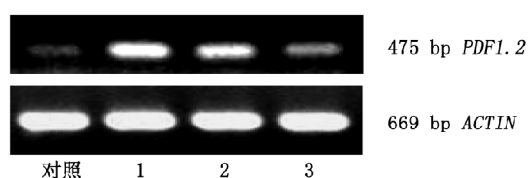


图3 RT-PCR 分析 JA/ET 依赖性信号途径中防御反应相关基因 *PDF1.2* 在转 *OXO* 基因株系与野生植株中表达的差异

Fig.3 Expressions of defense response gene *PDF1.2* in JA/ET-dependent signaling pathway was measured by RT-PCR in *OXO* transgenic plants and wild plants
1~3 分别为转基因株系 OX14、OX10 和 OX1。

讨 论

在先前的研究中,我们对PCR检测为阳性的T₆代转*OXO*油菜株系进行了离体叶和田间抗病鉴定,结果发现转*OXO*油菜对菌核病的抗性显著增强。我们推测转*OXO*油菜抗病机理可能存在两方面的作用:一是通过降解草酸,解除草酸的毒害作

用,该结论已经得到证实(Dong等2008);二是通过降解草酸产生的H₂O₂起作用。Dong等(2008)用DAB染色方法检测转*OXO*基因油菜中H₂O₂含量时,发现转基因油菜接菌后H₂O₂产生量显著高于未转化对照。有资料表明*OXO*引起的抗病性与H₂O₂介导的防御反应有关(Wei等1998;Dunwell等2000)。但通过何种途径介导抗病性尚不清楚。

本研究发现在3个T₆代转*OXO*基因株系OX1、OX10和OX14中,*PDF1.2*都有明显的上调表达,而且*PDF1.2*的表达量与*OXO*的表达量呈正相关,在*OXO*表达量最高的OX14株系中*PDF1.2*表达量也最高,反之,在*OXO*表达量最低的OX1株系中*PDF1.2*表达量也最低(图2、3)。在对OX1、OX10和OX14抗病性鉴定试验中发现,OX14的抗病能力也高于其它两个株系,OX1的抗病能力最低(Dong等2008)。基于*PDF1.2*是JA/ET依赖性信号途径的标记基因,我们由此推测转*OXO*基因油菜对菌核病的抗性增强不仅与降解草酸、解除草酸的毒害有关,而且与草酸降解过程中产生的H₂O₂诱发了JA/ET依赖性信号途径的激活有关。

参考文献

- 黄剑华,陆瑞菊,周志疆,王亦菲,孙月芳,周润梅(2001).应用小孢子和花药培养技术筛选油菜抗菌核病材料.植物生理学通讯,37(3):226~227
- 冀瑞琴,董彩华,高荣村,刘月英,刘胜毅(2006).甲基茉莉酸、BTH、草酸对油菜菌核病的诱导抗性.中国油料作物学报,28(2):184~188
- 刘胜毅,周必文,潘家荣(1998).油菜对毒素草酸的吸收代谢与抗病机理.植物病理学报,28(1):33~37
- de Bary A (1887). Comparative Morphology and Biology of the Fungi, Mycetoza and Bacteria. Oxford: Clarendon Press, 1380~1388
- Donaldson PA, Anderson T, Lane BG, Davidson AL, Simmonds DH (2001). Soybean plants expressing an active oligomeric oxalate oxidase from the wheat *gf-2.8* (germin) gene are resistant to the oxalate-secreting pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. Physiol Mol Plant Pathol, 59: 297~307
- Dong X, Ji R, Guo X, Foster SJ, Chen H, Dong C, Liu Y, Hu Q, Liu S (2008). Expressing a gene encoding wheat oxalate oxidase enhances resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in oilseed rape (*Brassica napus*). Planta, 228: 331~340
- Dunwell JM, Khuri S, Gane PJ (2000). Microbial relatives of the seed storage proteins of higher plants: conservation of structure and diversification of function during evolution of the cupin superfamily. Microbiol Mol Biol Rev, 64: 153~179
- Hammond-Kosack KE, Jones JDG (1996). Resistance gene-de-

- pendent plant defense responses. *Plant Cell*, 8: 1773~1791
- Hu X, Bidney DL, Yalpani N, Duvick JP, Crasta O, Folkerts O, Lu G (2003). Overexpression of a gene encoding hydrogen peroxide-generating oxalate oxidase gene evokes defense responses in sunflower. *Plant Physiol*, 133: 1~12
- Lamb C, Dixon RA (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 48 : 251~275
- Livingstone DM, Hampton JL, Phipps PM, Grabau EA (2005). Enhancing resistance to *Sclerotinia minor* in peanut by expressing a barley oxalate oxidase gene. *Plant Physiol*, 137: 1354~1362
- Marciano P, Di Lenna P, Magro P (1983). Oxalic acid, cell wall-degrading enzymes and pH in pathogenesis and their significance in the virulence of two *Sclerotinia sclerotiorum* isolates on sunflower. *Physiol Plant Pathol*, 22 (3): 339-345
- Penninckx IAMA, Thomma BPHJ, Buchala A, Mettraux JP, Broekaert WF (1998). Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 10: 2103~2113
- Thompson C, Dunwell JM, Johnstone CE, Lay V, Ray J, Schmitt M, Watson H, Nisbet G (1995). Degradation of oxalic acid by transgenic oilseed rape plants expressing oxalate oxidase. *Euphytica*, 85: 169~172
- Wei Y, Zhang Z, Anderson CH, Schmelzer E, Gregerson PL, Collinge DB, Smedegaard-Peterson V, Thordal-Christensen H (1998). An epidermis/papilla-specific oxalate oxidase-like protein in the defense response of barley attacked by the powdery mildew fungus. *Plant Mol Biol*, 36: 101~112