

青霉菌灭活菌丝体诱导烟草抑制消减杂交 cDNA 文库的构建

陈壮壮¹, 谢虹^{1#}, 钟宇¹, 张鹏远¹, 龙春瑞¹,

陈林¹, 王建光^{1*}, 陈穗云^{1*}, 李秀军²

(1. 云南大学生命科学学院 昆明 650091; 2. 昆明保腾生化技术有限公司 昆明 650106)

摘要: 为了探究青霉菌灭活菌丝体(DMP)在烟草抗性中的作用机制,以DMP水溶液处理的烟草红花大金元叶片为材料,利用抑制消减杂交(SSH)技术构建了cDNA文库,并对文库进行了分析。SSH获得356个克隆,挑选102个克隆,测序成功77个。Blastn比对出47个不同功能的基因。Blastx比对出26个不同功能的蛋白;7种未知功能的预测蛋白;2个克隆没有比对出相关蛋白。所有克隆抗病防御、能量代谢和细胞保护相关基因较多,分别占总数的40.3%、23.4%和14.9%。其余有关细胞结构、蛋白合成、转录及信号传导的基因相对较少,分别占到8.5%、4.3%、4.3%和4.3%。

关键词: 青霉菌灭活菌丝体; 烤烟; 红花大金元; cDNA文库; SSH

中图分类号: S435.72

文章编号: 1007-5119(2014)02-0026-06

DOI: 10.13496/j.issn.1007-5119.2014.02.005

Establishment of a Suppression Subtractive Hybridization cDNA Library of Tobacco Induced by Dry Mycelium of *Penicillium Chrysogenum*

CHEN Zhuangzhuang¹, XIE Hong^{1#}, ZHONG Yu¹, ZHANG Pengyuan¹, LONG Chunrui¹, CHEN Lin¹, WANG Jianguang^{1*}, CHEN Suiyun^{1*}, LI Xiujun²

(1. School of Life Sciences, Yunnan University, Kunming 650091, Yunnan, China; 2. Baoteng Biochemical Technology Co., Ltd., Kunming 650106, Yunnan, China)

Abstract: Dry mycelium of *Penicillium chrysogenum* (DMP) could protect plant from disease. But its mechanism of induction and signaling pathways was unclear. Analyzing the genes expression in the plant treated by DMP was a good way to find out how inducing agent works. SSH technology was used to establish a cDNA library of tobacco induced by Dry mycelium of *Penicillium chrysogenum*. In the library 356 positive clones were obtained, of which 102 clones were selected for sequencing and 77 were sequenced successful. The result of Blastn showed that 47 genes' functions were obtained in the library. The result of Blastx indicated that 26 genes had homologous sequences and 7 genes showed high similarities with putative proteins; 2 genes did not get any homologous sequence or protein. Defense-related genes (40.3%) were most in the library; The energy metabolism and the cytoprotective genes were in the next place (23.4% and 14.9% respectively). The genes related to eucaryotic cell structure, protein synthesis, transduction and signal transduction were fewer (8.5%, 4.3%, 4.3% and 4.3% respectively). DMP can induce numerous genes expression in tobacco. Masses of genes are related to plant growth and stress resistance.

Keywords: Dry Mycelium of *Penicillium Chrysogenum*; *Nicotiana tabacum*; Honghuadajinyuan; cDNA library; SSH

我国是世界最大的烟草生产国,烟草栽培和卷烟制品产量均为世界第一^[1]。云南烟草的种植面积、产量、质量、卷烟销售和市场占有量均居全国首列,是云南省的支柱产业^[2]。但是,随着栽培条件的变化,烟草病害的危害也日益严重,造成了巨大的经济损失。另一方面,为了控制病害的发生,化学农药被广泛使用,造成了烟叶中农药残留的增

加,病害的抗药性增强和病害的再猖獗,严重影响了农业的可持续发展,破坏了生态平衡。生物防治因具有无污染、不增加抗药性而逐渐受到人们的重视,近年来已成为烟草病害防治的一种重要手段。

青霉菌灭活菌丝体(Dry Mycelium of *Penicillium chrysogenum*, DMP)是生产青霉素后的残余产物,以色列等国家利用其制成一种非常优良

基金项目: 云南省烟草公司项目(2011YN60, 2012YN10, 2012YN13, 2012YN36, 2013YN36, 2011YN09); 国家自然科学基金(31101416); 云南大学生命科学学院植物科学研究所青年基金(ZW201002); 云南大学理(工)科校基金(2010BY007)

作者简介: 陈壮壮,男,硕士研究生,研究方向为植物学, E-mail: chen090330@163.com。# 与第一作者同等贡献; *通信作者, E-mail: jgwangyn@yeah.net

收稿日期: 2013-11-27

的有机肥。以色列的Cohen等实验室首先发现在温室盆栽条件下,该物质可诱导甜瓜、西瓜和棉花对枯萎病和黄萎病的抗性显著提高;同时诱导植物体内与抗病相关的过氧化物酶、辅氨酸、木质素等含量显著提升^[3-5]。瑞士Thuerig等也报道,以该残渣处理后,可以提高包括苹果、葡萄、马铃薯、黄瓜、洋葱等多种病害的抵抗能力,诱导拟南芥中大量抗性基因的表达^[6]。实验室前期研究发现青霉菌灭活菌丝体能够诱导棉花产生系统抗性,导致抗性基因的大量表达和上调^[7],大田试验表明青霉菌灭活菌丝体对烟草黑胫病和烟草花叶病有良好的防治效果^[8-9]。2007—2012年在云南烟区累计推广面积达40,000 hm²。可见青霉菌灭活菌丝体是良好的抗性诱导剂,但其具体的诱导机制和信号通路途径尚不明确。

抑制消减杂交技术(Suppression Subtractive Hybridization, SSH)由Diatchenko等在1996年建立,利用该技术构建cDNA文库有助于抗病相关基因的筛选和分析^[10-11]。Chacon等^[12]利用SSH技术研究了麦格隆熄丰烟参与抵抗黑胫病的抗性基因。苏格兰农作物研究中心等使用SSH法将冬眠马铃薯的发芽部位和块茎部位分别作为检测子和驱动子构建消减文库,找出了一系列与生长调节相关的基因。并继续重点研究了其中一个植物生长因子,证明它在植物发芽部位有高表达^[13],为茄属植物的进一步研究奠定了基础。利用SSH技术,是获得植物抗性和功能基因的有效手段。

本研究通过SSH构建DMP诱导的烟草cDNA文库,分析文库中相关克隆,探究DMP在烟草抗性中的作用机制,进而探究信号通路途径,为DMP诱导相关抗性基因的筛选和研究搭建平台,同时为DMP诱导其他作物抗病研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料及试剂

烟草红花大金元包衣种子由玉溪中烟种子有限责任公司提供。在云南大学生命科学学院温室内采用漂浮育苗技术将烟苗培育至5~6叶期,随后将

长势一致的健康烟苗转移到培养瓶培养3~4 d。DMP由昆明保腾生化技术有限公司提供。处理组(Tester组)用0.4%DMP水溶液处理72 h后采样;对照组(Driver组)为清水处理。取新鲜叶片置于-80℃冰箱保存备用。以DMP处理72 h的红花大金元cDNA样本为待测子(Tester),以清水处理对照组烟叶cDNA为驱动子(Driver)。

实验中所需试剂盒均由Clontech提供。

1.2 实验方法与步骤

1.2.1 消减抑制杂交 使用Trizol(invitrogen)提取烟叶总RNA, RNA样品测定浓度和纯度,并用1.0%琼脂糖凝胶变性电泳检测其质量。Clontech SMARTer™ PCR cDNA Synthesis Kit和Clontech Advantage 2 PCR Kit用于cDNA和ds-cDNA的合成及纯化。消减抑制杂交按Clontech PCR-Select™ cDNA Substraction Kit试剂盒说明进行。

1.2.2 消减cDNA文库的构建 消减杂交后产物与pGEM-T Easy(Promega)载体连接,重组载体转化大肠杆菌JM109。通过蓝白斑筛选阳性克隆,选取含有插入片段的阳性克隆送北京华大基因公司进行序列测定。PCR检测载体和重组子质量用于消减cDNA文库的质量分析。

1.2.3 DNA序列分析 测定序列在NCBI上进行Blastn和Blastx比对分析(www.ncbi.nlm.nih.gov/)。

2 结果

2.1 总RNA检测

琼脂糖凝胶变性电泳检测结果显示,处理组和对照组烟叶总RNA条带清晰(图1);由nanodrop2000测定RNA浓度和纯度。处理组RNA浓度为1 758 ng/μL,纯度260/280为2.06;对照组浓度为1 460 ng/μL,纯度260/280为1.93,总RNA质量能满足以下实验要求。

2.2 cDNA纯化和酶切

合成ds-cDNA后,将得到的ds-cDNA过柱纯化,琼脂糖凝胶检测纯化产物符合预期大小和分布(图2)。将富集纯化产物用限制性内切酶RsaI消

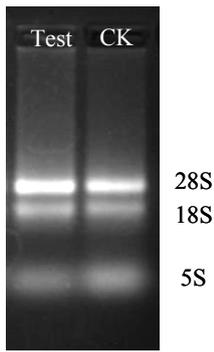


图1 总RNA提取结果
Fig.1 Result of total RNA

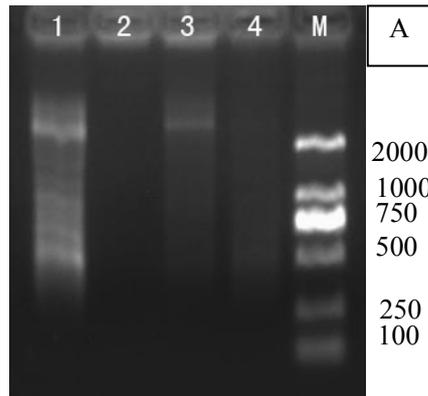


图2 柱纯化结果, A为处理组纯化, B为对照组纯化。M: DNA Markers, 1: LD-PCR 扩增产物; 2、3、4分别为洗脱第一、二、三部分

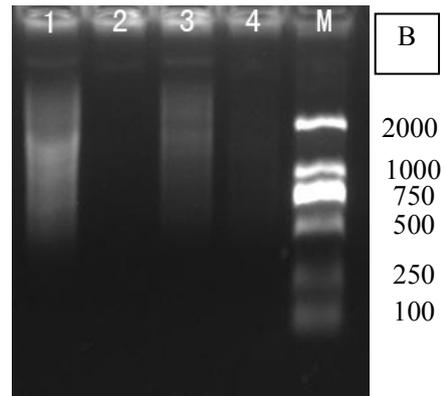


Fig. 2 Result of column chromatography. A: Column chromatography of tester; B: Column chromatography of driver. M: DNA Markers, lane 1: Result of LD-PCR, lane 2: First part of eluting, lane 3: Second part of eluting, lane 4: Third part of eluting.

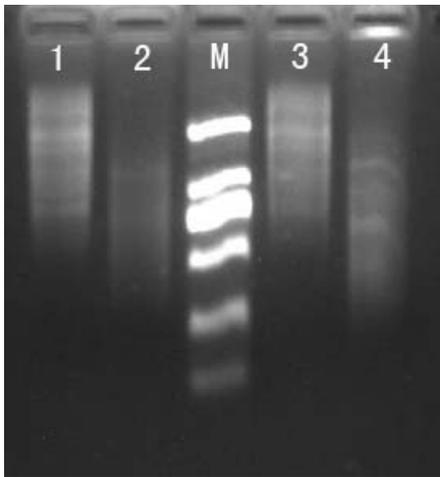


图3 RsaI 酶切结果

Fig. 3 Result of RsaI Digestion. M :DNA Markers, lane 1: Result of LD-PCR of driver, lane 2: Result of RsaI digestion of driver, lane 3: Result of LD-PCR of driver, lane 4: Result of RsaI digestion of test
注: M: DNA Markers; 1: 对照组 LD-PCR 扩增产物; 2: 对照组酶切产物; 3: 处理组 LD-PCR 扩增产物; 4: 处理组酶切产物。

化处理, 琼脂糖凝胶检测(图3)结果表明, 产物酶切后片段大小主要分布于 250~1_000_bp。

2.3 抑制消减杂交 cDNA 文库质量分析

蓝白斑筛选共获得 356 个单克隆, 随机挑选 50 个进行菌液 PCR, 克隆片段主要集中于 250~1_000 bp(图4), 表明 cDNA 文库质量良好, 可用于后续实验。

2.4 序列测定与分析

本研究应用 DMP 处理烟草, 成功构建了红花大金元烟叶抑制消减正向文库, 包括 356 个克隆,

文库的滴度达到 2.2×10^9 cfu/ml, 挑选均匀饱满、清晰的 102 个阳性克隆进行 DNA 序列测定, 测序成功 77 个, 阳性克隆比例为 75.4%, 并将其在 NCBI 上应用 Blastn 和 Blastx 进行比对分析, 最终比对出 46 个克隆基因包含 26 个不同功能的蛋白质(表1), 另外 7 种蛋白质是预测功能; 一个克隆有同源序列, 但无同源蛋白质; 一个克隆没有同源序列也没有同源蛋白质。

Blastx 结果表明, 比对出的 26 个不同功能的蛋白质中(图5)抗病防御的相关功能基因最多, 达到已知功能基因总数的 40.3%, 其次是能量代谢和细胞保护的基因, 达到 23.4%、14.9%, 其余的有关细胞结构、蛋白合成、转录相关及信号传导的相应较少, 分别占到 8.5%、4.3%、4.3%和 4.3%, 由此可以看出, DMP 能诱导烟叶大量表达抗逆性基因, 增强能量代谢, 加强免疫应答过程等方式来有效提高烟草的抗性。

从基因的出现频率来看, 响应 ABA 的蛋白出现了 14 次, 光合系统组分出现了 4 次, 硝酸还原酶出现了 3 次, 类泛素载体蛋白出现了 2 次, 核糖体组分蛋白出现了 2 次, 其余功能蛋白出现了 1 次。

3 讨论

抑制消减杂交(SSH)方法作为一种 mRNA 水平上的差异表达克隆技术, 具有操作简单, 灵敏度高,

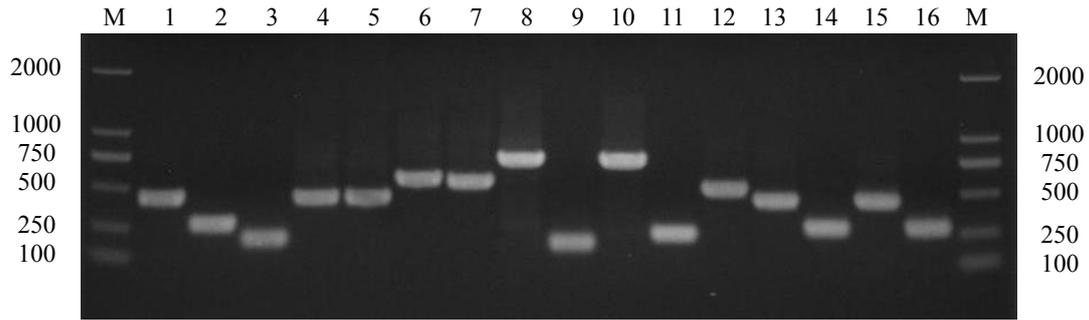


图4 部分菌液 PCR 结果

Fig. 4 Part result of RCR. Each lane represents the result of randomly selected clone ext.
注：各个电泳条带为随机挑选的克隆提取结果。

表1 测序基因同源比较结果

Table 1 Results of gene sequencing homology comparison

功能类别	基因编号	E-value	片段长度	出现频率	同源蛋白来源	功能
能量代谢	Z5	0.00E+00	616	1	Arabidopsis thaliana	光合系统 II D1 蛋白
	Z8	4.00E-173	336	6	Nicotiana tabacum	ATP 合酶功能亚基
	Z21	2.00E-29	76	3	Nicotiana tabacum	光合系统 44KD 蛋白
	Z87	8.00E-104	236	1	Nicotiana tabacum	NADH 脱氢酶蛋白亚基 1
蛋白合成	Z50	1.00E-102	215	1	Nicotiana tabacum	核糖体蛋白 S2
	Z98	2.00E-95	230	1	Nicotiana tabacum	核糖体蛋白 L14
信号传导	Z29	2.00E-89	185	1	Arabidopsis thaliana	蛋白激酶
	Z68	5.00E-85	180	1	Arabidopsis thaliana	ADP 核糖基化因子 GTP 酶激活蛋白 AGD2
细胞保护	Z3	1.00E-71	164	1	Prosthecochloris aestuarii DSM 271	棒状细胞决定蛋白 RODA
	Z30	0.00E+00	543	2	Vitis vinifera	类泛素载体蛋白
细胞保护	Z49	6.00E-136	302	1	Populus trichocarpa	羟基肉桂酰辅酶 A 莽草酸/奎尼酸羟基肉桂酰转移酶
	Z83	6.00E-05	197	1	Arabidopsis thaliana	谷胱甘肽过氧化物酶 6
	Z84	6.00E-05	200	1	Arabidopsis thaliana	谷胱甘肽过氧化物酶 7
	Z95	4.00E-77	226	1	Arabidopsis thaliana	TMK1 蛋白激酶受体
	Z61	5.00E-23	324	1	Medicago truncatula	mRNA 前体剪切因子, 依赖 ATP 的 RNA 解旋酶 PRP16
转录相关	Z67	3.00E-56	148	1	Arabidopsis thaliana	多聚 A 结合蛋白, 转录起始因子
	Z33	0.00E+00	524	1	Arabidopsis thaliana	结合蛋白/结构分子
	Z36	4.00E-32	208	1	Medicago truncatula	跨膜蛋白
	Z41	6.00E-116	270	1	Trichomonas vaginalis G3	锚定重复蛋白
	Z90	1.00E-164	378	1	Arabidopsis thaliana	ATP 锚定
抗病防御	Z11	2.00E-171	336	2	Arabidopsis thaliana	响应 ABA 蛋白 19
	Z14	5.00E-167	325	11	Arabidopsis thaliana	响应 ABA 蛋白 18
	Z17	2.00E-160	316	1	Arabidopsis thaliana	响应 ABA 蛋白 20
	Z18	0.00E+00	423	1	Medicago truncatula	细胞壁相关水解酶
	Z24	0.00E+00	379	1	Arabidopsis thaliana	齿质唾液磷酸蛋白
	Z52	7.00E-57	129	3	Vitis vinifera	硝酸还原酶

检测效率高,假阳性较低等的优点,已在生物学科学研究工作中得到较广泛的应用^[14]。本研究应用 SSH 技术,有效分离 DMP 诱导处理烟草 72 h 的差异基因表达,这些基因主要涉及抗病防御、能量代谢、细胞保护、细胞结构、信号转导、蛋白合成和转录调控。

抗病防御基因是本研究获得基因总数最多的,约占文库总数的 40.3%,主要包括响应 ABA 蛋白

基因、细胞壁相关水解酶基因、齿质唾液磷酸蛋白和硝酸还原酶基因。ABA 不仅可以作为植物胞间信号物质介导植株整体的抗逆反应,也能作为细胞逆境信号物质直接介导许多抗逆基因的表达^[15]。拟南芥中 ABA 参与多条信号通路的调控,如激活茉莉酸(jasmonic acid, JA)和乙烯(ethylene, ET)的应答基因 VSP2;抑制水杨酸(salicylic acid, SA)通路的 PR 蛋白表达等^[16]。前期研究结果表明,DMP

能诱导棉花叶片 *PR* 基因的表达^[4]，近期，我们在 DMP 处理的烟草中也检测到 *PR* 基因的表达，这些现象说明 DMP 可能诱导了 JA、ET 和 SA 信号转导途径，同时可能还存在另外一条未知的信号途径。

本文库中也筛选到了一系列的与信号转导过程有关系的基因，如 ADP 核糖基化因子 (ADP-ribosylation factor, ARF)，蛋白激酶，以及硝酸还原酶。ARF 参与细胞内物质运输和信号转导过和,具有重要的生理功能^[17-18]；蛋白激酶在信号转导中主要通过磷酸化调节蛋白的活性和蛋白质逐级磷酸化，使信号逐级放大，最后诱导某些在生理生化上有特定功能的基因进行表达，对胁迫做出各种适应性反应^[19-20]。硝酸还原酶参与植物的生长、发育、衰老和抗病等生理代谢过程，并作为第二信使激活各种抗病防卫基因的表达^[21-23]。

类泛素载体蛋白和谷胱甘肽过氧化物酶都为细胞保护相关基因。泛素化广泛地参与了茉莉酸、水杨酸和乙烯的信号传导和生物合成等环节^[24]，在植物免疫应答相关的各个途径中均发挥重要作用。而谷胱甘肽过氧化物酶对不同的非生物胁迫都有应答反应^[25-26]，是植物抗氧化酶系统中的重要一员，可增加植物的抗逆性。

除了上述参与抗病防御、信号转导和细胞保护等基因，还分离到了与能量代谢、细胞结构和蛋白合成等基因，这些基因都与植物的生长发育有密切关系，其作用和功能还有待进一步研究，同时，对

参与抗病防御、信号转导差导表达基因还需作定量分析和功能验证。

4 结 论

青霉菌灭活菌丝体能诱导烟叶抗病防御、能量代谢、细胞保护、细胞结构、蛋白合成和信号转导等基因表达，其中与抗病防御、能量代谢和细胞保护相关的基因占 78.6%，说明 DMP 能激活和诱导烟草细胞保护和抗病防御基因大量表达，同时也能启动相关信号转导途径使能量代谢处于活跃状态，提高光合效率，增加细胞供能维持大量细胞合成和正常生理系统运转。

参考文献

- [1] 魏雅华. 世界《烟草控制框架公约》与中国烟草业—写于 2005 年“世界戒烟日”[J]. 中国外资, 2005 (5): 36-39.
- [2] 胡雪琼, 李天福. 云南省烤烟内在品质类型与气象条件的关系分析[J]. 云南农业科技, 2006 (5): 17-18.
- [3] Dong H Z, Cohen Y. Induced resistance in cotton seedlings against *Fusarium* wilt by dried biomass of *Penicillium chrysogenum* and its water extract [J]. *Phytoparasitica*, 2002, 30: 77-87.
- [4] Dong H Z, Cohen Y. Extracts of killed *Penicillium chrysogenum* induce resistance against *Fusarium* wilt of melon[J]. *Phytoparasitica*, 2001, 29: 421-430.
- [5] Dong H Z, Cohen Y. Dry mycelium of *Penicillium chrysogenum* induces resistance against *Verticillium* wilt and enhances growth of cotton plants[J]. *Phytoparasitica*, 2002, 30: 147-157.
- [6] Thuering B, Felix G, Binder A, et al. An extract of *Penicillium chrysogenum* elicits early defense-related responses and induces resistance in *Arabidopsis thaliana* independently of known signalling pathways[J]. *Physiol Mol Plant Pathol*, 2006, 67: 180-193.
- [7] Chen S Y, Dong H Z, Fan Y Q, et al. Dry mycelium of *Penicillium chrysogenum* induces expression of pathogenesis - related protein genes and resistance against wilt diseases in Bt transgenic cotton[J]. *Biol Control*, 2006, 39: 460-464.
- [8] Xu C L, Zeng R, Ruan C S, et al. Study on the control of tobacco black shank by using dry mycelium of *Penicillium chrysogenum*[J]. *J Life Sci*, 2010, 4: 1-6.
- [9] 杨新成, 端永明, 王晓霞, 等. 青霉菌灭活菌丝体对烤烟漂浮育苗生长和抵抗烟草花叶病的影响[J]. 云南农业大学学报: 自然科学版, 2013 (2): 169-174.
- [10] Diatchenko L, Lau Y F, Campbell A P, et al. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes

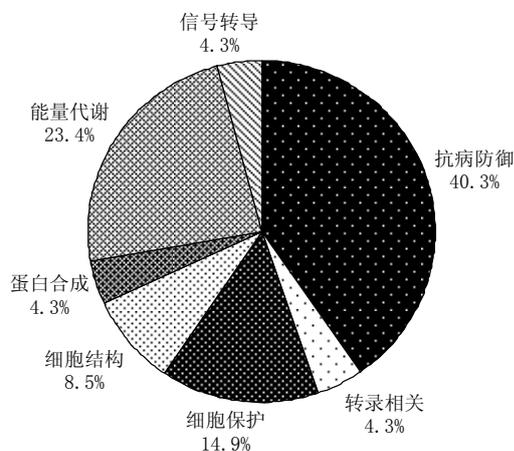


图 5 cDNA 文库 Blastx 比对结果

Fig. 5 The result of Blastx

- and libraries[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(12): 6025-6030.
- [11] Diatchenko L, Lukyanov S, Lau Y F, et al. Suppression subtractive hybridization: a versatile method for identifying differentially expressed genes[J]. Methods Enzymol, 1999, 303: 349-380.
- [12] Chacon O, Hernandez I, Portieles R, et al. Identification of defense-related genes in tobacco responding to black shank disease[J]. Plant Sci, 2009, 177: 175-180.
- [13] Faiver R O, Cardle L, Marshall D, et al. Changes in gene expression during meristem activation processes in *Solanum tuberosum* with a focus on the regulation of an auxin response factor gene[J]. J Exp Bot, 2004, 55(397): 613-622.
- [14] 李立芹, 鲁黎明. 抑制性消减杂交技术 (SSH) 及其在烟草生物学研究中的应用[J]. 中国烟草科学, 2011, 32(3): 89-94.
- [15] Mauch-Main B, Flors V. The ATAF1 transcription factor: At the convergence point of ABA-dependent plant defense against biotic and abiotic stresses[J]. Cell Res, 2009, 19(12): 1322-1323.
- [16] Pieterse C M J, Leon-Reyes A, Van der Ent S, et al. Networking by small-molecule hormones in plant immunity[J]. Nat Chem Biol, 2009, 5(5): 308-316.
- [17] 王磊, 宿红艳, 王昌留, 等. ADP 核糖基化因子的结构及其功能机制[J]. 细胞生物学杂志, 2007, 29(5): 675-681.
- [18] Song J T, Lu H, Greenberg J T. Divergent roles in *Arabidopsis thaliana* development and defense of two homologous genes, ABERRANT GROWTH AND DEATH2 and AGD2-LIKE DEFENSE RESPONSE PROTEIN1, encoding novel aminotransferases[J]. The Plant Cell, 2004, 16(2): 353-366.
- [19] Tena G, Boudsocq M, Sheen J. Protein kinase signaling networks in plant innate immunity[J]. Curr Opin Plant Biol, 2011, 14: 519-529.
- [20] 张春宝, 赵丽梅, 赵洪锟, 等. 植物蛋白激酶研究进展[J]. 生物技术通报, 2011(10): 17-23.
- [21] 王利军, 战吉成, 黄卫东. 水杨酸与植物抗逆性[J]. 植物生理学通讯, 2002, 38(6): 619-622.
- [22] Kyaing M S, 顾立江, 程红梅. 植物中硝酸还原酶和亚硝酸还原酶的作用[J]. 生物技术进展. 2011, 1(3): 159-164.
- [23] 田华, 段美洋, 王兰. 植物硝酸还原酶功能的研究进展[J]. 中国农学通报, 2009, 25(10): 96-99.
- [24] 严金平, 杨华. 泛素化修饰与植物免疫应答[J]. 生物技术通报, 2011(2): 18-22.
- [25] 李文君, 谷硕, 金岚, 等. 植物谷胱甘肽磷脂氢过氧化物酶基因的筛查[J]. 清华大学学报, 2000, 40(11): 12-14.
- [26] Milla M, Maurer A, Huete A R. Glutathione peroxidase genes in *Arabidopsis* are ubiquitous and regulated by abiotic stresses through diverse signaling pathways[J]. Plant J, 2003, 36: 602-615.