

稻瘟病抗性基因 *Pi63* 启动子 4 个构建体的表达及抗性分析

徐 鑫 郭旭梦* 刘松青 王晓婉 梁华兵 马克恩 韦明英

(中南民族大学 生命科学学院 武陵山区特色资源植物种质保护与利用湖北省重点实验室,
生物技术国家民委重点实验室 武汉 430074)

摘 要 利用农杆菌介导法获得带有不同长度启动子区域的稻瘟病抗性基因 *Pi63* 全长基因的转基因水稻,并采用实时荧光定量 PCR 方法鉴定了 T1 代阳性植株的基因拷贝数,进一步测定了单拷贝转基因植株在接种稻瘟病菌前后 *Pi63* 基因的表达量变化.结果表明:接种后 4 个分别带有不同长度启动子的 *Pi63* 转基因植物 T1 代中 *Pi63* 基因的表达量均升高,其抗病相关的顺式作用元件处于 P1 与 P2 中间的区域,P0 到 P1 的区域存在负调控元件.此结果可为进一步揭示水稻稻瘟病抗性基因 *Pi63* 的分子机理奠定基础.

关键词 水稻; 稻瘟病抗性; *Pi63* 基因; 表达分析

中图分类号 S432.1 文献标识码 A 文章编号 1672-4321(2018)02-0036-05

Expression and Resistance Analysis of the Rice Blast Resistance *Pi63* Gene Driven by Four *Pi63* Promoter Constructs

Xu Xin Guo Xumeng, Liu Songqing, Wang Xiaowan, Liang Huabing, Ma Keen, Wei Mingyin

(Hubei Provincial Key Laboratory for Protection and Application of Special Plant Germplasm in Wuling Area of China, Key Lab for Biotechnology of State Ethnic Affairs Commission, College of Life Science, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China)

Abstract Agrobacterium-mediated rice transformation was performed to obtain transgenic plants which have the the full length of rice blast resistance gene *Pi63* with different cis-acting elements. The copy numbers of target gene in T1 progeny were identified by qPCR. Those T1 plants with single copy number of target gene were inoculated with blast fungus and the expression of *Pi63* gene was detected before and after inoculation. The results showed that all of the expression levels of *Pi63* gene with the 4 different cis-acting elements were higher after inoculation. The differential expression level indicated that cis-acting elements response to inoculation is at the region between P1 and P2 and negative elements is at the region between P0 and P1. The results may lay the foundation for revealing the molecular mechanism of rice blast resistance gene *Pi63*.

Keywords rice; rice blast resistance; *Pi63* gene; expression analysis

水稻是世界上约一半人的主食.近几十年来,尽管由于高产品种的研发和栽培技术的改进等使水稻产量翻倍,但仍不能满足全球日益增加的对水稻的需要^[1].稻瘟病是影响所有水稻产区的严重病害,不但会导致水稻产量降低 10%~30%,并且降低稻米品质.在常用控制疾病的方法中,宿主抗性的应用是最经济和最环保的方法^[2].水稻稻瘟病抗性

通常分为真性抗性(也称作完全抗性或者质量抗性)和田间抗性(也称作部分抗性或者数量抗性).稻瘟病抗性基因 *Pi63* 来源于日本九州的陆稻品种“Kahei”,该基因有非常强的田间抗性^[3].初步研究表明, *Pi63* 的抗性与其表达量成正相关^[4].

为研究 *Pi63* 的表达调控机制,前期研究中利用生物信息学分析了 *Pi63* 的启动子区域和抗病相关

收稿日期 2018-01-19 * 通讯作者 郭旭梦,研究方向:遗传学, E-mail: 1056623859@qq.com

作者简介 徐鑫(1978-)男,副教授,研究方向:遗传学, E-mail: xinxu@mail.scuec.edu.cn

基金项目 湖北省自然科学基金资助项目(2018CFB476);中央高校专项基金资助项目(CZP17089)

顺式作用元件的位置及分布,根据预测构建了 4 个不同长度的启动子区域^[5]。在此基础上,将这些启动子缺失体连接 *Pi63* 全长基因并转化植物双元表达载体 pMDC99。

遗传转化是作物改良和新基因功能鉴定的常用方法,但目的基因的表达水平和遗传稳定性与转基因植物的外源基因的拷贝数有很大的关系。因此,筛选出单拷贝或拷贝数少的转基因株系对开展进一步的研究和应用显得尤为重要。传统的转基因植株拷贝数检测采用 Southern 杂交法,但该方法费时费力,要用到放射性同位素等具有潜在危险的药品^[6]。近年来高通量、快速、灵敏的定量 PCR (qPCR) 方法成为科研人员青睐的检测方法之一^[7]。

本研究利用农杆菌介导法获得带有不同长度的启动子区域的 *Pi63* 全长基因的转基因水稻,选择蔗糖磷酸合成酶基因(*SPS*) 作为内源参照基因进行拷贝数估算,通过 qPCR 法检测转基因植株中 *Pi63* 基因的拷贝数。进一步将单拷贝植株接种稻瘟病菌种 007,比较接种前后 *Pi63* 基因的表达量变化,分析顺式作用元件之间的相互作用以及对 *Pi63* 抗性的影响。

1 材料与方 法

1.1 材 料

植物双元表达载体为 pMDC99-P0、pMDC99-P1、pMDC99-P2 和 pMDC99-P3; 稻瘟病菌株为标准菌株 007; 转基因受体水稻品种为日本晴。

1.2 试 剂

rTaq 酶、DNA 分子量 Marker、反转录试剂盒、SYBR Premix Ex Taq 和其他分子生物学试剂均购自大连宝生物公司。

1.3 方 法

1.3.1 水稻遗传转化

按照文献[8]的方法,用农杆菌介导法对 4 个表达载体进行日本晴水稻的遗传转化。

1.3.2 转基因植株阳性鉴定

水稻 DNA 提取采用 CTAB 法^[9]。转基因植株阳性鉴定引物见表 1。PCR 反应程序: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 57 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 1 min, 34 个循环; 72 °C 延伸 10 min; 4 °C 保存。PCR 反应体系为 15 μ L, 上下游引物(10 μ mol / L) 各 0.1 μ L, DNA 模板(30 ng / μ L) 2 μ L。

表 1 PCR 引物序列

Tab. 1 Primers sequences of PCR

引物编号	引物名称	引物序列(5'-3')
1	Pi63-5'-u-pst p0	CATTAGCGTAGCTACTGAGCC
2	Pi63-5'-u-pst p1	GCCATTACTGTGGATTGTGG
3	Pi63-5'-u-pst p2	CCTTGTTCAGCACTAGAGAGC
4	Pi63-5'-u-pst p3	GGTGGAGCTGTAGCATAACG
5	POP1VR	CTCGAACACATGCTACATGG
6	P2P3VR	GGAATTGACTTGGAAAGTTGG
7	SPS-qHG-F	CCTCTTCTAGCATCGAGGTCAC
8	SPS-qHG-R	CTCCCCGACGATCAGATACATG
9	Pi63-Copy-F	CTAGTCGCCTCAACCATGTGA
10	Pi63-Copy-R	AGGTCTGTGATTCTTCGAGGC
11	RUBQ1-F	GGAGCTGCTGCTGTCTAGG
12	RUBQ1-R	TTCAGACACCATCAAACCAGA
13	Pi63-F	TCAATGAAGTAAGGCTAACCGT
14	Pi63-R	TACTGTCCCTGTCTTCCCACA

1.3.3 转基因 T₁ 代植株拷贝数鉴定

将 P0、P1、P2、P3 转基因水稻 T₁ 代植株的阳性苗利用 CTAB 法提取 DNA, 每个样品 3 个重复。利用实时荧光定量 PCR 法检测转基因水稻外源基因拷贝数^[10]。引物 SPS-qHG-F 和 SPS-qHG-R 为内参引物, Pi63-Copy-F 和 Pi63-Copy-R 为目的基因引物。实时荧光定量 PCR 反应程序: 采用两步法, 第一步, 95 °C 预变性 10 s; 第二步, 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火延伸 30 s, 同时在退火过程中检测荧光信号变化, 共进行 40 个循环。实时荧光定量 PCR 反应体系为 20 μ L: SYBR Premix Ex TaqTM (2 \times) 10 μ L, PCR 上下游引物(10 μ mol / L) 各 0.3 μ L, DNA 模板(30 ng / μ L) 2 μ L。

Pi63 启动子标准曲线的制作: 带有目的基因的质粒 DNA 做 5×10^9 、 5×10^8 、 5×10^7 、 5×10^6 、 5×10^5 、 5×10^4 倍稀释, 以这些稀释的 DNA 作为模版进行实时荧光定量 PCR 反应, 得到各梯度的 *C_t* 值。SPS 基因标准曲线的制作是以水稻基因组 DNA 做 2×10^5 、 2×10^4 、 2×10^3 、 2×10^2 、 2×10^1 的梯度稀释, 以稀释后的 DNA 作为实时荧光定量 PCR 的模版。以 SPS 基因和 *Pi63* 启动子的扩增 *C_t* 值为纵坐标, 以起始模版数(*S₀* 和 *C₀*) 的常用对数为横坐标, 绘制 SPS 基因和 *Pi63* 启动子的实时荧光定量 PCR 标准曲线图。

1.3.4 T₁ 代转基因植株目的基因的拷贝数计算

由 1.3.3 测得的样品的 *C_t* 值, 并由方程 $S_0 = 10^{-(C_t - 44.687) / 3.8017}$ 计算出该样品的 SPS 基因的起始模版数, 并由方程 $C_0 = 10^{-(C_t - 31.445) / 2.0357}$ 计算出该样品的 *Pi63* 启动子的起始模版数。

1.3.5 转基因 T₁ 代植株表达量检测

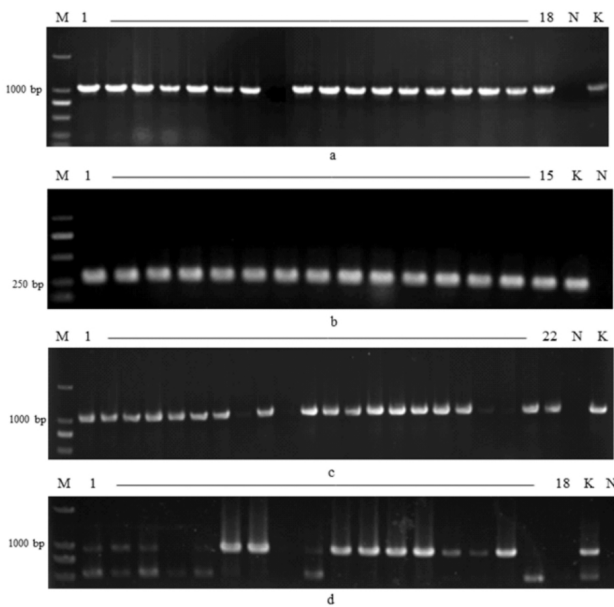
水稻种子播种在 30 cm \times 20 cm \times 5 cm 的盆中, 放在温室培养。共 7 排, 每排 15~20 株。稻瘟病 007

菌种孢子在水稻幼苗 4 叶期接种. 接种前取第 3 片叶片用于提取 RNA 并反转录检测接种前 *Pi63* 基因表达量. 使用喷枪将 20 mL 孢子悬浮液 (10^5 个孢子/mL) 分别喷到每盆水稻上, 放置于相对湿度 95%~100% 和温度的 28 °C 的黑暗接种箱中保持 24 h. 接种后转移到 28 °C 的温室, 7 d 后取样. 选取病斑严重的第 3 片叶片用于提取 RNA 并反转录后检测接种后表达量. RNA 提取方法参照文献 [11]. 引物 RUBQ1-F 和 RUBQ1-R 为内参引物, *Pi63*-F 和 *Pi63*-R 为目的基因引物. 实时荧光定量 PCR 反应程序参见 1.3.3.

2 结果

2.1 转基因 T_1 代植株的阳性鉴定

对不同长度的启动子连接 *Pi63* 全长基因(分别命名为 P0、P1、P2、P3) 的 T_1 代转基因植株进行阳性鉴定. P0 的 PCR 扩增目的条带长度为 1027 bp(图 1-a), 鉴定得到 17 棵阳性苗; P1 的 PCR 扩增目的条带长度为 278 bp(图 1-b), 鉴定得到 15 棵阳性苗, P2 的 PCR 扩增目的条带长度为 1131 bp(图 1-c), 鉴定得到 18 棵阳性苗; P3 的 PCR 扩增目的条带为 915 bp(图 1-d), 鉴定得到 17 棵阳性苗.



a) P0; b) P1; c) P2; d) P3
M 为分子标记 DL2000; 数字为转基因植株编号;
N 为阴性对照日本晴; K 为阳性对照 Kahei

图 1 T_1 代转基因植株的阳性鉴定

Fig.1 Identification of T_1 transgenic plants

2.2 转基因植株拷贝数鉴定

2.2.1 标准曲线制作

SPS 基因和 *Pi63* 启动子的实时荧光定量 PCR 标准曲线图如图 2. a 图是 *SPS* 基因标准曲线图, b 图是 *Pi63* 启动子标准曲线图. 从中得到相关性方程 $S_0 = 10^{-(Ct-44.687)/3.8017}$; $C_0 = 10^{-(Ct-31.445)/2.0326}$. *SPS* 基因标准曲线的相关系数为 $R^2 = 0.9922$, *Pi63* 启动子标准曲线的相关系数为 $R^2 = 0.9978$, 相关性高.

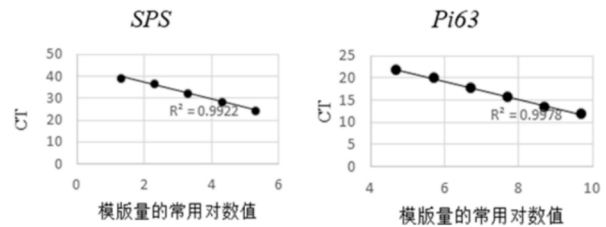


图 2 *SPS* 和 *Pi63* 启动子标准曲线图

Fig.2 The standard curve of *SPS* and *Pi63* promoter

2.2.2 T_1 代转基因植株目的基因的拷贝数计算

由 2.2.1 得到的相关性方程计算出 *SPS* 基因的起始模板数和样品的 *Pi63* 启动子的起始模板数. 由于水稻内参基因 *SPS* 是纯合二倍体, 因此 *Pi63* 启动子的起始模板数除以 *SPS* 基因的起始模板数, 再乘以 2 就是目的基因在水稻中基因组中的拷贝数. 其中 P0 有 7 个单拷贝, 2 个假阳性; P1 有 4 个单拷贝, 1 个假阳性; P2 有 7 个单拷贝, 2 个假阳性; P3 有 8 个单拷贝, 1 个假阳性(表 2).

表 2 转基因植株目的基因拷贝数的估算

Tab.2 Estimation of copy number of target gene in each transgenic line

株系	$2 \times C_0/S_0$	拷贝数	株系	$2 \times C_0/S_0$	拷贝数
p0-17-5	2.053+/-0.021	2	p1-1-2	1.041+/-0.091	1
p0-17-6	3.169+/-0.001	3	p1-1-3	0.992+/-0.002	1
p0-12-5	3.942+/-0.043	4	p1-1-4	1.109+/-0.056	1
p0-12-3	1.232+/-0.101	1	p1-1-5	0.959+/-0.033	1
p0-10-4	1.235+/-0.035	1	p1-1-7	0.111+/-0.082	0
p0-7-6	4.176+/-0.078	4	p1-6-3	3.145+/-0.065	3
p0-7-3	1.130+/-0.019	1	p1-6-4	3.150+/-0.082	3
p0-9-1	6.977+/-0.089	7	p1-15-2	3.942+/-0.071	4
p0-9-2	7.158+/-0.031	7	p1-15-6	2.053+/-0.006	2
p0-19-1	3.141+/-0.113	3	p1-17-3	4.058+/-0.104	4
p0-18-2	1.134+/-0.051	1	p1-17-5	4.186+/-0.021	4
p0-21-4	2.844+/-0.059	3	p1-20-6	2.260+/-0.093	2
p0-20-2	0.370+/-0.082	0	p1-25-1	5.160+/-0.031	5
p0-20-3	1.184+/-0.204	1	p1-25-2	5.223+/-0.074	5
p0-20-4	1.252+/-0.044	1	p1-23-5	4.097+/-0.052	4
p0-14-2	1.017+/-0.010	1	p0-20-7	0.178+/-0.073	0
p2-18-4	2.031+/-0.062	2	p3-2-1	0.926+/-0.051	1
p2-18-3	1.289+/-0.013	1	p3-2-3	0.893+/-0.005	1
p2-18-2	0.993+/-0.078	1	p3-2-4	1.104+/-0.094	1
p2-6-2	4.099+/-0.057	4	p3-5-1	0.549+/-0.082	0
p2-5-5	2.057+/-0.012	2	p3-5-3	0.904+/-0.074	1
p2-5-4	1.915+/-0.004	2	p3-5-4	2.295+/-0.045	2
p2-5-3	2.167+/-0.031	2	p3-5-6	1.045+/-0.072	1

株系	$2 \times C_0 / S_0$	拷贝数	株系	$2 \times C_0 / S_0$	拷贝数
p2-4-5	0.945+/-0.095	1	p3-8-1	10.525+/-0.061	10
p2-4-4	1.966+/-0.109	2	p3-9-2	2.047+/-0.083	2
p2-4-3	0.912+/-0.035	1	p3-9-3	0.917+/-0.071	1
p2-3-4	0.059+/-0.076	0	p3-10-1	2.276+/-0.052	2
p2-3-5	2.196+/-0.049	2	p3-10-2	0.920+/-0.088	1
p2-2-1	3.158+/-0.029	3	p3-10-3	1.190+/-0.069	1
p2-25-2	4.880+/-0.051	5	p3-1-6	8.279+/-0.094	8
p2-1-7	0.996+/-0.043	1	p3-1-2	4.263+/-0.003	4
p2-1-6	1.067+/-0.092	1	p3-1-3	4.198+/-0.104	4
p2-1-1	0.654+/-0.077	0	p3-1-4	8.104+/-0.009	8
p2-10-3	1.143+/-0.028	1			

2.3 转基因 T_1 代植株接种稻瘟病菌株前后 *Pi63* 基因表达量变化

如图 3, 接种 007 菌种 7 d 后 P1 的启动能力最强, *Pi63* 基因表达量比其他 3 个缺失体的都高, 其次是 P0, P2 和 P3 的启动能力最弱. 比较接种前后表达量的变化, 可以看出 P1 在稻瘟病菌种诱导后表达量增加最多, 其次是 P0, 而 P2 和 P3 在稻瘟病诱导前后表达量变化不明显. 推测可能是抗病相关的顺式作用元件处于 P1 与 P2 中间的区域, P0 到 P1 的区域存在负调控元件.

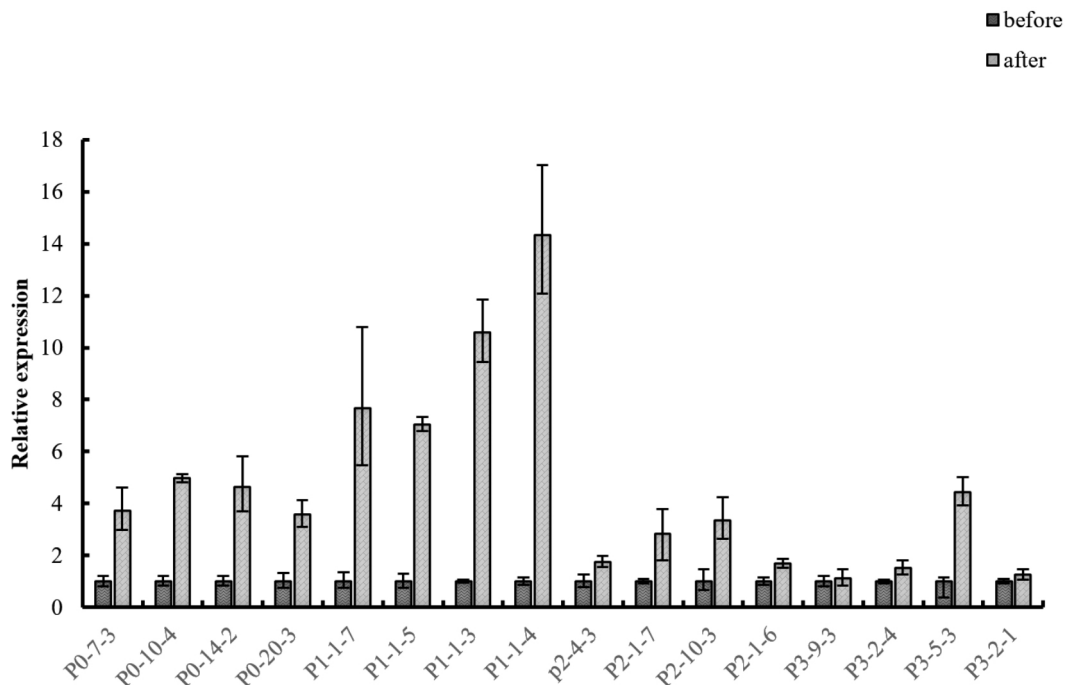


图 3 T_1 代转基因植株接种 007 菌株前后 *Pi63* 表达量比较

Fig.3 Expression of *Pi63* in T_1 progeny before and after inoculation with fungus strain 007

3 讨论

通常转基因受体植物中整合拷贝数为 1~2 的外源基因有较高的表达水平, 而整合拷贝数较高的外源基因则会因出现基因沉默现象导致表达水平较低^[12]. 为排除定量 PCR 法鉴定拷贝数实验过程中微小的变化对结果的可能影响, 本研究中设置了多个重复来比较验证, 用外源基因的 *Ct* 值减去内标准基因的 *Ct* 值, 将样品 DNA 浓度均一化^[3], 保证了结果的准确性. 本研究中转基因材料为 T_1 代转基因植株, 拷贝数鉴定结果不能准确区分纯合单拷贝和杂合双拷贝, 因此我们均选用杂合单拷贝用于后续基因表达量的分析.

植物的抗病能力与顺式作用元件的调控密切相

关. 如脱落酸的信号通路正负调控因子 WRKY 蛋白特异性结合含有 TGAC 序列的顺式作用元件^[14, 15]; 作为 WRKY 家族成员的 WRKY45 在真菌以及细菌引起的植物病理反应中也起着很重要的抗性作用^[16]. 实验结果表明 P1 与 P2 中间的区域存在抗病相关的正调控, P0 到 P1 的区域存在负调控元件, 而整体分布在启动子前端的是 GCCCORE 和 CATATGMSAUR 分布在启动子末端的是 CPBCSPOR, 是否是这几个顺式作用元件存在的位置和顺式作用元件的相互影响来共同调控启动子的启动抗病能力还需进一步验证. LUO 等研究表明如 BIHD1OS 顺式作用元件是 OsBIHD1 的结合位点, OsBIHD1 能激活 *BTH* 基因进而调控植物抗病反应^[17], 是否 *Pi63* 的启动子顺式作用元件之间也有类似的相互作用还待进一步研究.

参 考 文 献

- [1] Khush G S. What it will take to feed 5.0 billion rice consumers in 2030 [J]. *Plant Molecular Biology*, 2005, 59(1): 1-6.
- [2] McDowell J M, Woffenden B J. Plant disease resistance genes: recent insights and potential applications [J]. *Trends in Biotechnology*, 2003, 21(4): 178-183.
- [3] Xu X, Chen H, Fujimura T, et al. Fine mapping of a strong QTL of field resistance against rice blast, *Pikahei-1 (t)*, from upland rice Kahei, utilizing a novel resistance evaluation system in the greenhouse [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2008, 117(6): 997-1008.
- [4] Bryan G T, Wu K S, Farrall L, et al. A single amino acid difference distinguishes resistant and susceptible alleles of the rice blast resistance gene *Pi-ta* [J]. *The Plant Cell* 2000, 12(11): 2033-2045.
- [5] 梁华兵, 王晓婉, 胡晓岚, 等. 水稻稻瘟病抗病基因 *Pi63* 顺式作用元件调控元件的载体构建 [J]. *中国农学通报*, 2015, 31(30): 220-224.
- [6] Weng H B, Pan A H, Yang L T, et al. Estimating number of transgene copies in transgenic rapeseed by real-time PCR assay with HMG I / Y as an endogenous reference gene [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2004, 22: 289-300.
- [7] Ji W, Zhou W L, Abruzzese R, et al. A method for determining zygosity of transgenic zebrafish by TaqMan real-time PCR [J]. *Analytical Biochemistry*, 2005, 344: 240-246.
- [8] 吴云华, 邓欢. 尖镰孢菌细胞色素 *P450 55a1* 基因超表达载体的构建和水稻日本晴遗传转化 [J]. *中南民族大学学报(自然科学版)*, 2014, 33(2): 32-35.
- [9] 林强, 邱长玉, 朱方容, 等. 两种桑树基因组 DNA 提取方法的比较研究 [J]. *广西蚕业*, 2011, 48(2): 1-5.
- [10] 王育花, 赵森, 陈芬, 等. 利用实时荧光定量 PCR 法检测转基因水稻外源基因拷贝数的研究 [J]. *生命科学研究*, 2007, 11(4): 301-305.
- [11] 吴云华, 肖虔. 重组拟南芥细胞色素 *P450 707A3* 在大肠杆菌中的原核表达 [J]. *中南民族大学学报(自然科学版)*, 2017, 36(1): 28-31.
- [12] Mason G, Provero P, Vaira A M, et al. Estimating the number of integrations in transformed plants by quantitative real-time PCR [J]. *BMC Biotechnol*, 2002, 2(1): 1-10.
- [13] 张丽, 刘丽丽, 梁晓声, 等. 实时定量 PCR 鉴定转基因作物纯合体 [J]. *中南民族大学学报(自然科学版)*, 2015, (1): 43-46.
- [14] Eulgem T, Rushton P J, Schmelzer E, et al. Early nuclear events in plant defence signalling: rapid gene activation by WRKY transcription factors [J]. *The EMBO Journal*, 1999, 18(17): 4689-4699.
- [15] Eulgem T, Rushton P J, Robatzek S, et al. The WRKY superfamily of plant transcription factors [J]. *Trends in Plant Science*, 2000, 5(5): 199-206.
- [16] Shimono M, Koga H, Akagi A Y A, et al. Rice WRKY45 plays important roles in fungal and bacterial disease resistance [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2012, 13(1): 83-94.
- [17] Luo H, Song F, Goodman R M, et al. Up Regulation of OsBIHD1, a rice gene encoding BELL homeodomain transcriptional factor, in disease resistance responses [J]. *Plant Biology*, 2005, 7(5): 459-468.

(责任编辑 姚春娜)