

# 玉米萜类植保素代谢关键基因对小斑病侵染的防御响应分析

李珂, 马良, 杜鹏飞, 王强\*

(四川农业大学 农学院, 成都 611130)

**摘要:** 该研究选用小斑病差异抗性的玉米自交系 Mo17(较抗)、“郑 58”(中抗)和“吉 419”(感), 分别于接种小斑病病原菌玉蜀黍平脐孺胞(*Cochliobolus heterostrophus*) 0、6、12、24、36 和 48 h 时采集接种叶片为材料, 采用半定量和实时荧光定量 PCR 技术, 检测倍半萜植保素 Zealexin 生物合成关键基因(*TPS6*、*TPS11*)、二萜植保素 Kauralexin 代谢关键基因 *An2* 以及茉莉酸合成关键基因 *AOC* 的表达模式, 为阐明不同抗性品种对玉米小斑病的差异防御机制提供理论依据。结果显示: 接种小斑病病原菌后, 抗病自交系 Mo17 中 *TPS6*、*TPS11* 基因表达诱导不显著, *An2* 基因表达迅速增加, *AOC* 基因于接种 12 h 后表达明显上调。“郑 58”中 *TPS6*、*TPS11* 基因被快速诱导, 在接种 24 h 时表达量达到最大, *An2* 基因表达逐渐增加但差异不显著, *AOC* 基因表达量于接种 6 h 后显著增加; 感病自交系“吉 419”中 *TPS6*、*TPS11*、*An2* 基因在接种 24 h 后才显著上调, 明显比抗性自交系缓慢, *AOC* 基因表达先呈现递减的趋势然后上升, 在 24 h 表达量最高并持续到 48 h。研究表明, 两类植保素代谢在玉米小斑病防御中具有不同的时间应答模式, 但都受到茉莉酸介导。感病自交系中植保素代谢防御响应较慢, 而抗病自交系中响应较快, 符合其抗性差异。

**关键词:** 玉米; 萜类植保素; 关键基因; 小斑病; 防御响应

中图分类号: Q789

文献标志码: A

## Gene Expression of Maize Terpenoid Phytoalexin Metabolism in Response to Southern Leaf Blight

LI Ke, MA Liang, DU Pengfei, WANG Qiang\*

(College of Agronomy, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China)

**Abstract:** In this study, different disease-resistant inbred lines of maize, Mo17 (high), Zheng58 (medium), Ji419 (low), were inoculated with the pathogen spore of southern leaf blight, *C. heterostrophus*, for 0, 6, 12, 24, 36 and 48 hours. Through semi-quantitative and real-time PCR technology, the expression patterns of some key genes were explored in response to pathogen infection, including *TPS6* and *TPS11* for sesquiterpenoid phytoalexin Zealexin biosynthesis, *An2* for diterpenoid phytoalexin Kauralexin biosynthesis, and *AOC*, the key gene of jasmonic acid (JA) metabolism. The results were followed: *TPS6* and *TPS11* gene expression in Mo17 were not induced significantly while the gene accumulation of *An2* increased rapidly after inoculation. In the mean time, *AOC* gene expression was significantly increased after inoculation for 12 h in Mo17. *TPS6* and *TPS11* gene expression in Zheng58 increased rapidly, and reached the highest at 24 h. The *An2* gene expression gradually increased, but the difference was not significant. The *AOC* gene expression increased significantly after inoculation for 6 h. The *TPS6*, *TPS11* and *An2* of Ji419 were upregulated in 24 h, slower than that in other two lines, and *AOC* gene expression showed a decreasing trend in the ear-

收稿日期: 2015-04-20; 修改稿收到日期: 2015-07-14

基金项目: 四川省杰出青年基金(2014JQ0038); 四川农业大学国家级大学生创新训练计划(201410626010)

作者简介: 李珂(1993—), 女, 在读本科生, 主要从事玉米次生代谢与病害防御响应研究。E-mail: like9302@163.com

\* 通信作者: 王强, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事作物次生代谢调控与分子育种研究。E-mail: qwang@sicau.edu.cn

ly phase and reached the highest levels at 24 h and 48 h. These results indicated that two types of terpenoid phytoalexins exhibited different metabolic response temporally in response to *C. heterostrophus* inoculation, but both were mediated with JA signal. The defense response mediated by metabolism of terpenoid phytoalexin was faster in resistant inbred line than that in the susceptible one, which is consistent with their resistance difference. Investigation of the defense response for terpenes phytoalexin metabolic genes provided an important theoretical basis for clarifying the defense mechanisms of maize varieties with different resistance against southern leaf blight.

**Key words:** maize; terpenoid phytoalexin; key gene; southern leaf blight; defense response

玉米小斑病是玉米的常见病害,喜温暖潮湿的环境,在世界各个玉米产区都有发生。该病是由玉蜀黍平脐囊胞引起的真菌性病害<sup>[1]</sup>,病原菌以菌丝或分生孢子在病株残体外越冬,菌丝发育温度范围在 10~35 °C,适温为 28~30 °C, pH 2.6~10.0,最适 pH 8.7<sup>[2]</sup>。玉米小斑病主要发生在叶部,叶片被害后,叶片组织光合机能受影响,一般造成 15%~20%的减产,严重时可达 50%以上<sup>[3]</sup>。植保素为植物受到病原菌侵染后产生的具有物种特异性的次生代谢产物,具有广谱抑菌活性,积极参与植物的生物防御响应。2011 年,玉米中发现了两类植保素 Zealexin<sup>[4]</sup>和 Kauralexin<sup>[5]</sup>,分别为倍半萜和二萜化合物,具有对禾谷镰刀菌、黄曲霉菌、炭疽菌和小孢根霉的抑菌活性,也能被这些病原菌侵染诱导积累。这两类萜类植保素分别由母体倍半萜( $\beta$ -macrocarpene)和二萜(异)贝壳杉烯[*ent*-(iso)kaurene]经过氧化修饰而来,其代谢关键基因为 *TPS6*、*TPS11* 和 *An2*,分别编码萜类合成酶催化  $\beta$ -macrocarpene 和(异)贝壳杉烯的产生<sup>[6-7]</sup>。已有研究表明,这些代谢关键基因同样能够被病原菌侵染所诱导表达,和玉米萜类植保素的诱导积累呈正相关性<sup>[4-5]</sup>,可以作为指纹基因分析这两类植保素的积累情况。植物对生物胁迫的响应往往依赖植物激素的参与和调控,外源施加茉莉酸和乙烯能够协同诱导 Zealexin 和 Kauralexin 的产生<sup>[4-5]</sup>,推测这两类植保素的生物合成受茉莉酸和乙烯的调控。有报道表明茉莉酸甲酯能够诱导水稻、葡萄、高粱等多种植物中植保素的积累<sup>[8]</sup>,显示茉莉酸介导的植保素代谢机制广泛存在于高等植物中。

虽然现有研究发现 Zealexin 和 Kauralexin 能够被多种病原菌诱导所积累,参与生物胁迫防御响应<sup>[4-5]</sup>,但在玉米小斑病防御响应中的角色并不清楚,茉莉酸是否参与其中、这两类植保素是否与各个自交系的不同抗病性有关也亟待深入研究。本研究通过分析不同抗性自交系被小斑病病原菌侵染后 Zealexin、Kauralexin 和茉莉酸生物合成关键基因的表达模式,为阐明萜类植保素参与小斑病防御响应

的机理奠定基础,也为抗性育种提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料及处理

根据以往研究<sup>[9]</sup>,本研究使用对小斑病具有不同抗性的 3 个玉米自交系 Mo17(较抗)、“郑 58”(中抗)、“吉 419”(感)作为研究材料。各取 10 粒饱满种子,经氯化汞(1%)表面消毒,在培养箱发芽后播种于装有高温灭菌土壤的培养钵中,每个自交系种植 10 盆,每盆 1 株,放于温室中培养生长。玉米小斑病病原菌用 PDA 培养基,28 °C 恒温培养,待菌落铺满平板,用无菌水将病原菌分生孢子洗下,用 0.1%吐温-20 无菌水配成浓度为每毫升  $10^5$  个孢子的悬浮液。当玉米生长到 21~28 d 时,采用喷雾接种法将孢子悬浮液喷于植株表面,喷雾后将玉米苗套袋保湿。玉米接种小斑病病原菌后的 0、6、12、24、36 和 48 h,以 0 h 为对照,取对照组和处理组玉米相同部位叶片 0.5~1.0 g,液氮研磨成粉末于一 80 °C 保存,取材过程中观察有无病斑产生并记录。玉米自交系叶片总 RNA 采用 Trizol 方法提取,并用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性,用 Nanodrop2000 测定浓度。

### 1.2 *An2* 基因表达的 RT-PCR 分析

质量检测合格的 RNA 使用宝生物的 M-MLV 反转录试剂盒按照说明进行反转录合成 cDNA。以 *Ef1 $\alpha$*  作为内参基因,根据 NCBI 数据库中 *Ef1 $\alpha$*  (GenBank 登录号 NM-001112465) 和 *An2* (GenBank 登录号 NM-001111787) 的基因序列,在 Primer 3 上设计特异性引物用于半定量 RT-PCR 分析(表 1)。其扩增条件为 95 °C 预变性 5 min,95 °C 变性 30 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min,30 个循环。内参基因和目的基因分别进行 PCR。扩增产物用 1%琼脂糖凝胶电泳检测, Gelred 染色照相。

### 1.3 *TPS6*、*TPS11*、*An2* 和 AOC 基因表达的 qRT-PCR 分析

为了定量分析玉米萜类植保素代谢关键基因表达情况,使用 Primer 3 在线软件设计荧光定量 PCR

表 1 RT-PCR 和 qRT-PCR 分析引物

Table 1 The primers for RT-PCR and qRT-PCR analysis

用途 Usage	引物 Primer	序列 Sequence	登录号 GenBank	代谢途径 Metabolic pathway
RT-PCR	<i>An2-F</i>	TGTTCTTGTGAAGGCAGTTC	NM-001111787	Kauralexins
	<i>An2-R</i>	TCATTTCGAGCTAAAAGCAGA		
qRT-PCR	<i>Ef1<math>\alpha</math>-F</i>	AGGCTGACTGTGCTGTCCTT	NM-001112465	延伸因子 Elongation factor
	<i>Ef1<math>\alpha</math>-R</i>	ACGTGCCTTGGAGTATTTGG		
	<i>TPS6-F</i>	TAATTGTGCCACGAACGGTA	NM-001112204	Zealexins
	<i>TPS6-R</i>	TGCCCTCTGGAGTAGTGCT		
	<i>TPS11-F</i>	AAGCTGAAATGCGACAAAGG	NM-001112480	Zealexins
	<i>TPS11-R</i>	AGTCGCTGCAGGGTGATAAT		
	<i>An2-F</i>	GATGATGAGCCATGTCGATG	NM-001111787	Kauralexins
	<i>An2-R</i>	GAAAGGTCTGCCTTGTCTCG		
	<i>AOC-F</i>	CTCATCAATTCCAGCCCAGG	NM-001111775	茉莉酸 Jasmonate
	<i>AOC-R</i>	TCGAAGAACCCTAAGCCATACA		

特异性引物,确保每对引物  $T_m$  值相同,在 60 °C 左右,引物 G+C 含量在 40%~60%,避免自我互补和 3'端重复的 G 或 C,扩增片段大小在 80~120 bp。以接种小斑病原菌不同时间后材料的 cDNA 作为模板,以 *Ef1 $\alpha$*  作为内参基因,使用 Bio-Rad 公司的 SsoFast Eva Green Supermix 试剂在 Bio-Rad CFX96 荧光定量 PCR 仪上进行检测。反应程序为 95 °C 预变性 3 min;95 °C 变性 15 s,55 °C 退火 15 s,72 °C 延伸 20 s,40 个循环,每个样品均设 3 个重复,采用仪器自带的 Bio-Rad CFX Manager 软件按  $2^{-\Delta Ct}$  法处理数据,使用 Origin 9 作图。*Ef1 $\alpha$*  引物同时用于半定量和定量 PCR。

## 2 结果与分析

### 2.1 小斑病病原菌诱导 *An2* 基因表达的 RT-PCR 分析

不同抗性玉米叶片中 *An2* 基因表达的半定量 RT-PCR 结果(图 1)显示,接种后 48 h 内,*An2* 基因表达呈现明显增加趋势,其中 Mo17 和‘吉 419’的 *An2* 表达呈先增后降再增加的趋势。接种 0~6 h 内,‘郑 58’叶片中未检测到 *An2* 的积累,接种 24 h 时 *An2* 有明显积累。接种后 48 h,Mo17、‘郑 58’和‘吉 419’的 *An2* 表达量达到高峰。半定量 RT-PCR 分析显示玉米萜类植保素代谢能够响应小斑病病原菌的侵染,不同抗性品种中 *An2* 均能被诱导表达,推动 Kauralexin 的诱导积累以参与对小斑病病原菌的防御。

### 2.2 小斑病病原菌诱导 *TPS6*、*TPS11*、*An2* 基因表达的 qRT-PCR 分析

上述的实验证明玉米萜类植保素代谢能够响应小斑病病原菌的侵染,为了准确分析各个自交系在

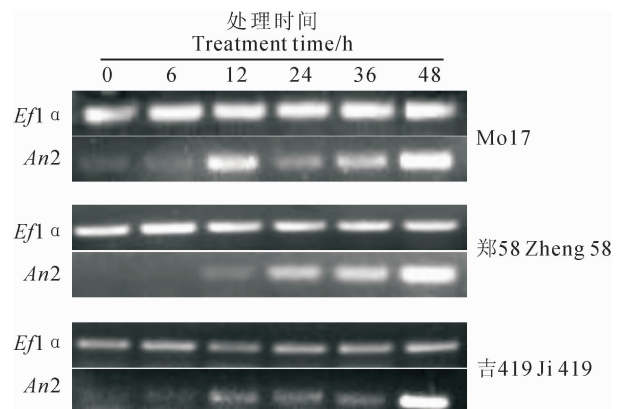


图 1 小斑病病原菌胁迫下 3 种不同抗性玉米自交系中 *An2* 基因表达的 RT-PCR 分析

Fig. 1 RT-PCR analysis of *An2* gene expression in three maize inbred lines in response to *C. heterostrophus* infection

小斑病病原菌侵染下萜类植保素的防御响应和代谢差异,运用实时荧光定量 PCR 检测 Zealexin 和 Kauralexin 生物合成的关键基因 *TPS6*、*TPS11*、*An2* 的表达模式。结果(图 2)显示,Mo17 中 *TPS6*、*TPS11* 基因基本不被诱导表达,甚至 *TPS11* 基因表达还有少许下调。‘郑 58’中 *TPS6* 基因表达量呈现先增加后减少的趋势,在小斑病病原菌侵染 12 h 后,*TPS6*、*TPS11* 基因表现出明显的上调趋势,在 24 h 时 2 个基因表达量达到最大。‘吉 419’中 *TPS6*、*TPS11* 基因表达量在侵染 12 h 后逐渐增加,但要慢于‘郑 58’,在 48 h 后才达到最大。相对于 *TPS6*、*TPS11*,‘吉 419’中 *An2* 基因诱导表达趋势明显,在侵染 24 h 后就达到最大,这与半定量 RT-PCR 结果有一定差异,表明后者结果的不确定性,需定量 PCR 进行准确分析。Mo17 的 *An2* 基因在侵染后的早期就被诱导表达,表明其具有对病原

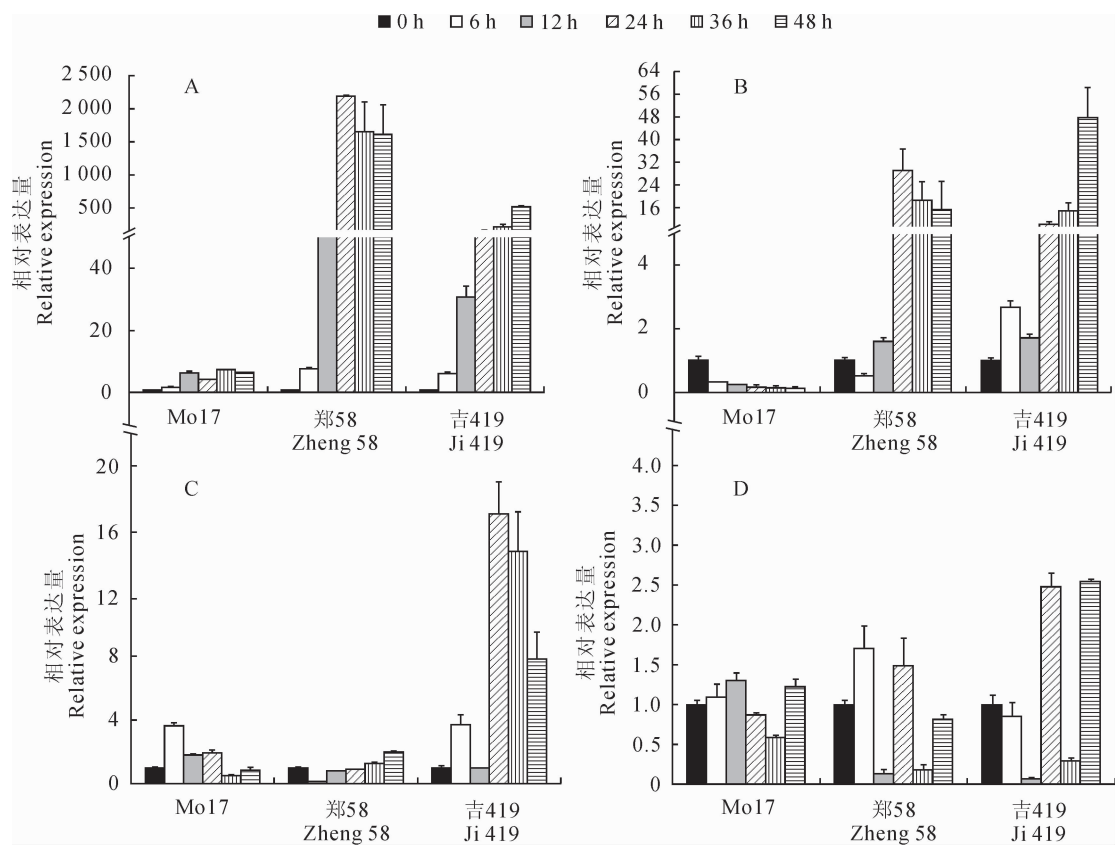


图2 玉米小斑病病原菌侵染下3种玉米自交系中 *TPS6*(A)、*TPS11*(B)、*An2*(C)和 *AOC*(D)基因表达定量分析

Fig. 2 qRT-PCR analysis of gene expression of *TPS6* (A), *TPS11* (B), *An2* (C) and *AOC* (D)

in three maize inbred lines in response to *C. heterostrophus* infection

菌侵染的快速响应机制。‘郑58’中 *An2* 基因尽管被诱导表达,但上升幅度不显著。总的来说,对于 *TPS6*、*TPS11*,‘郑58’基因诱导表达快于‘吉419’,而 Mo17 中 *TPS6*、*TPS11* 诱导不明显,但其本底表达高于其余2个自交系。而对于 *An2*, Mo17 中基因诱导表达明显快于另外2个自交系。

### 2.3 茉莉酸代谢关键基因 *AOC* 的 qRT-PCR 分析

茉莉酸广泛参与植物的胁迫响应,其生物合成关键基因 *AOC* 的表达情况能够反映出植物体内茉莉酸代谢情况及其对植物代谢的调控,结合植保素代谢基因的防御响应表达模式,能推测出茉莉酸和植保素代谢在生物胁迫防御中的关系。结果(图2, D)显示,接种小斑病病原菌后, Mo17 中 *AOC* 基因表达表现为先增加后减少再增加的趋势,在 12 h 表达量最大;‘郑58’中 *AOC* 基因表达量在 6 和 24 h 上调,12 h 基因表达量最低;‘吉419’中 *AOC* 基因表达有下调的趋势,在 12 h 基因表达量最低。随着侵染时间延长,‘吉419’中 *AOC* 基因表达量在 24 h 明显增加,差异显著,在 48 h 达到最高。

## 3 讨论

植物与环境长期相互作用下自身会形成一套精密的防御网络系统,比如诱导合成植保素、茉莉酸等小分子化合物参与生物或非生物胁迫应答。分析合成萜类植保素和防御激素茉莉酸关键基因的表达情况,对于研究不同抗性自交系/品种的次生代谢产物对玉米小斑病防御响应有重要意义。以往的研究已经确定玉米萜类植保素代谢关键基因的诱导表达和植保素的诱导积累具有正相关性<sup>[4-5]</sup>。相对于测定植保素含量的复杂提取步骤和昂贵的 GC-MS 分析,用 PCR 技术分析植保素合成关键基因的表达进而确定植保素的代谢情况更加便捷实惠。本研究中,采用半定量和定量 PCR 分析发现不同抗性自交系对小斑病病原菌侵染表现出不同的防御响应机制。Mo17 在病原菌侵染过程中, *TPS6*、*TPS11* 基因诱导表达不显著,而 *An2* 基因表达迅速增加, *AOC* 基因表达在接种 0~12 h 内明显上调。‘郑58’在接种小斑病病原菌后, *TPS6*、*TPS11* 基因表达为先增加后减少的趋势,在 24 h 积累量达到高

峰。*An2* 基因表达逐渐增加但差异不显著。而 *AOC* 基因表达量在接种 6 h 后显著增加。当‘吉 419’受到病原菌侵染时, *TPS6*、*TPS11* 基因表达量逐渐增加,但要慢于‘郑 58’,而 *An2* 基因尽管在侵染 24 h 时表达量达到最大,但响应时间明显迟于另外 2 个抗性自交系。

抗病与感病株系的一个主要差异在于能否快速激发自身的防御机制及时地限制病原体的入侵。抗病株系会快速激活大范围的防御响应,阻止病原体进一步入侵。但是,感病株系只表现出微弱的响应并且不能限制病原体的入侵和生长,结果可能会导致植物严重的损伤和大量的细胞死亡<sup>[10]</sup>。在病原菌侵染下,植物可以通过合成植保素等次级代谢产物来增强自身防御。本研究中,Mo17 和‘郑 58’受到病原菌侵染 6 h 就能快速激活植保素和茉莉酸代谢关键基因,积极参与防御响应,抵御小斑病的侵染。相反,‘吉 419’在接种小斑病病原菌后, *TPS6*、*TPS11*、*An2* 基因都是在 24 h 才显著上调,相对于抗病自交系反应迟缓,表现为对小斑病的易感性状。

Mo17 的 *TPS6*、*TPS11* 基因诱导表达不显著,推测 Zealexin 积累对于小斑菌侵染影响较小,但 *AOC* 基因诱导表达显著,表明茉莉酸防御机制较快速启动,能促进包括植保素合成基因在内的抗性基

因的诱导表达,快速提高植物的防御能力。‘郑 58’在病原菌侵染过程中, *TPS6*、*TPS11* 和 *An2* 基因分别在 24 和 48 h 达到最大。而在 6 h 时, *TPS6*、*TPS11* 基因基本不表达,主要是诱导茉莉酸参与外来病原菌的防御响应。对于具有较高抗性的 Mo17 和‘郑 58’,茉莉酸基因诱导表达早于两类植保素代谢关键基因,可能促进其他防御机制的启动<sup>[11]</sup>。而感病自交系‘吉 419’在接种 12 h 后才积极诱导体内抗病相关基因表达以参与抵抗病原菌侵染,并且在 24 h 茉莉酸和 Kauralexin 代谢关键基因表达量达到最高,两者相互作用参与防御应答,在侵染 48 h 后 Zealexin 代谢关键基因表达量最高,表明随着病原菌的侵染,茉莉酸和两类植保素之间积极地协同抵御小斑病的侵染。

植物抗病防御响应涉及一个庞大而复杂的系统,植物在与病原菌长期相互作用和共同进化过程中,通过各种代谢途径在体内形成多种多样的抵抗病原菌侵染的代谢物<sup>[12]</sup>。本研究通过分析不同玉米抗性自交系中两类植保素和茉莉酸代谢关键基因对玉米小斑病的防御应答,解析了不同品种间抗性的差异,为进一步探究植保素和激素在玉米重要病害防御响应中的关系提供依据,也为萜类植保素在抗性育种中的应用提供了理论依据。

## 参考文献:

- [1] ZHONG CH M (钟承茂). The occurrence and integrated control technology of southern leaf blight[J]. *Agricultural Extension Service* (农技服务), 2008, **25**(2): 83–84 (in Chinese).
- [2] 赖传雅. 农业植物病理学[M]. 北京: 科学出版社, 2003: 72.
- [3] ZENG X (曾兴), LI Y (李云), LIN H J (林海建), et al. Differences in different resistant maize inbred lines after inoculation with *Rhizoctonia solani* expression [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology* (农业生物技术学报), 2011, **19**(2): 250–257 (in Chinese).
- [4] ALISA H, FATMA K, MARTHA M, et al. Novel acidic sesquiterpenoids constitute a dominant class of pathogen-induced phytoalexins in maize[J]. *Plant Physiology*, 2011, **156**(4): 2 082–2 097.
- [5] ERIC A S, FATMA K, ALISA H, et al. Identity, regulation and activity of inducible diterpenoid phytoalexins in maize[J]. *PNAS*, 2011, **108**(13): 5 455–5 460.
- [6] KOLLNER T G, SCHNEE C, LI S, et al. Protonation of a neutral (S)-beta-bisabolene intermediate is involved in (S)-beta-macrocarpene formation by the maize sesquiterpene synthases *TPS6* and *TPS11*[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2008, **283**(30): 20 779–20 788.
- [7] HARRIS L J, SAPARNO A, JOHNSTON A, et al. The maize *An2* gene is induced by *Fusarium* attack and encodes an ent-copalyl diphosphate synthase[J]. *Plant Molecular Biology*, 2005, **59**(6): 881–894.
- [8] AHUJA I, KISSEN R, BONES A M. Phytoalexins in defense against pathogens[J]. *Trends in Plant Science*, 2012, **17**(2): 73–90.
- [9] 王晓鸣, 王会伟. 玉米大斑病小斑病及其防治[M]. 北京: 金盾出版社, 2009: 119–120.
- [10] 韩志群. 硫酸锌、赛众 28 及菌根健对玉米抗性相关酶和基因表达水平影响[D]. 河北保定: 河北农业大学, 2012.
- [11] RABBANI M A, MARUYAMA K, ABE H, et al. Monitoring expression profiles of rice genes under cold, drought and high-salinity stresses and abscisic acid application using cDNA microarray and RNA gel-Blot analyses[J]. *Plant Physiology*, 2003, **133**(4): 1 755–1 767.
- [12] XIA Q ZH (夏启中), ZHANG M J (张明菊), et al. Basic metabolism of plant disease resistance[J]. *Journal of Huanggang Polytechnic* (黄冈职业技术学院学报), 2004, **6**(3): 38–41 (in Chinese).