

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2009.01188

应用基因芯片分析红蚰麦白粉菌胁迫条件下的基因表达谱

王俊美^{1,2} 刘红彦^{1,2,*} 徐红明¹ 王飞¹ 高素霞¹ 康振生^{2,3,*}

¹河南省农业科学院植物保护研究所, 河南郑州 450002; ²西北农林科技大学植保资源与病虫害治理教育部重点开放实验室, 陕西杨凌 712100; ³西北农林科技大学陕西省农业分子生物学重点实验室, 陕西杨凌 712100

摘要: 小麦农家品种红蚰麦携带 1 对显性抗白粉病新基因, 暂命名为 *Pmhym*。为了深入了解该品种抗病的分子机制, 用豫麦 13/红蚰麦的 F₃ 代纯合抗病株系构建抗池, 采用 Affymetrix 小麦基因芯片技术, 以白粉菌接种 0 h 为对照, 分析白粉菌接种后 24 h 的基因表达谱。在 61 127 基因微矩阵点中, 有效差异表达 Ratio 值 2 或 0.5 的基因共 5 282 个, 其中上调基因 2 553 个, 下调 2 729 个。对上调序列的分类表明, 功能明确的序列中 39.81% 与抗病/防御相关; 下调表达基因中以能量代谢和抗病/防御相关基因比例最高, 分别占 26.71% 和 19.65%。上调表达在 8 倍以上的序列中 81 个的功能已知, 其中包括病程相关基因、防卫反应基因、生成或清除活性氧的基因, 以及抗病信号转导基因等。选取上调和下调表达 8 倍以上的共 13 个探针序列进行实时定量 PCR 验证, 表明基因芯片数据具有良好的重复性。

关键词: 小麦; 抗白粉病基因; 基因芯片; 表达序列标签; 实时定量 PCR

Expression Profile of Landrace Hongyoumai Infected by *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* Using Gene Microarray

WANG Jun-Mei^{1,2}, LIU Hong-Yan^{1,2,*}, XU Hong-Ming¹, WANG Fei¹, GAO Su-Xia¹, and KANG Zhen-Sheng^{2,3,*}

¹Institute of Plant Protection, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China; ²Key Laboratory of Plant Protection Resources and Pest Management, Ministry of Education, Northwest A&F University, Yangling 712100, China; ³Shaanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture, Northwest A&F University, Yangling 712100, China

Abstract: Wheat landrace Hongyoumai carries one dominant resistance gene for powdery mildew (*Blumeria graminis*), tentatively designated *Pmhym*. To further elucidate molecular mechanism of the resistance to powdery mildew in Hongyoumai, a resistant pool was constructed with four homogenous resistant lines from the F₃ generation of Yumai 13/Hongyoumai. The wheat seedlings were inoculated with single spore isolates of *B. graminis* f. sp. *tritici*, and at 0 and 24 h after inoculation the gene expression profile was analyzed using Affymetrix wheat microarray. There were approximately 5 282 expressed genes (with log ratio 2 or 0.5) among total 61 127 genes set in the microarray plate, including 2 553 up-regulated and 2 729 down-regulated genes or expressed sequence Tags (ESTs). In the up-regulated ESTs whose functions have been known, 39.81% were disease/defense genes. In the down-regulated ESTs, energy genes and disease/defense genes accounted for 26.71% and 19.65%, respectively. A total of 81 ESTs were up-regulated more than eight times, in which most were related to disease resistance, such as pathogenesis-related protein, defense genes, genes producing or eliminating reactive oxygen species, and genes involved in signal transduction. Quantitative RT-PCR (qRT-PCR) was carried out with 13 probe sets up-regulated and down-regulated more than eight times which validated a good reproducibility of microarray analysis.

Keywords: Wheat; Powdery mildew resistance gene; Gene chip; Expressed sequence Tag (EST); Real-time quantitative RT-PCR (q-PCR)

由禾谷类白粉菌 *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* 引起的小麦白粉病是小麦生产上的一种世界性病害。研究小麦的抗病机制是寻找抗病育种新方法的有效途径, 但由于传统研究方法的制约, 从基因表

达整体水平上反映抗病相关基因表达的研究报道较少。分子生物学技术的发展特别是近几年基因芯片技术的兴起为从整体的角度研究小麦抗病的分子机制提供了新的思路和解决方法。

本研究由河南省杰出青年基金项目(04120001400), 西北农林科技大学植保资源与病虫害治理教育部重点开放实验室资助项目, 国家“十一五”支撑计划项目(2006BAD08A05)资助。

*通讯作者(Corresponding authors): 刘红彦, E-mail: liuhy1219@163.com, Tel: 0371-65730166; 康振生, E-mail: kangzs@nwsuaf.edu.cn, Tel: 029-87091312
第一作者联系方式: E-mail: junmeiwang79@yeah.net

Received(收稿日期): 2009-01-07; Accepted(接受日期): 2009-03-10.

基因表达谱芯片(gene expression profiling)是目前应用最为广泛的基因芯片^[1]。表达谱芯片可以分析 2 组或 2 组以上不同来源的 mRNA 转录杂交的差异, 通过计算杂交信号的比值和统计分析以获得差异表达基因的信息^[2]。通过比较分析表达谱基因芯片, 可从整体水平研究代谢机制, 认识基因相互之间的网络关系, 发现重要基因。美国 Affymetrix 公司整合 GenBank 中已经提交的 EST 序列, 开发了小鼠、水稻、拟南芥、小麦等的 EST 基因芯片, 为从整体水平研究基因的表达提供了可能。其中小麦上已经开发出具有 6 万多个 EST 序列的基因芯片, 可用于小麦基因表达谱的差异分析。

红小麦是河南农业科学院植物保护研究所收集并保存的小麦农家品种, 具有优良的白粉病抗性^[3]。笔者利用传统的遗传分析发现该品种携带 1 对显性的抗白粉病基因, 并通过 SSR 标记将该抗白粉病基因定位在小麦的 7BL 染色体上(待发表)。本研究拟利用基因芯片分析 F₃ 代纯合抗病株系在白粉菌病菌诱导前后的表达差异, 为揭示红小麦抗病的分子机制提供参考, 为寻找抗病相关基因奠定基础。

1 材料与方法

1.1 抗病池的构建

从豫麦 13/红小麦杂种 F₃ 代中, 通过抗性鉴定选择 4 个纯合抗病株系(河南省农业科学院植物保护研究所生物防治室提供), 分别种植在 4 个营养钵内。待幼苗长至三叶一心期, 采用抖落孢子的方法接种。小麦白粉菌株由河南省农业科学院植物保护研究所生物防治室采自郑州市郊区, 经单孢分离培养后感病品种豫麦 13 上保存。采集接菌后 0 h 和 24 h 的叶片, 液氮速冻, 于干冰中保存并送往上海晶泰生物技术有限公司。从 4 个 F₃ 纯合抗病株系分别提取总 RNA 后等量混合构成抗池, 以接菌 0 h 的抗池为对照, 以接菌 24 h 的抗池为试验方。

1.2 探针合成和基因芯片筛选

利用 TRIzol (Invitrogen)方法抽提各材料的总 RNA, 并采用 RNeasy Mini kit (Qiagen)纯化总 RNA。利用 one-cycle cDNA Synthesis Kit (Affymetrix)合成 ds cDNA, 由 GeneChip Sample Cleanup Module (Affymetrix)纯化该 cDNA。以纯化的 cDNA 根据 GeneChip IVT Labeling Kit 的实验说明制备生物素标记的 cRNA, 并于 94 °C 保温 35 min 将其片段化。片段化的 cRNA 即为杂交用的探针。

Affymetrix 900493 芯片包含来自小麦 42 条染色

体上的代表 55 052 个小麦转录本的 61 127 个原位合成的探针组(<http://www.affymetrix.com/>)。Affymetrix 网站上 NetAffy 数据分析中心提供了所有探针的详细信息。

1.3 芯片杂交及数据分析

首先, 应用检测芯片(test chip)检测片段化 cRNA 的质量。之后取适量 cRNA 与实验芯片(experimental chip)在 45 °C 的 Affymetrix 杂交箱 640 中杂交 16 h, 在 Genechip fluidics station 洗涤工作站 450 中进行洗脱和染色。用 GeneArray™ scanner 3000 高分辨率扫描仪对染色后的芯片进行扫描, 利用 GeneChip Operating Software (GCOS)计算机工作站对芯片扫描所得数据进行计算和处理。先对每张芯片的数据进行标准化(将芯片所有探针组的 Signal 从小到大排序, 去掉最大的 2%和最小的 2%后, 将剩下探针组的平均信号值调整到 500)。根据杂交信号, 将基因分为表达(present, P), 模糊表达(marginal, M)和缺失(absent, A) 3 种情况。之后对两张芯片的杂交数据进行比较, 以白粉菌胁迫 0 h 的材料为参照, 白粉菌胁迫 24 h 后基因表达变化的比值 > 2.0 为基因表达明显上调, 比值 < 0.5 为基因表达明显下调。

1.4 定量 RT-PCR 检测

参考说明书, 采用 Biozol 法提取小麦叶片总 RNA(取样后-80 °C 保存)。1.0%琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性, 紫外分光光度计(Eppendorf)测定其纯度和浓度。利用 M-MLV reverse transcriptase (Promega)合成 cDNA 第一链, 稀释 50 倍做模板。

以组成型表达基因 18S rRNA(GenBank 登录号为 AY049040)作为内参对照。在已注释的差异表达基因中, 选取上调表达 ≥ 8 倍的候选基因 6 个, 下调表达 ≤ 0.125 倍的候选基因 7 个依据其芯片上探针组对应的代表序列, 利用 Primer5.0 软件设计 13 对定量 PCR 引物验证芯片结果, 引物序列见表 1。

根据本实验室优化的 PCR 反应条件, 总体积 25 μL 其中包含 cDNA 5 μL, MgCl₂ 4 μL, 10× buffer 2.5 μL, 上、下游引物(10 μmol L⁻¹)各 0.5 μL, dNTPs (10 mmol L⁻¹) 0.5 μL, Taq 酶 0.4 μL (MBI Fermentas), 50× SYBR Solution 0.5 μL, ROX 0.1 μL, ddH₂O 11 μL。反应在 ABI PRISM 实时定量 PCR 仪上进行, 程序为 94 °C 变性 1 min, 94 °C 变性 15 s, 55 °C 退火(依引物略有变化) 20 s, 72 °C 延伸 50 s, 42 个循环。于 72 °C

收集荧光, 反应结束后分析荧光值变化曲线和融解曲线。每个反应 3 次重复, 采用 2^{-ΔΔCt} 算法^[4]分析结果。

表 1 用于实时定量 RT-PCR 分析的引物
Table 1 Primers used in Real time quantitative RT-PCR analysis

探针组 Probe set	功能 Putative function	引物序列 Primer sequence(5'-3')
Y049040	18S rRNA	F: CTGAGAAACGGCTACCAT R: CCCAAGTCCAACACTACGAG
Ta.21342.1.S1_x_at	Chitinase 3	F: GCCGTTCGCATAGTCAATC R: CGCACCAATTATTCGCTTGT
Ta.25666.1.A1_at	MAP kinase homolog	F: CACTGGGTCGTGACACTTCT R: CCTCCTCTTCCTTGATGCTG
Ta.9226.1.S1_at	Pathogenesis-related protein 4	F: ACGGGATGCTGCCTTGTA R: GATAACCCGTTTGGTCTTTTC
Ta.169.1.S1_x_at	Germin-like protein	F: ACGAGCACAAACAGAAATAGGA R: GAAGGAAGGAAGAGGAGGATG
Ta.25053.1.S1_at	Thaumatococcus-like protein	F: GACGACCAGACCAGCACCT R: CCTGTTCCTTATTGATCCCA
Ta.28233.1.S1_at	Glutathione-S-transferase	F: TGTCGTTGGTGCTGGTCT R: GTGTCCCTGTGGCATAAGTG
Ta.28224.2.S1_x_at	Cyc07	F: GCTCGGTTTTATTGTGTGGC R: TCTTGGACTTGGGATTCTATTGT
TaAffx.27263.1.S1_at	Vacuolar proton-inorganic pyrophosphatase	F: CAATGTATTCTCTGCCCC R: GAAACCTGTGAAAAACCGC
TaAffx.120874.1.S1_x_at	23 kDa oxygen evolving protein of photosystem II	F: TCCACCTCCTGCTTCCTCC R: GCCTCGTCATTCTCTGCG
Ta.13242.2.S1_x_at	Cdpl1 protein	F: TTCCTCGCTTCCTTTCTCC R: ATCAAAACACACGGGCACA
Ta.11386.2.S1_a_at	Ascorbate peroxidase	F: AGGGATTCTCGCTGGACGC R: AACGAAGGGCTCTGGCTGTG
Ta.2383.2.S1_x_at	HSP80	F: TGGGCAATGTAACGAGGG R: AAAGGGGATTTGAGGCAGG
Ta.881.1.S1_at	Cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase GAPDH	F: ACATCTTTCAGACCCGTTCA R: TTTTACAGTTCCTCCACAG

2 结果与分析

2.1 芯片数据可靠性评价

无论是对照组还是试验组,其基因芯片扫描图像清晰,背景平均值(average background)以及噪声值(noise values)都在适当范围内,因而数据可以用于后续分析。检测到 Poly-A 对照(*lys*、*phe*、*thr* 和 *dap*)及杂交对照(*bioB*、*bioC*、*bioD* 和 *cre*),说明杂交成功,芯片检测的结果是可靠的。

2.2 整体水平基因差异表达

在 61 127 个基因微矩阵点中,有效差异表达 Ratio 值 2 或 0.5 的基因共 5 282 个,其中上调表达基因 2 553 个,下调表达基因 2 729 个。上调基因中包括 2 054 个转录位点,13 个假定序列,64 个克隆序列,已知 ESTs 序列 422 个(占 16.5%)。下调基因中包括 2 224 个转录位点,4 个假定序列,48 个克隆序列,已知 ESTs 序列 453 个(占 16.6%)。根据 Bevan 等^[5]的分类方法对上调的 422 个已知 EST 序列进行分类,其中以抗病/防御相关基因的比例最大占 39.81%,其他基因的功能及比例为能量 11.14%、信号转导 8.06%、细胞结构 7.58%、蛋白合成 5.92%、

蛋白加工和储藏 4.03%、转录 6.64%、初级代谢 4.47%、次级代谢 3.32%、膜运输 3.32%、转运 1.90%、细胞生长 0.24%,还有 3.32%的基因未分类。下调的 453 个 EST 序列中能量代谢及抗病/防御相关基因的所占的比例较大,分别是 26.71%、19.65%。其他基因的功能及比例为:细胞结构 7.73%、转录 9.05%、信号转导 6.40%、蛋白合成 6.18%、蛋白加工和储藏 3.97%、初级代谢 4.19%、次级代谢 5.52%、细胞生长 3.31%、膜运输 2.65%、转运 1.99%,另有 2.65%的基因未分类。

2.3 上调表达 8 倍以上的 EST 序列分析

为了更明确地了解可能在抗病过程中起作用的关键基因,着重分析了上调在 8 倍以上的 81 个已知 EST 序列(表 2),其中多数基因与抗病或防御相关。在上调表达的基因中,大多数病程相关蛋白上调表达,如病程相关蛋白 4、过氧化物酶、非特异性脂质转移蛋白 1 前体、1 型非特异性脂质转移蛋白前体、脂质转移蛋白 3 和几丁质酶 3。一些与胁迫反应相关基因上调表达,包括 *wrsi5-1* 蛋白、*Wali3* 蛋白、*Wali2* 蛋白、*wali6* 蛋白、*Wgluc5* 蛋白、冷适应蛋白

表 2 受白粉菌诱导上调表达 8 倍以上的已知 EST 序列
Table 2 Annotated ESTs induced by *Bgt* with up-regulated expression at change ratio more than eight times

No.	Probe set ID	Signal log ratio	Putative function	No.	Probe set ID	Signal log ratio	Putative function
1	Ta.9226.1.S1_at	9.5	Pathogenesis-related protein 4	42	Ta.141.1.S1_x_at	3.8	Gibberellin 20-oxidase
2	Ta.22564.2.S1_a_at	8.5	Peroxidase	43	Ta.87.1.S1_at	3.8	pSBGer1 protein
3	Ta.5810.1.S1_at	7.9	Nonspecific lipid transfer protein 1 precursor	44	Ta.1997.1.S1_at	3.8	Sec61p
4	Ta.22564.2.S1_x_at	7.8	Peroxidase	45	Ta.7479.1.S1_a_at	3.7	Lt1.1 protein
5	Ta.5385.1.S1_at	7.3	Peroxidase	46	Ta.25666.1.A1_at	3.7	MAP kinase homolog
6	Ta.22564.1.S1_at	6.7	Peroxidase	47	Ta.4834.1.S1_at	3.7	Ornithine/acetylornithine
7	Ta.25053.1.S1_at	6.7	Thaumatococcus-like protein	48	Ta.87.1.S1_x_at	3.7	pSBGer1 protein
8	Ta.30711.1.S1_x_at	6.6	Wrsi5-1 protein	49	Ta.27762.1.S1_x_at	3.7	Thaumatococcus-like protein
9	Ta.21267.1.S1_s_at	6.5	Wali3 protein	50	Ta.23322.1.S1_s_at	3.5	Beta amylase
10	Ta.169.1.S1_x_at	6.4	Germin-like protein	51	Ta.5125.3.S1_at	3.5	MRNA transport factor
11	TaAffx.24475.1.S1_at	6.3	Glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase	52	TaAffx.106322.1.S1_at	3.4	Catalase
12	Ta.13160.1.S1_at	6.2	Ribosomal protein L3 (RPL3) mRNA, RPL3-A2 allele	53	Ta.1082.3.S1_at	3.4	Delta-type tonoplast intrinsic protein
13	Ta.21342.1.S1_x_at	6.1	Chitinase 3	54	Ta.20563.1.S1_x_at	3.4	Germin-like protein
14	Ta.24710.1.S1_at	6.1	Peroxidase	55	Ta.5098.2.A1_at	3.4	Guanylyl cyclase
15	Ta.24715.1.S1_at	5.9	Peroxidase	56	Ta.24199.1.S1_a_at	3.4	HBP-1b
16	Ta.4876.1.A1_x_at	5.6	Peroxidase	57	Ta.22628.1.S1_at	3.4	HSP70
17	Ta.28.1.S1_at	5.5	Glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase	58	Ta.13818.1.S1_at	3.4	Putative xylanase inhibitor
18	TaAffx.104648.1.S1_at	5.5	Wali2 protein	59	Ta.7765.1.A1_at	3.3	Geranylgeranylated protein ATGP1
19	Ta.82.1.S1_at	5.3	Peroxidase	60	Ta.5890.1.A1_at	3.3	Lipid transfer protein 3
20	Ta.8574.2.A1_at	5.1	Putative xylanase inhibitor	61	Ta.24723.1.S1_x_at	3.3	PSBGer1 protein
21	TaAffx.15327.1.S1_at	5.0	Glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase	62	Ta.24501.1.S1_at	3.3	Thaumatococcus-like protein
22	Ta.5024.1.S1_x_at	5.0	Wali6 protein	63	Ta.21262.1.A1_at	3.3	Xylanase inhibitor TAXI-III
23	Ta.13.1.S1_at	4.9	WIR1, pathogen defense protein	64	Ta.3679.1.S1_x_at	3.2	Glutathione transferase
24	Ta.18878.1.S1_at	4.7	Germin-like protein	65	Ta.22628.1.S1_x_at	3.2	HSP70
25	TaAffx.24475.1.S1_x_at	4.7	Glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase	66	Ta.639.1.S1_at	3.2	Peptidylprolyl isomerase
26	Ta.28233.1.S1_at	4.4	Glutathione-S-transferase	67	Ta.8304.1.S1_a_at	3.2	Translation elongation factor 1 alpha-subunit
27	Ta.23322.2.S1_at	4.3	Beta amylase	68	Ta.9507.2.S1_at	3.1	CesA protein
28	Ta.27751.5.S1_at	4.2	Cdpl1 protein	69	Ta.5098.1.S1_a_at	3.1	Guanylyl cyclase
29	Ta.8108.2.S1_at	4.2	Cold acclimation protein WCOR410c	70	Ta.30802.1.A1_at	3.1	HSP70
30	TaAffx.29050.1.S1_s_at	4.2	Hypothetical LOC543097	71	Ta.1337.2.S1_x_at	3.1	Type 1 non-specific lipid transfer protein precursor
31	TaAffx.86898.1.S1_at	4.2	Phosphoethanolamine methyltransferase	72	Ta.8584.1.S1_at	3.1	Wgluc5 protein
32	Ta.2784.1.A1_at	4.0	Chitinase 1	73	Ta.21262.1.A1_x_at	3.1	Xylanase inhibitor TAXI-III
33	Ta.141.1.S1_at	4.0	Gibberellin 20-oxidase	74	Ta.304.1.S1_at	3.0	Ald protein
34	Ta.26230.1.S1_x_at	4.0	Glutathione transferase F5	75	Ta.9320.1.S1_x_at	3.0	CCoAMT protein
35	Ta.7479.3.S1_x_at	4.0	Lt1.1 protein	76	Ta.1082.3.S1_x_at	3.0	Delta-type tonoplast intrinsic protein
36	TaAffx.80336.2.S1_x_at	4.0	Putative high mobility group protein	77	Ta.28219.1.A1_at	3.0	Glutathione transferase
37	Ta.1997.2.S1_a_at	4.0	Sec61p	78	Ta.25666.1.A1_x_at	3.0	MAP kinase homolog
38	Ta.2690.1.S1_at	3.9	Glutamine-dependent asparagine synthetase	79	Ta.21137.1.S1_x_at	3.0	Peroxidase
39	Ta.7479.2.S1_x_at	3.9	Lt1.1 protein	80	Ta.29640.1.S1_x_at	3.0	Ribosomal protein L3 (RPL3) mRNA, RPL3-A2 allele
40	Ta.231.1.S1_x_at	3.9	Secretory protein	81	Ta.231.1.S1_at	3.0	Secretory protein
41	Ta.30501.1.S1_at	3.8	Chitinase 1				

WCOR410c 和热休克蛋白 70 等。抵抗病原菌的基因有几丁质酶 1、假定木聚糖酶抑制子、木聚糖酶抑制子 TAXI-III、WIR1、病原防御蛋白。类萌发素蛋白和 pSBGer1 蛋白与活性氧产生有关。活性氧清除有关基因谷胱甘肽转移酶、谷胱甘肽转移酶 F5、谷胱甘肽-硫-转移酶基因、过氧化氢酶等上调表达。上调 8 倍、与信号传导相关的基因涉及钙信号的钙依赖蛋白激酶 1 蛋白, 以及促分裂原活化蛋白激酶类似物等。还有小部分其他功能的基因, 如与蛋白合成、基础代谢、次生代谢、转运相关的, 如核糖体蛋白 L3、翻译延伸因子 1 α -亚基、鸟氨酸/乙酰鸟氨酸氨基转移酶、赤霉素 20-氧化酶和 Sec61p, 及一些未分类基因。

2.4 差异表达基因的实时定量 PCR 验证

为了验证芯片数据的可靠性, 对同样的实验材料采用相同方法处理后取样, 提取总 RNA, 以反转录的 cDNA 为模板, 利用设计的 13 对引物进行实时定量 PCR 验证。13 个探针的表达模式均与芯片结果一致(表 3)。说明芯片数据具有生物学意义上的可重复性, 结果是可信的。

表 3 13 个基因探针在基因芯片和实时定量 PCR 的表达率分析
Table 3 Expression ratios of selected probe sets assessed by GeneChip (Array) and qRT-PCR (qPCR)

探针组 Probe set	芯片 Array	定量 PCR qPCR	
		对照 Control (0 h)	诱导株 Induced plants (24 h)
Ta.21342.1.S1_x_at	6.1	0+/-0.72	6.59+/-0.47
Ta.25666.1.A1_at	3.7	0+/-0.74	1.95+/-0.63
Ta.9226.1.S1_at	9.7	0+/-0.69	3.65+/-0.76
Ta.169.1.S1_x_at	6.7	0+/-0.55	1.43+/-0.82
Ta.25053.1.S1_at	6.7	0+/-0.54	4.20+/-0.88
Ta.28233.1.S1_at	4.4	0+/-0.63	4.99+/-0.20
Ta.28224.2.S1_x_at	-4.7	0+/-0.53	-3.62+/-0.61
TaAffx.27263.1.S1_at	-3.6	0+/-0.55	-3.44+/-0.47
TaAffx.120874.1.S1_x_at	-3.6	0+/-0.43	-2.82+/-0.48
Ta.13242.2.S1_x_at	-3.3	0+/-0.52	-1.65+/-0.46
Ta.11386.2.S1_a_at	-3.2	0+/-0.86	-1.20+/-0.56
Ta.2383.2.S1_x_at	-2.5	0+/-0.86	-3.35+/-0.47
Ta.881.1.S1_at	-4.1	0+/-0.72	-1.26+/-0.69

3 讨论

在已有报道中, 对小麦抗白粉病基因及与白粉病抗性相关基因的分析均集中于接菌 24 h 以后, 对接菌早期的研究则较少。Li 等^[6]发现, 小麦近等基因系接白粉菌后, 在 24 h 内过敏反应差异较大, 进

一步说明研究 24 h 以内的早期反应对揭示抗病机制非常重要。本研究以小麦接白粉菌后 24 h 这一特殊时间点为对象来研究小麦接白粉菌早期的抗白粉病机理, 获得了较为重要的基因表达信息。骆蒙等^[7]以抗白粉病品系百农 3217/Mardler BC₅F₄ 为材料, 构建了一个白粉病菌接种 24、48 和 72 h 3 个时间点混合的抑制消减杂交 cDNA 文库, 获得了 271 条功能已知的 EST。在本试验中, 通过基因芯片表达谱分析接菌后 24 h 的差异表达基因, 共获得 5 282 个差异表达基因。可见, 基因芯片在通量上要比抑制消减杂交高很多, 而且由于基因芯片中的序列信息是已知的, 后期的数据处理也更快捷。

在白粉菌诱导后的 24 h, 小麦体内与抗病/防御相关基因上调表达, 而与能量代谢相关的基因下调表达。表明小麦在受到病原菌的诱导后体内的生理生化过程积极进行了适应性调节, 降低了能量代谢, 增强了抗病/防御的能力。与骆蒙等^[7]的报道一致, 本试验获得的序列中最多的也是抗病相关 EST。对上调 8 倍以上基因进行了分析, 发现其中很多可能涉及抗病的基因上调表达。主要包括一些 PR 蛋白、抗菌物质、活性氧生成及清除基因、胁迫相关基因和抗病信号传导基因。

由于 PR 蛋白 pathogenesis-related protein 4、thaumatin-like protein 参与了由水杨酸介导的系统获得抗性, 提示水杨酸信号途径可能与红苕麦的抗白粉病具有密切相关性。曹爱忠等^[8]利用大麦基因芯片研究簇毛麦的抗白粉病机制时发现簇毛麦抗白粉病过程涉及的主要信号传导途径是水杨酸途径。水杨酸途径是否作为一个普遍存在的信号传递途径参与植物对病原菌的抗病过程尚待进一步研究。

几丁质和 β -1,3-葡聚糖是真菌细胞壁的重要结构成分, 在许多真菌的菌丝顶端, β -1,3-葡聚糖和几丁质暴露在细胞壁表面, 能够直接受到 β -1,3-葡聚糖酶和几丁质酶的水解^[9-10], 这不仅使真菌菌丝生长点受到破坏, 而且在水解过程中由真菌细胞壁释放出来的寡糖能够作为植物多种抗病反应的激发因子, 诱导植物的全面防卫反应^[9]。本研究中发现 Germin-like protein 和 pSBGer1 protein 基因在白粉菌诱导后上调表达, 由于 Germin 与草酸盐氧化酶具有较高同源性, 可以氧化草酸盐生成 H₂O₂, 而 H₂O₂ 是一种重要的活性氧, 在抗病过程中起重要作用。Germin 基因在抗病过程中的作用可能就是由它氧化草酸盐产生的 H₂O₂ 来介导的。同时也发现一批清除活性氧的

基因上调表达,如 Glutathione transferase、Glutathione transferase F5、Glutathione-S-transferase 和 Catalase。其原因可能是活性氧爆发后,必然对细胞存在一定的危害,为维持细胞正常的代谢功能,感染点附近会产生很多清除活性氧的酶,这种现象已经被很多研究所证实^[11-13]。

本试验中还发现有大量 MAPK 类似物的表达。有研究表明信号激酶 MAPK 可以蛋白磷酸化的形式把细胞外信号刺激传递到细胞内,同时特异地放大信号,它参与的磷酸化反应在植物抵抗病原菌侵害中具有重要作用^[13-14]。说明外界刺激信号的传递参与小麦早期抗白粉病反应过程。胁迫相关基因的上调表达可能是与胁迫诱导后体内一些共同的调节机制有关。

13个探针的荧光定量PCR验证表明,作为一种高通量研究基因表达的手段,芯片分析具有良好的可重复性,是目前研究多基因表达谱,筛选植物抗病相关基因,揭示植物抗病分子机制的有效方法。

4 结论

利用基因芯片技术分析了豫麦13/红小麦的F₃代抗病株系受白粉菌胁迫诱导的基因表达谱,筛选到一批受白粉菌诱导后差异表达的基因,为克隆抗白粉基因、开展抗病育种及探讨小麦抗白粉病的分子调控机制提供了重要参考。

References

- [1] Han J, Lee H, Nguyen N Y, Beaucage S L, Puri R K. Novel multiple 5'-amino-modified primer for DNA microarrays. *Genomics*, 2005, 86: 252-258
- [2] Veerasingham S J, Sellers K W, Raizada M K. Functional genomics as an emerging strategy for the investigation of central mechanisms in experimental hypertension. *Prog Biophys Mol Biol*, 2004, 84: 107-123
- [3] Wang X-F(王锡锋), Zhang Z-S(张忠山), Liu H-Y(刘红彦), He W-L(何文兰). Evaluation of resistance and slow-mildewing of some wheat varieties in Henan Province. *Acta Agric Univ Henanensis* (河南农业大学学报), 1996, 30(2): 160-163 (in Chinese with English abstract)
- [4] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCt} method. *Methods*, 2001, 25: 402-408
- [5] Bevan M, Bancroft I, Bent E, Love K, Goodman H, Dean C, Bergkamp R, Dirkse W, Van Staveren M, Stiekema W, Drost L, Ridley P, Hudson S A, Patel K, Murphy G, Piffanelli P, Wedler H, Wedler E, Wambutt R, Weitzenegger T, Pohl T M, Terryn N, Gielen J, Villarroel R, De Clerck R, Van Montagu M, Lecharny A, Auborg S, Gy I, Kreis M, Lao N, Kavanagh T, Hempel S, Kotter P, Entian K D, Rieger M, Schaeffer M, Funk B, Mueller-Auer S, Silvey M, James R, Montfort A, Pons A, Puigdomenech P, Douka A, Voukelatou E, Milioni D, Hatzopoulos P, Piravandi E, Obermaier B, Hilbert H, D ü sterhöft A, Moores T, Jones J D G, Eneva T, Palme K, Benes V, Rechman S, Ansoerge W, Cooke R, Berger C, Delseny M, Voet M, Volckaert G, Mewes H W, Klosterman S, Schueller C, Chalwatzis N. Analysis of 1.9 Mb of contiguous sequence from chromosome 4 of *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 1998, 391: 485-488
- [6] Li A L, Wang M L, Zhou R H, Kong X Y, Huo N X, Wang W S, Jia J Z. Comparative analysis of early H₂O₂ accumulation in compatible and incompatible wheat powdery mildew interaction. *Plant Pathol*, 2005, 54: 308-316
- [7] Luo M(骆蒙), Kong X-Y(孔秀英), Huo N-X(霍纳新), Zhou R-H(周荣华), Jia J-Z(贾继增). ESTs analysis of resistance to powdery mildew in wheat at primary infected stage. *Acta Genet Sin* (遗传学报), 2002, 29(6): 525-530 (in Chinese with English abstract)
- [8] Cao A-Z(曹爱忠), Li Q(李巧), Chen Y-P(陈雅平), Zou X-W(邹晓文), Wang X-E(王秀娥), Chen P-D(陈佩度). Screening resistance-related genes to powdery mildew in *Haynaldia villosa* using barley genechip and studying its mechanism of resistance. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2006, 32(10): 1444-1452 (in Chinese with English abstract)
- [9] Selitrennikoff C P. Antifungal proteins. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67: 2883-2894
- [10] Klarzynski O, Plesse B, Joubert J M, Yvin J C, Kopp M, Kloereg B, Fritig B. Linear β-1,3-glucanase are elicitors of defense responses in tobacco. *Plant Physiol*, 2000, 124: 1027-1037
- [11] Alosi M C, Melroy D L, Park R B. The regulation of gelation of phloem exudate from cucurbita fruit by dilution, glutathione, and glutathione reductase. *Plant Physiol*, 1988, 86: 1089-1094
- [12] Walz C, Juenger M, Schad M, Kehr J. Evidence for the presence and activity of a complete antioxidant defence system in mature sieve tubes. *Plant J*, 2002, 31: 189-197
- [13] Machida Y, Nishihama R, Kitakura S. Progress in studies of plant homologs of mitogen-activated protein (MAP) kinase and potential upstream component in kinase cascades. *Crit Rev Plant Sci*, 1997, 16: 481-496
- [14] Frye C A, Tang D, Innes R W. Negative regulation of defense responses in plants by a conserved MAPKK kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 373-378