

热激对玉米大斑病菌 *Stste12* 基因沉默突变体发育的影响

张运峰

(唐山师范学院 生命科学系,河北 唐山 063000)

摘要:为了探明温度升高对玉米大斑病菌 *Stste12* 基因沉默突变体生长发育、基因表达水平等方面的影响,对玉米大斑病菌野生型菌株 Wt01 - 23 和 *Stste12* 基因沉默突变体 StRNAi9 - 10 同时进行热激处理,比较 2 个菌株菌落形态、菌丝形态、菌落生长速度及分生孢子产量方面的差异,并通过半定量 PCR 技术检测热激处理对 *Stste12* 基因表达的影响。结果显示,热激处理提高了突变体 StRNAi9 - 10 菌落的生长速度,其菌落形态和生长速度接近 Wt01 - 23 菌株,但对 Wt01 - 23 菌落的生长速度和形态无显著影响;半定量 PCR 检测显示,StRNAi9 - 10 在热激处理后 *Stste12* 基因表达量增加,且随着温度的升高而增加,而 Wt01 - 23 菌株的 *Stste12* 基因表达量未发生显著变化。以上结果表明,热激处理恢复了玉米大斑病菌 RNAi 突变体的生理特征,具有抑制 RNAi 的作用。

关键词:热激;玉米大斑病菌;发育;*Stste12*;半定量 PCR

中图分类号:S435.131;Q935 **文献标志码:**A **文章编号:**1004 - 3268(2016)11 - 0071 - 05

Effects of Heat Shock Treatment on Development of *Stste12* Silencing Mutant of *Setosphaeria turcica*

ZHANG Yunfeng

(Department of Life Science, Tangshan Normal University, Tangshan 063000, China)

Abstract: In order to explore the effect of temperature rise on the growth and *Stste12* expression of *Setosphaeria turcica* *Stste12* silencing mutants, the effects of heat shock treatment on the colony and mycelium morphology, colony growth speed, and spore formation of wild-type strain Wt01-23 and *Stste12* silencing mutant StRNAi9-10 were analyzed in this paper, and semi-quantitative PCR was performed to examine the effect of heat shock treatment on the expression of *Stste12*. The results demonstrated that heat shock treatment had no significant impact on the colony growth speed and morphology of Wt01-23, but significantly accelerated the growth of StRNAi9-10, which had similar growth speed and colony morphology to Wt01-23 under the heat shock treatment. *Stste12* mRNA level in StRNAi9-10 was significantly up-regulated after heat shock treatment in a temperature-dependent manner, but not in Wt01-23. These data showed that heat shock treatment could inhibit RNAi silencing, and restore the physiological characteristics of *Setosphaeria turcica* RNAi mutant.

Key words: heat shock; *Setosphaeria turcica*; development; *Stste12*; semi-quantitative PCR

玉米大斑病菌(*Exserohilum turcicum*)属无性菌
亚门凸脐蠕孢属,其有性态学名为 *Setosphaeria turci-*

ca,称大斑刚毛座腔菌,属于囊菌亚门座囊菌目^[1]。
玉米大斑病菌可以引起玉米叶部病害玉米大斑病,

收稿日期:2016 - 05 - 15

基金项目:国家自然科学基金项目(31271997);河北省自然科学基金项目(C2014105067);河北省留学人员科技活动项目(C2015005009);唐山师范学院科学基金项目(2014E04,2013A03)

作者简介:张运峰(1982 -),男,河北石家庄人,实验师,硕士,主要从事植物病理学与分子生理学的相关研究。

E-mail:zyfikx@126.com

在流行年份可造成玉米减产 50% 以上^[2]。目前,在植物病菌中发现了 3 条与生长发育和致病性有关的信号途径:Ca²⁺ 途径、cAMP 途径和 MAPK (mitogen-activated protein kinase, 促分裂原活化蛋白激酶) 途径,其中 MAPK 信号转导途径研究最为深入^[3-5],分为 Fus3/Kss1 - homolog 途径、Slt2 - homolog 途径和 Hog1 - homolog MAP kinase 途径 3 类保守途径,其中 Fus3/Kss1 - homolog 途径又称 PMK 信号途径 (pathogenicity MAPK Cascade),主要通过转录因子 STE12 影响病菌附着胞等侵染结构的形成,从而调控病菌的致病性。STE12 首先在酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中被发现,其作为 Fus3/Kss1 MAPK 途径的底物,调控酿酒酵母的交配反应、假菌丝的发育及侵入生长^[6]。目前,已经在植物病原真菌中发现了很多 STE12 - like 转录因子,它们主要参与调控病菌的侵染过程和有性发育,进而影响病菌的致病性^[7-8]。吴敏^[9]研究中获得了玉米大斑病菌的 STE12 - like 基因 *Stste12*,并构建了 *Stste12* 基因沉默突变体 StRNAi 9 - 10。

热激反应是细胞和生物体对热刺激的一种保守性反应,亚致死剂量的热激诱发热激反应,对细胞或生物体有积极的保护作用^[10]。近年来,随着全球气温的升高,频繁出现的极端天气已经开始影响生物的生长和发育,例如,Milus 等^[11]研究发现,高温会使小麦条锈病菌生长速度增快、产孢量增大。Zhong 等^[12]对拟南芥的研究显示,温度升高能够恢复拟南芥 *NRGI* RNAi (RNA interference, RNA 干涉) 突变体的生长和形态建成。虽然 RNAi 技术广泛用于生物的基因功能研究,在植物病原真菌中用于弱毒力菌株的培育,但是,在真菌中还没有关于高温环境对 RNAi 效应影响的研究报道。

本研究通过对玉米大斑病菌野生型菌株 Wt01 - 23 及其 *Stste12* 沉默突变体 StRNAi9 - 10 进行热激处理,比较了 Wt01 - 23 和 StRNAi9 - 10 的菌落形态、生长速度、菌丝形态、产孢量,并利用半定量 PCR 技术检测 *Stste12* 基因的表达情况,分析热激处理对玉米大斑病菌形态发育和 *Stste12* 基因表达的影响,这对于进一步了解玉米大斑病菌生长发育的调控机制和控制该病菌的危害将具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 玉米大斑病菌野生型菌株 Wt01 - 23 及其 *Stste12* 基因 RNAi 突变体菌株 StRNAi9 - 10 由唐山师范学院植物病理学实验室保存。

1.1.2 试剂 UNIQ - 10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒购于 Invitrogen 公司;反转录酶 Revert Transcriptase M - MLV 和 rTaq DNA 聚合酶购自 Takara 公司。用于试验的引物 β - tubulin - L (5' - AACAT-GCGTGAGATTGTAAGT - 3')、 β - tubulin - R (5' - TCTGGATGTTGGGAATCC - 3') 及 *Stste12* 基因半定量扩增的引物 RTste12 - F (5' - GTAGAGACGTAGCCCCGTACATCTGG - 3')、RTste12 - R (5' - CTC-TACCAGATTTCGCGTGGGCTGA - 3'),由上海生工生物工程技术有限公司合成。DEPC、琼脂糖、无水乙醇、异丙醇、葡萄糖、Tris、冰醋酸、EDTA 和琼脂粉等试剂均为国产化学纯。

1.2 方法

1.2.1 菌株的热激处理 首先以 PDA 培养基活化玉米大斑病菌菌株 Wt01 - 23 和 StRNAi9 - 10,然后用打孔器取菌盘(直径 6 mm)接种至 PDA 培养基上培养 2 d,之后对 Wt01 - 23 和 StRNAi9 - 10 进行 45 ℃热激 15 min 的处理;每隔 24 h 热激处理 1 次,直至菌株满皿;每个处理 3 皿,以 25 ℃培养的菌株作为对照。

1.2.2 菌落生长速度的测定 采用十字交叉法测量,每隔 24 h 测定菌落直径,直至菌落满皿。以 3 次重复试验的平均值为每次测量的菌落直径,采用 SPSS 方差分析软件对菌落生长速度进行差异显著性分析^[13]。

1.2.3 菌丝和菌落的形态观察 热激处理后观察、记录对照和热处理菌株菌丝和菌落形态变化,并进行分析。

1.2.4 分生孢子计数 分生孢子的计数按如下方法进行:待玉米大斑病菌长满培养皿后,向其中滴加适量蒸馏水,然后用毛笔刮下菌丝及分生孢子并制成菌液,过滤后弃去菌丝,5 000 r/min 离心 10 min,弃去上清后加入 0.5 mL 蒸馏水,然后用血球计数板对分生孢子进行观察计数,结果用 SPSS 软件进行差异显著水平分析。

1.2.5 热激处理对 *Stste12* 基因表达的影响测定

1.2.5.1 玉米大斑病菌不同温度下的热激处理 Wt01 - 23 和 StRNAi9 - 10 菌株的处理参照 1.2.1,将每次热激的温度设定为 25 ℃、30 ℃、35 ℃、40 ℃、45 ℃。

1.2.5.2 玉米大斑病菌总 RNA 的提取及第一链 cDNA 合成 按照 UNIQ - 10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒说明书提取玉米大斑病菌总 RNA,按照张鑫等^[14]的方法利用 Oligo(dT)₁₈ 合成第一链 cDNA。

1.2.5.3 *Stste12* 基因表达的半定量分析 分别以

Wt01 - 23 和 StRNAi9 - 10 热激处理后的第一链 cDNA 为模板,按下列条件进行 PCR 扩增。25 μL 扩增体系中含有 10 μmol/L 的 β -tubulin - R 和 β -tubulin - F(或 RTste12 - F 和 RTste12 - R)各 1 μL、dNTP Mix(各 2.5 mmol/L)2 μL、10 × PCR Buffer 2.5 μL、rTaq DNA 聚合酶(5 U/μL)0.25 μL、cDNA 20 ng,加入 ddH₂O 至 25 μL;经过 94 ℃ 变性 30 s、55 ℃ 退火 30 s、72 ℃ 延伸 30 s,计 30 个循环的反应。取 3 μL PCR 扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上以 3 V/cm 进行电泳检测。利用 Quantity One(Bio-Rad)分析扩增条带(内标)的亮度值,以内标亮度值确定 cDNA 的模板量,分析热激条件下 *Stste12* 基因表达量的变化。

2 结果与分析

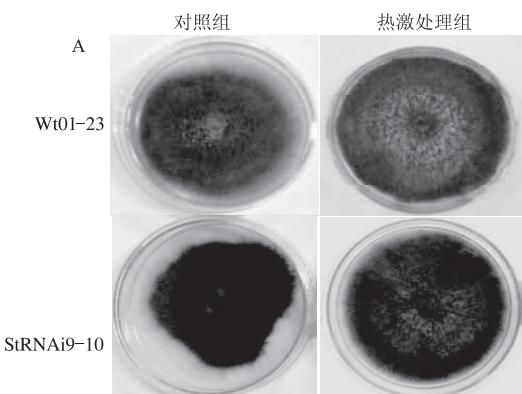
2.1 热激对 Wt01 - 23 和 StRNAi9 - 10 菌落形态和生长速度的影响

热激处理后,Wt01 - 23 菌株的菌落形态呈灰色、规则圆形,中心部分菌丝成簇生长,靠近边缘的菌丝蓬松,与对照组的菌落形态无显著差异;而热激

处理后的 StRNAi9 - 10 菌株菌落颜色、形态及菌丝生长形态与 Wt01 - 23 菌株相近,且靠近边缘的菌丝蓬松,与该菌株对照组菌落不规则的生长形态差异明显(图 1A)。通过比较 2 种菌株热激处理组和对照组的生长速度可以发现,热激处理对 Wt01 - 23 无显著影响;而 StRNAi9 - 10 菌株在热激处理后,生长速度从第 3 天开始高于对照组,第 7 天起 StRNAi9 - 10 菌株的生长速度显著高于对照组,接近 Wt01 - 23 的生长速度(图 1B)。试验结果表明,热激处理显著提高了 StRNAi9 - 10 菌株的生长速度,恢复了该菌株的形态和发育,而对野生型菌株 Wt01 - 23 无显著影响。

2.2 热激对 Wt01 - 23 和 StRNAi9 - 10 菌丝形态的影响

热激处理后,野生型菌株 Wt01 - 23 对照组和处理组菌丝均为灰绿色、表面平滑、菌隔清晰明显;突变体 StRNAi9 - 10 对照组和处理组菌丝均为灰褐色、表面平滑、菌隔清晰明显(图 2)。说明热激对 Wt01 - 23 和 StRNAi9 - 10 菌株的菌丝形态没有产生显著影响。



* 表示与对照组相比 $P < 0.05$, ** 表示 $P < 0.01$

图 1 热激对玉米大斑病菌 Wt01 - 23 和 StRNAi9 - 10 菌落形态(A)和生长速度(B)的影响

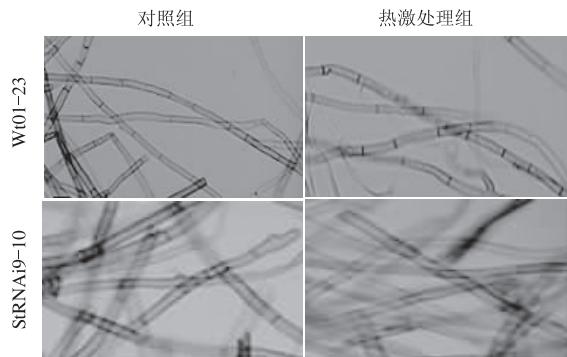
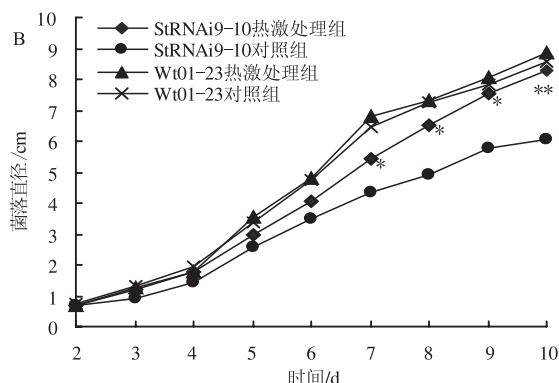


图 2 热激处理后玉米大斑病菌 Wt01 - 23 和 StRNAi9 - 10 的菌丝形态

2.3 热激对 Wt01 - 23 和 StRNAi9 - 10 分生孢子产量的影响

经过热激处理后,玉米大斑病菌 Wt01 - 23 及



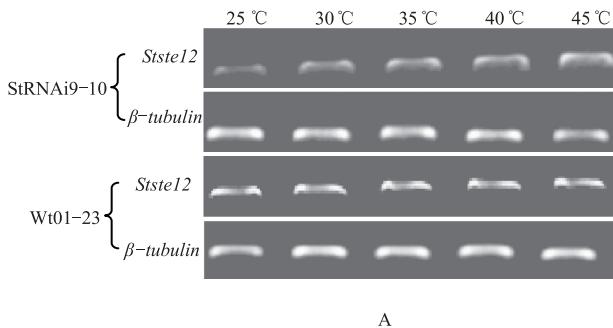
* 表示与对照组相比 $P < 0.05$, ** 表示 $P < 0.01$

StRNAi9 - 10 的分生孢子产量均显著增加,说明二者的产孢能力显著增强。在 25 ℃ 处理时,突变体 StRNAi9 - 10 的分生孢子产量极显著低于野生型菌株 Wt01 - 23;但是经过热激处理后,Wt01 - 23 和 StRNAi9 - 10 的分生孢子产量均极显著高于 Wt01 - 23 对照组,且热激处理后 Wt01 - 23 和 StRNAi9 - 10 的分生孢子产量差异不明显(图 3),说明 StRNAi9 - 10 菌株的分生孢子发育能力得到了恢复,趋向于野生型 Wt01 - 23 的水平。

2.4 热激对 Wt01 - 23 和 StRNAi9 - 10 *Stste12* 基因表达量的影响

通过半定量 PCR 技术检测和 Quantity One 软件对电泳图谱进行的定量分析发现,在 25 ℃、30 ℃、

35 ℃、40 ℃ 和 45 ℃ 热激胁迫下, 野生型菌株 Wt01 - 23 中 *Stste12* 基因的电泳条带亮度和表达量无显著差异(图 4A 和 4B)。而随处理温度的增加, StRNAi9 - 10 的 *Stste12* 基因条带亮度逐渐增强(图 4A)。以 25 ℃ 时 Wt01 - 23 菌株的 *Stste12* 表达量为对照进行比较发现, 随着温度的增加, StRNAi9 - 10 的 *Stste12* 基因表达量由极显著差异趋向于差异不显著(图 4B), 表明随温度上升 *Stste12* 基因的表达量逐渐增加, 45 ℃ 时表达量增加最多, 接近野生型 Wt01 - 23 的表达水平。试验结果表明, 在热激胁迫条件下, 玉米大斑病菌 StRNAi9 - 10 的菌丝细胞内基因表达会发生相应的变化, 导致 *Stste12* 的表达水平显著增强, 甚至接近于玉米大斑病菌野生型 Wt01 -



A. 琼脂糖凝胶电泳检测; B. 灰度分析。* 表示与 25 ℃ 处理的 Wt01 - 23 菌株相比 $P < 0.05$, ** 表示 $P < 0.01$

图 4 热激处理后玉米大斑病菌 Wt01 - 23 和 StRNAi9 - 10 的 *Stste12* 基因表达量

3 结论与讨论

STE12 是 PMK 信号途径中一个重要的调控因子, 在植物病原真菌的分生孢子形成、侵染结构发育及致病力形成等方面具有重要调控作用^[7]。本试验发现, 随着温度的增加, 玉米大斑病菌野生型菌株 Wt01 - 23 的菌落形态、生长速度和菌丝形态均未受到显著影响, 但分生孢子的数量显著增加, 这与 Milius 等^[11]对小麦条锈病菌的试验结果一致, 说明在玉米大斑病菌中, 该试验条件的热激处理, 除了显著促进分生孢子形成相关基因的表达外, 并未对菌丝形态建成等其他基因产生显著影响。突变体 StRNAi9 - 10 菌株随着热激温度的升高, 菌落的形态、生长速度及分生孢子产量均与其对照组呈现显著差异, 且 *Stste12* 基因的表达量较对照组显著增加, 表明热激可以恢复 *Stste12* 基因表达。

RNAi 是由双链 RNA (dsRNA) 介导的、由特定酶参与的特异性基因沉默现象, 它在转录水平、转录后水平和翻译水平上阻断基因的表达, 主要包括 siRNA 的形成和 siRNA 与沉默复合物结合 2 个步骤^[15-16], 受到多种因子的参与和调控。本试验中,

23 的表达水平。

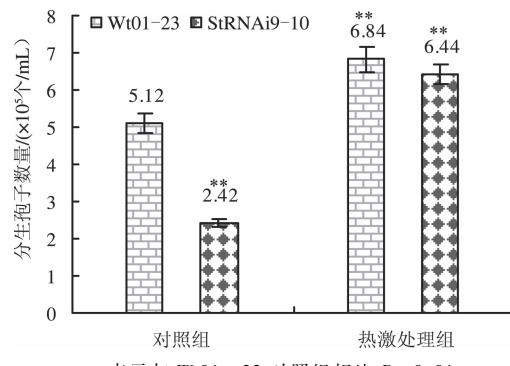
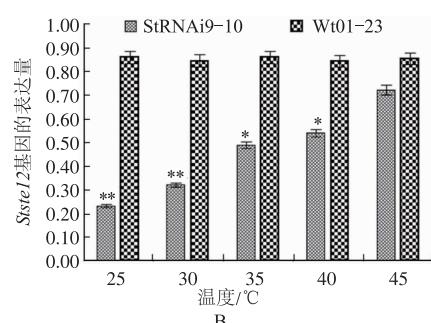


图 3 玉米大斑病菌 Wt01 - 23 和 StRNAi9 - 10 热激处理前后的分生孢子产量



随着培养温度的升高, 玉米大斑病菌 RNAi 突变体 StRNAi9 - 10 的菌落形态发生了明显的恢复; 通过半定量 PCR 检测发现, 菌株 StRNAi9 - 10 中 *ste12* 基因的表达量随着温度的升高显著提高, 这与 Zhong 等^[12]在拟南芥中的试验结果较为相似。推测较高的温度降低了玉米大斑病菌突变体中 RNAi 沉默的效率, 导致了 *Stste12* 基因表达显著升高, 进而使 *Stste12* 基因表达量得到部分恢复, 促使突变体菌株 StRNAi9 - 10 恢复野生型状态。

目前, 关于高温胁迫研究主要集中在热激蛋白 (heat shock protein, HSP) 上^[17], 并明确了该蛋白的表达能够保护细胞内生物活性分子正常工作, 显著提高细胞在高温胁迫下的适应性^[18-19]。Mourrain 等^[20]和 Zhong 等^[12]在对拟南芥的试验中发现, *sgs3/sde1* 主要通过调控 dsRNA 的特异性降解起到调控沉默效应的作用, 同时发现在高温环境中 *sgs3* 基因的表达会明显减弱, 进而导致沉默效率显著降低。由于在玉米大斑病菌中尚未获得 *sgs/sde1* 类基因及其功能研究的结果, 因此, 下一步需找到玉米大斑病菌 *sgs/sde1* 相关基因, 阐明玉米大斑病菌中高温胁迫影响 RNAi 的机制。

参考文献:

- [1] Dong J, Fan Y, Gui X, et al. Geographic distribution and genetic analysis of physiological races of *Setosphaeria turcica* in northern China [J]. American Journal of Agricultural and Biological Sciences, 2008, 3(1):389-398.
- [2] Perkins J M, Pedersen W L. Disease development and yield losses associated with leaf northern blight on corn [J]. Plant Disease, 1987, 71(10):940-943.
- [3] Yang S H, Sharrocks A D, Whitmarsh A J. Transcriptional regulation by the MAP kinase signaling cascades [J]. Gene, 2003, 320(4):3-21.
- [4] Krens S F, Spaink H P, Snaar-Jagalska B E. Functions of the MAPK family in vertebrate-development [J]. FEBS Lett, 2006, 580(21):4984-4990.
- [5] Chen R E, Thorner J. Function and regulation in MAPK signaling pathways: Lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Biochimica Et Biophysica Acta, 2007, 1773(8):1311-1340.
- [6] Errede B, Ammerer G. STE12, a protein involved in cell-type-specific transcription and signal transduction in yeast, is part of protein-DNA complexes [J]. Genes & Development, 1989, 3(9):1349-1361.
- [7] Rispail N, Di Pietro A. The homeodomain transcription factor Ste12: Connecting fungal MAPK signalling to plant pathogenicity [J]. Communicative & Integrative Biology, 2010, 3(4):327-332.
- [8] 张运峰. 碳源对 *Stste12* 基因调控玉米大斑病菌生长和分生孢子发育的影响 [J]. 河南农业科学, 2016, 45(1):71-75.
- [9] 吴敏. 玉米大斑病菌 MAPK 级联途径中 *Stste12* 基因的克隆与功能分析 [D]. 保定:河北农业大学, 2012.
- [10] Carrér A, Brion J D, Alami M, et al. Regulation of the heat-shock response [J]. Plant Physiology, 1998, 117 (4): 1135-1141.
- [11] Milus E A, Kristensen K, Hovmoller M S. Evidence for increased aggressiveness in a recent widespread strain of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* causing stripe rust of wheat [J]. Phytopathology, 2009, 99(1):89-94.
- [12] Zhong S H, Liu J Z, Jin H, et al. Warm temperatures induce transgenerational epigenetic release of RNA silencing by inhibiting siRNA biogenesis in *Arabidopsis* [J]. PNAS, 2013, 110 (22):9171-9176.
- [13] 王梅娟, 李坡, 吴敏, 等. 高渗胁迫对玉米大斑病菌生长发育及 *STK1* 表达的影响 [J]. 中国农业科学, 2012, 45(19):3965-3970.
- [14] 张鑫, 曹志艳, 刘士伟, 等. 玉米大斑病菌聚酮体合成酶基因 *StPKS* 功能分析 [J]. 中国农业科学, 2011, 44(8):1603-1609.
- [15] McManus M T, Sharp P A. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs [J]. Nature Reviews Genetics, 2002, 3(10):737-747.
- [16] Nykanen A, Haley B, Zamore P D. ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway [J]. Cell, 2001, 107(3):309-321.
- [17] Morishima N. Control of cell fate by Hsp70: More than an evanescent meeting [J]. Journal of Biochemistry, 2005, 137(4):449-453.
- [18] 陈亚琼, 肖调江, 周浙昆. 热激蛋白与生物环境适应及进化的关系 [J]. 自然科学进展, 2006, 16(9): 1066-1073.
- [19] 曹华宁, 刘博, 刘太国, 等. 小麦条锈菌 *hsp70* 基因的克隆及热胁迫下的表达特征分析 [J]. 植物保护, 2015, 41(3):19-24.
- [20] Mourrain P, Beclin C, Elmaya T, et al. *Arabidopsis SGS2* and *SGS3* genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance [J]. Cell, 2000, 101(5):533-542.