

褐飞虱取食诱导的 *MAPK3* 基因 在水稻叶鞘组织中的定位

宁淑萍^{1,2}, 黄慧润^{1,2}, 王小兰^{1*}

(1. 中国科学院华南植物园, 广州 510650; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要: 利用 Northern 杂交技术, 对促分裂原活化蛋白激酶基因(*MAPK3*, *BPHiw103*)进行了表达分析, 同时, 针对抗虫水稻 B5 植株接种褐飞虱若虫 48 h 后的叶鞘组织切片进行了原位定位。Northern 杂交结果表明, 在褐飞虱取食后, *MAPK3* mRNA 整体表现为上调的特性。原位杂交显示, 褐飞虱取食前, *MAPK3* 在水稻叶的薄壁组织中大量表达; 而取食后, 在韧皮部表达明显增加, 在薄壁组织表达则呈下降趋势。这一点在叶心组织切片中表现最为明显。这些结果说明, 水稻在受褐飞虱若虫取食诱导和刺激后, *MAPK3* 的表达在受伤部位急剧增加, 推测 *MAPK3* 基因可能在水稻对褐飞虱的抗性反应中发挥作用。

关键词: *MAPK* mRNA; 原位杂交; 褐飞虱; 水稻

中图分类号: Q786

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2005)05-0381-05

In situ Localization of the *MAPK3* Gene Induced by Brown Planthopper in Rice Sheath

NING Shu-Ping^{1,2}, HUANG Hui-Run^{1,2}, WANG Xiao-Lan^{1*}

(1. South China Botanical Garden, the Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China;

2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract: Northern blot was used to analyze the expression of *MAPK3* gene (*BPHiw103*), and *in situ* hybridization technique was developed for localization of *MAPK3* mRNA in rice sheath fed by brown planthopper (BPH) after 48 h. The results revealed that the expression of *MAPK* mRNA was on the whole up-regulated after BPH feeding. *In situ* hybridization indicated that it was mostly expressed in parenchyma before BPH feeding, while fed by BPH, this gene was mainly increased in phloem, but down-regulated in parenchyma. Such trend was obviously demonstrated in the tissue of inner leaves. All the results showed that the *MAPK* was induced by BPH feeding, and the gene accumulated in injured rice tissue suggested that it might play the role in the resistant response of rice to BPH feeding.

Key words: *MAPK* mRNA; *in situ* hybridization; Brown planthopper; Rice

褐飞虱 (*Nilaparvata lugens* Stal.) 是一种以水稻 (*Oryza sativa* L.) 为食的单食性昆虫, 主要刺吸稻株汁液, 引发飞虱“火烧”, 其对水稻的危害是毁灭

性的、暴发性的, 是亚洲最严重的水稻害虫之一。目前一般通过农药杀虫, 不但成本高, 而且大量使用农药还会造成环境污染。为从根本上遏制褐飞虱的

收稿日期: 2004-10-12 接受日期: 2005-06-13

基金项目: 广东省自然科学基金项目 (04300465); 国际 IFS 资助。

*通讯作者 Corresponding author

危害,从了解抗性相关基因的特性着手,弄清水稻对褐飞虱的抗性机理是很有意义的。

促分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)是一类丝氨酸/苏氨酸(Ser/Thr)蛋白激酶。人们已在多种植物中发现大量 MAPK 家族成员,它们同动物和酵母 MAPK 类似,在传递激素和环境胁迫等多种信号的过程中起作用^[1-3]。有研究表明,当植物受到各种生物和非生物胁迫时,能快速地激发产生 MAPKs^[4,5]。在烟草(*Nicotiana tabacum*)中有两个 MAPKs,即 SIPK 和 WIPK,由不同的病原菌相关信号和非生物胁迫激发,表明在植物体内,病原菌信号是完整的胁迫信号网络途径的一部分。在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中,SIPK 和 WIPK 类似物(AtMPK6 和 AtMAPK3)同样也能被胁迫因子激发^[6]。这些研究表明,MAPK 级联途径包含在植物抗性反应机制中。到目前为止,水稻中的一些 MAPKs 基因也已被成功分离,并且对其相应的特性进行了分析^[7,8]。本研究根据以前抑制差减杂交与点杂交相结合所分离得到的水稻特异表达基因,克隆出 *BPHiw103* 作为候选的基因,序列比对发现与基因 *MAPK3* 存在很高的同源性,因此可以认为是 MAPK 家族基因,我们对其相关特性进行了分析。原位杂交作为一种能够从细胞水平精确定位基因表达产物时空分布的技术已被广泛应用于植物发育生物学中基因表达调控研究^[9]。本研究旨在通过 Northern 杂交、mRNA 原位杂交技术,探索 *MAPK3* 在 RNA 整体水平以及在褐飞虱取食部位的表达情况,为探讨其在水稻抗性反应中的作用提供证据。

1 材料和方法

1.1 材料

B5 是来源于栽培稻与药用野生稻(*Oryza officinalis* Wall ex Watt)间杂交后代的一个高抗褐飞虱的稳定品系,本实验中所有用于组织切片的根、茎、叶均来自 B5。所用的褐飞虱(*Nilaparvata lugens* Stal.)均是发育至 2-3 龄的若虫,生物型为 2 型,由武汉大学生命科学院遗传所培养,为台中 1 号。*BPHiw103* 是由作者通过构建褐飞虱诱导的抑制差减杂交文库,经高密度点杂交筛选获得的克隆

子。该克隆包含 cDNA 全长 520 bp,质粒载体为 pGEMT,两端分别有 T3 和 T7 RNA 多聚酶启动子。在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 上经 Blast 比较分析得知,该序列与水稻品种日本晴中分离得到的 MAPK3 蛋白激酶序列高度一致,同源性达到 97%,预测 *BPHiw103* 编码一种 MAPK3 蛋白。

1.2 材料处理及组织切片制备

将 B5 的种子均匀播于直径约 40 cm 的塑料桶中,待秧苗生长 2 周,长至三叶期,按每苗 10 头放入 2-3 龄褐飞虱若虫,立即罩上纱网,防止其逃逸。48 h 后,剪取根、茎、叶,用 FAA (10% 甲醛、50% 乙醇、3% 冰乙酸)固定,经叔丁醇系列脱水后,石蜡包埋。不接虫材料同时播于另外一桶中,罩上纱网,防止昆虫进入。同样在三叶期剪取根、茎、叶,经固定、脱水、包埋。包埋好的各种材料用组织切片机切片,厚度为 8-10 μm 。

1.3 工具酶和试剂

T4 DNA 连接酶、限制性内切酶和 Taq 酶等分别购自 Promega, Gibco BRL 等公司, T3 和 T7 RNA 聚合酶以及地高辛标记检测试剂等分别购自 Promega, Sigma 和 Roche 等公司。

1.4 RNA 杂交鉴定

三叶期的水稻 B5 在褐飞虱取食 48 h 后,提取总 RNA。总 RNA 采用 TRIzol 试剂,根据试剂盒说明书来提取,取 25 μg 的总 RNA 在 1.2% 甲醛变性胶上电泳 4 h 后检测其完整性。

提取褐飞虱取食(T) 48 h 和未取食(C)的三叶期的 B5 幼苗总 RNA,以 cDNA 的 PCR 产物为探针,进行 Northern 杂交分析,探针标记及杂交方法参照陈绍荣等^[10]的方法。

1.5 mRNA 原位杂交探针的制备

提取质粒 DNA,用 *ScaI* 消化使其线性化,酚/氯仿抽提蛋白,沉淀并干燥 DNA,再按 1 $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ 重悬于 DEPC- H_2O 中,取 1 μg 消化后的质粒 DNA 分别用 T3 和 T7 RNA 聚合酶进行体外转录得到反义和正义(对照)RNA 探针。0.2 mol EDTA 终止反应后 LiCl/冰乙醇沉淀,清洗,真空干燥,根据沉淀物多少按 0.2 $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ 的浓度将沉淀重悬于 DEPC- H_2O

中并加入 RNase 抑制剂, -20°C 保存。分别用 *Kpn* I 和 *Eco*R I 完全消化包含 *MAPK* 基因的质粒后, 经 T3 和 T7 RNA 聚合酶体外转录分别得到地高辛标记的反义和正义(对照)RNA 探针。

1.6 mRNA 原位杂交

组织切片 mRNA 原位杂交采用王小兰等人^[11] 的方法进行, 分别取褐飞虱取食前后幼苗的根、茎、叶用 4% 多聚甲醛固定, 常规酒精系列脱水, 石蜡包埋, 切片。将石蜡切片在事先经 180°C 烘烤并于 100 mg L^{-1} 多聚赖氨酸浸泡晾干的载玻片上于 45°C 展片、贴片, 烘烤过夜。干燥的石蜡切片脱蜡后经复水、乙醇系列脱水, 室温晾干。预杂交处理后, 以 *MAPK* 正、反义探针分别作原位杂交, 经洗涤, 再用带有碱性磷酸酶的抗 DIG 抗体(购自 Roche 公司)作免疫反应, 最后用氯氮四唑(NBT)和 5-溴-4-氯-3-吡啶磷酸(BCIP)显色, 中性树脂胶封片观察, 产生蓝紫色沉淀的即为阳性反应。

2 结果和分析

2.1 Northern 杂交

对照及接虫的 B5 水稻植株 RNA 样品经电泳分离转膜后, 以 *MAPK3EST* 为探针进行 Northern 杂交。结果见图 1, 经褐飞虱取食后, *MAPK3* 的表达量明显高于对照, 说明此基因受褐飞虱取食诱导。

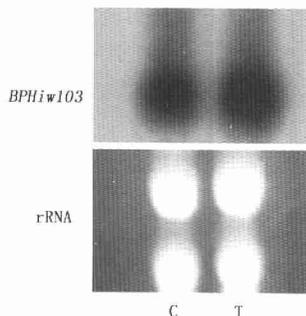


图 1 *BPHiw103* 的 Northern blot 分析

Fig. 1 Northern blot analysis of *BPHiw103*

C: 褐飞虱未取食的 B5 植株 RNA。RNA from B5 plant for control; T: 褐飞虱取食的 B5 植株 RNA。RNA from B5 plant fed by brown planthopper (BPH).

2.2 反义探针的确定

以 *BPHiw103* T3 和 *BPHiw103* T7 链为探针, 分别对接虫材料茎纵切的切片进行原位杂交。结果显示, 以 *BPHiw103* T3 为探针进行的原位杂交, 除适当的背景外无阳性反应; 而 *BPHiw103* T7 与切片

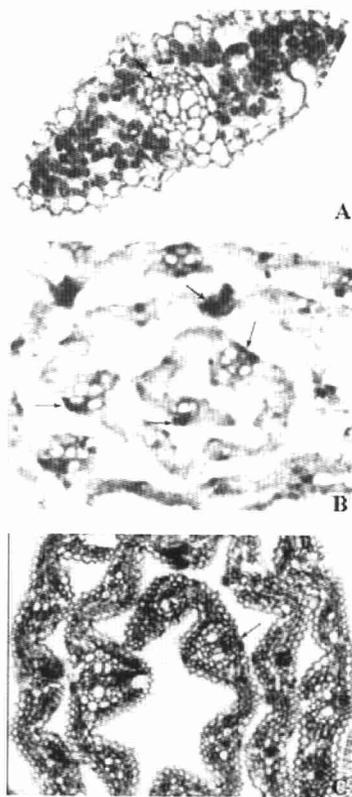


图 2 *BPHiw103* 在水稻叶鞘中的原位定位(均为叶鞘横切)

Fig. 2 *In situ* localization of *BPHiw103* in rice sheath. 箭头所示为韧皮部。A: 褐飞虱未取食的叶鞘组织, $\times 40$; B: 褐飞虱取食的叶鞘组织, $\times 10$; C: 褐飞虱取食的叶心组织, $\times 10$

Arrows indicate phloem. Leaf sheath transsections, showing tissue unfed by brown planthopper (A, $\times 40$), fed by brown planthopper (B, $\times 10$), and tissue of inner leaves fed by brown planthopper (C, $\times 10$).

杂交有蓝紫色沉淀,说明该探针为反义链。因此,确定了以反义链为探针来进行组织切片的原位杂交实验。

2.3 原位杂交

以 B5 接虫 48 h 后和未接虫的叶鞘石蜡包埋组织切片,与探针 *BPHiw103* T7 进行原位杂交,显色后镜检、照相,通过颜色反应判断不同组织中褐飞虱取食与未取食两种情况下 *MAPK* (*BPHiw103*) 在 B5 中的同源基因的表达情况(图 2)。结果显示,无论接虫与否,*MAPK* mRNA 都有表达,在未接虫材料的薄壁组织表达非常明显,而在维管组织的韧皮部不表达(图 2A);接虫材料的叶鞘薄壁组织 *MAPK* mRNA 有一定的表达,但与未接虫材料相比呈下降趋势(图 2B),叶心的薄壁组织中零星的杂交信号使得这一趋势尤为明显(图 2C)。原位杂交结果很直观地反映了 *MAPK* 基因在褐飞虱取食前后的水稻组织中的变化情况。从接虫的叶鞘组织切片原位杂交结果中,可见韧皮部的 *MAPK* 表达急剧上升,尤其是在叶心材料中。可以认为,在 B5 水稻叶鞘韧皮部中,褐飞虱若虫诱导了 *MAPK* 的表达。通过对褐飞虱取食生活习性的观察发现,它取食水稻组织的部位刚好在韧皮部。因此,可以进一步确定 *MAPK* 基因在水稻对褐飞虱的抗性反应中起着重要的作用。

3 讨论

植物中的许多 *MAPK* 激酶已经被分离,并可以分为 5 个亚家族,PERK1-5。目前的信息表明每个亚家族都是对特殊刺激产生反应或包含在特殊的细胞进程中,如伤反应、渗透胁迫、植物-病原菌关系、激素及细胞循环/分裂等。一些植物的多基因家族具有发育、生理及组织特异表达的特性^[12,13]。在已报道的研究中,多数并没有涉及到 *MAPK* 基因在组织转录中是如何表达的,矮牵牛花中该基因的表达被证明发生在生长阶段及其再生过程中,尤其在雌性繁殖器官中表达丰富^[14];还有些植物 *MAPK* 基因在胁迫处理中为上调反应,但其转录诱导的生理机制仍然未知^[15],因此研究 *MAPK* 基因在组织中的表达对于分析其功能具有重要的意义。我们初步的研究表明,褐飞虱取食后,*BPHiw103* 在韧皮部特异表

达,对日后进一步研究 *MAPK* 基因的功能具有重要的意义。

褐飞虱是亚洲最严重的水稻害虫之一,除了对水稻作物产生直接的伤害外,它还是水稻病毒病的传播媒介。尽管取食植物韧皮部的昆虫多种多样,但是植物抗性反应分子生理及抗性机理信息却相当匮乏。在本研究中,我们针对点杂交筛选获得的可能的褐飞虱诱导基因进行了进一步的特性分析,这些结果将为进一步研究取食植物韧皮部的昆虫与植物的关系奠定基础。

通过 Northern 杂交,可以很清晰地判断,*MAPK* 基因在褐飞虱取食 48 h 后,其表达量增加;*mRNA* 原位杂交结果表明,褐飞虱取食前后,此基因在叶鞘中均有表达,取食后,在韧皮部的表达尤为突出,如内层的叶鞘组织中蓝色的表达信号(图 2C 箭头所示)。十分巧合的是,褐飞虱的取食部位主要是在水稻的叶鞘部位,对褐飞虱的取食习性研究表明,褐飞虱主要通过口器刺入水稻叶鞘的韧皮部,形成针鞘,吸食维管束的汁液。这种位置上的相符正说明该基因在韧皮部的表达增强是受褐飞虱取食诱导所致。

参考文献

- [1] Innes R W. Mapping out the roles of MAP kinases in plant defense [J]. Trends Plant Sci, 2001, 6:392-394.
- [2] Tena G, Asai T, Chiu W, et al. Plant mitogen-activated protein kinase signaling cascades [J]. Curr Opin Plant Biol, 2001, 4:392-400.
- [3] Zhang S, Klessig D F. MAPK cascades in plant defense signaling [J]. Trends Plant Sci, 2001, 6:520-527.
- [4] Seo S, Sano H, Ohashi Y. Jasmonate-based wound signal transduction requires activation of WIPK, a tobacco mitogen-activated protein kinase [J]. Plant Cell, 1999, 11:289-298.
- [5] Ichimura K, Mizoguchi T, Yoshida R, et al. Various abiotic stresses rapidly activate *Arabidopsis* MAP kinases ATMPK4 and ATMPK6 [J]. Plant J, 2000, 24:655-665.
- [6] Nuhse T S, Peck S C, Hirt H, et al. Microbial elicitors induce activation and dual phosphorylation of the *Arabidopsis thaliana* *MAPK* [J]. J Biol Chem, 2000, 275:7521-7526.
- [7] Song F, Goodman R M. *OsBIMK1*, a rice MAP kinase gene involved in disease resistance response [J]. Planta, 2002, 215:997-1005.
- [8] Wen J Q, Oono K, Imai R. Two novel mitogen-activated protein signaling components, *OsMEK1* and *OsMAPI*, are involved in a

- moderate low-temperature signaling pathway in rice [J]. *Plant Physiol*, 2002, 129:1880-1891.
- [9] Davies S P, Singh M B, Knox R B. Identification and *in situ* location of pollen specific genes [J]. *Int Rev Cytol*, 1992, 140:19-35.
- [10] Chen S R(陈绍荣), Bi X Z(毕学知), Lu Y T(吕应堂), et al. An improved plant tissue RNA *in situ* hybridization protocol [J]. *Heridity (遗传)*, 1998, 20(3):27-30.(in Chinese)
- [11] Wang X L(王小兰), Weng Q M(翁清妹), You A Q(游艾青), et al. Cloning and characterization of rice *RH3* gene induced by brown planthopper [J]. *Chin Sci Bull(科学通报)*, 2003, 48:1976-1981. (in Chinese)
- [12] Kranz H D, Denekamp M, Greco R, et al. Towards functional characterization of the members of the *R2R3-MYB* gene family from *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant J*, 1998, 16:263-276.
- [13] Durbin M L, McCaig B, Clegg M T. Molecular evolution of the chalcone synthase multigene family in the morning glory genome [J]. *Plant Mol Biol*, 2000, 42:79-92.
- [14] Decroocq-Ferrant V, Decroocq S, Van Went J, et al. A homologue of the MAP/ERK family of protein kinases is expressed in vegetative and in female reproductive organs of *Petunia hybrida* [J]. *Plant Mol Biol*, 1995, 27:339-350.
- [15] Romeis T, Piedras P, Zhang S, et al. Rapid Avr9- and Cf-9-dependent activation of MAP kinases in tobacco cell cultures and leaves: convergence of resistance gene, elicitor, wound, and salicylate responses [J]. *Plant Cell*, 1999, 11:273-287.

欢迎订阅 欢迎投稿

《热带亚热带植物学报》2006 年征订启事

《热带亚热带植物学报》是中国科学院主管、中国科学院华南植物研究所和广东省植物学会联合主办、科学出版社出版的国家级学术性期刊。主要刊载热带亚热带地区植物学研究的论文报告、科研简报、综述评等;介绍植物学研究领域中各分支学科的新发现、新理论、新方法和新技术等,为推动植物学研究和开发热带亚热带植物资源,为国民经济建设和科学技术进步做出贡献。主要读者对象为本学科的研究人员、大专院校师生等。

本刊创刊于 1993 年,刊号为 CN 44-1374/Q,是中国自然科学核心期刊。本刊多年来被美国《生物学文摘》(BA)、美国《化学文摘》(CA)、英国《CAB International》的多种专业文摘以及《中文核心期刊要目总览》(2004 年版)、中国科技论文统计源期刊、《中国科学引文数据库》、《中国生物学文摘》等收录。

本刊为双月刊,大 16 开铜版纸,96 页,2006 年每册 15.00 元,全年订价 90.00 元(含邮费)。可直接汇款到本刊编辑部或通过天津“联合征订服务部”订购,地址为:天津市大寺泉集北里别墅 17 号,邮编:300385,电话:(022)23973378,联合征订代号:5521。海外发行机构:中国图书进出口(集团)总公司出口部,海外发行代号:BM7260。

编辑部地址:广州市乐意居中国科学院华南植物园内,邮编:510650

电话:(020)37252514 传真:(020)37252642

E-mail: jtsb@scib.ac.cn 网址: <http://ryzb.chinajournal.net.cn>;

<http://rdyrdzwx.periodicals.net.cn>

若有漏订者,可直接汇款至本刊编辑部补订。本刊历年的订价(含邮费)为:1993 年(只出版了一期)3.8 元;1994 年-1996 年 15.4 元/年;1997 年-2001 年 26.4 元/年;2002 年-2003 年 46 元/年;2004 年-2005 年 90 元/年。