

CMV 侵染胁迫下黄瓜重要功能基因表达及代谢响应的研究

毛伟华^{1,2}, 龚亚明³, 宋兴舜¹, 夏晓剑¹, 王彦杰¹, 周艳虹¹, 师 恺¹, 李亚丹^{1,4}, 喻景权¹

(¹浙江大学园艺系/农业部园艺植物生长发育与品质调控重点开放实验室, 杭州 310029; ²浙江大学分析测试中心, 杭州 310029;

³浙江省农业科学院蔬菜研究所, 杭州 310021; ⁴河北师范大学生命科学院, 石家庄 050016)

摘要: 【目的】研究黄瓜花叶病毒病 (CMV) 侵染胁迫下黄瓜重要功能基因表达和代谢途径响应。【方法】在结合气体交换和叶绿素荧光参数及抗性相关酶活性测定的基础上, 应用农业部园艺植物生长发育与品质调控重点开放实验室自主开发的黄瓜 cDNA 芯片研究黄瓜在 CMV 侵染胁迫下的基因表达谱变化, 并对其中 5 个具有代表性的基因通过实时荧光定量 PCR (QRT-PCR) 进行检测, 以验证 cDNA 芯片杂交结果的可靠性。【结果】共获得 67 个差异表达显著的基因, 其中 42 个基因下调表达, 25 个基因上调表达。这些差异表达的基因涉及了许多重要代谢途径。许多与光合作用、氮同化相关的基因受到明显的抑制; 而一些防御相关基因和信号传导相关基因则诱导表达; 同时, 也发现了一些与 CMV 胁迫相关的功能未知基因或未有任何功能信息的基因。【结论】CMV 胁迫引发了黄瓜代谢发生一系列复杂的适应性变化, *PR1-1a* 等基因可能在黄瓜防御 CMV 侵染过程发挥着重要作用。

关键词: 黄瓜; CMV; cDNA 芯片; 基因表达谱

Expression Analysis of Important Functional Genes and Pathways in Cucumber Leaves in Response to CMV Stress

MAO Wei-hua^{1,2}, GONG Ya-ming³, SONG Xing-shun¹, XIA Xiao-jian¹, WANG Yan-jie¹, ZHOU Yan-hong¹,
SHI Kai¹, LI Ya-dan^{1,4}, YU Jing-quan¹

(¹Department of Horticulture, Zhejiang University/The Ministry of Agricultural Laboratory of Horticultural Plant Growth Development and Biotechnology, Hangzhou 310029; ²Center of Analysis and Measurement, Zhejiang University, Hangzhou 310029; ³Institute of Horticulture, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021; ⁴College of Life Science, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050016)

Abstract: 【Objective】 The aim of this paper is to study on the expression of important functional genes and pathways in cucumber leaves in response to CMV stress. 【Method】 On the basis of study of photosynthesis and activities of defence-related enzymes, the changes of gene expression profiles was analyzed by microarray in cucumber (*Cucumis sativus* L.) after CMV infection. In order to validate the microarray result, five representative clones induced or repressed from microarray analysis were selected for real-time quantitative PCR analysis. 【Result】 Significant changes in transcript abundance were observed for 67 genes, among them, 42 showed down-regulated expression and 25 showed up-regulated expression. Analysis of these CMV-responsive genes showed that they belong to wide range of functional categories. Many genes for photosynthesis and nitrogen assimilation were strongly repressed while some defense-related genes, on the other hand, were found to be up-regulated. In addition to these expression changes, some functions unknown or unreported novel genes that respond to CMV stress were also identified. 【Conclusion】 A complex set of metabolic adaptation appears to occur during CMV stress and some genes, such as *PR1-1a* might play an important role in defence.

Key words: *Cucumis sativus* L.; CMV; Microarray ; Gene expression profiling

收稿日期: 2007-08-25; 接受日期: 2007-10-15

基金项目: 国家重点基础研究发展计划资助项目 (2009CB119000), 国家自然科学基金资助项目 (30400297, 30671257, 30800763, 3050044) 和浙江省自然科学基金资助项目 (Y307168)

作者简介: 毛伟华 (1970-), 女, 浙江温岭人, 博士, 研究方向为蔬菜分子生物学。Tel: 0571-86971391; E-mail: whmao@zju.edu.cn. 通讯作者喻景权 (1963-), 男, 浙江义乌人, 教授, 研究方向为设施园艺学。E-mail: jqyu@zju.edu.cn

0 引言

【研究意义】黄瓜花叶病毒 (cucumber mosaic virus, CMV) 是雀麦花叶病毒科 (Bromoviridae) 黄瓜花叶病毒属 (*Cucumovirus*) 典型成员, 其寄主范围十分广泛, 能侵染 85 科 1 000 多种植物^[1]。其中包括许多重要的经济作物, 如引起番茄的坏死、香蕉的心腐、豆科和瓜类植物的花叶等, 对这些作物的生产造成了巨大的经济损失。【前人研究进展】关于 CMV 致病机制的研究历来受到重视, 但以往对 CMV 的研究主要着重于对 CMV 基因组和病毒复制的生物学研究^[2], 而关于 CMV-寄主互作机理的研究相对较少。已有研究表明病原菌侵染植物后, 常引起植物光合下降、碳水化合物代谢途径发生变化^[3-5], 与此同时, 植物在感知病原菌入侵后也会作出一定的反应, 如产生信号分子, 并通过关键调控基因传递和放大, 最终诱导一系列防卫反应基因的表达和代谢的变化而产生抗性^[6]。可见植物对病毒的响应是一个十分复杂的过程, 涉及多种代谢途径和基因的协作。目前, 基因芯片技术因具有微型化、集约化和标准化的优点, 在病原菌-寄主互作机理研究上显示出了极为广阔的应用前景。运用基因芯片技术研究病原菌与拟南芥等模式植物的互作已获得了可喜的结果^[7,8]。【本研究切入点】黄瓜 (*Cucumis sativus* L.) 是一种深受人们喜爱的重要的设施园艺作物, 在栽培过程中极易受黄瓜花叶病毒侵染, 但目前对 CMV-寄主互作机理研究主要集中于西葫芦^[3]、拟南芥^[8]、烟草^[9], 而有关黄瓜-CMV 互作分子机理的研究罕有报道。【拟解决的关键问题】本研究在结合气体交换和叶绿素荧光参数及抗性相关酶活性测定的基础上, 利用农业部园艺植物生长发育与品质调控重点开放实验室自主开发出的首张黄瓜 cDNA 基因芯片研究黄瓜在 CMV 侵染这一生物胁迫下的代谢响应及基因表达谱变化, 为寄主-CMV 互作机理的深入研究和基因功能的分析与验证提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料培养及处理

供试黄瓜品种为‘津研 3 号’ (*Cucumis sativus* L. cv Jinyan 3)。精选一定数量的种子播种于草炭中, 两片子叶充分展开时移入 Hoagland 和 Arnon 配方营养液中, 在 12 h 600 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF 和 28°C/18°C 条件下培养。期间每隔 5 d 更换 1 次营养液。

黄瓜花叶病毒 (cucumber mosaic virus, CMV) 侵

染。试验设两个处理: (1) CK (不接种 CMV); (2) CMV (接种 CMV)。待幼苗第 1 片真叶展开时, 以接种缓冲液浓度 (0.01 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液, pH 7.0) 制备的 CMV 侵染西葫芦粗汁液摩擦接种供试黄瓜子叶和第 1 片真叶, 并以健康西葫芦粗汁液同样处理的供试植株为健康对照, 每个处理 40 株。接种后第 12 天, 取上部第 1 片完全展开叶进行各种指标的测定。此时, 接种 CMV 的黄瓜叶片已经表现出典型的花叶症状。

1.2 方法

1.2.1 气体交换与叶绿素荧光参数的测定 应用 LI-6400 型光合仪 (美国 LI-COR 公司生产) 在测定光合速率 (Pn)、气孔导度 (Gs) 和胞间 CO_2 浓度 (Ci), 应用 FMS2 脉冲调制式荧光仪 (英国 Hansatech 公司生产) 测定荧光参数天线色素光能转化效率 F_v'/F_m' 、光化学猝灭系数 q_P 、PS II 光合电子传递量子效率 $\Phi_{PS II}$ 和 PS II 最大光化学效率 F_v/F_m , 测定光强为 600 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 温度为 25°C, CO_2 浓度为 350 $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$, 参照 Zhou 等^[5]的方法进行有关光合作用和叶绿素荧光参数的测定和计算, 测定叶片均为上部第 1 片完全展开叶, 测定重复 3 次。立即采取经光合参数测定后的叶片于液氮中冷冻后, -76°C 低温保存, 用于酶活性测定及总 RNA 提取。

1.2.2 酶活性的测定 苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 活性测定: 取 0.3 g 待测叶组织与预冷的 0.25 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硼酸缓冲液 (pH 8.8, 含 5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 巯基乙醇) 在冰浴上研磨, 匀浆液于 20 000 $\times g$ 下低温离心 20 min。取上清液按 Hyodo 等^[10]的方法测定酶活性, 测定所有样品在波长为 290 nm 时的光吸收值 A, 以 ΔA 每分钟增加 0.01 为 1 个酶活性单位。

愈创木酚过氧化物酶 (GPOD) 活性的测定: 取 0.3 g 待测叶组织加 25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ HEPES 缓冲液 (含 1% PVP, 0.2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA) 于冰浴中研磨, 匀浆液于 20 000 $\times g$ 下低温离心 20 min。取上清液按 Cakmak 等^[11]的方法测定过氧化物酶活性, 取其中 10 s 的动力学变化计算酶促反应速率。

1.2.3 荧光探针的制备、杂交及芯片扫描、数据分析 用于杂交的芯片为本实验室根据 GenBank 已发布的生物代谢途径中的关键酶基因序列, 以黄瓜叶片为材料, 采用 RT-PCR 法扩增这些酶的相应基因片段, 在完成 432 个基因片段的克隆分离、测序和生物信息学分析工作的基础上所研制的黄瓜 cDNA 芯片。该芯片含有 9 个质控 cDNA 片段和 423 个 cDNA 探针。

按 TRIzol[®]试剂说明书分别抽提对照和 CMV 处理样本总 RNA 各 90 μg 。其中每个处理的 10 μg 总 RNA 用于 QRT-PCR 试验, 80 μg 总 RNA 用于芯片荧光探针的制备。荧光探针标记采用 CyScribe First-Strand cDNA Labeling kit (Amersham) 标记, 处理组以 Cy5 dCTP 标记, 对照组以 Cy3 dCTP 标记。按照毛伟华等^[12]的方法进行芯片制备、荧光探针标记、芯片杂交、清洗、扫描及数据分析。每个处理设置 3 次独立试验, 基因差异表达判断标准为: (1) Ratio 值 > 2 为明显上调表达基因, Ratio 值 < 0.5 为明显下调表达基因, $0.5 < \text{Ratio 值} < 2$ 视为该基因表达无明显变化; (2) 重复间试验结果一致, 即都有相同的上调和下调表达趋势, 且程度相似, 计算基因点的平均 Ratio 值为重复间 Ratio 值的平均值。

1.2.4 QRT-PCR 验证芯片分析结果 根据芯片分析结果, 选择有代表性的 2 个下调的基因 (光合相关基因 *SSU* 和 *RCA*) 及 3 个上调的基因 (抗性相关基因 *PAL*、*PRI-1a* 和 *HPL*) 作为 QRT-PCR 验证的对象。首先分别以处理和对照的 10 μg 总 RNA 逆转录成 cDNA 第一链, 然后通过所选基因的特异性引物参照试剂说明书 (BioRad) 在 BioRad 的 iCycle 定量 PCR 仪进行实时定量 PCR。PCR 反应参数为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min, 然后 94 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 min, 40 个循环后作熔解曲线 (94 $^{\circ}\text{C}$ ~56 $^{\circ}\text{C}$, 0.5 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{s}^{-1}$) 以鉴定反

应的特异性。每个点 3 次重复。选用 *actin* 基因为内参照, 按照 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak) 法^[13]计算出待测基因相对表达量, 最终确定基因表达水平变化趋势, 以验证芯片杂交结果的可靠性。QRT-PCR 引物如下: *actin* 上游引物序列 5'-TGGACTCTGGTGGATGGTGTGA-3', 下游引物序列 5'-CAATGAGGGATGGCTGGAAAA-3'; *SSU* 上游引物序列 5'-ATGGGTTCCCTGCGTTGA-3', 下游引物序列 5'-CCTGAGATGAGTCGGTGC-3'; *RCA* 上游引物序列 5'-GCTGACAACCCAACCAA-3', 下游引物序列 5'-CATCCGACCATCACGAA-3'; *PAL* 上游引物序列 5'-ACGGTTTGCCTTCTAAT-3', 下游引物序列 5'-CATCCTGGTTGTGTTGC-3'; *PRI-1a* 上游引物序列 5'-AACTCTGGCGGACCTTAC-3', 下游引物序列 5'-GACTTCCTCCACACTACT-3'; *HPL* 上游引物序列 5'-CTCCTTTCTCGCTTCTCACC-3', 下游引物 5'-TCAAACGACACGGCATCACT-3'。

2 结果与分析

2.1 CMV 侵染对黄瓜气体交换和叶绿素荧光参数的影响

在接种 CMV 后 12 d 分别测定黄瓜植株接种叶片及对照叶片的相关气体交换和叶绿素荧光参数 (表 1)。结果表明 CMV 侵染的植株中, 伴随着 Pn 和 Gs 显著降低, 胞间 CO_2 却反而上升, 但 Fv/Fm 却没有明

表 1 CMV 对黄瓜叶片气体交换和叶绿素荧光参数的影响

Table 1 Effects of CMV infection on gas exchange characteristics and chlorophyll fluorescence parameters in cucumber leaves

处理 Treatment	净光合速率 Pn ($\mu\text{molCO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	气孔导度 Gs ($\text{molH}_2\text{O}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	胞间 CO_2 浓度 Ci ($\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$)	天线色素光能转 化效率 Fv'/Fm'	光化学猝灭 系数 qP	PS II 光合电子传 递量子效率 Φ_{PSII}	PS II 最大光化 学效率 Fv/Fm
CK	17.07±0.21a	0.27±0.08a	231.33±5.43a	0.84±0.04a	0.61±0.03a	0.37±0.02a	0.84±0.04a
CMV	5.02±0.37b	0.14±0.09b	261.33±5.23b	0.50±0.04b	0.45±0.05b	0.20±0.08b	0.85±0.02a

数值后不同字母表示经 Tukey 法多重检验在 0.05 水平上差异显著

Values followed by different letters are significantly different according to Tukey test at 5% level

显的变化; 同时, CMV 侵染导致了 qP 和 Fv'/Fm' 的下降, 从而也引起了 Φ_{PSII} 的下降。

2.2 CMV 侵染对黄瓜叶片 GPOD 和 PAL 活性的影响

CMV 侵染植株的 GPOD 与 PAL 活性显著提高 (图 1)。与对照相比, CMV 侵染使侵染植株的 GPOD、PAL 活性分别增加了 66.7%、50.2%。

2.3 黄瓜 cDNA 芯片杂交结果分析

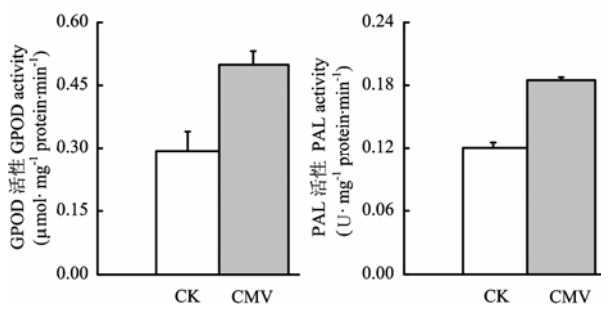
提取 CMV 处理和对照样本的总 RNA, 制备成荧光探针进行芯片杂交。经数据提取分析后获芯片杂交有效数据 1 127 个, 占总数 87.9%。其中受诱导差异

表达的基因 67 个, 下调表达的有 42 个, 上调表达的有 25 个。序列分析表明, 受诱导表达差异基因中已知功能的基因有 27 个, 上调 8 个, 下调 19 个。表 2 列出已知功能的上调和下调基因。从表 2 可知, CMV 侵染后, 黄瓜生物代谢途径中许多酶的基因表达发生明显的变化: (1) 10 个与光合作用相关的基因的表达受到了抑制, 其中 4 个基因 (叶绿素 a/b 结合蛋白 I、III、光系统 II PsbP 蛋白、铁氧还蛋白 NAPD^+ 还原酶) 与植物光反应相关, 6 个基因 (包括 5 个 Calvin 循环的关键酶和与运输 CO_2 有关的关键酶碳酸酐酶)

表 2 CMV 胁迫下黄瓜表达显著差异的基因

Table 2 Genes showing significant differential expression in cucumber after CMV infection

功能分类 Category	基因注释 Annotation	比值 Average ratio
光合作用相关基因 Photosynthesis	叶绿素 a/b 结合蛋白 III Chlorophyll a/b binding protein type III	0.141
	光系统 II PsbP 蛋白 PsbP	0.128
	铁氧还蛋白 NADP ⁺ 还原酶 Ferredoxin NADP ⁺ reductase	0.284
	Rubisco 活化酶 RCA	0.292
	碳酸酐酶 Carbonic anhydrase isoform 2	0.289
	转酮酶 Transketolase	0.021
	天庚酮糖 1,7-二磷酸酶 Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase precursor	0.192
	叶绿素 a/b 结合蛋白 I Chlorophyll a/b-binding protein type I	0.419
	Rubisco 小亚基 SSU	0.235
叶绿素合成相关基因 Chlorophyll synthesise	磷酸甘油酸激酶 Phosphoglycerate kinase	0.108
	原叶绿素酯氧化还原酶 NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase	0.007
碳水化合物代谢相关基因 Carbohydrate metabolism	谷氨酰-tRNA 还原酶 Glutamyl-tRNA reductase	0.232
	肌醇半乳糖苷合成酶 Galactinol synthase	0.168
	高尔基体苹果酸脱氢酶 Glyoxysomal malate dehydrogenase	0.083
	棉子糖合成酶 Raffinose synthase	0.165
	液泡 3-磷酸甘油醛脱氢酶 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	0.296
氮, 蛋白代谢相关基因 Nitrogen, protein metabolism	磷酸果糖激酶 Phosphofructokinase	2.081
	硝酸还原酶 Nitrate reductase	0.232
	谷氨酸脱羧酶 Glutamate decarboxylase	0.206
	转氨酶 2 Aminotransferase 2	0.107
	25S 核糖体蛋白 25S ribosomal RNA	2.682
逆境相关基因 Stress	天冬氨酸蛋白酶 Aspartic proteinase	3.477
	过氧化物酶 Peroxidase	2.054
	苯丙氨酸解氨酶 Phenylalanine ammonia lyase 1 (PAL1)	2.304
	PR 蛋白 1-1a Pathogenesis-related protein 1-1a	2.183
	脂氢过氧化物裂解酶 Fatty acid hydroperoxide lyase	6.102
	细胞色素 P450 90 C1 Cytochrome P450 90 C1 (CYP90 C1)	5.945



数据至少为 3 次重复的平均数 Data are the mean of at least three replicates with standard errors shown by vertical bars

图 1 CMV 侵染对 GPOD 与 PAL 活性的影响

Fig. 1 Effects of cucumis mosaic virus infection on activities of GPOD and PAL in cucumber leaves

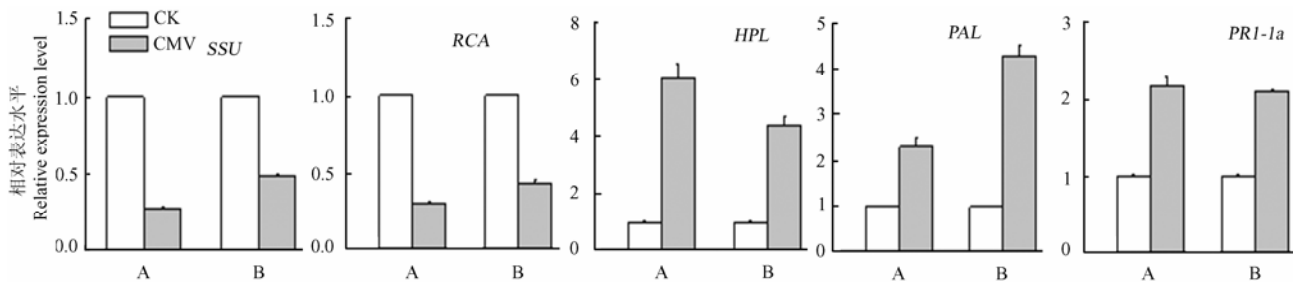
与暗反应相关。(2) 3 个氮同化关键酶硝酸还原酶 (NR)、谷氨酸脱羧酶、转氨酶 2 的表达受到抑制。(3) 2 个叶绿素合成代谢途径中的相关基因谷氨酰-tRNA 还原酶、原叶绿素酯氧化还原酶表达发生下调。(4) 一些碳水化合物代谢相关酶的基因下调表达, 包括液泡 3-磷酸甘油醛脱氢酶、高尔基体苹果酸脱氢酶, 肌醇半乳糖苷合成酶, 棉子糖合成酶等。(5) 与此同时, CMV 侵染也使一些基因表达发生明显的上调, 功能明确的有: 磷酸果糖激酶、过氧化物酶 (POD)、苯丙氨酸解氨酶 (PAL)、PR1-1a、25S 核糖体蛋白、天冬氨酸蛋白酶、细胞色素 P450 90 C1 (CYP90 C1)、脂肪酸羟过氧化物解氨酶 (HPL)。

2.4 黄瓜 cDNA 芯片杂交结果验证

为了验证芯片的结果, 笔者进一步对 3 个上调的

基因 (*PAL*, *PR1-1a*, *HPL*)、2 个下调基因 (*SSU*, *RCA*) 进行实时定量 PCR 检测。结果发现 QRT-PCR 的结果与芯片的结果具有一致性, 即芯片中上调的基

因在定量 PCR 中也上调, 芯片中下调的基因在定量 PCR 中也下调 (图 2)。这说明芯片试验结果是可靠的。



A. 在芯片中检测出的 CK 和 CMV 胁迫下基因的相对表达量; B. QRT-PCR 中检测出的 CK 和 CMV 胁迫下基因的相对表达量

A. Showing the relative expression level of gene in microarray for control and CMV stress; B. Showing the relative expression level of gene in RT-PCR for control and CMV stress

图 2 cDNA 芯片和 QRT-PCR 检测结果比较

Fig. 2 Comparison of microarray and QRT-PCR results

3 讨论

大量资料表明, 病毒侵染后会引引起植物光合效率明显下降, 已有一些研究认为植物感染 TMV、CMV 病毒后, 病毒外壳蛋白 CP 积累于叶绿体和类囊体膜, 从而抑制了光系统 II (PS II) 电子传递^[14], 导致了光合下降。另一方面, 包括本试验对马铃薯 Y 病毒(PvY) 侵染有关的工作在内的很多研究表明, 病毒感染导致与 CO₂ 同化、光同化物运输相关的一些酶受到了抑制, 可能是造成光合作用下降的主要原因^[4,5,15,16]。和前人的结果一致, 本研究结果也表明 CMV 侵染后黄瓜叶片光合效率明显下降。通过气体交换和叶绿素荧光参数分析表明, CMV 侵染叶片伴随着 Pn 和 Gs 显著降低, Ci 却反而上升 (表 1), 但 Fv/Fm 却没有明显的变化。这说明在 CMV 处理后, 黄瓜叶片光合作用的下降, 并不是气孔导度下降而使 CO₂ 供应减少所致, 而是由于非气孔因素阻碍了 CO₂ 的利用, 因而造成细胞间隙 CO₂ 积累^[17]。并且由于无论是对照或者 CMV 处理, 其 Fv/Fm 都保持在 0.85 左右, 这说明 CMV 处理并没有受到光抑制, 即 CMV 处理后并不是因为破坏了 PSII 才导致光合作用下降的。因此推测 CMV 侵染胁迫所引起的光合作用下降更多的是由于暗反应速率的下降所引起的。同时许多研究表明, 任何改变碳同化的因子均会减少对 ATP 和 NADPH 等的需求, 以减少电子传递速率, 即“下游”调节机制, 从而对

光合机构起着光保护作用^[18]。荧光测定结果表明, 伴随 qP 和 Fv'/Fm' 的下降, CMV 导致了 Φ_{PSII} 明显下降。通过芯片杂交 (表 2), 笔者鉴定到了 6 个与暗反应相关基因 (包括 5 个 Calvin 循环的关键酶和与运输 CO₂ 有关的关键酶碳酸酐酶) 的表达发生下调; 4 个与植物光反应相关基因 (叶绿素 a/b 结合蛋白 I、III, 光系统 II PsbP 蛋白, 铁氧还蛋白-NAPD⁺还原酶) 和两个叶绿素合成关键酶 (谷氨酰-tRNA 还原酶, 原叶绿素酯氧化还原酶) 的表达也受到了抑制。其中叶绿素 a/b 结合蛋白 I、III, 谷氨酰-tRNA 还原酶, 原叶绿素酯氧化还原酶与天线色素光能传递有关, 而光系统 II PsbP 蛋白, 铁氧还蛋白-NAPD⁺还原酶与电子传递有关。因此推测 CMV 侵染所引发的暗反应关键酶基因在转录水平的抑制是引起光合效率下降的主要原因, 从而在一定程度上引起 CMV 侵染植株产量下降; 与光合电子传递相关的这些基因在转录水平的下调则可能是对光合效率下降的一种适应性响应, 从而保护光合机构。

PR-1、POD、PAL 通常被认为与植物抗病性有着密切的关系, 并且 PR-1 的产生是系统获得抗性的标志^[19], 和前人结果一致, 笔者的芯片杂交结果表明 CMV 胁迫下 *PR-1a*、*PAL*、*POD* 明显上调。同时酶活性测定也表明 GPOD 和 PAL 活性明显高于对照, 因此推测在黄瓜 *PR-1a*、*PAL*、*POD* 在转录水平的上调表达对于防御 CMV 起着重要作用。

值得注意的是, 在为数不多的基因中, 笔者发现 CMV 胁迫下黄瓜两个细胞色素 P450 基因——*HPL* 和 *CYP90 C1* 表达量发生了明显的增加。*HPL* 属于 *CYP74 B* 的亚家族, 催化脂氢过氧化物裂解生成短链醛和含氧酸等 Oxylin, 其产物六碳醛不仅具有植保素功能以防御细菌、真菌、原生动物的侵染, 而且是一系列防御基因产生的信号分子^[20]。另外最近研究表明, *CYP90 C* 参与油菜素内酯 (BRs) 的合成^[21], 而 BR 对真菌细菌以及病毒病害具有广谱抗性。因此, 推测这两个细胞色素 P450 基因的上调表达, 是调控黄瓜合成各种抗病原物有关的物质以抵抗 CMV 胁迫的一种重要途径。

除以上所讨论的基因外, 还有为数不少的这一类与 CMV 和植物互作无确切关系、或该方面研究报道较少、但在笔者试验中受 CMV 诱导明显的基因, 这表明存在着一些并没有引起重视但在 CMV 和植物互作有重要作用的基因, 尽管难以在短时间内探明这些基因在植物 CMV 胁迫中的功能和相互之间联系, 然而这为进一步研究 CMV 和植物互作机理提供了丰富可靠的研究线索。

4 结 论

CMV 侵染胁迫引发了黄瓜代谢发生一系列复杂的适应性变化, CMV 侵染从转录水平抑制了碳、氮同化途径, 同时 CMV 侵染也诱导了 *PR-1a*、*PAL*、*POD*、*HPL* 和 *CYP90 C* 等防御基因的表达, 推测这些基因在黄瓜防御过程发挥着重要作用。

References

- [1] Roossinck M J. Pathogen profile cucumber mosaic virus, a model for RNA virus evolution. *Molecular Plant Pathology*, 2001, 2(2): 59-63.
- [2] Moury B. Differential selection of genes of cucumber mosaic virus subgroups. *Molecular Biology and Evolution*, 2004, 21(8): 1602-1611.
- [3] Havelda Z, Maule A J. Complex spatial responses to cucumber mosaic virus infection in susceptible *Cucurbita pepo* cotyledons. *The Plant Cell*, 2000, 12(10): 1975-1985.
- [4] 彭晏辉, 雷娟利, 黄黎锋, 喻景权. 马铃薯 Y 病毒侵染对叶绿体超微结构、光合和荧光参数的影响. *植物病理学报*, 2004, 34(1): 32-36.
Peng Y H, Lei J L, Huang L F, Yu J Q. Effects of potato virus Y infection on chloroplast ultrastructure, photosynthesis and chlorophyll fluorescence quenching in potato leaves. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2004, 34 (1): 32-36. (in Chinese)
- [5] Zhou Y H, Peng Y H, Lei J L, Zou L Y, Zheng J H, Yu J Q. Effects of potato virus Y^{NTN} infection on gas exchange and photosystem 2 function in leaves of *Solanum tuberosum* L. *Photosynthetica*, 2004, 42(3): 417-423.
- [6] 何祖华. 植物抗病反应的信号传导网络. *植物生理学报*, 2001, 27(4): 281-290.
He Z H. Signal network of plant disease resistance. *Acta Phytophysiologica Sinica*, 2001, 27(4): 281-290. (in Chinese)
- [7] Schenk P M, Kazan K, Wilson I, Anderson J P, Richmond T, Somerville S C, Manners J M. Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *Proceedings of the National of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(21): 11655-11660.
- [8] Marathe R, Guan Z, Anandalakshmi R, Zhao H Y, Dinesh-Kumar S P. Study of *Arabidopsis thaliana* resistome in response to cucumber mosaic virus infection using whole genome microarray. *Plant Molecular Biology*, 2004, 55(4): 501-520.
- [9] Takahashi H, Ehara Y. Changes in the activity and the polypeptide composition of the oxygen-evolving complex in photosystem II of tobacco leaves infected with cucumber mosaic virus strain Y. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1992, 5: 269-272.
- [10] Hyodo H, Yang S F. Ethylene-enhanced synthesis of phenylalanine ammonialyase in pea seedlings. *Plant Physiology*, 1971, 48(6): 765-769.
- [11] Cakmak I, Marschner H. Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase ascorbate peroxidase. and glutathione reductase in bean leaves. *Plant Physiology*, 1992, 98(4): 1222-1227.
- [12] 毛伟华, 龚亚明, 宋兴舜, 夏晓剑, 师 恺, 周艳虹, 喻景权. 黄瓜 cDNA 芯片的构建及其在黄瓜缺镁胁迫下基因差异表达研究中的应用. *园艺学报*, 2006, 33(4): 767-772.
Mao W H, Gong Y M, Song X S, Xia X J, Shi K, Zhou Y H, Yu J Q. Construction of a cucumber cDNA microarray and its application in the study of response of cucumber plants to magnesium deficiency stress. *Acta Horticulturae Sinica*, 2006, 33(4): 767-772. (in Chinese)
- [13] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*, 2001, 25: 402-408.
- [14] Rahoutei J, Garcia-Luque I, Baron M. Inhibition of photosynthesis by viral infection: Effect on PS II structure and function. *Physiologia Plantarum*, 2000, 110(2): 286-292.
- [15] Balachandran S, Osmond C B, Makino A. Effects of two strains of tobacco mosaic virus on photosynthetic characteristics and nitrogen partitioning in leaves of *Nicotiana tabacum* cv xanthi during photoacclimation under two nitrogen nutrition regimes. *Plant*

- Physiology*, 1994, 104: 1043-1050.
- [16] Sampol B, Bota J, Riera D, Medrano H, Flexas J. Analysis of the virus-induced inhibition of photosynthesis in malmsey grapevines. *New Phytologist*, 2003, 160(2): 403-412.
- [17] Allen D J, Ort D R. Impact of chilling temperatures on photosynthesis in warm climate plants. *Trends in Plant Science*, 2001, 6: 36-42.
- [18] Lu C M, Zhang J H. Changes in photosystem II function during senescence of wheat leaves. *Physiologia Plantarum*, 1998, 104(2): 239-247.
- [19] Sarowar S, Kim Y J, Kim E N. Overexpression of a pepper basic pathogenesis-related protein 1 gene in tobacco plants enhances resistance to heavy metal and pathogen stresses. *Plant Cell Reports*, 2005, 24 (4): 216-224.
- [20] Bate N J, Rothstein S J. C6-Volatiles derived from the lipoxygenase pathway induce a subset of defense-related genes. *Plant Journal*, 1998, 16: 561-569.
- [21] Kim G T, Fujioka S, Kozuka T, Tax F E, Takatsuto S, Yoshida S, Tsukaya H. CYP90C1 and CYP90D1 are involved in different steps in the brassinosteroid biosynthesis pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 2005, 41(5): 710-721.

(责任编辑 曲来娥)