

## 水杨酸诱导黄瓜幼苗抗冷性的基因表达

孙春杰,徐杰,刘成连,原永兵

(青岛农业大学青岛市现代农业质量与安全工程重点实验室,山东青岛 266109)

**摘要:**水杨酸 (Salicylic acid, SA) 能诱导植物提高抗生物胁迫和非生物胁迫(冷胁迫等)的能力。为研究 SA 对非生物胁迫下植物基因表达的影响;以黄瓜(“新优30”)幼苗为试材,用 SA (3 mmol/L, pH6.0) 溶液和蒸馏水处理后,经 7℃冷胁迫 48 h,提取叶片总 RNA 并反转录 cDNA,利用 mRNA 差异显示技术分离出 12 个差异表达 cDNA 片段,经反向斑点杂交验证其中 2 个(SICCL\_1 和 SICCL\_2)为高差异表达片段。序列测定和 Blast 分析表明, SICCL\_1 与甜瓜中黄瓜花叶病毒(Cucumber Mosaic Virus, CMV) 相关基因 AM734282 有 88% 同源性; SICCL\_2 与毛茛柳中 NaHCO<sub>3</sub> 胁迫相关基因 THL24h-106 有 86% 同源性。由此推测, SA 诱导植物抵抗生物胁迫和非生物胁迫的能力可能是通过诱导植物某些相同基因的表达来实现的。

**关键词:** 黄瓜(*Cucumis sativus* L.); 水杨酸; 冷胁迫

**中图分类号:** S663 **文献标识码:** A

### Gene Expression of Chilling Tolerance Induced by Salicylic Acid in Cucumber Seedling

Sun Chunjie, Xu Jie, Liu Chenglian, Yuan Yongbing

(Qingdao Key Lab of Agricultural Quality and Safety Engineering,

Qingdao Agricultural University, Qingdao Shandong 266109)

**Abstract:** Salicylic acid (SA) was found to improve biotic and abiotic tolerance of plants. In present paper cucumber “Xinyou30” was employed to study the effect of SA on plant gene expression and its mechanism. Under chilling stress at 7℃ cucumber seedlings were sprayed by distilled H<sub>2</sub>O and SA (3mmol/L, pH6.0), respectively. After 48 hours total RNA was extracted from cucumber leaves and reversely transcribed into first strand cDNA. mRNA differential display was applied to analyzed SA-induced cDNA in cucumber leaves. Twelve SA-induced cDNA fragments were isolated and retracted. Two (SICCL\_1 and SICCL\_2) of them were affirmed by reverse dot blot to be significantly induced by SA. Nucleotide sequence analysis showed that SICCL\_1 had 88% identity to AM734282 related with Cucumber Mosaic Virus (CMV) in *Cucumis melo subsp. melo*; SICCL\_2 had 86% identity to THL24h-106 related with NaHCO<sub>3</sub> stress in *Tamarix hispida*. It is postulated that SA may improve tolerance of plants via inducing overlapping genes against biotic and abiotic stresses.

**Key words:** cucumber (*Cucumis sativus* L.), salicylic acid, chilling stress

### 0 引言

黄瓜(*Cucumis sativus* L.)属于葫芦科甜瓜属一年

生草本植物,是典型的冷敏型植物<sup>[1]</sup>。水杨酸(Salicylic acid, SA)是植物体内简单的酚类物质,不仅

基金项目: 青岛市科技计划项目“水杨酸诱导黄瓜抗冷胁迫和盐胁迫基因的研究”(06-2-2-15-jch)。

第一作者简介: 孙春杰,女,1983年出生,在读硕士,主要从事园艺作物逆境生理研究。通信地址:266109 青岛市城阳区长城路700号青岛农业大学园林园艺学院, E-mail: best-1214@163.com。

通讯作者: 原永兵,男,1960年出生,教授,理学博士,主要从事果树发育生理与分子生物学研究。通信地址:266109 青岛市城阳区长城路700号青岛农业大学校长办公室, Tel: 0532-86080018, E-mail: yyb@qau.edu.cn。

收稿日期: 2009-02-18, 修回日期: 2009-03-04。

能诱导多种植物对病毒、真菌及细菌病害产生抗性<sup>[2]</sup>,而且还能够提高植物对非生物胁迫如紫外线、干旱、盐及温度逆境等的抗性<sup>[3-5]</sup>。深入研究SA诱导黄瓜抵抗温度胁迫的分子机理,对黄瓜生产和揭示SA的生物作用机理具有重要的实践和理论意义。

Raskin (1987)<sup>[6]</sup>发现SA能诱导魔芋属植物佛焰花序产热以后,先后发现了内源或外源SA在植物的生长发育中有许多重要的生理功能<sup>[7]</sup>。尤其是SA诱导植物抗病性的分子机理方面已有深入系统的研究<sup>[8]</sup>。目前,许多关于SA提高植物抗冷胁迫的研究主要集中在SOD、CAT等植物抗氧化酶<sup>[9]</sup>和光合作用等逆境下细胞代谢<sup>[10]</sup>。近年研究发现非生物胁迫和SA能诱导特殊基因的表达,如包括冷胁迫在内的部分非生物胁迫和SA能诱导TOP2<sup>[11]</sup>、AtPLA II A<sup>[12]</sup>、*BnHB6*<sup>[13]</sup>、*OsBIPP2C1*<sup>[14]</sup>和蛋白激酶CIPK<sup>[15]</sup>等基因的表达,这表明SA在提高植物抵抗非生物胁迫中可能是通过诱导一系列基因的表达实现的。笔者采用mRNA差异显示技术分离SA诱导的冷胁迫相关基因片段并对其功能进行初步推断,为进一步揭示SA提高植物抗非生物胁迫能力的分子机制提供线索。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验时间、地点

研究于2006至2008年在青岛农业大学青岛市现代农业质量与安全工程重点实验室进行。

### 1.2 材料

黄瓜(*Cucumis sativus* L.)种子在30℃下浸种3h后,30℃催芽;芽长2~3mm时,于土沙混合物(10:1)中播种育苗,出苗后以荷兰特培养液浇注培养,条件为28℃/24℃(昼/夜)、光照14h(PFD 80 μmol/(m<sup>2</sup>·s))。

### 1.3 冷胁迫处理及取样

待幼苗长出第三片真叶时分别用SA(3 mmol/L, pH 6.0)和蒸馏水喷施叶片,7℃下低温处理48h,取叶

片用液氮速冻于-70℃保存。

### 1.4 mRNA差异显示和序列分析

采用Unizol(上海博星公司)方法分离总RNA,按反转录酶产品说明书合成cDNA。mRNA差异显示体系以3条锚定引物和8条随机引物组成24对引物组合。反向斑点杂交用DIG High DNA Labeling and Detection Starter Kit I(Roche公司),按照产品说明书操作。二次扩增产物用TIANGEN Midi Purification Kit(天根公司)回收,pGM-T克隆试剂盒克隆目标片段,上海联众基因科技研究院测序。将测序得到的EST序列在NCBI上应用Blast同源性检测,DNAMAN软件进行序列对比分析。

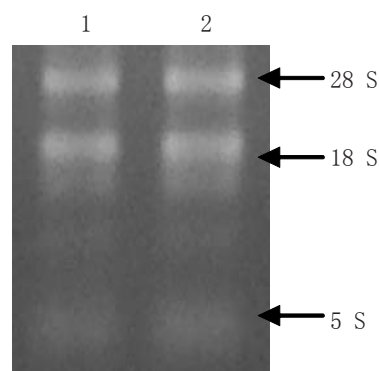


图1 冷胁迫下SA处理和蒸馏水处理黄瓜幼苗叶片总RNA电泳图

注:1:冷胁迫下蒸馏水处理黄瓜幼苗叶片总RNA;2:冷胁迫下SA处理黄瓜幼苗叶片总RNA

## 2 结果与分析

### 2.1 总RNA的提取

1.0%琼脂糖凝胶电泳检测总RNA质量。从图1中可以看出所提的总RNA带型整齐且28S、18S条带清晰,而5SRNA条带较弱,说明总RNA降解很少且纯度较高,提取的总RNA质量较高,可用于mRNA差异显示分析。

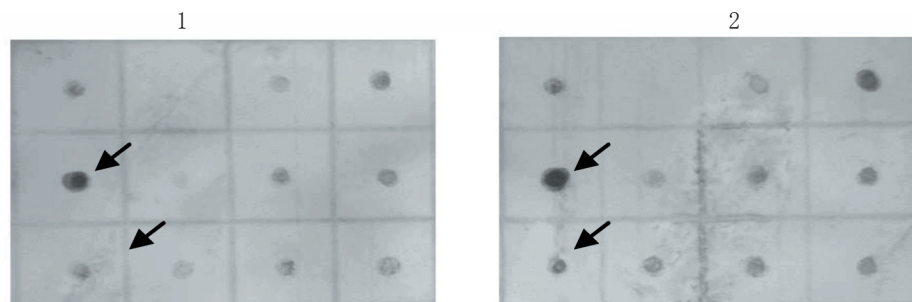


图2 冷胁迫下SA诱导cDNA的反向斑点杂交分析

注:1:探针为冷胁迫下蒸馏水处理黄瓜幼苗叶片cDNA;2:探针为冷胁迫下SA处理黄瓜幼苗叶片cDNA

### 2.2 mRNA差异显示分析

利用3条锚定引物(R1,R2和R3)和8条随机引物(API-AP8)24对引物组合,通过mRNA差异显示分

析,共筛选12条冷胁迫下SA诱导的cDNA片段,长度大约300bp,低温下SA处理的黄瓜幼苗48h后该基因上调表达,而蒸馏水处理的则不表达或者低水平表达。

### 2.3 反向斑点杂交

鉴于 mRNA 差异显示存在的假阳性问题,同时可以筛选信号差异明显的 cDNA 片段,采用了反向斑点杂交进一步验证。图2中箭头所示为存在显著差异的斑点,反向斑点杂交验证得到两个存在显著差异表达的 cDNA 片段 SICCL\_1 和 SICCL\_2;而其它的 cDNA 片段则杂交信号差异不明显。

### 2.4 SICCL\_1 和 SICCL\_2 cDNA 差异片段的序列分析

将得到的冷胁迫下 SA 诱导表达的 cDNA 片段进

行回收、重扩增和克隆后进行测序。获得 SICCL\_1 的片段长度 174 bp,在 GenBank 中同源性检索后发现与 CMV 感染的甜瓜中 AM734282 有 88% 的同源性,AM734282 为甜瓜 CMV 抗性相关基因。序列对比结果见图3。

SICCL\_2 片段长度 197 bp,在 GenBank 中同源性检索后发现,与毛茛柳中 THL24h-106 有 86% 同源性,而 THL24h-106 为抗旱植物毛茛柳 NaHCO<sub>3</sub> 胁迫相关基因。序列对比结果见图4。

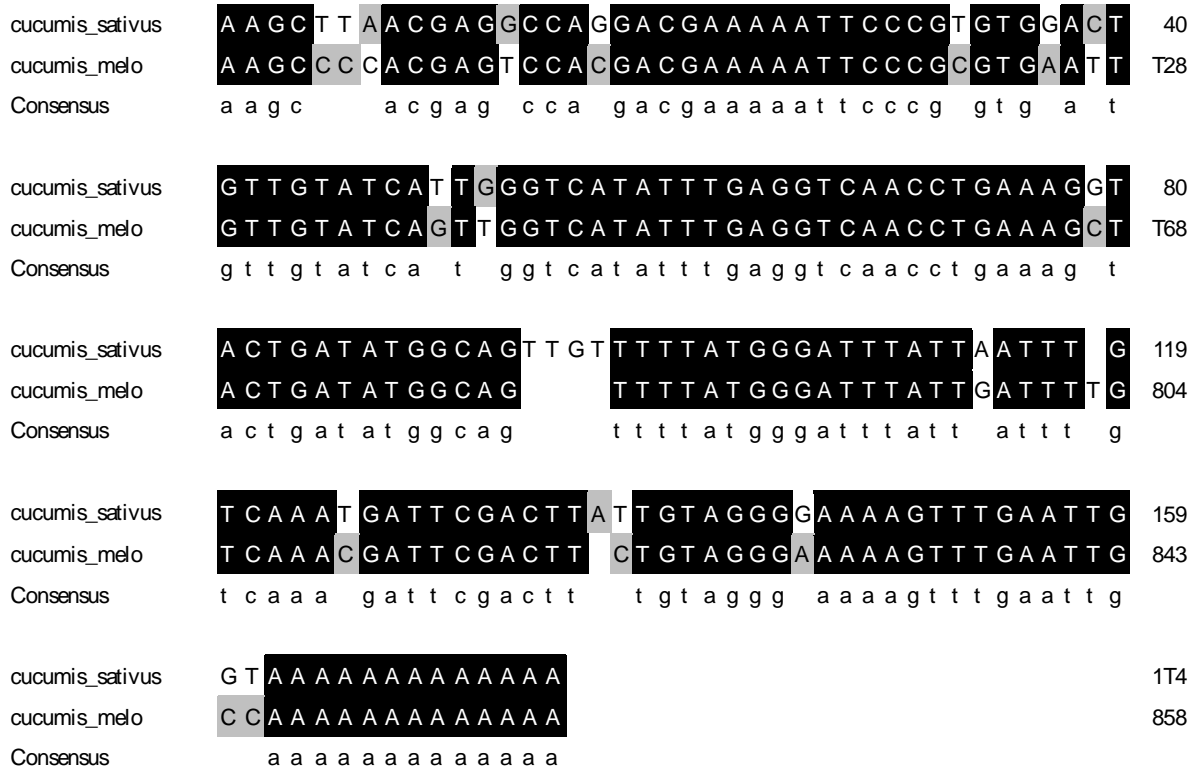


图3 SICCL\_1 与 AM734282 的序列比较

### 3 讨论

黄瓜是一种冷敏感植物,通常 10~12 °C 即不能正常生长,低于 5 °C 就会难以生存。此研究选择 7 °C 下冷胁迫处理黄瓜幼苗 48 h,结果表明这既可导致黄瓜幼苗轻度萎蔫,引发黄瓜冷胁迫反应,同时又不会导致叶片 RNA 的过分损伤而影响后续的试验。

SA 不仅能调节植物的一些生长发育过程,还在植物抗生物胁迫和非生物胁迫中发挥着重要作用,增强植物的抗逆能力。不同植物内源 SA 的浓度有较大的差别<sup>[6]</sup>,不同植物和不同组织对外源 SA 的敏感性也不同,在已有的研究中高粱根施 1 mmol/L SA<sup>[17]</sup>、拟南芥叶喷 4 mmol/L SA<sup>[18]</sup>、黄瓜叶喷 2~4 mmol/L SA<sup>[19]</sup> 都发挥了不同的生理作用,笔者使用 3 mmol/L SA 喷施黄瓜幼苗叶片诱导出了冷胁迫相关基因。

SA 诱导植物对生物胁迫的抗性通常是通过在基因转录水平上的调控而实现的<sup>[20]</sup>。对正常生长条件下的拟南芥施用外源 SA,能够诱导出大量防御基因的表达,提高植株对各种胁迫的抗性<sup>[18]</sup>。研究中 SA 对低温逆境下的黄瓜幼苗诱导出了特异基因片段 SICCL\_1 和 SICCL\_2。其中,SICCL\_1 与甜瓜 CMV 抗性相关基因 AM734282<sup>[21]</sup> 有 88% 的同源性;SICCL\_2 与毛茛柳中 THL24h-106<sup>[22]</sup> 有 86% 同源性,而 THL24h-106 是抗旱植物毛茛柳 NaHCO<sub>3</sub> 胁迫抗性相关基因。这表明冷胁迫下 SA 对黄瓜幼苗诱导的某些冷胁迫相关基因,不但可提高植株的抗冷能力,而且还可能与抵抗其它生物胁迫和非生物胁迫有关。由此推测 SA 可能通过诱导植物交叉保护反应而对各种胁迫产生广谱抗性。

cucumis_sativus	AAGCTTGATTGCCTCTACATCAGGTTAAATTTGGTTAATTT	40
cucumis_melo	TTTCTTGATTGCCTCTACATCAGGC	13T
Consensus	c t t g a t t g c c t c t a c a t c a g g a a a t t t g g t t a a t t t	
cucumis_sativus	TGTATGTGTGTGTATCCGCAAA AATATCATTCTTTTCGATG	80
cucumis_melo	TATTTTGAATGTATCTGCACGAATCTAATTTATTTTCGATG	1TT
Consensus	t t t g t a t c g c a a a t t a t t t t t t c g a t g	
cucumis_sativus	GAGAAGGGGATCTTCTCTTATATTTCTACATCTAGGAT	120
cucumis_melo	GAGAAGGTTGTGCGCCCTTTTATTTTACATCTAGGAT	214
Consensus	g a g a g g t t c c t t t a t t t t a c a t c t a g g a t	
cucumis_sativus	CCGACTTGTATCATTGATACTACTAGGAATTGAATCATT	160
cucumis_melo	CCGACTTGTATCATTGATACTAATAGGAACCTGAACCATT	254
Consensus	c c g a c t t g t a t c a t t g a t a c t a t a g g a a t g a a c a t t a	
cucumis_sativus	TGGCAAAGGAAAAGTTTAAATTCAGAGGAAAAA	19T
cucumis_melo	TGGCAAAGAAAAGTTTGAATTCAGAGCAAAAA	29T
Consensus	t g g c a a g a a a a g t t t a a t t c a g a g a a a a a a a a	

图4 SICCL\_2与THL24h-106的序列比较

生物细胞信号通路间的交叉对话(cross-talking)是生物高效应对外界刺激的一种精密机制。笔者检测到的基因也可能处于信号通路的上游,而在不同的胁迫条件下与抗性直接相关的下游基因的表达,可能存在对不同胁迫应对的特异性。笔者将进一步探讨植物在应对不同胁迫时,SA是否会诱导其产生特异的抵抗机制。

#### 参考文献

- [1] Cabrera R M, Saltveit M E, Owens K. Cucumber cultivars differ in their response to chilling temperatures. *J Am Soc Hortic Sci.*, 1992, 117:802-807.
- [2] 原永兵,刘成连,鞠志国,等.SA对苹果叶片中过氧化氢的调节及其机制. *园艺学报*,1997,24(3):220-224.
- [3] Janda T, Szalai G, Tari I, et al. Hydroponic treatment with salicylic acid decreases the effects of chilling injury in maize (*Zea, may L.*) plants. *Planta*, 1999, 208:175-180.
- [4] Dat JF., Lopez-Delgado H., Foyer CH., et al. Effects of salicylic acid on oxidative stress and thermotolerance in tobacco. *J Plant Physiol*, 2000, 156:659-665.
- [5] Al-Hakimi AMA., Hamada AM. Counteraction of salinity stress on wheat plants by grain soaking in ascorbic acid, thianmin or sodium salicylate. *Biol Plant*, 2001, 44: 253-261.
- [6] Raskin I, Ehmann A. Melander W R et al. Salicylic acid: a natural inducer of heat production in Arum lilies. *Science*, 1987, 237: 1601~1602.
- [7] 原永兵,曹宗巽.水杨酸在植物体内的作用. *植物学通报*,1994,11(3):1-9.
- [8] Chen, Z., Silva, H. and Klessig, D. F. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science*, 1993, 262: 1883 - 1886.
- [9] 李兆亮,原永兵,刘成连等.SA对黄瓜叶片抗氧化剂酶系的调节作用. *植物学报*,1998,40(4):356-361.
- [10] 康国章,欧志英,王正询等.SA诱导提高香蕉幼苗耐寒性的机制研究. *园艺学报*2003,30(2):141-146.
- [11] Gardhi H. C. M. Hettiarachchi, Malireddy K. Reddy, Sudhir K. Sopory et al. Regulation of TOP2 by Various Abiotic Stresses Including Cold and Salinity in Pea and Transgenic Tobacco Plants. *Plant Cell Physiol*, 2005, 46(7):1 154 - 1 160.
- [12] Yoshihiro Narusaka, Mari Narusaka, Motoaki Seki, et al. Expression Profiles of Arabidopsis Phospholipase A IIA Gene in Response to Biotic and Abiotic Stresses. *Plant Cell Physiol*, 2003, 44 (11):1 246-1 252.
- [13] Yu Shun, Zhang LiDa, Zuo KaiJing et al. *Brassica napus L.* homeodomain leucine-zipper gene BnHB6 responds to abiotic and biotic stresses. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2005, 47 (10): 1 236-1 248.
- [14] Xuebo Hu, Fengming Song and Zhong Zheng. Molecular characterization and expression analysis of a rice protein phosphatase 2C gene, OsBIPP2C1, and overexpression in transgenic tobacco conferred enhanced disease resistance and abiotic tolerance. *Physiologia Plantarum*, 2006, 127(2): 225-236.
- [15] Shilpi Mahajan, Sudhir K Sopory and Narendra Tuteja. Cloning and

- characterization of CBL-CIPK signalling components from a legume (*Pisum sativum*). *FEBS Journal*, 2006, 273(5): 907-925.
- [16] Enyedi, A. J., Yalpani, N., Silverman, P., et al. Localization, conjugation and function of salicylic-acid in tobacco during the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1992, 89: 2480-2484.
- [17] Salzman, R. A., Brady, J. A., Finlayson, S. A. et al. Transcriptional profiling of sorghum induced by methyl jasmonate, salicylic acid and aminocyclopropane carboxylic acid reveals cooperative regulation and novel gene responses. *Plant Physiol.*, 2005. 138: 352-368.
- [18] Schenk, P. M., Kazan, K., Wilson, I., et al. Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2000. 97: 11655-11660.
- [19] 庞金安, 马德华, 霍振荣, 等. SA 预处理对提高黄瓜幼苗耐低温能力的影响. *华北农学报*, 2000, 15(1): 112-115
- [20] Leon, J., Rojo, E. and Sanchez-Serrano, J. J. Wound signalling in plants. *Exp. Bot.*, 2001, 52: 1-9.
- [21] Gonzalez-Ibeas, D., Blanca, J., Roig, C., et al. MELOGEN: an EST database for melon functional genomics. *BMC Genomics*, 2007, 8 (1), 306.
- [22] Gao, C., Wang, Y., Liu, G., et al. Expression profiling of salinity-alkali stress responses by large-scale expressed sequence tag analysis in *Tamarix hispid*. *Plant Mol. Biol.* 2008, 66 (3), 245-258.