

低浓度 SA 诱导桃叶片 *PGIP* 基因的表达变化

魏 平, 张 军 科

(西北农林科技大学 园艺学院, 农业部西北园艺植物种质资源利用重点开放实验室, 陕西 杨凌 712100)

摘 要:通过改良的 CTAB 方法提取桃叶片总 RNA, 根据桃 *PGIP* 基因开放阅读框设计特异引物, 以荧光实时定量 PCR 技术分析低浓度 SA 诱导处理后桃叶片 *PGIP* 基因的表达水平变化。结果表明: 0.002 mmol/L SA 诱导处理桃叶片后引起 *PGIP* 基因表达水平上升, 在 2 h 出现峰值, 表达峰值时(2 h)的表达量是最低点(8 h)表达量的 2.4 倍。清水对照在 0~8 h 内 *PGIP* 基因的表达几乎没有变化, 由此可见, 0.002 mmol/L 的 SA 对桃叶片 *PGIP* 基因的表达有促进作用。

关键词:桃; 定量 PCR; *PGIP* 基因; 水杨酸

中图分类号:S 662.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)17-0128-03

桃在我国具有丰富的种质资源, 同时桃也是蔷薇科植物基因组研究的模式植物之一。如同大多数果树一样, 桃的病害中绝大多数属于真菌病害。在植物真菌侵染植物时, 病原菌会分泌许多酶去降解细胞壁, 多聚半乳糖醛酸酶(Polygalacturonases, PGs)是植物病原真菌最先分泌的最重要的一种酶, 它能够水解植物聚半乳糖醛酸, 并为病原菌的进一步侵染提供营养^[1-2]。多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白(Polygalacturonase inhibiting protein, *PGIP*)是一种富含亮氨酸重复单位(Leucine-rich Repeat, LRR)结构的细胞壁结合蛋白, 能够特异性地与病原菌 PGs 结合, 从而阻断真菌侵染过程和抑制相应病害的发生^[3-4]。现有许多研究证明, *PGIP* 参与了植物的抗病反应, 在植物抗病中发挥了关键作用。同时许多研究都证明了水杨酸(Salicylic acid, SA)可以诱导植物产生抗病性。White^[5]观察到用水杨酸处理感染 TMV 的烟草后, 其病害症状减轻, 抗性增强。柳建良^[6]通过大田试验结果表明, 水杨酸叶面喷雾可减轻芒果炭疽病的发生, 王长春等^[7]用 5 mmol/L 水杨酸外源处理可诱导烟草对黑胫病的抗性, 推迟植株死亡, 因此, 采用荧光实时定量 PCR 的方法分析 SA 诱导处理后对桃叶片 *PGIP* 基因的表达变化, 为 *PGIP* 基因的开发利用奠定基础。从分子水平

上来相对定量桃发育过程中的 *PGIP* mRNA 的变化趋势, 以期通过植物 *PGIP* 基因的转录水平的变化来防御和减弱真菌病害的侵染。

1 材料与方法

1.1 试验材料

实时定量 PCR 的植物材料为西北农林科技大学园艺场桃“秦蜜露”品种, 反转录试剂盒 PrimeScript™ RT reagent kit、定量试剂盒 SYBR Premix Ex Taq™ II 均购自大连 TaKaRa 公司。

1.2 试验方法

参照文献[8]设定的 SA 浓度为 0.002 mmol/L, 选取长势相近的桃树的主枝作为处理, 每处理重复 3 次, 于早 7:00 叶面喷施 SA, 连续喷施 2 次。在 SA 处理后的 0、2、4、8 h 采取桃叶片, 采样叶片分别用锡箔纸包裹后立即投入液氮中速冻, 带回实验室后存于 -70℃ 备用。观察低浓度 SA 诱导处理诱导 *PGIP* 基因表达的短期效应, 以喷蒸馏水为对照。

1.3 引物的设计与合成

利用 Primer 5.0 生物学软件设计荧光实时定量 PCR 的特异引物, 以该试验测序完成的桃 *PGIP*-pMD18T 克隆质粒的 *PGIP* 基因^[9]的 ORF 设计特异引物, 扩增长度为 192 bp, 退火温度为 61℃, 引物序列为:

Forward 5'-CAGGTCATATCCGAAGTCATTTG-3';
Reverse 5'-CAATCTGGGTGTCTTGTTCATC-3'。

内参基因桃 β -Actin 以 Genebank 上登录的 AB046952 设计引物, 扩增长度为 200 bp, 退火温度为 59℃, 引物序列为:

Forward 5'-GTGCCAATTTAATGAAGGTTATGC-3';
Reverse 5'-GTTTCCAGCTCTTGCTCGTAGC-3'。

所有引物由北京奥科生物有限公司合成, 采用 PAGE 纯化法。

第一作者简介:魏平(1985-), 女, 山东郓城人, 在读硕士, 现主要从事桃抗病基因分离与功能鉴定研究工作。E-mail: yaoking11@yahoo.com.cn。

责任作者:张军科(1969-), 男, 甘肃灵台人, 博士, 副教授, 现主要从事果树生物技术与育种方面的研究工作。E-mail: zhangjk@nwsuaf.edu.cn。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30671447)。

收稿日期:2011-05-16

1.4 测定方法

秦蜜露桃叶片总 RNA 提取:参考陈长宝等^[10]的方法。总 RNA 的纯化:参照张今今等^[11]的方法。总 RNA 的检测:经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 20 min, 通过凝胶成像系统观察其完整性,再经过微量紫外可见分光光度计检测其在 280、260、230 nm 处吸光度以确定浓度、纯度。以 OD_{260}/OD_{280} 在 1.8~2.0 之间为合格,以 260 nm 处吸光度 1 OD 为 33 μ g 计算 RNA 样品浓度。总 RNA 进行 RT-PCR 反应:纯化后的 RNA 按照 TaKaRa 反转录试剂盒 PrimeScriptTM RT reagent kit 说明书进行反转录反应。实时定量 PCR 反应:实时荧光定量 PCR 体系 20 μ L,反转录产物稀释 5 倍后加 1 μ L 作为模板,正反向 10 μ mol/L 引物各 0.8 μ L, SYBR II 10 μ L,加无菌的双蒸水 7.4 μ L。实时定量 PCR 程序:95 $^{\circ}$ C、2 min,95 $^{\circ}$ C、30 s,62 $^{\circ}$ C、30 s,72 $^{\circ}$ C、30 s并收集荧光信号,40 个循环。

2 结果与分析

2.1 桃叶片 RNA 的提取结果

使用改良的 CTAB 法对桃叶片进行总 RNA 的提取,进行 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分析。并分别在 260 nm 和 280 nm 波长处测其吸光度值(图 1)。电泳结果显示,提取的桃叶片总 RNA 质量较好,纯度较高,可以进行后续反应。

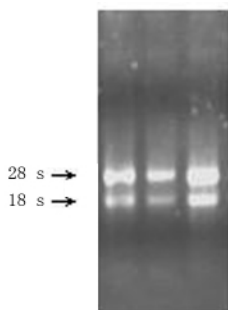


图 1 桃叶片总 RNA 琼脂糖凝胶电泳结果

Fig. 1 Total RNA of peach leaves by 0.8% agarose gel electrophoresis

2.2 RT-PCR 结果分析

以该试验所提取 RNA 样品的 cDNA 为模板,利用荧光实时定量 PCR 的特异引物,进行 RT-PCR 扩增反应(图 2)。结果显示,改良的 CTAB 法所提取的 RNA 经 RT-PCR 后均得到约 200 bp 左右的扩增片段,电泳条带清晰一致,大小和理论扩增长度数值一致,可见桃叶片 cDNA 样品可以进行荧光定量 PCR 反应。

2.3 SA 诱导处理对桃叶片 PGIP 基因表达的影响

对 0.002 mmol/L 的 SA 诱导处理后 0~8 h 的桃叶片中的 PGIP 基因表达水平进行了荧光实时定量分析(图 3)。结果表明,0.002 mmol/L 的 SA 诱导处理后,桃叶片 PGIP 基因转录水平在 0 h 后开始升高,在 2 h 达到峰值,达到内参基因表达量的 1.1 倍,在 4 h

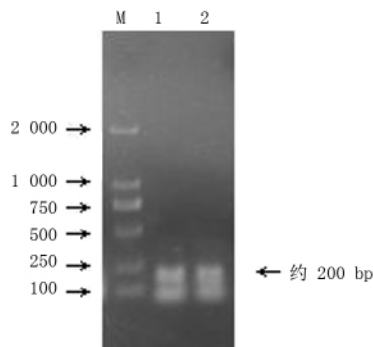


图 2 RT-PCR 扩增结果

注:M, DNA 分子量标准;1、2 RT-PCR 扩增结果。

Fig. 2 RT-PCR amplification results

Note: M, DNA Marker, 1, 2 RT-PCR product.

时 PGIP 基因的表达依然维持在较高水平,到 8 h 快速下降,峰值(2 h)表达量是最低点(8 h)表达量的 2.4 倍。相对于清水对照,0.002 mmol/L 的 SA 与清水对照在 0 h 二者 PGIP 基因的表达水平基本相当,随着时间的延长,喷施 0.002 mmol/L 的 SA 桃叶片 PGIP 的表达量在 2 h、4 h 分别是清水对照的 2.6、2.4 倍,到 8 h 二者 PGIP 基因的表达水平又基本持平,清水对照桃叶片 PGIP 基因的表达在 0~8 h 内变化微弱,可见低浓度 0.002 mmol/L 的 SA 可以促进桃叶片 PGIP 基因的表达。

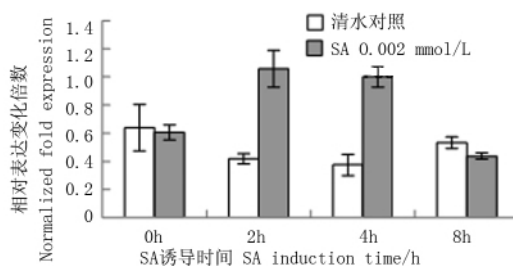


图 3 SA 诱导后 0~8 h 桃叶片 PGIP 基因表达变化

Fig. 3 The expression changing of peach leaves in 0~8 h after SA treatment

3 讨论

水杨酸(Salicylic acid, SA) 即邻羟基苯甲酸,是植物体内普遍存在的一种内源酚类小分子化合物,其参与调节植物中许多生理过程,如植物开花、种子发芽、产热、气孔关闭、离子的吸收及膜通透性^[12-14]等。现许多研究发现,SA 可诱导植物对病原真菌害产生抗性同时 SA 被认为是一种新的植物激素,它调节植物内源信号分子并会引发与植物抗病相关蛋白的积累^[15-17]。

Qiang C 等^[18]克隆了 2 个美洲黑杨 PGIP 基因,分别为 PdPGIP2 和 PdPGIP4,且对材料进行了 5 mmol/L SA 处理,实时定量 PCR 结果显示 SA 处理后 PdPGIP2 和 PdPGIP4 的表达量均在 1 h 迅速达到峰值(1 h 表达量分别是未 SA 处理样品的 1.9、2.9 倍),Dwayne D 等^[19]研究发现,油菜用 50 mmol/L SA 处理

后,结果显示油菜 *PGIP* 基因转录水平在 6 h 内迅速达到峰值;Di 等^[20]研究证明,0.1 mmol/L SA 处理高山离子芥,实时定量 PCR 结果显示,*PGIP* 基因的表达量在 48 h 时快速达到峰值,48 h 表达量是 0 h 的 14 倍;上述前人研究表明,不同浓度的 SA 处理植物材料后 *PGIP* 基因的转录水平均在短时间内有一个快速升高的过程,可见 SA 诱导抗病相关基因的表达是一个相对短期的过程,故该试验选用低浓度 0.002 mmol/L 的 SA 处理桃叶片并判定在短期时间内是否会促进抗病基因 *PGIP* 的表达,试验结果表明,从 0 h 开始 *PGIP* 基因的表达水平开始上调,并在 2 h 出现峰值,一直到 4 h 基因的表达维持在较高水平,可见桃叶片 *PGIP* 基因对低浓度 SA 诱导处理较敏感,在较短的时间内促进了 *PGIP* 基因的表达,对于不同植物材料,组织对于同一浓度的 SA 的敏感程度不一样,基因表达到达峰值的时间也不一样。黄艳娜等^[21]用水杨酸诱导山茶抗灰斑病,结果显示,水杨酸可增强山茶的抗病能力,并发现喷施 0~5 mmol/L 的水杨酸诱导植物产生抗病性是通过诱导植物抗病基因的表达,使山茶可能产生了抗病性,并不是通过直接的杀菌或是抑菌作用,通过黄艳娜的研究也可以看出,较低浓度的 SA 主要是通过诱导抗病基因的表达使植物产生了抗病性。并由此可见桃叶片 *PGIP* 基因对低浓度 SA 诱导处理较敏感,并可以在短时期内促进 *PGIP* 基因的表达。

参考文献

- [1] Desiderio A, Araci B, Leckie F, et al. Polygalacturonase-inhibiting protein (PGIPs) with different specificities are expressed in *Phaseolus vulgaris* Mol [J]. Plant Microbe interact, 1997, 10: 852-860.
- [2] De Lorenzo G, Ferrari S. Polygalacturonase inhibiting proteins in defense against phytopathogenic fungi [J]. Curr. Opin Plant Biol, 2002(5): 295-299.
- [3] D' Ovidio R, Mattei B, Roberti S. Polygalacturonases, polygalacturonase-inhibiting protein and pectic oligomers in plant-pathogen interactions[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2004, 1696(2): 237-244.
- [4] De Lorenzo G D, Ovidio R, Cervone F. The role of polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) in defense against pathogenic fungi [J]. Annu Rev. Phytopathol, 2001, 39: 313-335.
- [5] White R F. Short communications: acetylsalicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco [J]. Virology, 1979, 99: 410-412.
- [6] 柳建良, 黄小丹, 傅炽栋, 等. 水杨酸对芒果炭疽病的诱导抗性作用 [J]. 热带亚热带植物学报, 1998, 6(3): 245-248.
- [7] 王长春, 蔡新忠, 林敬州, 等. 水杨酸和乙烯在烟草抗黑胫病中的作用 [J]. 植物保护学报, 2003, 3(30): 295-299.
- [8] 王芳芳. 外源水杨酸诱导苹果抗轮纹病效应的研究 [D]. 保定: 河北农业大学, 2008.
- [9] 谌悦, 张军科, 熊帅. 桃 *PGIP* 基因及 cDNA 的克隆及序列分析 [J]. 安徽农业科学, 2009, 37(32): 15738-15740.
- [10] 陈长宝, 朱树华, 周杰. 改良 CTAB 法提取成熟肥城桃果实的总 RNA [J]. 山东农业科学, 2009(5): 102-104.
- [11] 张今今, 王跃进, 王西平, 等. 葡萄总 RNA 提取方法的研究 [J]. 果树学报, 2003, 20(8): 178-181.
- [12] Klessig D F, Malamy J. The salicylic acid signal in plants [J]. Plant Mol Biol, 1994, 26: 1439-1458.
- [13] Raskin I. Role of salicylic acid in plants [J]. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1992, 43: 439-463.
- [14] 原永兵, 刘连成, 鞠志国, 等. 水杨酸对苹果叶片中过氧化氢水平的调节及其机制 [J]. 园艺学报, 1997, 24(3): 220-224.
- [15] Li R, Rimmer R, Yu M, et al. Two *Brassica napus* polygalacturonase inhibitory protein genes are expressed at different levels in response to biotic and abiotic stresses [J]. Planta, 2003, 217: 299-308.
- [16] Malamy J, Henning, Klessig D F. Temperature-dependent induction of salicylic acid and its conjugates during the resistance response to tobacco mosaic virus infection [J]. Plant Cell, 1992(4): 359-366.
- [17] Yalpani N, Silverman P, Wilson T M A, et al. Salicylic acid is a systemic signal and an inducer of pathogenesis-related proteins in virus-infected tobacco [J]. Plant Cell, 1991(3): 809-818.
- [18] Cheng Q, Cao Y Z, Pan H X, et al. Isolation and characterization of two genes encoding polygalacturonase-inhibiting protein from *Populus deltoids* [J]. Journal of Genetics and Genomics, 2008, 35: 631-638.
- [19] Dwayne D, Hegedus, Li R G, et al. *Brassica napus* possesses an expanded set of polygalacturonase inhibitor protein genes that are differentially regulated in response to *Sclerotinia sclerotiorum* infection, wounding and defense hormone treatment [J]. Planta, 2008, 228: 241-253.
- [20] Di C X, Li M, Long F, et al. Molecular cloning, functional analysis and localization of a novel gene encoding polygalacturonase-inhibiting protein in *Chorispora bungeana* [J]. Planta, 2009, 231: 169-178.
- [21] 黄艳娜. 外源性水杨酸诱导山茶对灰斑病抗性的研究 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2006.

The Effect of SA Induction on the Expression of *PGIP* Gene in Peach Leaves

WEI Ping, ZHANG Jun-ke

(College of Horticulture, Northwest Agricultural and Forestry University, Key Laboratory of Northwest Horticultural Plant Germplasm Application of Ministry of Agriculture, Yangling, Shaanxi 712100)

Abstract: In this research, the total RNA of peach leaves were extracted with the improved CTAB method. Specific oligonucleotide primers were designed according to the peach *PGIP* gene's open reading frame. According to the method of real-time fluorescence quantitative PCR, the expression changing of peach leaves and peel were analyzed. The result showed that 0.002 mmol/L SA treatment resulted in up-regulation of *PGIP* gene expression. The expression peak occurred 2 h after treatment. The highest level (2 h) was 2.4 times higher than the lowest level (8 h). The expression of *PGIP* gene of the control samples were nearly unchanged in 0~8 h, which showed that 0.002 mmol/L SA could promote the expression of *PGIP* gene.

Key words: *Prunus persica* (L.) Batch; real-time quantitative PCR; *PGIP* gene; salicylic acid