

doi:10.11937/bfyy.20164582

黄瓜耐铜相关基因 *CsLecRK* 的克隆及表达分析

赵金凤^{1,2}, 田春育^{1,2}, 郭冬雪^{1,2}, 武涛^{1,2}

(1. 东北农业大学 农业部东北地区园艺作物生物学与种质创制重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150030;

2. 东北农业大学 园艺园林学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要:以黄瓜为试材,根据基因响应铜(Cu)的表达模式及保守性,采用基因克隆和生物信息学方法,对筛选获得的黄瓜凝集素受体激酶基因(*CsLecRK*)进行克隆及生物信息学分析,并对该基因在 Cu 胁迫条件的表达模式进行分析,以期探索黄瓜耐铜(Cu)的分子机制。结果表明:该基因 cDNA 全长为 2 121 bp,编码 706 个氨基酸;理论分子量为 78.36 kDa,等电点为 7.76。NCBI Blastp 分析与进化树分析均表明,*CsLecRK* 编码的蛋白与甜瓜的 *LecRK* 序列同源性最高(95%),进化距离最近。qRT-PCR 分析表明,*CsLecRK* 在 Cu 胁迫条件下表达明显下调。

关键词:黄瓜;耐铜基因;*CsLecRK*;表达分析

中图分类号:S 642.203.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)13-0014-08

黄瓜(*Cucumis sativus* L.)属葫芦科甜瓜属蔬菜,是全球消费量最大的十类蔬菜之一,深得世界各国人民喜爱。铜(Cu)是植物生长发育的必需微量元素,也是细胞色素氧化酶、多酚氧化酶、抗坏血酸氧化酶及超氧化物歧化酶等多种酶类的组分,参与植物的许多生理代谢过程,对作物的生长、发育、产量和品质等有重要的影响^[1-2]。Cu 同时具有累积性,过量的 Cu 对植物细胞具有破坏作用,可引起水分代谢、光合作用、呼吸作用、营养吸收等各种生理代谢过程的紊乱^[3-5],最终抑制植

株生长,导致作物减产^[6-7]。近年来,我国工业化水平迅速提高,采矿、冶炼、印染、化工等重金属污染型企业遍布城乡,工业“三废”、城市垃圾的大量排放,高 Cu 畜肥、杀菌剂、杀虫剂等的不合理施用,使土壤 Cu 污染日益严重^[8-10]。黄瓜植株对 Cu 胁迫非常敏感,在 Cu 胁迫下,黄瓜幼苗生长受抑,植株矮小,叶片数量明显减少,新生叶片变小且严重失绿,下部老叶逐渐枯萎,主根萎缩,侧根呈瘤状突起,根系呈暗褐色^[11];同时对蔬菜作物的产量和品质造成十分严重的后果以及还可能通过食物链的传递为害动物和人类的健康^[12-13]。因此有效提高黄瓜耐 Cu 胁迫能力,培育耐 Cu 黄瓜品种对于创造绿色农业、现代农业具有重要意义。

植物凝集素蛋白激酶(lectin receptor-like kinases, *LecRK*)是植物体内广泛存在的一类受体蛋白激酶,一般认为它们参与多种信号转导和糖信号识别,但是 *LecRK* 基因的具体功能研究尚鲜见。前人的研究表明 *LecRK* 基因可能参与植物的生物胁迫和非生物胁迫的信号转导,如意大利杨树 *PnLPK* 基因与拟南芥 *AtLecRK-a1* 基因的表达都能够受衰老和创伤胁迫的诱导,而且另外

第一作者简介:赵金凤(1991-),女,河南平顶山人,硕士研究生,研究方向为蔬菜作物营养及抗逆分子生物学。E-mail:1319441066@qq.com.

责任作者:武涛(1981-),男,博士,副教授,现主要从事黄瓜分子遗传育种与蔬菜作物营养及抗逆分子生物学等研究工作。E-mail:wutao@neau.edu.cn.

基金项目:黑龙江省普通本科高等学校青年创新人才培养计划资助项目(UNPYSCT-201500);东北农业大学“青年才俊”资助项目(14QC07);东北农业大学“学术骨干”资助项目(16XG05)。

收稿日期:2017-02-17

一个拟南芥 *AtLecRK2* 基因在盐胁迫的条件下诱导表达^[14-16]。此外,研究表明 *LecRK* 也参与植物的生长发育调控。然而黄瓜 *CsLecRK* 基因对 Cu 胁迫的响应尚鲜见报道。

因此,该研究对黄瓜 *CsLecRK* 基因进行克隆,获得该基因全长 cDNA 序列,并对该基因进行生物信息学分析和表达模式分析,以期为进一步研究 *LecRK* 基因在耐 Cu 胁迫过程中的功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试黄瓜品种‘649’的种子由东北农业大学园艺园林学院黄瓜课题组提供。

菌株及试剂:大肠杆菌 DH5 α 菌株、p1250-3301 克隆载体、DNA 凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒和 *Taq* DNA Polymerase 购自北京全式金生物技术(TransGen Biotech)有限公司;Trizol 购自 Invitrogen 公司;SYBR Green PCR Master Mix 荧光定量试剂盒、cDNA 第一链合成试剂盒购自东洋纺(TOYOBO)公司;测序由北京金唯智生物科技有限公司完成;其它生化试剂均为进口或国产分析纯试剂。

1.2 试验方法

1.2.1 黄瓜叶片的获取

将‘649’黄瓜种子浸种催芽后,在光照培养箱中进行播种培养,光周期为 16 h/8 h(光照/黑暗),昼夜温度分别为 26、18 $^{\circ}\text{C}$,空气相对湿度保持在 65%~70%,使用全蛭石为基质,浇灌营养液栽培。待其子叶展平时,分别在 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{CuSO}_4(\text{Cu})$ 的营养液中进行水培处理,基础营养液配方^[17]:1.512 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.257 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 1.5 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 4 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 6 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ KNO_3 , 8.6 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{FeN}_2\text{NaO}_8 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 10.3 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ MnSO_4 , 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_3BO_3 , 24 nmol $\cdot \text{L}^{-1}$ $\text{Na}_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 130 nmol $\cdot \text{L}^{-1}$ $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$,每隔 1 d 浇灌营养液一次。水培 7 d 后取叶片,液氮速冻后,存放于 -80°C 保存备用。

1.2.2 总 RNA 提取及 cDNA 第一链合成

采用 Trizol(Invitrogen 公司)法提取叶片总 RNA,用分光光度计检测浓度;cDNA 第一链的合成使用 TOYOBO 公司的 ReverTra Ace qPCR RT Kit 反转录试剂盒,按照说明书进行操作。

1.2.3 引物设计与合成

以黄瓜基因组数据库(<http://www.icugi.org/cgi-bin/ICuGI/index.cgi>)中序列号为 Csa3M734050.1 的基因 CDS 序列为模板,利用 Primer Premier 5.0 软件进行克隆引物和 qRT-PCR 引物的设计(表 1)。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

表 1 *CsLecRK* 基因克隆和 qRT-PCR 引物序列

Table 1 Primers sequences for cloning of *CsLecRK* gene and qRT-PCR

引物名称 Name of primers	引物序列 Sequence of primers(5'-3')	引物用途 Usage
CsLecRK-F	ATGGCTTCTAATTTTGATCGC	全长扩增上游引物
CsLecRK-R	TCAACGCCACCTGACAG	全长扩增下游引物
CsLecRK-qF	TTAGGAGATTTCGGTTTGGC	qRT-PCR 上游引物
CsLecRK-qR	GGAGCCAAATATCCGAGTGT	qRT-PCR 下游引物
CsEF1 α -F	CCTTGGTGTCAAGCAGATGA	内参基因上游引物
CsEF1 α -R	TGAAGACACCTCCTTGATGATTT	内参基因下游引物

1.2.4 黄瓜 *CsLecRK* 基因的克隆与序列分析

以 Cu 胁迫处理的黄瓜叶片 cDNA 为模板,利用 PCR 方法进行 *CsLecRK* 的克隆,20 μL 反应体系包括:10 \times *Taq* buffer 2 μL , dNTP Mix 2 μL , *CsLecRKs*-F(10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)和 *CsLecRK*-R(10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)各 0.5 μL , *Taq* DNA 聚合酶(5 U $\cdot \mu\text{L}^{-1}$) 0.2 μL , 模板 cDNA (约 200 ng $\cdot \mu\text{L}^{-1}$) 2 μL , ddH $_2\text{O}$ 12.8 μL ;反应条件:96 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,56 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,30 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。反应结束后,用 1%琼脂糖凝胶电泳检测并进行目的条带的回收,与 p1250-3301 克隆载体连接,转入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中,菌液铺平板 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜,挑斑,摇菌。经 PCR 鉴定为阳性菌落送金唯智生物科技有限公司进行测序。利用 NCBI 在线 Blast 工具和 DNAMAN、DNASTar 软件进行序列比对和分析;利用在线软件 Expasy、TMHMM 等进行氨基酸组成、稳定系数、亲水系数等分析;

利用 MEGA 5.1 软件,以邻近法构建系统进化树。

1.2.5 Cu 胁迫条件下黄瓜 *CsLecRK* 基因的表达分析

以 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu 处理的植株叶片 cDNA 为模板,进行 qRT-PCR,反应体系为 20 μL ,包括: SYBR Green PCR Master Mix 10 μL , *CsLecRK*-qF (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 *CsLecRK*-qR (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 各 0.5 μL , cDNA (约 150 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 1 μL , ddH₂O 8 μL 。反应条件: 96 $^{\circ}\text{C}$, 1 min; 95 $^{\circ}\text{C}$, 15 s; 56 $^{\circ}\text{C}$, 15 s; 72 $^{\circ}\text{C}$, 45 s, 45 个循环,以 *CsEF1 α* 基因作为参照基因。每个样品设置 4 次重复,数据采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法进行分析^[18]。

2 结果与分析

2.1 黄瓜耐 Cu 相关基因 *CsLecRK* 的获得

根据文献检索初步鉴定出 3 个在拟南芥或水稻中受 Cu 或者其它重金属诱导表达的基因,进而将其序列在黄瓜基因组数据库中进行同源比对,发现有 1 个来源于拟南芥的凝集素受体激酶基因 AT1G70130 (*LecRK*),将该基因与黄瓜基因组数据库中 Csa3M734050.1 氨基酸同源性进行比较(图 1),可知二者的相似性为 46%,并且该基因在耐 Cu 胁迫方向的功能尚鲜见报道,暗示 *CsLecRK* 可能为潜在的黄瓜耐 Cu 胁迫的新基因。

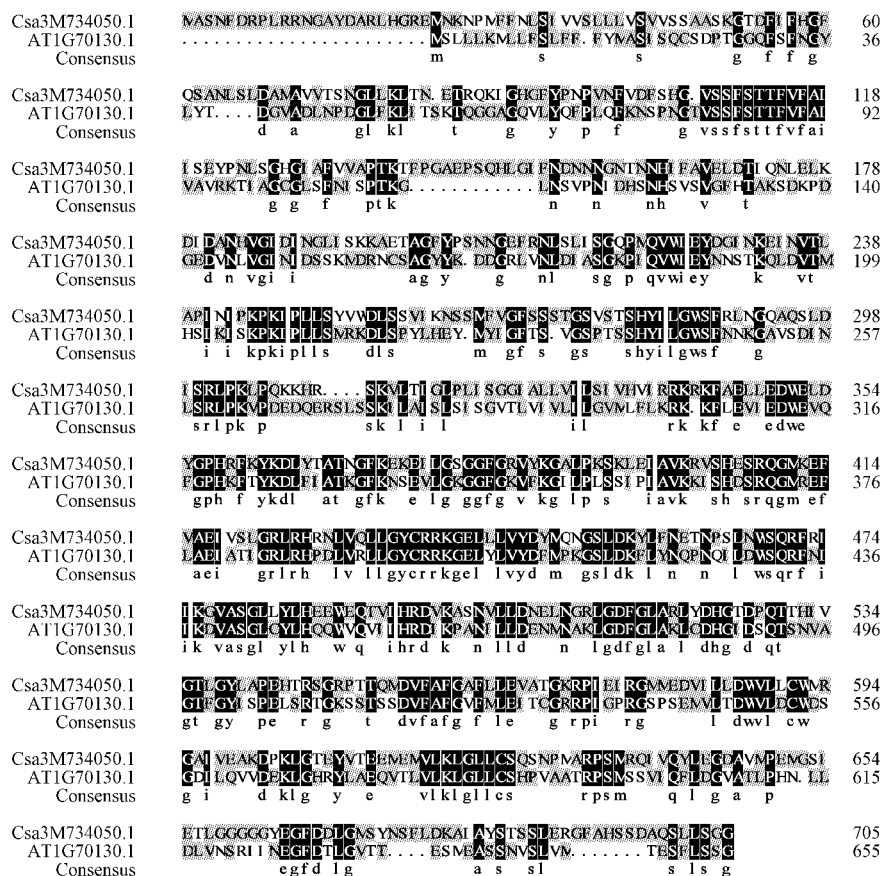


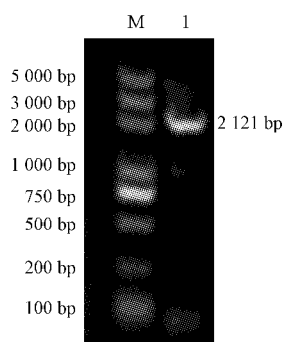
图 1 AT1G70130 与 Csa3M734050.1 氨基酸序列同源性比较

Fig. 1 Homology comparison of amino acid sequences between AT1G70130 and Csa3M734050.1 protein

2.2 黄瓜耐 Cu 相关基因 *CsLecRK* 的克隆

以 Cu 胁迫处理的黄瓜叶片 cDNA 为模板, *CsLecRK*-F 和 *CsLecRK*-R 为引物,通过 PCR 扩

增出 1 条约 2 000 bp 的条带(图 2),测序结果表明,基因全长为 2 121 bp;与黄瓜基因组数据库 Csa3M734050.1 基因编码区序列一致。



注: M, Marker 2 000 plus; 1, *CsLecRK*。

图 2 *CsLecRK* 全长扩增

Fig. 2 Full-length amplification of *CsLecRK*

2.3 黄瓜耐 Cu 相关基因 *CsLecRK* 全长 cDNA 序列分析

利用 DNAMAN 8 软件将该序列进行翻译, 共编码 706 个氨基酸(KGN58851.1)(图 3)。对该基因的氨基酸序列保守结构域分析发现, 其蛋白质属于 lectin L-type superfamily 和 PKc-like superfamily 超基因家族之一(图 4)。经过在线软件 Expasy - ProtParam (<http://www.expasy.org/>)预测该基因所编码蛋白质的理化性质, 结果表明, *CsLecRK* 蛋白的分子量为 78.36 kDa, 理论等电点为 7.76, 不稳定系数为 32.69, 平均亲水系数为 -0.139, 属于不稳定型疏水蛋白。

```

1      ATGGCTTCTAATTTTGATCGCCCTTACGAAGAAATGGTGCTTATGATGCTCGGTTACACGGAAGAGAGATGAACAAAAATCCCATGTTT
1      M A S N F D R P L R R N G A Y D A R L H G R E M N K N P M F
91     TTCAATCTCTCAATTTGGTGTCTCTGCTTCTAGTCTCAGTAGTCTCATCAGTCTCTCTAAAGTACTGATTTCATCTCCATGGCTTC
31     F N L S I V V S L L L V S V S S A A S K G T D F I F H G F
181    CAATCTGCAAAATCTATCACTCGATGCTATGGCTGTTGTTACCTCAAATGGCTCTTGAAACTGACCAACGAGACCAGGCCAAAAAATGGC
61     Q S A N L S L D A M A V V T S N G L L K L T N E T R Q K I G
271    CATGGGTTTATCCTAATCCTGTAATTTTGTGATTTCTCATGGCGTTTCATCTTTCTCAACTACTTTTGTCTTTGCCATTATTTCT
91     H G F Y P N P V N F Y D F S H G V S S F A I I S
361    GAATACCCAAATCTAAGTGGCCATGGAATTGCCTTTGTGGTGGCTCCGACGAAACTTCCCGGAGCTGAGCCAAAGTCAGCATCTTGGC
121    E Y P N L S G H G I A F V V A P T K T F P G A E P S Q H L G
451    ATTTTTAATGACAACAACCGGTAAACACAACAACCATATTTTCGCTGTAGAAGTCTGATACAATTGAGAATCTAGAGTTGAAAGATATA
151    I F N D N N N G N T N N H I F A V E L D T I Q N L E L K D I
541    GATGCGAATCATGTTGGTATAGATATAAATGGGTGATTTCTAAGAAAGCTGAAACTGCTGGGTTTATCCTTCCAACAAATGGGGAAATTC
181    D A N H V G I D I N G L I S K K A E T A G F Y P S N N G E F
631    AGAAATTTGAGTCTTATAAGTGGCCAACCAATGCAAGTTTGGATCGAATATGATGGTATCAACAAAGAGATCAATGTCACATTTGGCACCA
211    R N L S L I S G Q P M Q V W I E Y D G I N K E I N V T L A P
721    ATTAACATACCCAAACCAAAATTCACCTTTTATCTTACGCTGGGACCTTTCGTCGTCATAAAAACTCTTCCATGTTCTGTCGGGTTT
241    I N I P K P K I P L L S Y V W D L S S V I K N S S M F V G F
811    TCATCTCCACTGGCTGTGTTTCAACTTCTCATTATATTTAGGTTGGAGTTTCAGATTAAACGGCCAAAGCTCAAAGTCTTGACATTTCTT
271    S S S T G S V S T S H Y I L G W S F R L N G Q A Q S L D I S
901    CGTCTCCAAAGCTGCCTCAGAAAAACATAGATCCAAAGTTTAAACAAATTTGGGTTGCTTTAATTTCTGGAGGGATTGCTTTATGGTT
301    R L P K L P Q K K H R S K V L T I G L F L I S G G I A L L V
991    ATTTTATCCATTGTCATGTTATCAGAAGGAAGGAAGTTTCGCCGAGCTGCTCGAAGATTGGGAGCTTGATTATGGGCTCATAGGTTT
331    I L S I V H V I R R K R K F A E L L E D W E L D Y G P H R F
1 081  AAATACAAAGACTTATACAGCTACAAATGGATTTAAAGAAAAAGAAATTTCTGGGTTCTGGAGGATTGGACGAGTCTACAAAGGTGCA
361    K Y K D L Y T A T N G F K E K E I L G S G G F G R Y Y K G A
1 171  TTACCAAAATCAAAACTTGAATAGCTGTAAAGAGGGTTTCTCATGAATCAAGACAAGGAATGAAAGAATTTGTAGCTGAGATAGTTAGT
391    L P K S K L E I A V K R V S H E S R Q G M K E F V A E I V S
1 261  CTTGGGAGGCTTCGTCATAGAAACCTTGTAACCTTTTAGGCTACTGTAGACGAAAGGAGAGCTGCTTTTAGTATATGATTATGCAA
421    L G R L R H R N L V Q L G Y C R R K G E L L L V Y D Y M Q
1 351  AATGGAAGCTTGGCAAGTACCTGTTTAAACGAAACAAATCCAAGTTTGAAGTGGAGCCAGAGATTTCGAATCATAAAGGAGTGGCTTCA
451    N G S L D K Y L F N E T N P S L N W S Q R F R I I K G V A S
1 441  GGGCTGCTTTACCTGCATGAAGATGGGAGCAAACTGTTATTCAGAGATGTAAAGDCAGTAATGTCTTACTAGACAATGAGTTAAAT
481    G L L Y L H E E W E Q T V I H R D V K A S N V L L D N E L N
1 531  GGAAGATTAGGAGATTTCGGTTTGGCAAGACTGTATGATCACGGAACAGACCTCAAACAACATATTTGATAGGAACACTCGGATATTTG
511    G R L G D F G L A R L Y D H G T D P Q T T H I V G T L G Y L
1 621  GCTCCAGAGACACAGATCCGGCAGGCCGACGACTCAATGGATGTGTTTGTCTTTTGGGCAATTCTGCTGGAAGTAGCAACAGGAAG
541    A P E H T R S D R P T T Q M D V F A F G A F L L E V A T G K
1 711  AGGCCAATAGAGATTTCGAGGATGATGGAAGATGTAATATTGCTGGATTGGTATTGTTATGTTGGATGAGAGGAGCCATTGTTGAGGCC
571    R P I E I R G M M E D V I L L D W V L L C W M R G A I V I A
1 801  AAAGTCCAAAGTTGGGAACAGAGTATGTGACAGAGGAGATGGAAATGGTTCTGAAACTTGGATTGTTGTGTTTCAACATCTAACCAATG
601    K D P K L G T E Y V T E E M E M V L K L G L L C S Q S N P M
1 891  GCGAGGCCAAGCATGAGGCAAAATGTGCACTACTTGAAGGAGATGCTGTGATGCCAGAGATGGGTTCTATAGAAACGTTAGTGGTGGT
631    A R P S M R Q I V Q Y L E G D A V M P E M G S I E T L G G G
1 981  GGTGGATAGAAAGTTTGTATGATCTTGGCATGTCTGATAATTTCTTTTGGATAAAGCTATTGCATATTCTACTTCTCACTTGAAGA
661    G G Y E G F D D L G M S Y N S F L D K A I A Y S T S S L E R
2 071  GGTTTTGGCCATTTCTTCTGATGCGCAGTCTCTCTGTCAAGTGGCCGTTGA
691    G F A H S S D A Q S L L S G G R *

```

图 3 *CsLecRK* 基因编码序列及其氨基酸序列

Fig. 3 cDNA sequence and amino acid sequence of *CsLecRK*

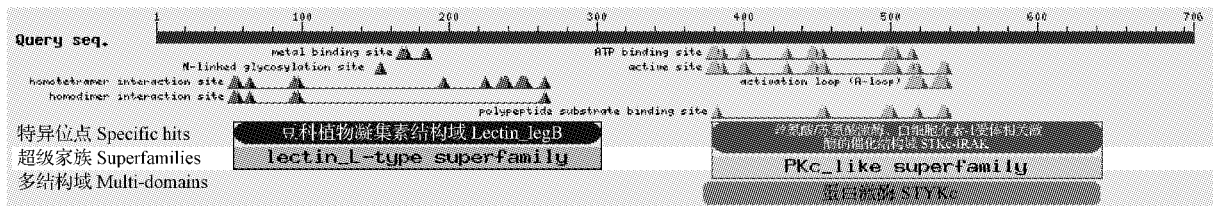


图4 CsLecRK 蛋白保守结构域分析

Fig. 4 Analysis of CsLecRK protein conserved domain

TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 跨膜结构区预测结果表明, CsLecRK 蛋白具有跨膜蛋白结构。TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) 分析预测该蛋白质最可能定位于细胞膜上。

2.4 CsLecRK 蛋白系统进化分析

利用 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 蛋白数据库比对发现, 该蛋白与甜瓜、白梨、梅花等 19 种植物 LecRK 蛋白有 64%~95% 的同源性, 其中与甜瓜的蛋白同源性最高, 为 95%。利用 MEGA 5.1 软件构建系统进化树。由图 5 可知, 这 18 条蛋白序列明显地聚类为 2 类, CsLecRK 与甜瓜、苹果、枣等为第 1 类, 其中黄瓜与甜瓜同属葫芦科甜瓜属作物, 亲缘关系非常接近; 而川桑、胡杨、巨桉等为第 2 类(图 5)。

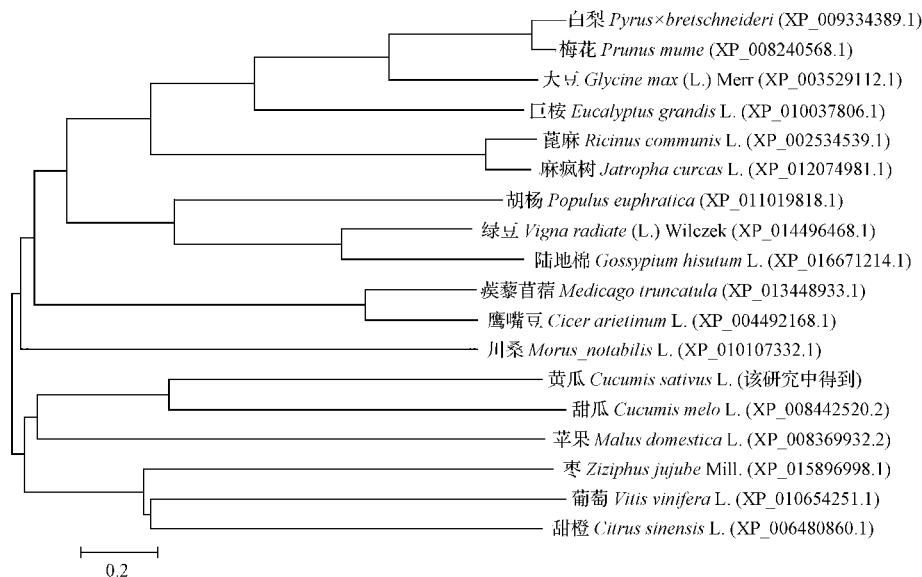


图5 CsLecRK 蛋白与其它植物 LecRK 蛋白系统进化分析

Fig. 5 Phylogenetic analysis of CsLecRK and LecRK proteins of other plants

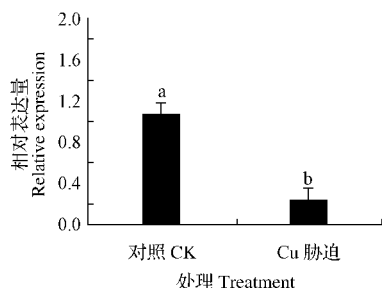
2.5 CsLecRK 在 Cu 胁迫条件下的表达模式分析

由图 6 可知, 与对照相比, CsLecRK 在 Cu 胁迫条件下的表达量明显下调, 降低了 4.39 倍。这表明 Cu 胁迫抑制了 CsLecRK 基因的表达。

3 讨论与结论

该研究首先通过生物信息学分析, 获得黄瓜

耐 Cu 相关基因 CsLecRK 信息, 进而利用 PCR 技术, 从黄瓜叶片中扩增了 CsLecRK 基因的 cDNA 全长。通过保守结构域分析表明, 该基因编码的蛋白质是植物 Lectin L-type superfamily 和 PKc-like superfamily 超基因家族蛋白; 其氨基酸序列与其它植物 LecRK 基因编码的氨基酸序列同源性较高, 其中与同属葫芦科的甜瓜同源性最高。而且进化分析表明, 该蛋白与多数作物亲缘关系较近, 符合植物进化规律。

图 6 *CsLecRK* 在 Cu 处理下的表达分析Fig. 6 Expression analysis of *CsLecRK* under Cu treatment

凝集素类受体蛋白激酶(LecRK)是一类由一个胞外与大豆凝集素类似的功能域、一个跨膜结构域以及一个胞内激酶功能域所组成的蛋白^[19],是类受体激酶家族中的一个亚家族,在酵母和人类基因组中,目前还没有发现或被报道,而在其它物种,如水稻、拟南芥、烟草、豌豆等均有研究^[20]。最近的研究也证明了这个观点,拟南芥 AT5g60300 蛋白的凝集素受体结构域能够结合 RGD(arginine-glucine-aspartic acid)蛋白,很可能参与了植物病原体的识别和信号转导^[21]。通过生物信息学的手段对 LecRK 的序列和蛋白的三维结构模型的分析表明,在凝集素类似的结构域的 β -折叠之间形成了一个疏水的空腔,这个疏水部位很可能会结合疏水的植物激素分子^[22]。XIN 等^[23]发现拟南芥类受体激酶家族的 A4 亚家族的基因在种子的萌发过程中负调节 ABA 的信号转导。因此涉及胁迫响应的基因也逐渐被研究,如陆地棉^[24]、拟南芥^[16]、蒺藜苜蓿^[25]、小麦抗条锈病基因等^[26]。

目前,尽管 *LecRK* 基因在不同作物中已有了较为广泛的研究,但是关于该基因对 Cu 响应的研究还不明确。根据前人的预测,拟南芥的凝集素类受体激酶可能主要在识别糖类分子和相关信号转导过程中发挥功能。现有文献已证实拟南芥的类受体激酶参与花粉的发育和病原胁迫反应的信号转导,表明凝集素受体激酶活性在信号转导过程中是不可缺少的。当植物处于干旱、高盐胁迫下,植物细胞会感知外界的胁迫信号,通过一系列复杂的信号转导途径如 ABA 信号转导,把信号传递给胁迫响应基因,由各类基因激发胁迫响

应使其诱导表达,从而激活植物抗逆,降低或消除盐胁迫等造成的伤害。该研究对 *CsLecRK* 在 Cu 胁迫条件下叶片的表达进行分析,表明该基因是响应 Cu 胁迫下调表达的基因,*LecRK* 基因表达量降低能否提高黄瓜对 Cu 的耐受性仍是未知的。基于前人研究表明,ABA 能迅速的诱导 *LecRK* 基因高水平的表达,但是处理超过 6 h 后,其表达量又降低到诱导前的水平。而外源 ABA 可以通过提高植物的抗氧化能力,保护细胞的生物膜,维持各种元素在体内的平衡,从而缓解了植物的重金属毒害。植物在 Cu 胁迫条件下会产生活性氧(ROS),*LecRK* 基因受到 ABA 诱导的表达模式是否受到了活性氧的影响目前尚不明确,但是 ABA 与 Cu 胁迫均使活性氧含量增加,胁迫后期 *LecRK* 基因的表达量均下降,因此,推测铜胁迫会激发其通过 *CsLecRK* 的迅速下调表达来参与 ABA 信号的转导,降低活性氧的累积;从而提高黄瓜对 Cu 的耐受性。

目前,关于黄瓜耐 Cu 相关基因的报道较少。该研究通过克隆获得了 *CsLecRK* 并对其在 Cu 胁迫的响应做了初步检测,表明该基因是响应 Cu 胁迫下调表达的基因,这一结论将为后续更加深入研究 *CsLecRK* 的功能及其参与的信号途径和调控网络提供思路和线索,为研究提高黄瓜耐 Cu 能力奠定了基础。

参考文献

- [1] 张立军,刘新.植物生理学[M].2版.北京:科学出版社,2011.
- [2] 杨丽丽.铜胁迫对甜菜幼苗生长和光合特性的影响[D].济南:山东师范大学,2013.
- [3] 胡筑兵,陈亚华,王桂萍,等.铜胁迫对玉米幼苗生长、叶绿素荧光参数和抗氧化酶活性的影响[J].植物学通报,2006,23(2):129-137.
- [4] 林义章,张淑媛,朱海生,等.铜胁迫对小白菜叶肉细胞超微结构的影响[J].中国生态农业学报,2008,16(4):948-951.
- [5] 王瑞刚,唐世荣,郭军康,等.铜胁迫对高丹草和紫花苜蓿生长和光合特性的影响[J].生态环境学报,2010,19(12):2922-2928.
- [6] XIONG Z T, LIU C, GENG B. Phytotoxic effects of copper on nitrogen metabolism and plant growth in *Brassica pekinensis* Rupr. [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2006, 64: 273-280.
- [7] 肖志华,张义贤,张喜文,等.外源铅、铜胁迫对不同基因型谷子幼苗生理生态特性的影响[J].生态学报,2012,32(3):889-

897.

- [8] 刘小红. 九华铜矿重金属污染调查及耐铜植物的筛选耐性机理研究[D]. 合肥:安徽农业大学, 2005.
- [9] RAMOS M C. Metals in vineyard soils of the penedes area (NE Spain) after compost application[J]. Journal of Environmental Management, 2006, 72: 1-7.
- [10] 黄永东, 黄永川, 于官平, 等. 蔬菜对重金属元素的吸收和积累研究进展[J]. 长江蔬菜, 2011(10): 1-6.
- [11] JANAS K, ZIELIN'SKA-TOMASZEWSKA J, RYBACZEK D, et al. The impact of copper ions on growth, lipid peroxidation, and phenolic compound accumulation and localization in lentil (*Lens culinaris* Medic.) seedlings[J]. Journal of Plant Physiology, 2010, 167: 270-276.
- [12] 王松华, 杨志敏, 徐朗莱. 植物铜素毒害及其抗性机制研究进展[J]. 生态环境, 2003, 12(3): 336-341.
- [13] 孙权, 何振立, 杨肖娥, 等. 铜对小白菜的毒性效应及其生态健康指标[J]. 植物营养与肥料学报, 2007, 13(2): 324-330.
- [14] NISHIGUCHI N M, YOSHIDA Y K, SUMIZONO S T, et al. A receptor-like protein kinase with a lectin-like domain from lombardy poplar: Gene expression in response to wounding and characterization of phosphorylation activity[J]. Mol Gen Genomics, 2002, 267: 506-514.
- [15] RIOU C, HERV C, PACQUIT V, et al. Expression of an *Arabidopsis* lectin kinase receptor gene, *lecRK-al*, is induced during senescence, wounding and in response to oligogalacturonic acids[J]. Plant Physiol Biochem, 2002, 40: 431-438.
- [16] HE X J, ZHANG Z G, YAN D Q, et al. A salt-responsive receptor-like kinase gene regulated by the ethylene signaling pathway encodes a plasma membrane serine/threonine kinase[J]. Theor Appl Genet, 2004, 109: 377-383.
- [17] FUJIWARA T, HIRAI M Y, CHINO M, et al. Effects of sulfur nutrition on expression of the soybean seed storage protein genes in transgenic *Petunia*[J]. Plant Physiology, 1992, 99(1): 263-268.
- [18] LIVAK K J, SCHMITTGEN D T. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method[J]. Methods, 2001(25): 402-408.
- [19] HERVE C, DABOS P, GALAUD J R, et al. Characterization of an *Arabidopsis thaliana* gene that defines a new class of putative plant receptor kinases with an extracellular lectin like domain[J]. J Mol Biol, 1996, 258: 778-788.
- [20] JOSHI A, DANG H Q, VAID N, et al. Pea lectin receptor-like kinase promotes high salinity stress tolerance in bacteria and express in response to stress in planta[J]. Glycoconjugate Journal, 2010, 27(1): 133-150.
- [21] HAFFANI Y Z, SILVA N F, GORING D R. Receptor kinase signalling in plants[J]. Canadian Journal of Botany, 2004, 82(1): 1-15.
- [22] BARRE A, HERV E, CHRISTINE, et al. Lectin receptor kinases in plants[J]. Critical Reviews in Plant Sciences, 2002(21): 379-399.
- [23] XIN Z, WANG A, YANG G, et al. The *Arabidopsis* A4 subfamily of lectin receptor kinases negatively regulates abscisic acid response in seed germination[J]. Plant Physiol, 2009, 149: 434-444.
- [24] SONIA M., PHILLIPS I A, DUBERY H V H. Identification and molecular characterisation of a lectin receptor-like kinase (GhLecRK-2) from cotton[J]. Plant Mol Biol Rep, 2013, 31: 9-20.
- [25] JOHANNES A, HOFBERGER, DAVID L, et al. A complex interplay of tandem-and whole-genome duplication drives expansion of the L-type lectin receptor kinase gene family in the Brassicaceae[J]. Genome Biol Evol, 2015, 7(3): 720-734.
- [26] JIANG Z, GE S. *RLPI. 1*, a novel wheat receptor-like protein gene, is involved in the defence response against *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*[J]. Journal of Experimental Botany, 2013, 64(12): 3735-3746.

Cloning and Expression Analysis for Copper Tolerance Related Gene *CsLecRK* in Cucumber

ZHAO Jinfeng^{1,2}, TIAN Chunyu^{1,2}, GUO Dongxue^{1,2}, WU Tao^{1,2}

(1. Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Horticultural Crops (Northeast Region), Ministry of Agriculture, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030; 2. College of Horticultural and Landscape Architecture, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030)

Abstract: Cucumber was used as test material. The mechanism of copper (Cu) tolerance in cucumber was investigated, a candidate Cu tolerance related gene, named lectin receptor kinase (*CsLecRK*), was cloned and analyzed by using gene cloning and bioinformatics methods based on expression pattern and conservative of genes response to Cu. The results showed that full-length cDNA of *CsLecRK* was

doi:10.11937/bfyy.20164683

黄瓜根际解钾细菌的分离筛选、鉴定及其促生效果

葛红莲, 纪秀娥

(周口师范学院 生命科学与农学院, 河南 周口 466001)

摘要:以黄瓜根际土壤为试材,采用亚历山大硅酸盐细菌培养基从黄瓜根际土壤中分离筛选解钾菌,用原子吸收法测定菌株的解钾能力,选出解钾能力较强的菌株进行菌种鉴定,同时研究其对黄瓜幼苗生长的影响。结果表明:从黄瓜根际土壤中共分离获得9株细菌,其中PK1、PK3和PK7具有较强的解钾能力,液体培养96 h后其解钾率分别为30.05%、33.78%和44.01%。依据菌株的形态学特征和生理生化特征鉴定,PK1和PK3为恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*),PK7为胶质类芽孢杆菌(*Paenibacillus mucilaginosus*)。盆栽试验结果表明,与对照相比,14 d后PK1提高黄瓜的根长、株高、鲜质量和干质量分别为42.60%、10.45%、48.65%、33.01%,PK3分别对应提高65.26%、21.09%、83.78%和49.48%,PK7分别对应提高79.46%、44.26%、105.41%和113.03%。

关键词:黄瓜;解钾细菌;根际;筛选;促生长

中图分类号:S 436.421.1⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)13-0021-05

钾是作物生长发育所必需的三大营养元素之一,钾参与植物的新陈代谢,如光合作用、蛋白质的合成、碳水化合物的代谢以及酶的活化等^[1-2],并且钾能提高植物的抗逆性和改善作物的品质^[3-4]。缺钾影响植物生长、根系发育以及抗逆性和抗病虫害的能力,进而造成作物产量低。目前,我国约有60%的耕地缺钾,但硅酸盐类矿物如钾

长石和云母等钾元素含量丰富,因其具有难溶性,钾元素很难释放出来^[5-6]。为了缓解土壤缺钾的状况,利用化肥补钾成为我国农业生产中普遍使用的方法,但长期使用化肥改变了土壤的理化性质,导致了土壤结构的破坏,造成养分流失和环境污染,制约了我国农业的可持续性发展^[7]。因此,需要寻求解决钾亏缺、生态环保的途径。许多研究表明解钾细菌能分解含钾矿物,将土壤中的无效钾、磷、硅等营养元素转化为速效养分,增加土壤中钾、磷、硅等元素的含量,促进作物生长发育,提高作物的产量和品质,有利于农业的可持续性发展^[8-10]。国内外学者已从一些重要的作物,如水稻、小麦、甘蔗、玉米和棉花等根际分离选育出许多优良促生菌株,并且部分菌株已用于商业化

第一作者简介:葛红莲(1976-),女,硕士,副教授,研究方向为微生物农药和微生物菌肥的开发与应用。E-mail:gehonglian2003@126.com.

基金项目:河南省科技厅科技攻关资助项目(162102310588);周口师范学院校本资助项目(ZKNUB215210)。

收稿日期:2017-02-27

2 121 bp and encoded a protein of 706 amino acids with predicted molecular mass of 78.36 kDa and a pI of 7.76. Both the results of NCBI Blastp and phylogenetic tree based on LecRK proteins showed that CsLecRK protein had the highest homology with that of muskmelon (95%), the evolutionary distance was the shortest. The result of qRT-PCR showed that *CsLecRK* was significantly down-regulated under Cu stress.

Keywords: cucumber; copper tolerance related gene; *CsLecRK*; expression analysis