

黄瓜抗黑星病相关基因的差异表达分析

李全辉^{1,2}, 李锡香¹, 王海平¹, 邱 杨¹, 宋江萍¹, 张晓辉¹, 沈 镝¹

(¹ 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081; ² 青海省农林科学院园艺研究所, 西宁 810016)

摘要:以抗黑星病黄瓜材料 HX1 为试材, 接种黑星病菌 (*Cladosporium cucumerinum*) 2 h、8 h、20 h、32 h 和 72 h 的叶片作为试验方 (Tester), 相应的未接种叶片作为对照方 (Driver), 利用 SSH 技术, 构建了黑星病菌侵染初期的正向和反向 cDNA-SSH 文库。用巢式引物 PCR 检测插入片段, 获得了 200 个阳性克隆, 通过测序, 除去重复序列, 共得到 105 个 Unique ESTs, 其中 50 个为 singleton, 55 个为 contigs。与非冗余蛋白数据库进行 BLASTx 比对, 结果显示, 17 条 ESTs 未找到同源序列, 88 条非重复序列和已知基因的同源性较高, 占全部 ESTs 序列的 83.8%, 其中 86 条 ESTs 与非冗余蛋白数据库已知功能的蛋白具有高度的相似性。结合高密度点阵膜杂交差异筛选, 阳性率为 75.0%。经初步分析这些序列的功能, 差异表达的 ESTs 功能涉及能量和基础代谢、信号转导、蛋白和核酸代谢、光合作用及逆境中特异表达的基因等方面, 为研究黄瓜抗黑星病基因提供了依据。

关键词: 黄瓜; 黑星病; 抑制性消减杂交; 差异表达

Differential Expression Analysis of Related Resistant Genes to *Cladosporium cucumerinum* in Cucumber

LI Quan-hui^{1,2}, LI Xi-xiang¹, WANG Hai-ping¹, QIU Yang¹, SONG Jiang-ping¹, ZHANG Xiao-hui¹, SHEN Di¹

(¹ Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081;

² Institute of Horticulture, Qinghai Academy of Agriculture and Forestry, Xining 810016)

Abstract: A forward-and reverse-suppression subtractive hybridization libraries were constructed based on a cucumber accession HX1 which showed highly resistant to *Cladosporium cucumerinum*. The seedling leaves inoculated with *Cladosporium cucumerinum* on 2 h, 8 h, 20 h, 32 h and 72 h were used as Tester, and that from untreated leave as Driver. Totally 200 SSH cDNA fragments were selected with Nested primer PCR. Through the DNA sequencing and repeated and redundant sequences removing, 105 ESTs including 50 singletons and 55 contigs were obtained. Protein homology search in non-redundant (Nr) protein database revealed that 17 ESTs didn't have homologous gene, 88 ESTs were highly homologous with known protein, accounting for 83.8% of all EST sequences, of which only 2 ESTs were unknown function protein. The positive rate of these ESTs was 75.0% detected by DIG Nonradioactive Nucleic Acid Labeling and Detection System. The function of these ESTs involved in energy and basic metabolism, signal transduction, protein and nucleic acid metabolism, photosynthesis, and genes specifically induced under certain stress, etc. This study could provide a basis for further study of the cucumber genes resistance to *Cladosporium cucumerinum*.

Key words: Cucumber; *Cladosporium cucumerinum*; suppression subtractive hybridization (SSH); differential expression

黄瓜是我国乃至全世界的重要蔬菜作物之一, 我国黄瓜的年播种面积及总产量均居世界首位。由

瓜枝孢霉 (*Cladosporium cucumerinum* Ell. et Arthur) 引起的黄瓜黑星病是一种世界性病害, 给黄瓜生产

收稿日期: 2012-08-30 修回日期: 2012-09-06 网络出版日期: 2013-04-02

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20130402.1736.016.html>

基金项目: 国家科技支撑计划项目 (2013BAD01B04); 农业部园艺作物生物学与种质创制重点实验室资助

作者简介: 李全辉, 助理研究员, 从事蔬菜遗传育种研究。E-mail: liquanhui_2008@163.com

通信作者: 沈镝, 副研究员, 主要从事蔬菜种质资源收集保存、鉴定评价及优异基因挖掘。E-mail: shendi@mail.caas.net.cn

带来巨大损失。目前,有关黄瓜对黑星病的抗性大多集中在组织结构、生理生化^[1-2]以及分子标记和基因定位等方面研究,对黄瓜和黑星病互作的分子机理了解甚少,因此从分子水平上对黄瓜与黑星病菌互作过程中基因的差异表达进行研究,对揭示黄瓜与黑星病的互作机制有重要意义。在分子标记及基因定位的研究方面,张桂华等^[3]筛选到与黄瓜抗黑星病基因连锁的 AFLP 标记 E20M64,距离为 4.83 cM;王惠哲等^[4]筛选到与黄瓜黑星病抗病相关基因紧密连锁的 SSR 标记 CSWCTT02D,距离为 3.1 cM。2009 年研究人员成功地以较低的成本绘制了黄瓜基因组的精细图^[5]。利用基于全基因组开发的大量 SSR 标记,S. P. Zhang 等^[6]构建了黄瓜栽培变种内的遗传连锁图谱,并将黄瓜黑星病抗病基因 *Ccu* 定位在黄瓜的第 2 条染色体上,与两端标记 SSR03084 和 SSR17631 的距离分别为 0.7 cM 和 1.6 cM。这些研究结果为进一步克隆该抗病基因奠定了基础。

抑制性消减杂交 (SSH, suppression subtractive hybridization) 是近年来发展起来的一种差减杂交技术,是快速克隆基因差异表达 cDNA 的有效方法。由于具有高度敏感性、操作简便、快速、高效、假阳性率低、mRNA 需要量较少,目的序列富集程度高,且丰度相对一致等突出优点,目前该技术已广泛应用于植物领域,从小麦等多种植物中成功克隆了 48 个抗病基因^[7],在不同逆境胁迫下差异表达基因的研究方面也有广泛应用。诸多研究表明,SSH 技术现已成为有效分离差异表达基因的重要方法。截至目前,尚未见抑制性差减杂交技术用于黄瓜抗黑星病过程中差异表达基因的研究报道。

本研究以高抗黑星病的黄瓜品系 HX1 为试材,通过构建黑星病菌诱导黄瓜早期抗性的 cDNA-SSH 文库,筛选与黑星病抗性相关基因的 EST 片段并进行功能分析,以期从表达水平了解黄瓜对黑星病抗性的分子机制。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以高抗黑星病黄瓜品系 HX1 (DI = 5.0%) 为供试材料, HX1 是一个以国外品种 373/85、北京刺瓜和东北地方品种 8970 为亲本材料,经杂交选育的高代自交系,表现为高抗黑星病,抗霜霉病、枯萎病和白粉病。黑星病病原由中国农业科学院蔬菜花卉研究所病理课题组提供。试材于 2008 年 11 月底播种在中国农业科学院蔬菜花卉研究所日光温室中,待幼苗

长至 1 叶 1 心时,将其转移至定温温室,试验方接种黑星病菌,对照方喷清水,室内保持恒温 20 ℃。分别于接种后 2 h、8 h、20 h、32 h 和 72 h 时摘取接菌幼苗及对照的叶片,迅速置于液氮中并保存在 -80 ℃ 备用。

1.2 试验方法

1.2.1 总 RNA 的提取与 mRNA 的分离 分别取接菌及对照材料不同时间点的叶片,用 Trizol 试剂 (Invitrogen 公司) 提取总 RNA,然后分别将接菌处理及对照各时间点的总 RNA 等量混合,采用 Promega 公司的 PloyATtract mRNA Isolation System IV 方法进行 mRNA 的分离纯化,用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.2 抑制消减杂交 (SSH) 采用 Clontech PCR-Select TM cDNA Subtraction Kit 试剂盒构建 SSH 文库。以接菌处理 HX1 的 cDNA 为试验方 (Tester),对照处理 HX1 的 cDNA 为对照方 (Driver),进行正向和反向的消减杂交。

1.2.3 消减 cDNA 文库构建及差异筛选 将 SSH 第 2 次 PCR 产物纯化后,采用 Promega 公司的 pGEM®-T Easy 载体系统试剂盒进行产物的连接与转化,在氨苄青霉素的 LB 平板上进行阳性克隆筛选,挑取白斑菌落在氨苄青霉素液体培养基中 37 ℃ 振荡过夜培养,用 Nest PCR Primer 1 (5'-TC-GAGCGGCCCGCCGGCAGGT-3') 和 2R (5'-AGCGT-GGTCGCGCCGAGGT-3') 进行 PCR 扩增,2% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

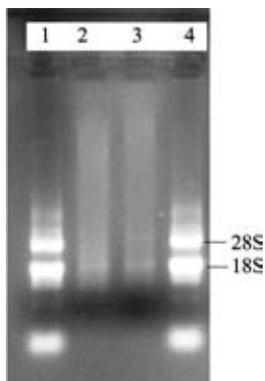
1.2.4 差异表达基因测序与序列分析 菌液 PCR 验证后获得的阳性克隆送至中国农业科学院作物科学研究所 Open Lab 进行测序,用 Phrap 软件去载体,进行序列拼接,对获得的 EST 片段进行 Gene Ontology (GO) 分类分析。PCR 产物进行点阵膜杂交,分别以正向消减杂交和反向消减杂交为探针,差异筛选的探针用地高辛标记,与高密度点阵膜杂交,杂交方法按照美国罗氏公司地高辛核酸标记指示系统试剂盒进行。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 与 mRNA 的检测

对试验方和对照方的总 RNA 和 mRNA 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 (图 1),结果显示,在 28S 和 18S 处有各有 1 条完整的条带,没有弥散,说明提取的总 RNA 具有良好的完整性。纯化后的 mRNA 在 28S 和 18S 处条带明显减弱,成弥散状,且条带主

要集中于上部。分光光度计检测结果显示:试验方 mRNA 和对照方 mRNA 的 R(OD260/280)值分别为 1.983 和 1.965,浓度分别为 0.583 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 和 0.547 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$,符合建库对 mRNA 的要求。

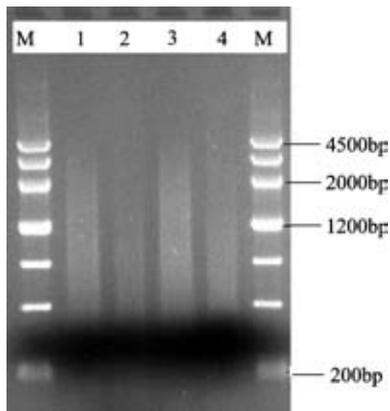


1: 试验方总 RNA ;2: 试验方 mRNA ;
3: 对照方总 mRNA ;4: 对照方总 RNA
1: The total RNA of Tester, 2: Tester mRNA,
3: Driver mRNA, 4: The total RNA of Driver

图 1 总 RNA 和 mRNA 的琼脂糖凝胶电泳检测
Fig. 1 The agarose gel electrophoresis detection of isolated total RNA and mRNA

2.2 cDNA 的合成及酶切效果分析

将试验方 mRNA 和对照方 mRNA 分别反转录为 cDNA,并用 RsaI 酶酶切。酶切前后的 cDNA 在 1% 琼脂糖凝胶电泳上进行检测。由结果图 2 可以看出,酶切前试验方和对照方 cDNA 的片段在 200 ~ 4500 bp 之间,而酶切后片段主要集中在 200 ~ 1500 bp 之间,说明酶切效果较好,符合进行下一步试验的要求。



M: DNA maker III ;1: Tester cDNA;2: 酶切后 Tester cDNA;
3: Driver cDNA;4: 酶切后 Driver cDNA

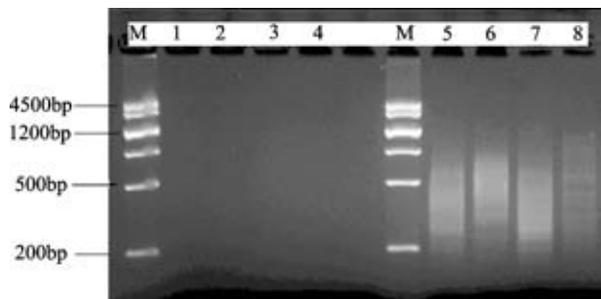
M: DNA maker III ,1 and 3: Double strand cDNA of Tester and Driver,
2 and 4: Double strand cDNA of Tester and Driver after Rsa I digestion

图 2 酶切前后 cDNA 的琼脂糖凝胶电泳检测

Fig. 2 The agarose gel electrophoresis detection of digestion and non-digestion cDNA with Rsa I

2.3 SSH 结果分析

对 Tester 和 Driver 进行差减杂交和两次巢式 PCR 扩增。第 1 次 PCR 扩增 25 个循环,第 2 次 PCR 扩增 12 个循环。将 2 次 PCR 扩增产物在 2.0% 琼脂糖凝胶电泳上检测,结果见图 3。经第 2 次扩增后条带呈现均匀的弥散状态,片段大小主要集中在 200 ~ 1000 bp 之间,且小于未消减的扩增产物,其亮度也低于未消减的扩增产物,说明消减杂交的效果较好,可以进行差减文库的建立。



M: DNA maker III ;1~4: 差减杂交后的第 1 轮 PCR 产物;
5~8: 差减杂交后的第 2 轮 PCR 产物;1,5: 未差减的 Tester cDNA;2,6: 未差减的 Driver cDNA;
3,7: 差减的 Tester cDNA;4,8: 差减的 Driver cDNA
M: DNA maker III ,1-4: Products of first PCR,
5-8: Products of second PCR,
1 and 5: Products of unsubtracted tester cDNA,
2 and 6: Products of unsubtracted Driver cDNA,
3 and 7: Products of subtracted tester cDNA,
4 and 8: Products of subtracted Driver cDNA

图 3 差减杂交后两轮 PCR 检测

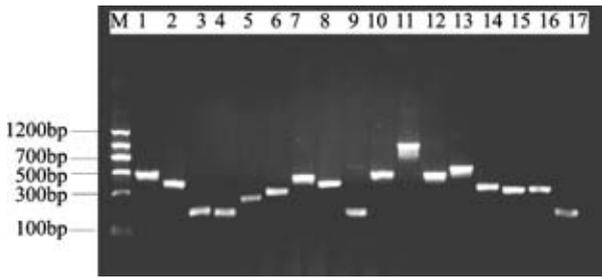
Fig. 3 Analysis of subtracted products after primary and secondary PCR

2.4 SSH cDNA 文库的构建

随机挑取消减文库中阳性克隆,利用巢式引物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳检测结果如图 4 所示,获得克隆片段主要集中于 200 ~ 1000 bp 范围内,符合建库要求。从正向和反向 SSH 文库中分别挑取 150 条和 50 条筛选效果好且大于 200 bp 的片段共计 200 个阳性克隆送至中国农业科学院作物科学研究所 Open Lab 进行测序,共获得 198 条高质量 EST。

2.5 序列分析

对测序后获得 198 条高质量 ESTs 用 Phrap 软件去载体、序列拼接后,共得到 105 个 Unique ESTs,其中 50 个为 singleton,55 个为 contigs。将这些 EST 与非冗余蛋白数据库进行 BLASTx 比对(表 1)。结果表明,88 条非重复序列和已知基因的同源性较高,占全部 EST 序列的 83.8%,其中 86 条 ESTs 与非



M: DNA maker II ; 1~17: 随机挑取克隆的 PCR 扩增片段
M: DNA maker II ; 1-17: PCR products of some random clones

图4 差减文库中部分随机挑取克隆的 PCR 检测
Fig.4 PCR identification of inserted fragments of randomly selected clones in the SSH-cDNA library

冗余蛋白数据库已知功能的蛋白具有高度的相似

表1 SSH文库中部分 EST 片段的 BLASTx 比对结果

Table 1 BLASTx result of some EST fragment in SSH cDNA library

克隆号 Clone No.	长度 (bp) Length	同源比对结果 BLASTx result	来源 Source	E 值 E-value
singleton12	174	similar to SET domain-containing protein	<i>Vitis vinifera</i>	2.00E-10
* singleton14	215	nuclear acid binding protein	<i>Ricinus communis</i>	1.00E-23
singletonT23	430	transcription factor, putative	<i>Ricinus communis</i>	3.00E-07
singletonT157	294	protein binding protein, putative	<i>Ricinus communis</i>	1.00E-22
singletonT159	249	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein 27C, putative	<i>Ricinus communis</i>	1.00E-29
* singletonT172	331	nuclear acid binding protein, putative	<i>Ricinus communis</i>	4.00E-39
* singletonT177	322	conserved hypothetical protein	<i>Ricinus communis</i>	3.00E-39
* singletonT192	505	RNA polymerase II complex component SRB7 protein-like	<i>Oryza sativa Japonica Group</i>	1.00E-30
* Contig8	415	40S ribosomal protein S7, putative	<i>Ricinus communis</i>	7.00E-31
* Contig40	844	RNA polymerase sigma factor rpoD1, putative	<i>Ricinus communis</i>	1.00E-13
* Contig44	617	global transcription factor group	<i>Populus trichocarpa</i>	3.00E-48
Contig52	581	translocon-associated protein beta family protein-like	<i>Solanum tuberosum</i>	1.00E-54
* Contig26	624	DEAD/DEAH box helicase, putative	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1.00E-74
* Contig39	609	50S ribosomal protein L1p, putative	<i>Ricinus communis</i>	4.00E-43
* Contig41	711	ribosomal protein L29 family protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1.00E-38
Contig50	515	RNA helicase	<i>Oryza sativa Japonica Group</i>	2.00E-19
* D29	332	ribosomal protein S26	<i>Pisum sativum</i>	2.00E-11
* singletonT168	215	regulatory protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1.00E-12
* Contig2	225	BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1-associated receptor kinase I precursor, putative	<i>Ricinus communis</i>	1.00E-23
* Contig18	1616	copper amine oxidase-like protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2.00E-30
Contig20	1235	protein-tyrosine phosphatase mitochondrial 1	<i>Zea mays</i>	3.00E-60
Contig28	684	IQD13 (IQ-domain 13); calmodulin binding protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	3.00E-31
* Contig45	604	signal peptidase I, putative	<i>Ricinus communis</i>	6.00E-10
* D7	669	tryptophan biosynthesis protein, trpc, putative	<i>Ricinus communis</i>	4.00E-99
* D11	257	serine/threonine protein kinase, putative	<i>Ricinus communis</i>	4.00E-34
* singleton4	253	casein kinase, putative	<i>Ricinus communis</i>	1.00E-36
* singleton22	367	quinone reductase family protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	4.00E-40
singletonT160	247	pentatricopeptide repeat-containing protein, putative	<i>Ricinus communis</i>	5.00E-09
singletonT182	688	beta-carotene hydroxylase	<i>Coffea arabica</i>	5.00E-75

2.6 功能分类

在 Swissport 蛋白数据库中对获得的 105 条 Unique ESTs 进行 Gene ontology (GO) 分类分析, 结果表明, 这些 Unique ESTs 分别属于细胞组分 (cell component)、分子功能 (molecular function) 和生物过程 (biological process), 其中与细胞组分相关的 ESTs 共有 25 条, 占

性, 占全部 EST 序列的 81.9%, 仅有 2 条 ESTs 功能未知。在其余的 17 条 ESTs 序列中, 有 15 条在非冗余蛋白数据库中没有找到与之相匹配的蛋白质, 可能为未知基因或相关片段。另外有 2 条同源性比对结果的 E 值大于 $1.00E-10$, 可信度不高。在这 86 个已知基因中, 包括了一些已经报道的与抗病相关的基因, 如过氧化氢酶 (Catalase)^[8]、锌指蛋白 (zinc finger)^[9]、脯氨酸脱氢酶 (proline dehydrogenase)^[10]、肌醇半乳糖苷酶 (galactinol synthase)^[11] 等, 在一定程度上证明了所构建消减文库的可靠性。这些同源基因中, 37.5% 来自蓖麻, 25% 来自拟南芥, 9.7% 来自黄瓜, 9.7% 来自水稻和玉米, 13.9% 来自其他作物。

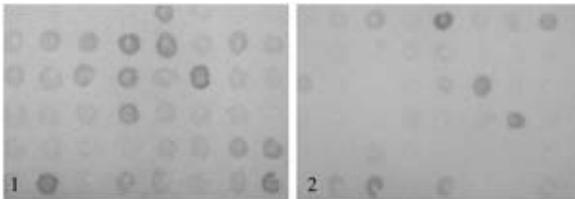
总数的 23.8%, 与分子功能相关的 ESTs 有 36 条, 占总数的 34.2%, 与生物过程相关的 ESTs 仅有 2 条。

在二级分类水平上可以看出, 在细胞组分分类中, 与细胞、细胞组分、细胞器相关的 ESTs 分别为 9 条、9 条、7 条; 所占的比例分别为 36%、36%、28%。在分子功能分类中, 分子绑定 (binding) 及催化功

能(catalytic activity)相关的 EST 数量最多,分别为 22 条、9 条,所占比例分别为 60% 和 25%,此外还有与抗氧化活性(antioxidant activity)、结构分子活性(structural molecule activity)、转录调控活性(translation regulator activity)、转运活性(transporter activity)等相关的 EST。在生物过程分类中,与细胞过程(cellular process)和代谢过程(metabolic process)相关的 EST 各有 1 条。通过分类可以看出,在黑星病菌感染后寄主在细胞组分及生物代谢中发生了明显的变化,许多具有绑定功能和催化功能的基因大量表达,使细胞进程、生理代谢和刺激反应加强,而这些基因的表达与抗性紧密相关。

2.7 差异筛选 SSH cDNA 文库

利用斑点杂交技术筛选并验证黑星病菌感染黄瓜初期的差异表达基因。将菌液 PCR 产物为单一条带的 96 个 PCR 产物点膜,分别以 Tester cDNA 和 Driver cDNA 标记后探针进行斑点杂交筛选。可以与正向消减探针杂交,不能与反向消减探针杂交,即正向杂交点信号强于反向杂交点信号的克隆就是差异表达基因,对应杂交点信号强度相同或反向杂交信号强于正向信号的视为假阳性克隆。通过 2 个标记探针的 2 次重复杂交,结果如图 5 所示,在 96 个 PCR 产物的斑点杂交试验中,共有 72 个为差异表达基因,阳性率为 75.0%。



1:以 Tester cDNA 为探针;2:以 Driver cDNA 作为探针
1:Tester cDNA used as probe,2:Driver cDNA used as probe

图 5 斑点杂交筛选结果

Fig. 5 Result of dot blotting

3 讨论

本研究为系统地阐述黄瓜对黑星病的抗性机制,构建了 SSH-cDNA 文库,共获得差异表达的 ESTs 105 个,其中 17 条 ESTs 未找到同源匹配,88 条非重复序列和已知基因的同源性较高,在已知基因中,其功能涉及能量代谢、防御反应、信号转导及基因的表达调控等多个方面。

在构建的差减文库中,发现了一系列和光合碳代谢相关的酶和蛋白,如:Rubisco 活化酶(Contig6)、核酮糖-1,5 二磷酸羧化酶/加氧酶(Contig4)、碳酸酐酶(singletonT167)等。Rubisco 是植物

光合碳代谢中的关键酶,参与调节光合作用和光呼吸的关系,对净光合速率起着决定性作用,病原物感染及非生物胁迫均可使之在植物叶片中的含量下降^[12-14],导致光合效率显著降低^[15]。在喻修道等^[16]构建的小麦与条锈菌亲和互作的差减文库中有 13 个 ESTs 编码此酶,在苹果与黑星病菌亲和互作的 SSH-cDNA 文库中有 57 个 ESTs 编码此酶^[17]。在本文构建的差减文库中也发现了 Rubisco 活化酶(Contig6),Rubisco 活化酶在体内对 Rubisco 的活性起着重要的调节作用^[18]。碳酸酐酶(singletonT167)也是一个重要的光合作用酶,通过催化 CO₂ 和 HCO₃⁻ 之间的相互转化反应来降低 CO₂ 在叶肉细胞中的扩散阻力,为羧化反应提供底物,叶片中的高碳酸酐酶活性使植物在逆境条件下仍能维持较高的光合速率^[19],Mg-原卟啉 IX 单甲酯环化酶(D30)是叶绿素 a 生物合成中间环节的催化酶^[20]。此外,还发现叶绿素 a/b 结合蛋白(D18),叶绿体光调节蛋白(singletonT163)等一系列和光合作用相关的酶和蛋白。综上所述,黄瓜在遭受黑星病侵入时,可能调动一系列和光合作用相关的酶和蛋白,促进光合作用,增加光合效率,以实现对病原菌的抗性。光合作用可能和作物的抗病性密切相关,至于其作用机理还有待深入研究。

在黄瓜与黑星病菌的互作中,植株会合成一系列和信号转导相关的蛋白参与抗病过程,如丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(D11)、酪蛋白激酶(singleton4)、信号肽(Contig45)等。促分裂原活化蛋白激酶(MAPK, mitogen-activated protein kinase)是普遍存在于真核细胞的一类保守的丝氨酸/苏氨酸类蛋白激酶(D11)^[21]。在抗病反应中,MAPK 可以介导信号的传递^[22]。在小麦抗白粉病研究中,发现 2 个与 MAPK 类似、促分裂原活化蛋白激酶家族(MAPK)的成员,均为保守的丝氨酸/苏氨酸类蛋白激酶,在多种信号传递系统中起着重要作用^[23-24]。除了信号传递外,还可以调控抗病基因表达和转录因子的活化^[25]。还发现了一种酪蛋白激酶(singleton4),酪蛋白激酶在许多物种的细胞分裂及分化过程中都有重要作用。刘炜^[26]以经油菜素内酯处理(BR, brassinolide)的水稻幼苗为材料,通过 cDNA 微矩阵的方法得到了一个全长 1939bp、编码蛋白产物为 I 型的酪蛋白激酶(CKIs)的 *OsCKII* 基因(Accession number AJ487966),该基因的表达受油菜素内酯和脱落酸(ABA, abscisic acid)的诱导,并且通过 cDNA 芯片技术研究了受 *OsCKII* 调节的基因表达谱,结果显示该基因的缺失影响了参与信号转导及激素代谢

途径的许多基因的表达。

在构建的文库中还发现一系列与抗病及逆境相关的酶和蛋白,如过氧化氢酶(Contig9)、锌指蛋白(Contig27)、泛素(Contig30)等。在病原菌侵染初期,植物体内会出现短暂的活性氧爆发^[27],其中活性氧或直接抵抗病原物,或诱导细胞壁加厚,或激发植物局部细胞过敏性死亡,也可调节与植保素合成相关基因的表达^[28]。黑星病菌对黄瓜植株的侵染过程中,过氧化氢酶(Contig9)可能参与调解 H₂O₂ 在植物体内的平衡,从而参与抗病过程。在构建的文库中还发现了锌指蛋白(Contig27),是由半胱氨酸和组氨酸组成的能够结合锌原子的局部多肽结构,存在于许多转录因子中并在与其他分子的互动中起关键作用。在拟南芥基因组上鉴定出了 2 个含锌指蛋白基因 *LOLI* 与 *LSDI*, 编码植物特有的转录因子,二者通过拮抗作用调节铜锌过氧化物歧化酶(Cu-ZnSOD)的积累来决定细胞的命运^[9]。同时来自拟南芥的 *RAR1* 和 *HvRar1* 锌指类蛋白基因的 C3H 基元已被证明是抗病基因比较密集的部位^[29-31]。王丽娟等^[32] 在水稻中也克隆了一个含锌指蛋白的基因 *OsLSD1*, 该基因的过量表达可以加速稻瘟菌侵染引起的过敏反应。泛素(Ubiquitin, Contig30)以及由泛素介导的泛素-蛋白水解酶复合体通路是最近几年发现的新的植物防卫反应类型^[33], 是细胞质和细胞核内依赖于 ATP 的非溶酶体途径的蛋白质降解通路, 高效并高度选择性地对细胞内的蛋白进行转换和修饰^[34], 参与细胞周期调整、细胞生长与凋亡、细胞信号感受、转录催化、离子通道、免疫应答以及抗原呈递等多种生命过程^[35]。此外,在文库中还发现脯氨酸脱氢酶(Contig43)、木葡聚糖转葡糖苷酶(XET, Contig5)、醌还原酶家族蛋白(singleton22)等酶和蛋白, 诸多研究表明, 这些基因都和植物的抗病性密切相关。

本研究中有 2 条 ESTs 在 BLASTx 上找到匹配序列, 但功能未知, 文库中 17 条 ESTs 未找到任何序列与之匹配, 推测可能为新基因, 这些功能未知的 ESTs 序列可能包含一些与黄瓜对黑星病的抗性有关的基因, 还有待进一步研究, 以便为抗病基因利用提供依据。

参考文献

- [1] Svalheim O, Robertsen B. Induction of peroxidases in cucumber hypocotyls by wounding and fungal infection[J]. *Physologia Plantarum*, 1990, 78(2): 261-267
- [2] 李宝聚, 李凤云. 黄瓜不同抗性品种感染黑星病菌后过氧化物酶和多酚氧化酶的变化[J]. *中国农业科学*, 1998, 31(1): 86-88
- [3] 张桂华, 韩毅科, 孙小红, 等. 与黄瓜抗黑星病基因连锁的分子标记研究[J]. *中国农业科学*, 2006, 39(11): 2250-2254
- [4] 王惠哲, 李淑菊, 管炜. 与黄瓜抗黑星病相关基因紧密连锁的 SSR 标记[J]. *分子植物育种*, 2009, 7(3): 550-553
- [5] Huang S W, Li R Q, Zhang Z H, et al. The genome of the cucumber, *Cucumis sativus* L[J]. *Nat Genet*, 2009, 41(12): 1275-1281
- [6] Zhang S P, Miao H, Yang Y H, et al. Genetic mapping of the scab resistance gene in Cucumber[J]. *J Am Soc Hort Sci*, 2010, 135(1): 53-58
- [7] Dilbirli M, Gill K S. Identification and analysis of expressed resistance gene sequences in wheat [J]. *Plant Mol Biol*, 2003, 53: 771-787
- [8] 宁顺斌, 王玲, 宋运淳. 玉米(*Zea mays* L.)过氧化物酶基因 *px* 和冷调控蛋白编码基因 *clt* 的物理定位[J]. *遗传学报*, 2000, 27(8): 719-724
- [9] Eppe P, Mack A A, Morris V R F, et al. Antagonistic control of oxidative stress induce cell death in *Arabidopsis* by two related plant-specific zinc finger proteins [J]. *PNAS*, 2003, 100(11): 6831-6836
- [10] Kiyosue T, Yoshida Y, Yamaguchi-Shinozaki K, et al. A nuclear gene encoding mitochondrial proline-dehydrogenase, an enzyme involved in proline metabolism, is upregulated by proline but downregulated by dehydration in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 1996, 8: 1323-1335
- [11] Taji T, Ohsumi C, Iuchi S, et al. Important roles of drought and cold inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant J*, 2002, 29: 417-426
- [12] 洪健, 王卫兵, 胡东维, 等. Rubisco 和 RCA 在青菜叶绿体中的分布及病毒侵染对其细胞定位的影响[J]. *实验生物学报*, 2005, 38(1): 30-36
- [13] 赵淑芳, 胡东维. 白粉病菌侵染诱导的大麦叶肉细胞变化的超微结构与细胞化学[J]. *植物病理学报*, 2003, 33(5): 444-448
- [14] 贺军民, 余小平, 刘成, 等. 增强 UV-B 辐射和 NaCl 复合胁迫下绿豆光合作用的气孔和非气孔限制[J]. *植物生理与分子生物学报*, 2004, 30(1): 53-58
- [15] 李月仁, 高鸿生. 条锈菌侵染对小麦光合作用和蒸腾作用的影响[J]. *麦类作物学报*, 2001, 21(2): 51-56
- [16] 喻修道, 屈志鹏, 郭军, 等. 小麦与条锈菌亲和互作的差减文库构建及初步分析[J]. *中国农业科学*, 2008, 41(5): 1267-1273
- [17] Degenhardt J, Al-Masri A N, Kurkcuoglu S, et al. Characterization by suppression subtractive hybridization of transcripts that are differentially expressed in leaves of apple scab-resistant and susceptible cultivars of *Malus domestica* [J]. *Mol Genet Genomics*, 2005, 273(4): 326-335
- [18] 李卫芳. 小麦 Rubisco 和 Rubisco 活化酶对光合作用的影响[D]. 扬州: 扬州大学, 2002
- [19] 戴新宾, 翟虎渠, 张红生. 土壤干旱对水稻叶片光合速率和碳酸酐酶活性的影响[J]. *植物生理学报*, 2000, 26(2): 133-136
- [20] 王平荣, 张帆涛, 高家旭. 高等植物叶绿素生物合成的研究进展[J]. *西北植物学报*, 2009, 29(3): 629-636
- [21] Machida Y, Nishihama R, Kitakura S. Progress in studies of plant homologs of mitogen-activated protein (MAP) kinase and potential upstream component in kinase cascades [J]. *Crit Rev Plant Sci*, 1997, 16: 481-496
- [22] Seo S, Okamoto M, Seoto H, et al. Tobacco MAP kinase: A possible mediator in wounding signal transduction pathways [J]. *Science*, 1995, 270: 1988-1992
- [23] Walther-Larsen H, Brandt J, Collinge D, et al. A pathogen-induced gene of barley encodes a HSP90 homologue showing striking similarity to vertebrate forms resident in the endoplasmic reticulum [J]. *Plant Mol Biol*, 1993, 21(6): 1097-1108