

李为观, 杨寅桂, 魏跃, 等. 热胁迫下黄瓜幼苗生理生化指标变化及 *CSHSP₇₀* 基因表达 [J]. 南京农业大学学报, 2010, 33 (3): 47-50

热胁迫下黄瓜幼苗生理生化指标变化 及 *CSHSP₇₀* 基因表达

李为观¹, 杨寅桂^{1,2}, 魏跃^{1,3}, 孟佳丽¹, 陈劲枫^{1*}

(1. 南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室/农业部南京蔬菜遗传改良重点开放实验室, 江苏 南京 210095;
2. 江西农业大学农学院, 江西 南昌 330045; 3. 江苏农林职业技术学院, 江苏 镇江 212400)

摘要: 选用 2 个黄瓜热敏材料和 2 个耐热材料研究了黄瓜幼苗在不同温度热胁迫下的生理表现, 并用 RT-PCR 技术检测了黄瓜热激蛋白 *CSHSP₇₀* 基因的表达。结果表明: 随着热胁迫温度的增高, 黄瓜幼苗叶片细胞膜透性增加, 丙二醛含量升高, 膜脂过氧化严重, 膜伤害加剧, 游离脯氨酸含量增加, 超氧化物歧化酶活性增强, *CSHSP₇₀* 被诱导增强表达, 耐热材料与热敏材料间表达存在差异。

关键词: 黄瓜; 热激蛋白; 耐热性; 基因型差异

中图分类号: Q945.78

文献标志码: A

文章编号: 1000-2030(2010)03-0047-04

Expression of *CSHSP₇₀* gene and changes of some physiological characters in cucumber seedlings during heat stress

LI Wei-guan¹, YANG Yin-gui^{1,2}, WEI Yue^{1,3}, MENG Jia-li¹, CHEN Jin-feng^{1*}

(1. State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement/Key Laboratory of Southern Vegetable Crops Genetics Improvement, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;
2. College of Agriculture, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China;
3. Jiangsu Polytechnical College of Agriculture and Forestry, Zhenjiang 212400, China)

Abstract: The objective of this paper is to study the relationship between thermotolerance and *HSP₇₀* gene expression in cucumber seedlings. Some physiological characters were determined and expression of heat shock protein gene *CSHSP₇₀* was detected using RT-PCR technique between different genotype cucumber under various thermal stresses. The results showed increased membrane permeability and enhanced SOD activity. The MDA and proline content increased significantly in all genotypes under various thermal stresses. The enhanced genotypic difference in *CSHSP₇₀* gene expression was noted in present studies.

Key words: cucumber; heat-shock protein; thermotolerance; genotypic differences

黄瓜 (*Cucumis sativus* L.) 是重要的蔬菜作物之一, 其最适宜的生长温度为 25~30 °C, 气温超过 30 °C 时花药发育不良, 花粉活力下降, 造成生殖障碍^[1]。高温胁迫会使果柄伸长, 果实缩短, 形成尖嘴瓜、弯曲瓜、蜂腰瓜等, 大大降低了黄瓜的商品性^[2]。因此, 在目前温室效应变得越来越突出的情况下, 提高黄瓜的耐热能力是黄瓜育种研究的重要内容之一。研究表明, 苗期高温对黄瓜产量的影响大于结果期, 在播种后的 10~50 d 内, 黄瓜遭遇高温的苗龄越小, 产量下降就越多^[1,3]。所以研究苗期的热激响应, 提高苗期耐热能力是黄瓜耐热育种的核心内容。

黄瓜苗期的热激响应研究主要集中在形态学和生理学方面^[4-5], 而在分子生物学方面的研究却很少。热胁迫下, 热激蛋白 (heat shock protein, HSP) 的合成是植物适应热胁迫的机制之一, 通过增强膜的耐热性保护细胞免受伤害^[6]。其中 *HSP₇₀* 是 HSP 家族中最保守、最重要的一类蛋白, 在胁迫条件下 *HSP₇₀* 能防止蛋白降解, 有利于变性蛋白的复性。*HSP₇₀* 基因的热响应调节已经在许多植物中被研究, 它

收稿日期: 2009-03-20

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30830079, 30671419); 国家 863 计划项目 (2008AA10Z150); 国家 973 计划项目 (2009CB119000); 国家科技支撑计划项目 (2008BADB105); 江苏省高新技术研究计划项目 (BG2007301); 江苏省农业三项工程项目 (sx (2008)zs20); 作物遗传与种质创新国家重点实验室开放课题 (ZW2007010)

作者简介: 李为观, 硕士研究生。* 通讯作者: 陈劲枫, 教授, 博导, 研究方向为蔬菜育种与生物技术, Tel: 025-84396279, E-mail: jfchen@njau.edu.cn。

的表达与耐热性密切相关^[7-8]。杨寅桂等^[9]对黄瓜叶绿体基质 *HSP*₇₀ (*CSHSP*₇₀) 基因的内含子结构进行过研究, 但对其在耐热性不同的黄瓜中的表达研究尚未见报道。

笔者在研究不同温度热胁迫下黄瓜幼苗电解质渗透率、丙二醛 (MDA) 和脯氨酸 (Pro) 积累、超氧化物歧化酶 (SOD) 活性等生化指标变化的基础上, 进一步对 *CSHSP*₇₀ 基因诱导表达和基因型差异进行研究, 旨在为深入了解黄瓜的耐热机制提供帮助。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为 2 份热敏材料 Boothbyls Blonde、二早子 (热害指数达 90) 和 2 份耐热材料 Poinsett97、PI508455 (热害指数小于 20)^[10]。Boothbyls Blonde 和 Poinsett97 由美国康内尔大学提供, PI508455 引种于美国种质资源中心, 二早子 (Erzaози) 为本实验室多代自交系材料。播种于 6 cm × 6 cm 的营养钵中, 置于 25 °C 人工气候箱 (RXZ 型) 中生长, 光照 14 h, 黑暗 10 h, 光照强度 100 μmol · m⁻² · s⁻¹, 相对湿度 75% ~ 80%。待幼苗长到 3 ~ 4 片真叶时, 用于所有的试验。

1.2 方法

将 Boothbyls Blonde、二早子、Poinsett97 和 PI508455 生长至 3 片真叶时放于光照培养箱中分别进行 38 °C 和 42 °C 热胁迫处理 2 h (其余生长条件同上), 每个处理 15 株, 25 °C 为对照。取同一部位功能叶用于电导率、丙二醛 (MDA) 和脯氨酸含量以及超氧化物歧化酶 (SOD) 活性的测定, 取心叶用于 RNA 提取。各指标测定参考李合生^[11]的方法进行: 相对膜透性用电导仪 (DDS-307 型) 测定, MDA 含量用硫代巴比妥酸 (TBA) 法测定, 脯氨酸含量采用磺基水杨酸提取法测定, SOD 活性测定用 NBT 还原法进行。以上指标均以鲜重计, 数据采用 SPSS 进行分析。

总 RNA 提取采用 CTAB 法^[12]进行。cDNA 的单链合成按 TaKaRa M-MLV 反转录酶说明书进行: Microtube 管中配制模板 RNA/引物混合液: 模板 RNA 1 ng ~ 1 μg, 1 μL Oligo (dT)₁₈ 和 Primer (50 μmol · L⁻¹), 加入 RNase free dH₂O, 使总体积到 6 μL。70 °C 保温 10 min 后迅速在冰上急冷 2 min 以上。离心数秒, 使模板 RNA/引物的变性溶液聚集于 Microtube 管底部。在上述 Microtube 管中配制转录反应液: 模板 RNA/引物的变性溶液 6 μL, 5 × M-MLV Buffer 2 μL, dNTP Mixture (各 10 mmol · L⁻¹) 0.5 μL, RNase Inhibitor (40 U · μL⁻¹) 0.25 μL, RNase M-MLV (200 U · μL⁻¹) 0.25 ~ 1 μL; 加入 RNase free dH₂O, 使总体积为 10 μL。42 °C 保温 1 h, 70 °C 保温 15 min 后冰上冷却, 得到的 cDNA 可用于 PCR 扩增。

1.3 *CSHSP*₇₀ 基因片段克隆引物设计、RT-PCR 反应体系和程序

根据 GenBank 中黄瓜 *CSHSP*₇₀ 基因的 cDNA 序列 (登录号: X73961, 2 511 bp), 用 Primer Premier 5.0 软件设计特异引物 P1 和 P2: 即 5'-AAGTGGGCGATGGAGTG-3' 和 5'-CTCGGACTTTGAGGTAGGAA-3', 以 cDNA 为模板进行 RT-PCR, 其中 RT-PCR 的产物长度为 643 bp。以黄瓜的肌动蛋白 (Actin, 序列号: AB010922) 基因为内标, 引物为 P3 和 P4: 即 5'-TGACGCAGATAATGTTTGA-3' 和 5'-AGAGATGGCTGGAATAGAACT-3'。反应体系为: 10 μmol · L⁻¹ 的引物 P1 和引物 P2 各 1 μL, 2.5 mmol · L⁻¹ dNTP 2 μL, 5 U · μL⁻¹ *Taq* 酶 0.2 μL, 10 × PCR Buffer 2 μL, 25 mmol · L⁻¹ MgCl₂ 1.2 μL, ddH₂O 11.6 μL, cDNA 1 μL。RT-PCR 反应程序: 94 °C 4 min; 94 °C 1 min, 54.6 °C 1 min, 72 °C 100 s, 循环 35 次; 72 °C 10 min。电泳及检测方法: 用 1% 琼脂糖凝胶电泳, 电压 100 V, 30 ~ 40 min 后, 放于凝胶成像系统中拍照, 检测 PCR 扩增产物。

1.4 测序及同源性比对

将克隆产物委托上海英骏生物技术有限公司进行双向测序, 测序结果用 DNAMAN 软件进行同源性比对。

2 结果与分析

2.1 电解质渗透率和丙二醛含量比较

由表 1 可见, 随着热胁迫温度的增加, 4 份材料的电解质渗透率增大且差异明显。在 25 °C 条件下, 耐热材料 Poinsett97 的电解质渗透率最低为 3.4%, 热敏材料 Boothbyls Blonde 的最高为 6.0%, 两者间

差异显著; 在 38 °C 热胁迫下, 热敏材料 Boothblys Blonde 比耐热材料 PI508455 的电解质渗透率高出了 3.0%; 在 42 °C 下, 耐热材料与热敏材料间电解质渗透率差异显著, 但 PI508455 和 Poinsett97 之间、Boothblys Blonde 和二早子之间无显著差异。

随着热胁迫温度升高, 丙二醛含量增加, 并且在 25 °C 和 38 °C 时, 耐热材料和热敏材料两者间都存在显著差异, 但耐热材料间、热敏材料间并无显著差异; 在 42 °C 下, 耐热材料 PI508455 与热敏材料间存在显著差异, Poinsett97 与热敏材料并无显著差异 (表 1)。

表 1 热胁迫下黄瓜幼苗叶片相对膜透性和丙二醛 (MDA) 含量的变化

Table 1 Changes on content of relative membrane permeability and MDA of leaves at cucumber seedling under heat stress

材料 Material	电解质渗透率/% Electrolyte leakage rate			MDA 含量/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$) MDA content		
	25 °C (CK)	38 °C	42 °C	25 °C (CK)	38 °C	42 °C
PI508455	4.7 ^b	7.9 ^c	11.2 ^b	3.66 ^b	3.83 ^b	4.14 ^b
Poinsett97	3.4 ^c	8.6 ^c	11.8 ^b	3.68 ^b	3.89 ^b	4.21 ^{ab}
Boothblys Blonde	6.0 ^a	10.9 ^a	14.8 ^a	3.84 ^a	4.12 ^a	4.36 ^a
二早子 Erzaazi	5.2 ^b	9.9 ^b	14.2 ^a	3.86 ^a	4.03 ^a	4.32 ^a

注: 相同字母表示在 0.05 水平上差异不显著。The same letter means no significance at 0.05 level. The same as follows.

2.2 脯氨酸含量和 SOD 活性比较

由表 2 可以看出, 在 25 °C 下, 热敏材料 Boothblys Blonde 脯氨酸含量最低, 耐热材料 Poinsett97 含量最高; 在 38 °C 时, 脯氨酸含量均增加, 其中 Boothblys Blonde 增幅最大, 为 $52.63 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, 而二早子的增幅只有 $13.65 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, 含量最低; 42 °C 下, 二早子的增幅虽最大, 可是其含量仍最低只有 $343.09 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, Poinsett97 含量最高, 达 $408.15 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

随着温度的升高, SOD 活性增强, 品种间存在差异 (表 2)。在 25 °C 下, 4 份材料间存在显著差异, 耐热材料 Poinsett97 的 SOD 活性比热敏材料 Boothblys Blonde 的高出 $48.55 \text{U} \cdot \text{g}^{-1}$; 38 °C 时, 耐热材料 Poinsett97 和热敏材料间存在显著差异, 2 份耐热材料间也存在显著差异, 但 2 份热敏材料间却没有显著差异; 在 42 °C 下, Poinsett97 与其他 3 份材料间存在显著差异, 热敏材料二早子增幅较大, 达到 $225.05 \text{U} \cdot \text{g}^{-1}$, 与耐热材料 PI508455 间无显著差异, 与热敏材料 Boothblys Blonde 间差异显著。

表 2 热胁迫下黄瓜幼苗叶片脯氨酸含量和超氧化物歧化酶 (SOD) 活性的变化

Table 2 Changes on activity of SOD and content of proline of leaves at cucumber seedling under heat stress

材料 Material	脯氨酸含量/ ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) Proline content			SOD 活性/ ($\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$) SOD activity		
	25 °C (CK)	38 °C	42 °C	25 °C (CK)	38 °C	42 °C
PI508455	308.74 ^a	332.86 ^b	365.76 ^{ab}	180.35 ^b	205.40 ^b	224.66 ^b
Poinsett97	321.90 ^a	367.22 ^a	408.15 ^a	198.84 ^a	221.20 ^a	236.22 ^a
Boothblys Blonde	267.07 ^a	319.70 ^{bc}	356.74 ^{ab}	150.29 ^c	185.36 ^c	213.10 ^c
二早子 Erzaazi	284.61 ^a	298.26 ^c	343.09 ^b	161.46 ^c	189.36 ^c	225.05 ^b

2.3 *CSHSP₇₀* 基因的表达

利用娄群峰等^[12]改良的 CTAB 法所提取的 RNA 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 28S、18S、5S 三条带清晰, 28S 带明显亮于 18S 带, 表明提取的 RNA 完整性好 (图 1), 可以用于后续试验。以 4 份材料的 cDNA 为模板的 PCR 产物与预期大小一致 (图 2), 经测序证实所克隆片段为 *CSHSP₇₀* 基因中的部分序列。

由图 2 可以看出, 黄瓜 *CSHSP₇₀* 基因在高温下被诱导增强表达, 但耐热性不同的材料间存在较大的差异。

CSHSP₇₀ 在 25 °C 时, 在耐热材料和热敏材料中都不进行表达; 随着温度升高至 38 °C, 在热敏材料 Boothblys Blonde 和二早子以及耐热材料 Poinsett97 中都进行表达, 只是耐热材料 Poinsett97 中表达较弱, 而耐热材料 PI508455 中并未进行诱导表达; 在 42 °C 热胁迫下, 耐热材料和热敏材料均被诱导增强表达。

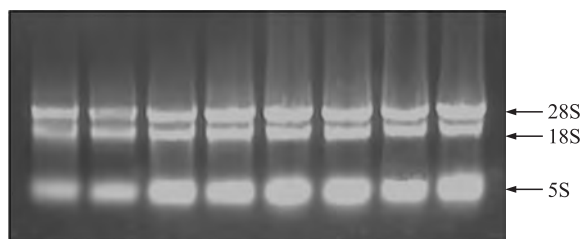


图 1 RNA 琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of RNA

3 讨论

研究表明,大多数植物的 *HSP*₇₀ 基因在 37 ~ 45 °C 下热处理 30 ~ 120 min 后增强表达^[13]。本试验中,在 25 °C 对照下,未能检测出 *CSHSP*₇₀ 基因的表达;在 38 和 42 °C 胁迫处理 2 h,在热敏和耐热材料中均检测到 *CSHSP*₇₀ 基因的表达,这与前人研究结果一致^[13]。

生物膜(特别是质膜)在植物抗性方面起着非常重要的作用,膜伤害与植物胁迫伤害及其抗性有密切的关系。热激蛋白具有分子伴侣的作用,确保热胁迫下细胞蛋白自身构造和功能的完整,阻止其他蛋白变性,保护膜的完整性。本试验中,在 25 °C 时,黄瓜幼苗的相对电导率和丙二醛含量较低,细胞膜系统没有受到伤害,因而没有检测到 *CSHSP*₇₀ 基因的表达;随着温度的升高,细胞膜系统开始受到伤害, *CSHSP*₇₀ 基因被诱导表达;在 42 °C 时,细胞膜系统伤害加剧, *CSHSP*₇₀ 基因被诱导增强表达。这表明随着膜伤害的加剧, *CSHSP*₇₀ 表达增强。

一些研究证明 *HSP*₇₀ 基因的增强表达确实提高了植物的热耐受性^[14];但也有研究表明 *HSP*₇₀ 基因的增强表达没有显著提高植物的热耐受性^[15]。本研究中,38 °C 时 *CSHSP*₇₀ 基因在热敏材料 Boothbyls Blonde 和二早子中表达较强,耐热材料 Poinsett97 中表达较弱,而在耐热材料 PI508455 中并不表达,但是 PI508455 的相对电导率和丙二醛含量却最低。这表明 *CSHSP*₇₀ 基因的增强表达并没有使耐热性显著提高,研究结果与 Vitale 等^[15]的一致。这可能是由于黄瓜耐热性的提高需要黄瓜体内其他 HSP 和与其相关的生理变化如渗透保护物质含量升高、抗氧化物酶类活性增强等因素协同作用才能完成和实现。

参考文献:

- [1] 缪旻珉,李权,曹碚生,等. 高温对黄瓜生殖生长及产量形成的影响 [J]. 园艺学报, 2000, 27 (6): 412 - 417
- [2] 史跃林,宋述尧. 温度对黄瓜生理生育的影响及管理实践 [J]. 中国蔬菜, 1989 (3): 43 - 47
- [3] 缪旻珉,李式军. 黄瓜雄花与雌花发育过程中高温敏感期的初步研究 [J]. 南京农业大学学报, 2001, 24 (1): 120 - 122
- [4] 何晓明,林毓娥,陈清华,等. 高温对黄瓜幼苗生长、脯氨酸含量及 SOD 酶活性的影响 [J]. 上海交通大学学报: 农业科学版, 2002, 20 (1): 30 - 33
- [5] 孟焕文,张彦峰,程智慧,等. 黄瓜幼苗对热胁迫的生理反应及耐热鉴定指标筛选 [J]. 西北农业学报, 2000, 9 (1): 96 - 99
- [6] Larkindale J, Mishkind M, Vierling E. Plant responses to high temperature [M] // Jenks M A, Hasegawa P M. Plant Abiotic Stress. Ames, Iowa, USA: Blackwell Publishing, 2005: 100 - 144
- [7] Wang W, Vinocur B, Shoseyov O, et al. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in abiotic stress response [J]. Trends Plant Sci, 2004, 9 (5): 244 - 252
- [8] Lee J H, Schöfl F. An Hsp₇₀ antisense gene affects the expression of HSP70/HSC70, the regulation of HSF, and the acquisition of thermotolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana* [J]. Mol Gen Genet, 1996, 252: 11 - 19
- [9] 杨寅桂,娄群峰,陈劲枫,等. 黄瓜 *CSHSP*₇₀ 基因内含子结构分析 [J]. 中国农业科学, 2007, 40 (12): 2915 - 2919
- [10] 杨寅桂,李为观,娄群峰,等. 黄瓜耐热材料筛选 [J]. 中国瓜菜, 2008 (1): 1 - 3
- [11] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2004
- [12] 娄群峰,江彪,李为观,等. 一种适于黄瓜不同组织总 RNA 提取的方法 [J]. 江苏农业科学, 2007 (6): 108 - 110
- [13] Sung D Y, Vierling E, Guy C L. Comprehensive expression profile analysis of the *Arabidopsis HSP*₇₀ gene family [J]. Plant Physiol, 2001, 126: 789 - 800
- [14] Sung D Y, Guy C L. Physiological and molecular assessment of altered expression of *Hsc70-1* in *Arabidopsis*. Evidence for pleiotropic consequences [J]. Plant Physiol, 2003, 132: 979 - 987
- [15] Vitale A, Bielli A, Ceriotti A. The binding protein associates with monomeric phaseolin [J]. Plant Physiol, 1995, 107: 1411 - 1418

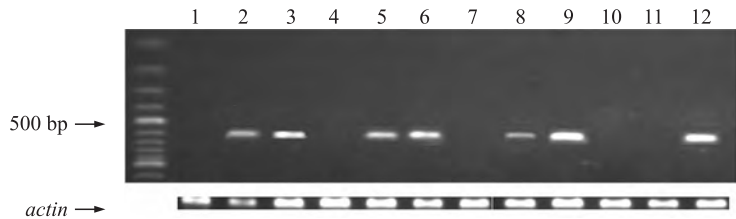


图2 热胁迫下黄瓜 *CSHSP*₇₀ 基因在幼苗中的表达

Fig. 2 Expression of *CSHSP*₇₀ in cucumber seedlings under heat stress

1 ~ 3. Boothbyls Blonde 在 25、38 和 42 °C 下的扩增产物 PCR products from Boothbyls Blonde under 25, 38 and 42 °C; 4 ~ 6. 二早子在 25、38 和 42 °C 下的扩增产物 PCR products from Erzaozhi under 25, 38 and 42 °C; 7 ~ 9. Poinsett97 在 25、38 和 42 °C 下的扩增产物 PCR products from Poinsett97 under 25, 38 and 42 °C; 10 ~ 12. PI508455 在 25、38 和 42 °C 下的扩增产物 PCR products from PI508455 under 25, 38 and 42 °C