

# 黄瓜根结 RDR 酶基因的分离与表达分析

张婧妹, 茆振川, 刘 峰, 陈国华, 杨宇红, 冯东昕, 谢丙炎\*

(中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 农业部蔬菜种质遗传改良重点实验室, 北京 100081)

**摘 要:** 基于黄瓜 (*Cucumis sativus* L.) 自交系 9930 全基因组序列, 采用 RT-PCR 的方法, 分离出根结形成过程中表达的 RDR 基因, 共获得了 5 个 *CsRDR* 基因: *CsRDR1a*、*CsRDR1b*、*CsRDR1c*、*CsRDR2* 和 *CsRDR6* (HQ738485 ~ HQ738489)。qPCR 定量分析表明, 5 个基因在接种根结线虫后的不同时期表达量都有不同程度的增加。*CsRDR1a*、*CsRDR1b*、*CsRDR2* 和 *CsRDR6* 在接种线虫早期 (6 h) 相对表达量明显增加; 而 *CsRDR1c* 在接种 36 h 时相对表达量达到最高, 从而表明 *CsRDR* 基因与黄瓜根结的发育相关。

**关键词:** 黄瓜; 根结; RDR; 分离; 表达

中图分类号: S 642.2

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2011) 10-1911-10

## Isolation and Expression Analysis of CsRDRs in Root-knot of *Cucumis sativus*

ZHANG Jing-mei, MAO Zhen-chuan, LIU Feng, CHEN Guo-hua, YANG Yu-hong, FENG Dong-xin, and XIE Bing-yan\*

(Institute of Vegetables and Flowers, Key Laboratory of the Ministry of Agriculture on Genetic Improvement for Vegetable Germplasm, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

**Abstract:** To indentify the RDR genes and their expression characteristics involved in the root-knot development of cucumber (*Cucumis sativus* L.), RT-PCR and qPCR approaches were used in this study. Five *CsRDR* genes were isolated from root-knot of cucumber via RT-PCR, including *CsRDR1a*, *CsRDR1b*, *CsRDR1c*, *CsRDR2* and *CsRDR6* (GenBank No. HQ738485 - HQ738489). qPCR analysis showed that the expression of five *CsRDR* genes were increased at different levels in different stages upon *Meloidogyne incognita* infection. *CsRDR1a*, *CsRDR1b*, *CsRDR2* and *CsRDR6* displayed a significant increase in expression at the early stage (6 hours after *M. incognita* infection), while the expression of *CsRDR1c* was enhanced at 36 hours after the inoculation. The results revealed that *CsRDR* genes were related to the root-knot development of *Cucumis sativus*, which laid a foundation for the prevention of root-knot nematode through molecular breeding technology.

**Key words:** *Cucumis sativus*; root-knot; RDR; isolation; expression

在黄瓜 (*Cucumis sativus* L.) 全基因组水平上已发现 61 个具有抗性的核苷酸绑定位点 (nucleotide-binding site containing resistance), 以及较为庞大的脂肪氧合酶基因 (*LOX*) 家族 (Huang

收稿日期: 2011-06-27; 修回日期: 2011-09-20

基金项目: 国家重点基础发展计划项目 (2009CB119000); 公益性行业 (农业) 科研专项 (201103018); 国家自然科学基金重点项目 (31030057); 国家自然科学基金项目 (30971905); 国家大宗蔬菜产业技术体系项目

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: xiebingyan2003@yahoo.com.cn)

et al., 2009), 脂肪氧合酶代谢途径的产物参与植物防卫反应以及对昆虫的抗性 (Schwab et al., 2008)。但目前还没有发现黄瓜抗南方根结线虫相关的基因, 生产上也还没有抗根结线虫的黄瓜品种。

已有研究证明 RDR 酶 (RNA-dependent RNA polymerase, RDRP) 参与病毒防卫反应及植物的生长发育。RDR 酶在真核生物中广泛存在, 首次发现是在 RNA 病毒中 (Astier & Cornuet, 1971); 在真核生物中, 从番茄中分离出第一个 *RDR* 基因 (Schiebel et al., 1993)。植物中有 4 类 RDR 酶 (RDR1, RDR2, RDR3, RDR6), 多种 RDR 酶参与植物体中不同的调节途径 (van der Krol et al., 1990)。

研究 *RDR* 基因是否参与根结发育及其表达特点, 对于黄瓜在没有可利用抗源的情况下, 通过分子技术降低黄瓜对根结线虫的感病性, 从而控制根结线虫危害, 具有重要意义。本研究中以全基因组测序的黄瓜 9930 为材料, 接种南方根结线虫 (*Meloidogyne incognita*), 采用 RT-PCR 的方法从根结中分离 *CsRDR* 基因, 并用 qPCR 的方法分析根结发育过程中 *RDR* 的表达特性, 为研究 *RDR* 在黄瓜根结发育过程中的调控作用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

黄瓜自交系 9930 由中国农业科学院蔬菜花卉研究所黄瓜课题组提供, 用于 *CsRDR* 基因的分离及表达分析。

南方根结线虫 (*Meloidogyne incognita*) 采自北京海淀区四季青农场, 并在温室中进行单卵块繁殖。

‘茄门’甜椒 (*Capsicum annuum* L.) 由中国农业科学院蔬菜花卉研究所辣椒课题组提供, 为感根结线虫病品种, 用于根结线虫的繁殖。

### 1.2 接种与取样

黄瓜种子经表面消毒, 在 28 °C 培养箱中催芽, 露白后播种于育苗钵内, 培养基质为沙子草炭混合土 (2:1)。在日光温室内 25 ~ 28 °C 培养, 两叶一心期进行接种线虫处理。从茄门甜椒根部挑取成熟的根结线虫卵块于无菌水中孵化, 收集 2 龄幼虫, 并在 24 h 内进行接种 (茆振川 等, 2007)。

在距离苗根 1 cm 左右的基质处打 1 cm 深的小孔, 接种 2 龄线虫于孔内, 每株接种量为 400 条, 同时以无菌水作模拟接种对照。分别在接种 0、3、6、12、24、36 h, 3 d 及 7 d 时取处理的根结部位及相应位置的对照根部为样品, 迅速浸入液氮中冷冻, -80 °C 冰箱中保存, 用于总 RNA 的提取 (李淑敏 等, 2008); 同时留取一部分根部样品, 采用溴酚蓝染色法在显微镜下检测线虫和根部样品的形态学变化 (方中达, 1998)。

### 1.3 基因预测及分离

总 RNA 的提取采用 Trizol 法, 具体步骤参照 Invitrogen Trizol Reagent 试剂盒说明书。cDNA 第一链的合成采用 Invitrogen SuperScript<sup>TM</sup> III RT 试剂盒。

根据黄瓜自交系 9930 的基因预测结果 (Huang et al., 2009), 采用 Blast 方法在全基因组水平预测黄瓜 *RDR* 基因, 在 DNA 水平预测出 6 个 *RDR* 基因 (*CsRDR1a*、*CsRDR1b*、*CsRDR1-3*、*CsRDR1c*、*CsRDR2*、*CsRDR6*)。根据基因序列的编码区设计引物 (表 1), 分别以接种线虫后 8 个时间点根部样品 cDNA 的混合及对照样品 cDNA 为模板, 用 Trans Taq HiFi DNA 聚合酶 (TransGen Biotech) 进行 PCR 扩增, 分离与根结发育相关的 *RDR* 基因 cDNA 序列。

PCR 扩增产物采用琼脂糖凝胶回收试剂盒进行回收 (TIANGEN BIOTECH), 回收产物插入

pMD18-载体 (TaKaRa), 热激法转化到 *E. coli* 感受态 DH5 $\alpha$  细胞 (TIANGEN BIOTECH), 在氨苄平板上进行阳性克隆筛选, 挑取白色克隆进行菌液 PCR 鉴定, 阳性克隆送北京诺赛公司测序, 重复测定 10 个阳性克隆。用 DNAMAN 6.0 软件将分离出的 *RDR* 基因的编码序列与预测的基因序列进行比对, 对预测结果进行分析。

表 1 PCR 引物代码与序列

Table 1 Primers and their sequences for *RDR* cDNA PCR

基因名称 Gene name	上游引物 Forward primer	序列 (5'→3') Sequence	下游引物 Reward primer	序列 (5'→3') Sequence
<i>RDR1a</i>	R1-1Up	ATG GGG AAA ACA ATT CAC ATT	R1-1Lp	TCA ACT CCC ACC AAG ATT TAA
<i>RDR1b</i>	R1-2Up	ATG GGT AAA ACA ATT CAG CTT	R1-2Lp	TCA ATA GCG AGC TCT ACA ATT
<i>RDR1-3</i>	R1-3Up	ATG GGA AAG ACG ATC GAA AT	R1-3Lp	TCA GGT TCT TCC TCT AAA AAG
<i>RDR1c</i>	R1-5Up	ATG GGT TGC CTG GAT GAA AC	R1-5Lp	TCA CCC CAT CAA AAT TGT GTG
<i>RDR2</i>	R2Up	ATG GCT CAG CCG GAG AGA	R2Lp	TCA CCC CAT CAA AAT TGT GTG
<i>RDR6</i>	R6Up	ATG GGG TCA GAA GAA GGT G	R6Lp	TCA CAT TCG ATC AGA GAG ATA

#### 1.4 基因结构与进化、定位分析

分析黄瓜 *CsRDR* 基因结构及编码蛋白的特点, 并从 NCBI 数据库下载来自拟南芥、水稻等物种的 *RDR* 酶与几种黄瓜 *RDR* 酶氨基酸比对, 用 MEGA4.1 软件在氨基酸序列水平构建系统进化树, 分析其进化关系。

将黄瓜的 5 个 *RDR* 酶氨基酸序列 (*CsRDR1a*、*CsRDR1b*、*CsRDR1c*、*CsRDR2*、*CsRDR6*), 与由 NCBI 数据库获取的拟南芥 6 种 *RDR* 酶氨基酸序列 (*AtRDR1*、*AtRDR2*、*AtRDR6*、*AtRDR3a*、*AtRDR3b*、*AtRDR3c*), 水稻 5 种 *RDR* 酶氨基酸序列 (*OsRDR1*、*OsRDR2*、*OsRDR6*、*OsRDR3a*、*OsRDR3b*), 用 DNAMAN 6.0 软件进行多序列比对。

#### 1.5 黄瓜 *RDR* 基因的表达特性分析

分别以每个时间点接种处理黄瓜根部样品和相应对照样品 cDNA 为模板, 用 qPCR (real time quantity PCR) 方法分析根结发育过程中黄瓜 *RDR* 基因的表达特性。采用 Primer 5.0 软件进行引物设计 (表 2), 黄瓜  $\beta$ -*actin* 基因为内参基因。反应体系 20  $\mu$ L: SYBR Premix Ex *Taq*<sup>TM</sup> II 10  $\mu$ L, 正反向引物 (10  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>) 各 0.8  $\mu$ L, 模板 1.6  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 6.8  $\mu$ L。在荧光定量 PCR 仪 (Bio-Rad CFX96) 上进行反应, PCR 反应程序为: 95  $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 95  $^{\circ}$ C 5 s, 58  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环。每个样品重复 4 次, 数据处理采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ CT</sup> 法 (Livak & Schmittgen, 2001), 共做 3 次生物学重复。

表 2 qPCR 引物代码与序列表

Table 2 Primers and their sequences for qPCR

基因名称 Gene name	上游引物 Forward primer	序列 (5'→3') Sequence	下游引物 Reward primer	序列 (5'→3') Sequence
$\beta$ - <i>actin</i>	ActinF	ATTGTTCTCAGTGGTGGTTCTAC	ActinR	CCTTTGAGATCCACATCTGCT
<i>CsRDR1a</i>	QR1aF	CCAGATCCTAGGACATACATGT	QR1aR	CAGCTTTCAAATGAAAGTTCATT
<i>CsRDR1b</i>	QR1bF	CACCTCCTCGAACCATCAACTTGC	QR1bR	GATCTATGACGGCAGTAT
<i>CsRDR1c</i>	QR1cF	CACCCAAACGAGTGTCTGGAAG	QR1cR	ACACCAGTCTTCGGAAGTCAAC
<i>CsRDR2</i>	QR2F	CTGAGATTGGGCTTGTGG	QR2R	CTGAGATTGGGCTTGTGG
<i>CsRDR6</i>	QR6F	TCATGGACTCTCCAGAATCGTAC	QR6R	TTATATGAAAAGGACTCTCAGGCC

2 结果与分析

2.1 黄瓜 *RDR* 基因的克隆与序列分析

以接种处理及对照的黄瓜根部样品 cDNA 为模板，进行 PCR 扩增，分别得到 *RDR1a*、*RDR1b*、*RDR1c*、*RDR2*、*RDR6* 基因序列（图 1）。说明在正常发育及根结发育过程中均存在 *RDR* 基因的表达。测序结果与预测的基因的编码序列比对表明扩增到的 *RDR1a*、*RDR1b*、*RDR2*、*RDR6* 基因的编码序列与预测结果一致；*RDR1c* 编码序列有 9 个碱基差异，在氨基酸水平上有 4 个氨基酸差异；*RDR1-3* 在 cDNA 水平没有扩增到。

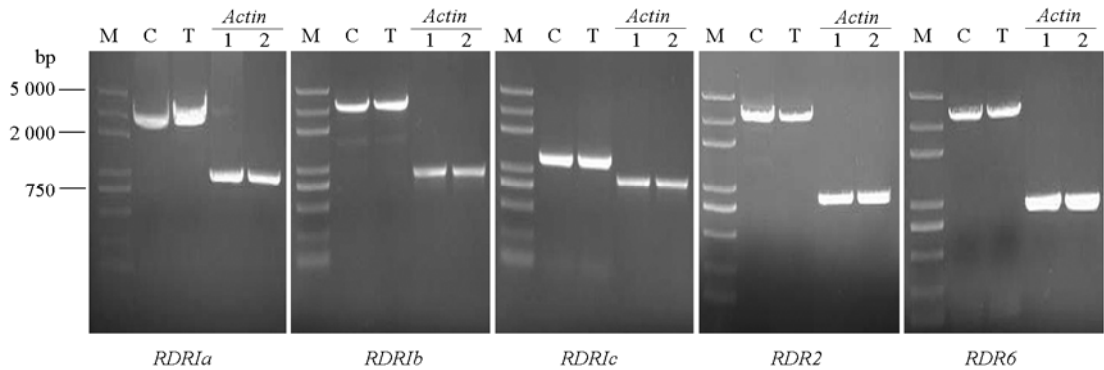


图 1 *RDR* 基因的 PCR 扩增产物

M: Trans 2K plus DNA marker; C: 以对照样品的 cDNA 为模板; T: 以线虫处理的样品的 cDNA 为模板;  
1、2: 分别以对照和处理样品的 cDNA 为模板，扩增的 *Actin* 基因片段。

Fig. 1 PCR product of *RDR* genes

M: Trans 2K plus DNA marker; C: Control; T: Treat; 1, 2: PCR product for *Actin* gene.

在 DNA 水平上，通过扩增证实，分离得到的几种黄瓜 *RDR* 基因均含有内含子，其中 *CsRDR1a*、*CsRDR1b* 和 *CsRDR2* 含 3 个内含子，*CsRDR1c* 含 2 个内含子，*CsRDR6* 只含有 1 个内含子（表 3）。对编码序列分析可知，其开放阅读框长度最短的为 *CsRDR1c*，长 1 203 bp，编码 400 个氨基酸；最长的为 *CsRDR1a*，长 3 393 bp，编码 1 130 个氨基酸；*CsRDR1b* 开放阅读框长为 3 348 bp，编码 1 115 个氨基酸；*CsRDR2* 开放阅读框长为 3 354 bp，编码 1117 个氨基酸；*CsRDR6* 开放阅读框长为 3 594 bp，编码 1 197 个氨基酸（表 3）。

表 3 与根结发育相关的黄瓜 *RDR* 基因的特点

Table 3 Structural characteristics of *CsRDR* genes related to the development of root-knot

基因名称 Gene name	NCBI 登录号 GenBank No.	基因组中定位 Coordinates (5'→3')	开放阅读框长度/bp ORF length	编码蛋白质 Protein			内含子数 Number of introns
				长度/aa Length	分子量/D Molecular weight	等电点 pI	
<i>CsRDR1a</i>	HQ738485	199 370 ~ 203 440	3 393	1 130	129 373.9	7.95	3
<i>CsRDR1b</i>	HQ738486	192 093 ~ 196 878	3 348	1 115	127 516.4	8.09	3
<i>CsRDR1c</i>	HQ738487	33 ~ 1 541	1 203	400	45 621.2	6.72	2
<i>CsRDR2</i>	HQ738488	1051 346 ~ 1055 673	3 354	1 117	128 489.5	6.64	3
<i>CsRDR6</i>	HQ738489	1792 878 ~ 1796 690	3 594	1 197	136 531.0	7.81	1

## 2.2 RDR 酶氨基酸序列同源性比较与系统进化树分析

真核生物的 RDR 酶氨基酸序列有 5 个保守性较高的区域, 其中一个为特征性基序 DbDGD, 在所有 RDR 酶和 DDRP (DNA-dependent DNA polymerases) 的氨基酸序列中都存在。其在 RDR1, RDR2, RDR6 中为 DLDGD, 而在 RDR3 中为 DFDGD。

将黄瓜 CsRDR 酶与拟南芥相应的蛋白序列比对, CsRDR1a, CsRDR1b, CsRDR1c 与 AtRDR1 的相似性分别为 55.99%、67.36%和 56.38%; CsRDR2 与 AtRDR2 的相似性为 54.96%; CsRDR6 与 AtRDR6 的相似性为 52.55%。

比对结果 (图 2) 表明, 不同的 RDR 酶之间以及单子叶与双子叶植物之间, 保守区的氨基酸序列不完全相同, 尤其是 RDR1、RDR2、RDR6 与 RDR3 之间有所不同。CsRDR1a, CsRDR1b, CsRDR2, CsRDR6 均含有真核生物 RDR 酶氨基酸序列的 5 个保守性较高的区域。而 CsRDR1c 氨基酸序列含有第 IV 个和第 V 个保守区。V 是 RDR 酶的特征基序。为进一步研究黄瓜根结发育过程中 RDR 酶的表达特性打下基础。

AtRDR1	SLGTRYVPSDGIGKISAEFARK-----PSAFQIRYGG--YKGVV-----KKLSLRKSMKFESENTKLD	502
CsRDR1a	GE-IKYVPSDGIGKISSKFAKE-----PSAFQIRYGG--YKGVV-----IKLSLRKSMCKFESDNTKLD	502
CsRDR1b	GSGVNYVPSDGIGKIAASFARK-----PSAFQIRYAG--FKGVI-----VKLSLRNSMLKYESTDTKLD	503
CsRDR1c	-----	0
OsRDR1	--GTQHVPFDGIGKISSAFANE-----PSAFQIRYGG--YKGVV-----WKLSLRKSMKLFQSDNITVD	233
AtRDR2	TDGADYCFSDGIGKISLAFKQ-----PSAFQIRYGG--YKGVV-----RKLSLRDSMLKFDNNRMLN	619
CsRDR2	TDGIDYCFSDGIGKISLSFARQ-----PSAFQIRYGG--YKGVV-----RKLSLRDSMLKFESENKMLN	611
OsRDR2	TDGSKYIFSDGIGKISLRFKAKR-----PSAFQIRYGG--YKGVV-----IDLRLRPSMKKFESNRLN	616
AtRDR6	---NGYVPSDGIGITITPDLAGE-----PCAYQIRYAG--FKGVV-----IRLALRDSMKKIFSKHTILE	654
CsRDR6	---NGYVPSDGIGITITPDLAQE-----PCAYQIRYAG--YKGVV-----IRLALRPSMNKFESNHRILE	677
OsRDR6	---NEYIFSDGIGITITPDLALE-----PSAYQIRFAG--FKGVI-----TRLFLRPSMRKFESNHLVLE	631
AtRDR3a	KNGKPCIHSDGTGYISEDLMARM-----LIQIRIFNYGAVKGTG-----RTVQVRPSMIKVYEDRTLNS	496
AtRDR3b	KNGKPRIHSDGTGYISEDLMARM-----LIQIRMFNDGSAVKGIF-----QTVQVRPSMIKVYKDKNLSN	487
AtRDR3c	KNKKPCIHSDGTGYISEDLMARM-----LIQIRMFYDGYAVKGTG-----RTVQVRPSMIKVSKDPSLSN	483
OsRDR3a	KDQEPLIHTDGTGLVSVDLALN-----LMQFRLFYNGSAVKGTG-----ATILIRPSMVKIETHPELSG	618
OsRDR3b	RDGERLIHTDGTGLISEDLAQK-----LIQLRLFYNGSAVKGTG-----RTIHIRPSMLKIKTYPELSG	687
	I II III	
AtRDR1	GPVVVAKNPCLHPGDVRVLQAVNVP-----FPQKGLRPHPNNECSGSDLDGDIYFVCWDQELVPP	715
CsRDR1a	GNVTVAKNPCLHPGDVRVLKAVNIP-----FPQKGRPHPNNECSGSDLDGDIYFVCWDTELIPS	728
CsRDR1b	GTVVVAKNPCLHPGDVRVLTAVDVP-----FPQKGRPHPNNECSGSDLDGDIYFVCWDPDLIPP	728
CsRDR1c	GKIVVAKNPCLHPGDVRVLDAVDVK-----FPQKGRPHPNNECSGSDLDGDIYFVCWDTLTCI	102
OsRDR1	GKVVIAKNPCLHPGDIRVLHVAVDVP-----FPQQGRPHPNNECSGSDLDGDIYFVSWDPSLIIPP	446
AtRDR2	GKVVVTKNPCLHPGDIRVLDAIYEV-----FPQKGERPHPNNECSGSDLDGDIYFVSWDEKIIPS	849
CsRDR2	GKVVVTKNPCLHPGDIRVLEAIFHV-----FPQKGRPHPNNECSGSDLDGDIYFVSWDENLIIPP	839
OsRDR2	GKVAITKNPCLHPGDIRVLEAIYDP-----FPQGRGERPHPNNECSGSDLDGDIYFITWDDKLIPE	842
AtRDR6	GYVAIAKNPCLHPGDVRILEAVDVP-----FPQKGRPHPNNECSGSDLDGDIYFVAVWDQKLIPP	880
CsRDR6	GTVVIAKNPCLHPGDVRILEAVDAP-----FPRNGRPHPNNECSGSDLDGDIYFTTWGDLNLIIPP	903
OsRDR6	GTVVIAKNPCLHPGDVRILEAVDVP-----FPQKGRPHANEASGSDLDGDIYFVTWDEKLIIPP	857
AtRDR3a	GDVLVYRNPLHFGDIHVLKATYVK-----FPQKGRPSLGDEIAGGDFDGDYFISRNPKLLEH	710
AtRDR3b	QDVLVYRNPLHFGDIHVLKATYVK-----FPQKGRPSLGDEIAGGDFDGDYFISRNPKLLEH	699
AtRDR3c	GEVLVYRNPLHFGDIHVLKATYVK-----FPQKGRPSLGDEIAGGDFDGDYFISRNPELLEN	699
OsRDR3a	GDVLVYKHPGLHFGDIHVLKATYIR-----FPISGRPSLADEMANSDFDGDIYVWVSKNPKLLEH	856
OsRDR3b	GDVLVYKYPGLHFGDIHVLKATYSS-----FPTTGQRSLADEMANSDFDGDIYVWVSLNPKLLEH	935
	IV V	

图 2 RDR 氨基酸序列比对及 RDR 的 5 个保守区

I~V 标出真核生物 RDR 酶 5 个保守性较高的区域, 其中 V 是 RDR 酶特征基序。

Fig. 2 Alignment of the deduced CsRDRs protein sequence with other known plant RDRs

I - V indicate the five conserved regions and they are marked in the boxes. V is the signature motif of all eukaryotic RDRs.

At: *Arabidopsis thaliana*; AtRDR1: NM\_101348; AtRDR2: NM\_117183; AtRDR3a: NM\_127549; AtRDR3b: NM\_127550; AtRDR3c: NM\_127551; AtRDR6: NM\_11481. Os: *Oryza sativa*; OsRDR1: NM\_001054586; OsRDR2: AP008210; OsRDR3a: NP\_913147; OsRDR3b: NP\_919148; OsRDR6: BAC00725. Cs: *Cucumis sativus*; CsRDR1a: HQ738485; CsRDR1b: HQ738486; CsRDR1c: HQ738487; CsRDR2: HQ738488; CsRDR6: HQ738489.

植物中有 4 类 RDR 酶: RDR1、RDR2、RDR3、RDR6。系统进化分析表明, *CsRDR1a*、*CsRDR1b*、*CsRDR1c* 基因编码第 1 类 RDR1 酶; *CsRDR2* 基因编码第 2 类 RDR2 酶; *CsRDR6* 基因编码第 4 类 RDR6 酶 (图 3), 且均与双子叶植物相应的 RDR 酶相似度更高。

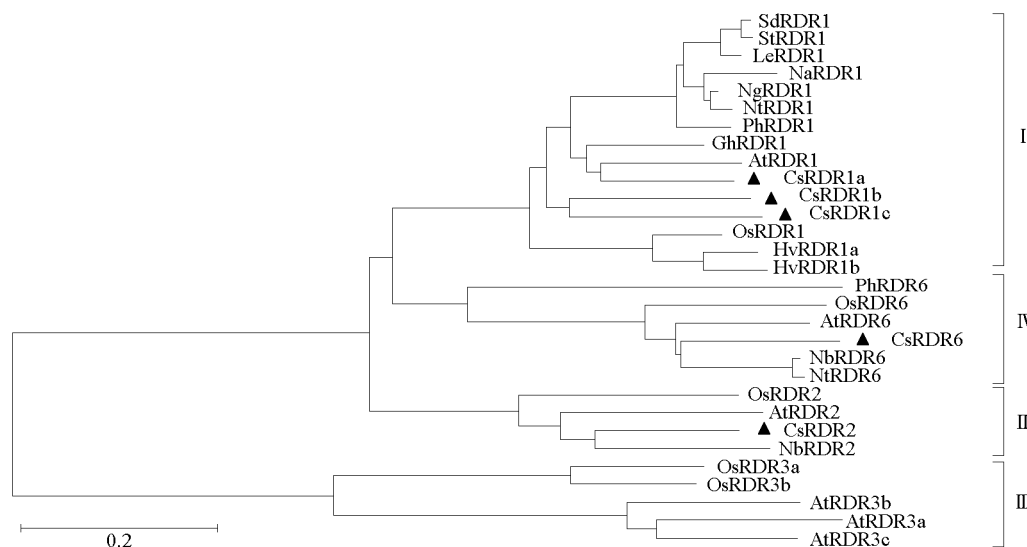


图 3 不同植物 RDR 基因编码蛋白的系统进化分析

I~IV 分别标出 4 类 RDR 酶, ▲ 标出分离出的黄瓜的 RDR。

Fig. 3 Phylogenetic analysis of RDRs from different plants

I - IV indicate the 4 kinds of RDRs of plants. ▲ indicate the CsRDRs.

At: *Arabidopsis thaliana*; Le: *Lycopersicon esculentum*; Nb: *Nicotiana benthamiana*; Na: *Nicotiana attenuate*; Nt: *Nicotiana tabacum*; Ng: *Nicotiana glauca*; St: *Solanum tuberosum*; Sd: *Solanum demissum*; Hv: *Hordeum vulgare*; Ph: *Petunia hybrida*; Os: *Oryza sativa*; Gh: *Gossypium hirsute*; Cs: *Cucumis sativus*.

### 2.3 与根结发育相关的黄瓜 RDR 基因的表达特性分析

以  $\beta$ -Actin 基因为内参, 在线虫处理组和对照组中, 分别用不同时间点 RDR 基因相对于  $\beta$ -Actin 基因的表达倍数分析 RDR 基因的表达量变化。对根部组织的外部形态及线虫形态观察证明, 黄瓜根部接种南方根结线虫后 6 h 就已有线虫侵入根组织 (图 4, A1); 3 d 时根部明显膨大; 7 d 时根结就发育成熟 (图 4)。

荧光定量 PCR 结果表明, 从接种线虫至根结形成 (0 h ~ 7 d), 5 种 RDR 基因在不同时间点较对照都有所增加, 表现出上调表达 (图 5)。CsRDR1a、CsRDR1b、CsRDR2 和 CsRDR6 基因均在接种线虫 6 h 时表达量达到最高, 而 CsRDR1c 基因在 36 h 时达到最高。CsRDR1a 在接种线虫 6 h 时的表达量约为对照的 25 倍, 而 CsRDR1b 在黄瓜接种线虫 36 h 时表达量达到对照的 20 倍; CsRDR1c、CsRDR2 和 CsRDR6 在接种线虫后 6 h 时表达量也约为对照表达量的 10 倍。

在接种线虫后 5 种 CsRDR 基因表达量的变化不同, 表明黄瓜 RDR 基因在参与线虫介导的根结发育的调控过程中起不同的作用。CsRDR1a、CsRDR1b、CsRDR2 和 CsRDR6 在材料接种线虫早期 (6 h), 相对表达量明显增加, 且达到最高, 此时线虫刚侵入细胞 (泰勒和萨塞, 1983), 表明 CsRDR1a、CsRDR1b、CsRDR2 和 CsRDR6 在早期参与了根结的发育。并且这 4 种黄瓜 CsRDR 基因相对表达量达到最高持续时间不长, 均不超过 6 h, 说明 CsRDR 基因在黄瓜根结形成过程中可能主要起信号传递作用。CsRDR1c 在根结发育过程中也表达, 并在接种线虫 36 h 时相对表达量达到最高, 此时线虫已经侵染根部组织, 显微镜下观察到根部的维管束被改变 (图 4, D1), 说明 CsRDR1c 参与了根结的发育。

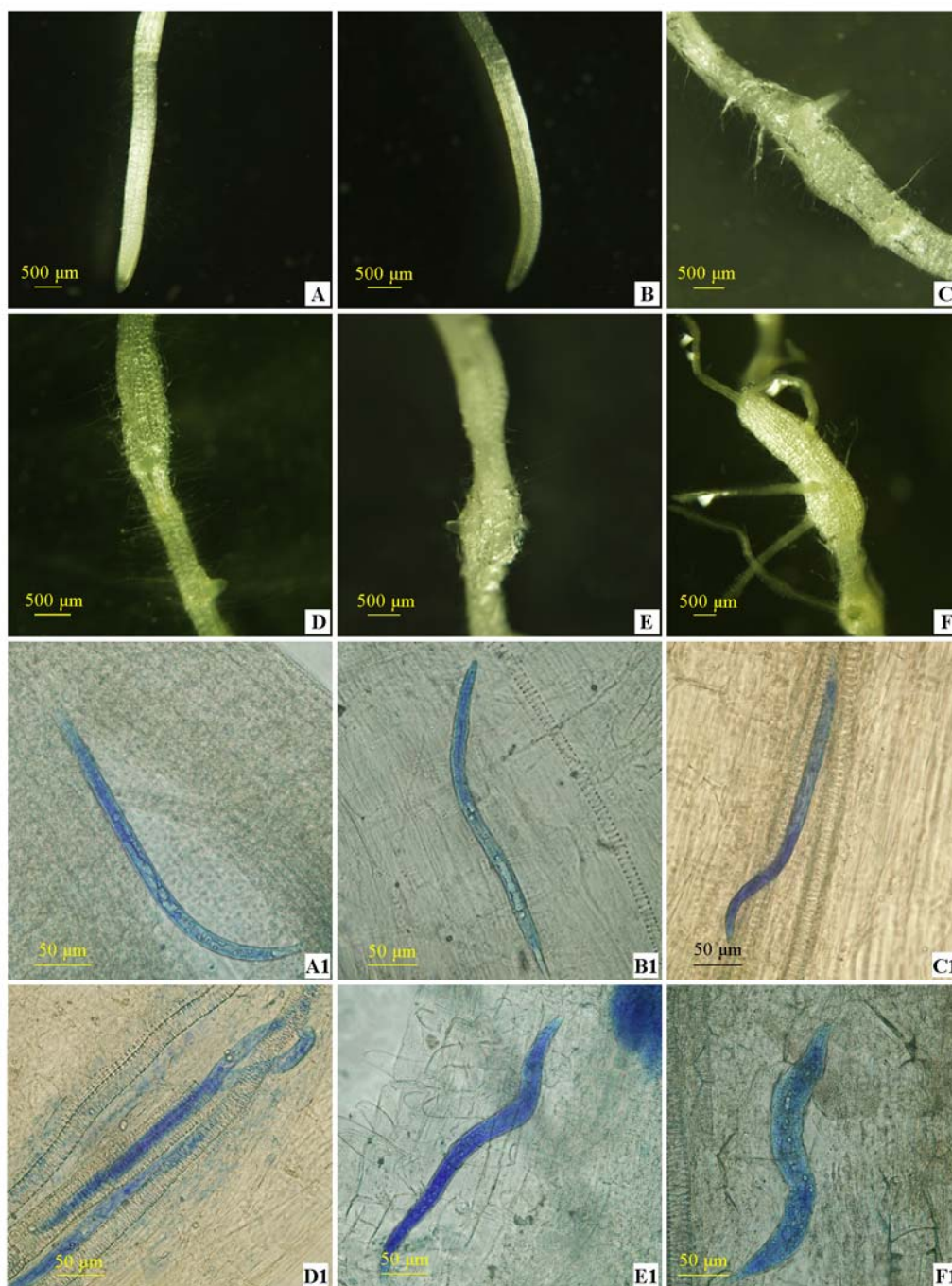


图 4 接种后不同时间点黄瓜根尖细胞对线虫侵染的反应

A、B、C、D、E、F 分别是接种线虫 6 h、12 h、24 h、36 h、3 d、7 d 的根部样品的外部形态;

A1、B1、C1、D1、E1、F1 分别是接种线虫 6 h、12 h、24 h、36 h、3 d、7 d 侵入根组织的线虫形态。

Fig. 4 The response of cucumber root tip cell at different times after root-knot nematode infection

A, B, C, D, E and F indicate the cucumber root after root-knot nematode inoculation 6 h, 12 h, 24 h, 36 h, 3 d and 7 d respectively.

A1, B1, C1, D1, E1 and F1 indicate the morphology of root-knot nematode in root after root-knot nematode inoculation

6 h, 12 h, 24 h, 36 h, 3 d and 7 d respectively.

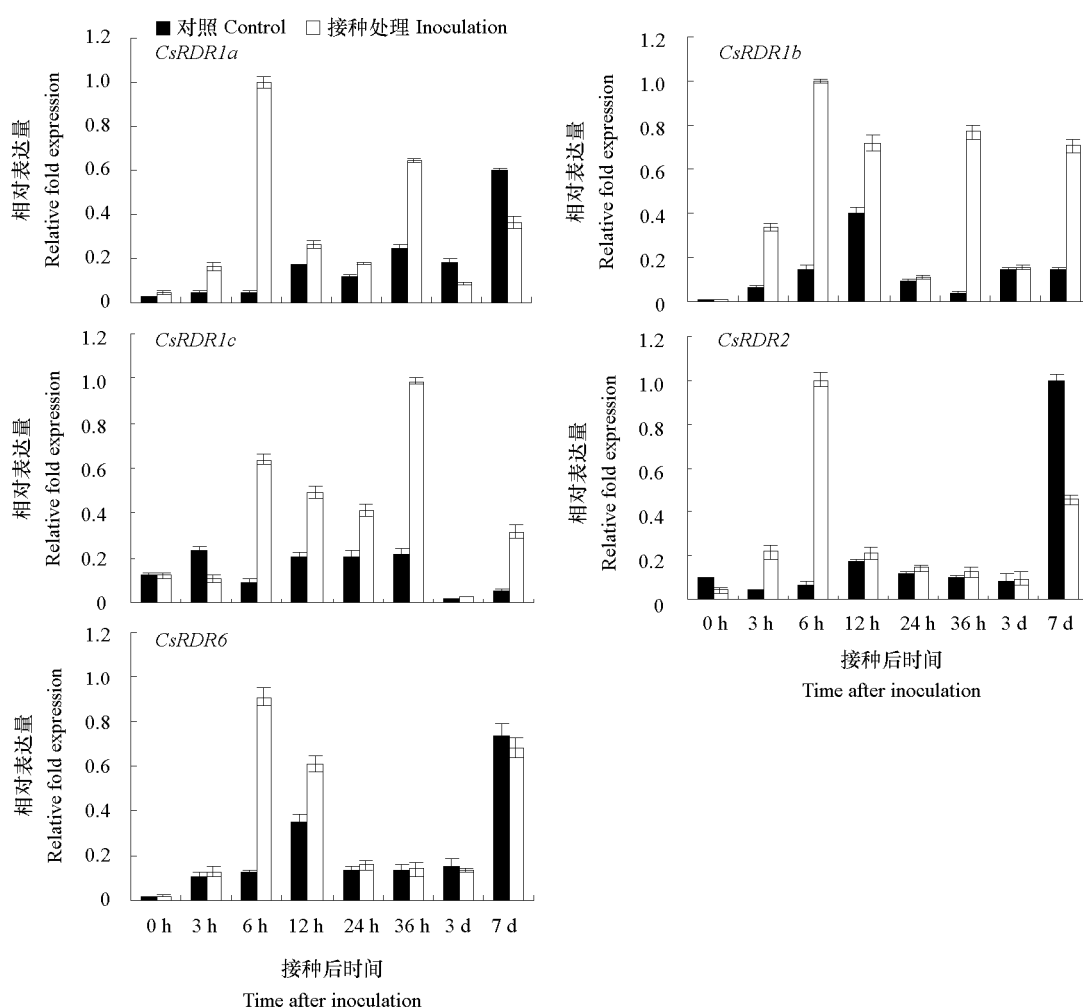


图5 黄瓜 *RDR* 基因表达特性分析  
Fig. 5 The expression analysis for *CsRDR*

### 3 讨论

基于黄瓜全基因组, 预测到 6 个 *CsRDR* 基因, 在正常发育及根结发育中分离出 5 个 *RDR* 基因 *CsRDR1a*、*CsRDR1b*、*CsRDR1c*、*CsRDR2* 和 *CsRDR6*, 均含有真核生物 *RDR* 酶的特征基序 DbDGD, 分别属于 *RDR1*、*RDR2*、*RDR6* 类家族基因。试验表明, 这些 *CsRDR* 基因表达量在根结线虫介导的根结发育过程中发生了改变, 说明 *RDR* 基因参与了根结的发育。在预测的 *RDR* 基因中 *CsRDR1-3* 没有扩增出, 这可能与试验样品的采集部位及时期有关, 在试验中只是针对黄瓜的根部及根结线虫侵染早期根结部位进行取样, 未涉及到地上部分, 因此, 初步推测 *CsRDR1-3* 基因不参与根和根结发育过程。

研究表明植物细胞的基因表达沉默系统中, 沉默信号(dsRNA)的放大机制是依赖于宿主的 *RDR* 酶。这种沉默信号的放大机制是一种类似于 PCR 反应的过程 (Lipardi et al., 2001)。 *CsRDR1a*、*CsRDR1b*、*CsRDR1c*、*CsRDR2*、*CsRDR6* 基因在线虫处理后不同的时间点表达量都有增加, 表明多种黄瓜 *RDR* 基因可能参与根结的发育过程。由于 *RDR* 酶与基因表达的沉默系统直接相关, 因此, *RDR* 酶在根结发育中沉默的靶标基因及其功能研究是揭示根结发育机制的一个重要内容。在根结线



虫侵染早期, 多种 *RDR* 基因可能共同参与, 但在不同阶段起不同作用。黄瓜接种根结线虫 6~12 h, 这个时间段线虫已侵入根部, *CsRDR1a*、*CsRDR1b*、*CsRDR1c*、*CsRDR2* 和 *CsRDR6* 等 5 个基因相对表达量都有明显增加, 而在 36 h 时已经开始刺激根部细胞形成根结, 此时 *CsRDR1a*、*CsRDR1b*、*CsRDR1c* 基因仍然具有较高的相对表达量, 表明这些基因可能与根结的发育密切相关。

目前已从不同的植物中克隆出由水杨酸 (salicylic acid, SA) 和病毒、类病毒诱导的 *RDR* 基因。如烟草的 *NgRDR1* 基因可被 SA 和茉莉酸甲酯 (methyl jasmonate, MeJA) 诱导, 两者分别参与不同的信号途径 (Kunkel & Brooks, 2002; Liu et al., 2009), 而 *NgRDR1* 可被 SA 和 MeJA 诱导上调表达, 说明其可能与 SA 和 MeJA 信号途径相互作用; *AtRDR6* 被 SA 诱导的表达量则几乎没有变化 (Yu et al., 2003), 说明高等植物 *RDR* 酶家族的复杂性, 不同的 *RDR* 酶可能参与不同的信号途径, 并有不同的功能。SA 介导的抗性反应和 RNA 沉默之间可能存在某种联系, 不同的 *RDR* 酶被不同病菌侵染的反应也有所不同。*NgRDR1* 不能被青枯菌 (*Ralstonia Solanacearum*) 诱导 (Liu et al., 2009), 类似的结果在对 *AtRDR1* 的研究中也有报道 (Kunkel & Brooks, 2002)。而 *NgRDR1* 可被烟草花叶病毒 (TMV), 马铃薯 Y 病毒 (PVY) 和巨细胞病毒 (CMV) 诱导, 但不被马铃薯 X 病毒 (PVX) 诱导 (Liu et al., 2009), 表明不同的 *RDR* 酶对不同的病毒可能有不同的作用。*AtRDR6* 对 CMV 也有抗性反应 (Mourrain et al., 2000), 表明不同的 *RDR* 酶又有功能交叉。黄瓜根结形成过程中, 各 *CsRDR* 基因的表达量变化程度以及相对表达量最高时间点各不相同, 说明多种 *CsRDR* 参与根结形成过程, 然而 *RDR* 基因在根结发育过程的调控机制有待于进一步的深入研究, 确定参与根结发育有关的 *RDR* 基因可对根结发育机制研究奠定基础。

## References

- Astier-Manificat S, Cornuet P. 1971. RNA-dependent RNA polymerase in Chinese cabbage. *Biochimica et Biophysica Acta*, 232: 484 - 493.
- Christian T M, Jennifer S, Csaba H, Jane S, David B C, Christophe L, Merete A. 2009. Identification and characterization of barley RNA-directed RNA polymerases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1789: 375 - 385.
- Fang Zhong-da. 1998. *Phytopathological research method*. Beijing: China Agriculture Press. (in Chinese)
- 方中达. 1998. 植物研究方法. 北京: 中国农业出版社.
- Huang S W, Li R Q, Zhang Z H, Li L, Gu X F, Fan W, William J L, Wang X W, Xie B Y, Ni P X, Ren Y Y, Zhu H M, Li J, Lin K, Jin W W, Fei Z J, Li G C, Staub J, Kilian A, van der Vossen E A G, Wu Y, Guo J, He J, Jia Z Q, Ren Y, Tian G, Lu Y, Ruan J, Qian W B, Wang M W, Huang Q F, Li B, Xuan Z L, Cao J J, Asan, Wu Z G, Zhang J B, Cai Q L, Bai Y Q, Zhao B W, Han Y H, Li Y, Li X F, Wang S H, Shi Q X, Liu S Q, Cho W K, Kim J Y, Xu Y, Katarzyna H U, Miao H, Cheng Z C, Zhang S P, Wu J, Yang Y H, Kang H X, Man L, Liang H Q, Ren X L, Shi Z B, Wen M, Jian M, Yang H L, Zhang G J, Yang Z T, Chen R, Liu S F, Li J W, Ma L J, Liu H, Zhou Y, Zhao J, Fang X D, Li G Q, Li Y G, Liu D Y, Zheng H K, Zhang Y, Qin N, Li Z, Yang G H, Yang S, Bolund L, Kristiansen K, Zheng H C, Li S C, Zhang X Q, Yang H M, Wang J, Sun R F, Zhang B X, Jiang S Z, Wang J, Du Y C, Li S G. 2009. The genome of the cucumber, *Cucumis sativus* L. *Nature Genetic*, 41: 1275 - 1281.
- Kunkel B N, Brooks D M. 2002. Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Curr Opin Plant Biol*, 5: 325 - 331.
- Lipardi C, Wei Q, Paterson B M. 2001. RNAi as random degradative PCR: siRNA primers convert mRNA into dsRNAs that are degraded to generate new siRNAs. *Cell*, 107 (3): 297 - 307.
- Li Shu-min, Mao Zhen-chuan, Li Lei, Feng dong-xin, Yang Yu-hong, Xie bing-yan. 2008. Isolation of *WRKY* genes in the incompatible interaction between *Meloidogyne incognita* and *Capsicum annuum*. *Acta Horticulturae Sinica*, 35 (10): 1467 - 1472. (in Chinese)
- 李淑敏, 茆振川, 李 蕾, 冯东昕, 杨宇红, 谢丙炎. 2008. 辣椒抗根结线虫相关 *WRKY* 基因的分离. *园艺学报*, 35 (10): 1467 - 1472.
- Liu Yan, Gao Qiu-qiang, Wu Bin, Ai Tao-bo, Guo Xing-qi. 2009. *NgRDR1*, an RNA-dependent RNA polymerase isolated from *Nicotiana glutinosa*, was involved in biotic and abiotic stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47: 359 - 368.

- Livak K J, Schmittgen T D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods*, 25: 402 – 408.
- Mao Zhen-chuan, Xie Bing-yan, Yang Yu-hong, Feng Dong-xin, Feng Lan-xiang, Yang Zhi-wei. 2007. Analysis of pepper *Me3* gene resistance to root knot nematodes by SSH. *Acta Horticulturae Sinica*, 34 (6): 1453 – 1458. (in Chinese)
- 茆振川, 谢丙炎, 杨宇红, 冯东昕, 冯兰香, 杨之为. 2007. 辣椒 *Me3* 基因介导抗根结线虫相关基因的 SSH 分析. *园艺学报*, 34 (6): 1453 – 1458.
- Mourrain P, Beclin C, Elmayan T, Feuerbach F, Godon C, Morel J B, Jouette D, Lacombe A M, Nikic S, Picault N, Remoue K, Sanial M, Vo T A, Vaucheret H. 2000. *Arabidopsis* *SGS2* and *SGS3* genes are required for post-transcriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell*, 101: 533 – 542.
- Schiebel W, Haas B, Marinkovic S, Klanner A, Sanger H L. 1993. RNA-directed RNA polymerase from tomato leaves. I. Purification and physical properties. *J Biol Chem*, 268: 11851 – 11857.
- Schwab W, Davidovich-Rikanati R, Lewinsohn E. 2008. Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. *Plant J*, 54: 712 – 732.
- Taylor A L, Sasser J N. 1983. Plant root-knot nematode. Yang Bao-jun, Zeng Da-peng trans. Beijing: Science Press. (in Chinese)
- 泰勒 A L, 萨塞 J N. 1983. 植物根结线虫. 杨宝君, 曾大鹏译. 北京: 科学出版社.
- van der Krol A R, Mur L A, Beld M, Mol J N M, Stuitje A R. 1990. Flavonoid genes in *Petunia*: Addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression, *Plant Cell*, 2: 291 – 299.
- Yu D, Fan B, MacFarlane S A, Chen Z. 2003. Analysis of the involvement of an inducible *Arabidopsis* RNA-dependent RNA polymerase in antiviral defense. *Mol Plant Microbe Interact*, 16: 206 – 216.

## 征 订

# 《中国蔬菜栽培学》(第 2 版)

《中国蔬菜栽培学》(第二版)于 2009 年 10 月由中国农业出版社出版发行。全书约 250 万字,分总论、各论、保护地蔬菜栽培、采后处理及贮藏保鲜共 4 篇。总论篇概要地论述了中国蔬菜栽培的历史、产业现状,中国蔬菜的起源、来源和种类,蔬菜作物生长发育和器官形成与产品质量的关系,蔬菜生产分区、栽培制度和技术原理,蔬菜栽培的生理生态基础以及环境污染与蔬菜的关系等;各论篇较详细地介绍了根菜类、薯芋类、葱蒜类、白菜类、芥菜类、甘蓝类、叶菜类、瓜类、茄果类、豆类、水生类、多年生类、芽苗菜以及食用菌类蔬菜的优良品种、栽培技术、病虫害综合防治、采收等方面的技术经验和研究成果;保护地蔬菜栽培篇论述了中国蔬菜保护地的类型、构造和应用,主要栽培设施的设计、施工,保护地环境及调节,保护地蔬菜栽培技术;采后处理及贮藏保鲜篇重点介绍了蔬菜采后处理技术及贮藏原理和方法等。与原著(1987 年版)相比较,具有如下特点:

1. 重点增加了自 20 世纪 80 年代后期以来,中国在蔬菜栽培理论、无公害蔬菜栽培技术、推广应用的新品种、病虫害综合防治以及在蔬菜产品质量、产品采后处理及贮藏保鲜原理和技术等方面取得的新成果、新进展;概述了改革开放以来中国蔬菜产、销通过商品基地建设、流通体系建设等在解决蔬菜周年生产和供应方面所取得的成绩。
2. 对蔬菜栽培历史,蔬菜的起源、来源,分类,蔬菜学名,病虫害学名等进行了复核,校勘。
3. 尽可能地反映不同学术思想和观点;尽量反映不同生态区,包括台湾地区在内的栽培技术特点。
4. 删去了“蔬菜的加工”和“野生蔬菜”两章,以使本书的内容更加切题。另在附录中增加了“主要野生蔬菜简表”、“主要野生食用菌简表”和“主要香辛料蔬菜简表”3 个附表。

本书由中国农科院蔬菜花卉研究所主编,组织全国有较高学术水平和实际工作经验的专家、学者和技术人员 130 余人分别撰写,反映了 21 世纪初中国蔬菜栽培科学研究和蔬菜生产技术的水平,内容较全面、系统,科学性、学术性强,亦有较强的实用性,插有近 500 张彩图,可供相关科研人员、农业院校师生、专业技术及管理人员等参考。

定价 330 元(含邮费)。

购书者请通过邮局汇款至北京中关村南大街 12 号中国农业科学院蔬菜花卉研究所《园艺学报》编辑部,邮编 100081。