园　艺　学　报　2011，38（增刊）：2552　　http: // www. ahs. ac. cn
Acta Horticulturae Sinica　　E-mail: yuanyixuebao@126.com

NO_3^-胁迫下菠菜 SSH 文库的构建及 EST 分析

徐慧妮*，何小钊，王　康，陈丽梅，李昆志
（昆明理工大学生命科学与技术学院，昆明 650224）

土壤次生盐渍化是设施蔬菜生长的主要障碍因子，设施土壤的盐分组成特点为阴离子主要是 NO_3^-，约占阴离子总量的 67% ~ 76%，阳离子主要是 Ca^{2+}和 K^+。菠菜（*Spinacia oleracea* L.）在我国南北方的设施中广泛种植，是典型的喜硝蔬菜，也是耐盐性较强的蔬菜。为了解蔬菜对 NO_3^-胁迫应答的分子机制，构建了菠菜 NO_3^-胁迫下的正向抑制消减杂交（SSH）cDNA 文库，并对获得的表达序列标签（EST）进行分析，为从分子水平揭示土壤次生盐渍化对蔬菜的伤害机制，解决土壤次生盐渍化问题提供理论依据。

供试材料为‘益农菠菜’。将菠菜种子按常规方法浸种催芽，两片子叶展平后，转入营养液槽中培养，待植株长到六叶时进行胁迫处理。对照营养液中 NO_3^-为 10 mmol · L^{-1}，NO_3^-胁迫处理浓度为 100 mmol · L^{-1}［NO_3^-由 $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ 和 KNO_3 各提供一半］。菠菜根系在对照和 NO_3^-胁迫条件下处理 0 min、10 min、0.5 h、1 h、3 h、6 h、24 h 后取样，液氮速冻，保存于－80 ℃。RNA 的提取采用 Trizol Reagent（Invitrogen）的方法。以对照营养液处理的菠菜幼苗根系为消减方（driver），以 100 mmol · L^{-1} NO_3^-处理不同时间后的菠菜根系为检验方（tester），根据 Clotech PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit（Clontech，USA）试剂盒的说明书进行文库构建。将 SSH 产物进行 T/A 克隆，转化大肠杆菌后挑选阳性克隆组成 SSH cDNA 文库。通过 PCR 扩增文库中每个克隆的插入片段，分析克隆插入片段的有无及片段的大小，进而判断所构建文库的质量是否符合要求。对文库中插入片段在 200 ~ 1 500 bp 的克隆进行单向测序，分析测序结果，并在 GenBank 中进行 BlastX 比对，推测 EST 的可能功能。对部分基因进行 RT-PCR 分析验证文库的可靠性。

从菠菜根系提取的总 RNA 经 1%甲醛琼脂糖变性凝胶电泳检测，出现清晰的 28S 和 18S rRNA 两条带，说明总 RNA 结构完整、未降解，完全可以满足 cDNA 文库的构建。菠菜 cDNA 第一链的产物检测结果呈弥散状，大小主要集中在 500 ~ 2 000 bp 之间，符合建库要求。本研究共挑取了 798 个阳性克隆组成 SSH cDNA 文库。用 PCR 扩增检测文库中各克隆插入 cDNA 的大小，结果显示，插入 cDNA 片段的长度在 200 ~ 1 500 bp 之间，平均值约为 500 bp。挑选 260 个克隆进行测序，一共获得 211 个有效的 EST。对 EST 进行 BlastX 比对及功能注释，发现已知的基因参与到代谢、细胞救援及防御、细胞转运、信号转导、蛋白合成、DNA 和 RNA 代谢、转录、细胞骨架等途径，说明菠菜对 NO_3^-胁迫应答的复杂性。随机挑选 11 个基因进行半定量 RT-PCR 分析，结果表明所选的 11 个基因在 NO_3^-胁迫后均上调表达，说明该文库的可靠性。

关键词：菠菜；NO_3^-胁迫；　SSH；RT-PCR

中图分类号：S 636.1　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0513-353X（2011）S-2552-01

收稿日期：2011－09－21
基金项目：云南省应用基础研究面上项目（2010ZC053）
* E-mail：hnxusun@gmail.com；Tel：15911581834