

# 植物激素处理和环境胁迫对‘金魁’猕猴桃 *AdRAVs* 基因表达特性的影响

张计育<sup>1</sup>, 黄胜男<sup>1</sup>, 程竞卉<sup>2</sup>, 王 刚<sup>1</sup>, 潘德林<sup>1</sup>, 郭忠仁<sup>1,①</sup>

[1. 江苏省中国科学院植物研究所(南京中山植物园), 江苏 南京 210014; 2. 延边朝鲜族自治州种子管理站, 吉林 延吉 133001]

**摘要:** 以‘金魁’猕猴桃(*Actinidia deliciosa* ‘Jinkui’)组培苗及2年生扦插苗为实验材料,采用qRT-PCR技术对0.1 mmol·L<sup>-1</sup>水杨酸(SA)、0.05 mmol·L<sup>-1</sup>茉莉酸甲酯(MeJA)、0.01 mmol·L<sup>-1</sup>1-氨基环丙烷-1-羧酸(ACC)和0.01 mmol·L<sup>-1</sup>脱落酸(ABA)4种植物激素处理后0、4、12和48 h,低温(4℃)和0.2 mol·L<sup>-1</sup> NaCl胁迫0、4、12和48 h,高温(48℃)胁迫0、2和4 h及恢复培养6 h,以及干旱胁迫14 d后叶片中*AdRAV1*、*AdRAV2*和*AdRAV3*基因的相对表达量进行了测定。结果显示:不同处理条件下3个*AdRAVs*基因相对表达量的变化存在一定差异。SA、MeJA和ACC处理后4和12 h,*AdRAV1*基因的相对表达量显著( $P<0.05$ )升高,但ABA处理后该基因的相对表达量无明显变化;SA、MeJA、ACC和ABA处理后48 h,*AdRAV2*基因的相对表达量显著降低;4种植物激素处理后4、12和48 h,*AdRAV3*基因的相对表达量总体上显著降低。低温胁迫下,*AdRAV1*和*AdRAV2*基因的相对表达量无明显变化,但胁迫48 h时*AdRAV3*基因的相对表达量却显著升高。NaCl胁迫12 h时,*AdRAV1*和*AdRAV2*基因的相对表达量均显著升高,而*AdRAV3*基因的相对表达量则显著降低。高温胁迫4 h时,*AdRAV1*基因的相对表达量显著降低,*AdRAV2*基因的相对表达量显著升高;胁迫2 h时,*AdRAV3*基因的相对表达量显著降低;恢复培养6 h时,3个基因的相对表达量均无法恢复至起始水平。干旱胁迫14 d后,*AdRAV1*基因的相对表达量显著高于对照(正常浇水);*AdRAV2*的相对表达量高于对照,而*AdRAV3*基因的相对表达量则低于对照,且均与对照无显著差异。研究结果表明:不同胁迫条件对‘金魁’猕猴桃*AdRAVs*基因的表达特性有不同诱导效应。根据实验结果,推测*AdRAV1*、*AdRAV2*和*AdRAV3*基因可能参与SA、MeJA、ACC和ABA信号转导途径以及耐盐和耐高温过程;并且,*AdRAV1*基因还可能参与耐旱过程,而*AdRAV3*基因则可能参与耐寒过程。

**关键词:** ‘金魁’猕猴桃; *AdRAVs* 基因; 植物激素; 环境胁迫; 相对表达量; qRT-PCR 技术

中图分类号: Q786; Q946-33; S663.4 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2016)03-0028-08

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2016.03.04

**Effects of phytohormone treatment and environmental stress on expression characteristics of *AdRAVs* gene from *Actinidia deliciosa* ‘Jinkui’** ZHANG Jiyu<sup>1</sup>, HUANG Shengnan<sup>1</sup>, CHENG Jinghui<sup>2</sup>, WANG Gang<sup>1</sup>, PAN Delin<sup>1</sup>, GUO Zhongren<sup>1,①</sup> (1. Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China; 2. Seed Management Department of Yanbian Korean Autonomous Prefecture, Yanji 133001, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2016, 25(3): 28-35

**Abstract:** Taking tissue culture seedling and two-year-old cutting seedling of *Actinidia deliciosa* ‘Jinkui’ as experimental materials, relative expression of *AdRAV1*, *AdRAV2* and *AdRAV3* genes in leaf after 0, 4, 12 and 48 h treated by four phytohormones including 0.1 mmol·L<sup>-1</sup> salicylic acid (SA), 0.05 mmol·L<sup>-1</sup> methyl jasmonate (MeJA), 0.01 mmol·L<sup>-1</sup> 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) and 0.01 mmol·L<sup>-1</sup> abscisic acid (ABA), stressed by low temperature (4℃) and 0.2

收稿日期: 2015-11-24

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31401854); 江苏省自然科学基金资助项目(BK20140760); 江苏省科技计划项目(BE2015350); 泰州市科技支撑计划(农业)项目(TN201511)

作者简介: 张计育(1982—),男,山西沁县人,博士,副研究员,主要从事猕猴桃抗逆分子生物学研究。

①通信作者 E-mail: zhongrenguo@cnbg.net

mol · L<sup>-1</sup> NaCl for 0, 4, 12 and 48 h, stressed by high temperature (48 °C) for 0, 2 and 4 h and recovery culturing for 6 h, and stressed by drought for 14 d were determined by qRT-PCR technique. The results show that there are some differences in change of relative expression of three *AdRAVs* genes under different treatment conditions. After 4 and 12 h treated by SA, MeJA and ACC, relative expression of *AdRAV1* gene increases significantly ( $P < 0.05$ ), but it does not change obviously after treated by ABA. After 48 h treated by SA, MeJA, ACC and ABA, relative expression of *AdRAV2* gene decreases significantly. After 4, 12 and 48 h treated by four phytohormones, relative expression of *AdRAV3* gene decreases significantly as a whole. Under low temperature stress, relative expression of *AdRAV1* and *AdRAV2* genes has no obvious change, but that of *AdRAV3* gene increases significantly when stressing for 48 h. When NaCl stressing for 12 h, relative expression of *AdRAV1* and *AdRAV2* genes increases significantly, while that of *AdRAV3* gene decreases significantly. When high temperature stressing for 4 h, relative expression of *AdRAV1* gene decreases significantly, that of *AdRAV2* gene increases significantly; when stressing for 2 h, that of *AdRAV3* gene decreases significantly; when recovery culturing for 6 h, that of three genes all cannot return to the starting level. After drought stressed for 14 d, relative expression of *AdRAV1* gene is significantly higher than that of the control (normal watering); relative expression of *AdRAV2* gene is higher than that of the control, while relative expression of *AdRAV3* gene is lower than that of the control, both of them have no significant difference with the control. It is suggested that different stress conditions have different inductive effects on expression characteristics of *AdRAVs* gene from *A. deliciosa* ‘Jinkui’. According to the experimental results, it is speculated that *AdRAV1*, *AdRAV2* and *AdRAV3* genes may be involved in SA, MeJA, ACC and ABA signal transduction pathway and resistance process of salt and high temperature, and *AdRAV1* gene also may be involved in drought resistance process, while *AdRAV3* gene does in cold resistance process.

**Key words:** *Actinidia deliciosa* ‘Jinkui’; *AdRAVs* gene; phytohormone; environmental stress; relative expression; qRT-PCR technique

AP2/ERF 是植物体内一个庞大的转录因子基因家族,存在于所有植物中,因具有由 60 ~ 70 个氨基酸组成的 AP2/ERF 结构域而得名。AP2/ERF 类转录因子能够参与植物的生长、花、果实和种子的发育以及果实香味形成等生长发育过程,并能够参与植物对病菌的防御过程以及对损伤、高盐和干旱等非生物胁迫的响应<sup>[1-2]</sup>。AP2/ERF 类转录因子不但在水杨酸、茉莉酸、乙烯和脱落酸等信号转导途径中起作用,而且是逆境信号交叉途径的连接因子<sup>[1]</sup>。根据序列相似性和 AP2/ERF 结构域的数量,AP2/ERF 基因家族可分成 AP2、ERF 和 RAV 3 类<sup>[3]</sup>,其中,RAV 类基因编码的蛋白质均含有 AP2/ERF 和 B3 结构域各 1 个,且多数植物含有 2 个以上的 RAV 类基因<sup>[4-7]</sup>。研究发现,RAV 类基因在植物的乙烯响应<sup>[8]</sup>、油菜素内酯响应<sup>[9]</sup>、生物和非生物胁迫响应<sup>[10]</sup>过程中发挥重要作用。但关于木本植物中 RAV 类基因功能及作用的研究报道甚少。

‘金魁’猕猴桃(*Actinidia deliciosa* ‘Jinkui’)为美味猕猴桃[*Actinidia deliciosa* (A. Chev.) C. F. Liang et A. R. Ferguson]的主要栽培品种,具有果实品质极佳、耐贮运、抗逆性强、丰产稳产、货架期长等优点,深

受果农和消费者的喜爱。目前,江苏省中国科学院植物研究所已经完成水涝胁迫下‘金魁’猕猴桃转录组的测序工作(登录号 SRR2048539)<sup>[11]</sup>,共获得 91 个 AP2 转录因子。在受到水涝胁迫时,其中的 14 个 AP2 转录因子上调表达,另有 14 个 AP2 转录因子下调表达;在上述 28 个 AP2 转录因子中有 3 个 RAV 类基因,其中 *AdRAV1* (comp100639\_c0\_seq2) 和 *AdRAV2* (comp100786\_c0\_seq3) 为上调表达基因,*AdRAV3* (comp104656\_c0\_seq4) 为下调表达基因<sup>[11]</sup>。然而,关于这 3 个 RAV 类基因的功能特性并不十分清楚。

鉴于此,作者以‘金魁’猕猴桃组培苗和 2 年生扦插苗为试材,利用 qRT-PCR 技术对 0.1 mmol · L<sup>-1</sup> 水杨酸(SA)、0.05 mmol · L<sup>-1</sup> 茉莉酸甲酯(MeJA)、0.01 mmol · L<sup>-1</sup> 1-氨基环丙烷-1-羧酸(ACC)和 0.01 mmol · L<sup>-1</sup> 脱落酸(ABA)4 种植物激素处理后 0、4、12 和 48 h,4 °C 低温和 0.2 mol · L<sup>-1</sup> NaCl 胁迫 0、4、12 和 48 h,48 °C 高温胁迫 0、2 和 4 h 及恢复培养 6 h,以及干旱胁迫 14 h 后‘金魁’猕猴桃叶片中 *AdRAV1*、*AdRAV2* 和 *AdRAV3* 基因相对表达量的变化进行分析和比较,以期为猕猴桃抗逆基因的筛选及其抗逆分子机制的研究提供基础数据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

供试材料为江苏省中国科学院植物研究所经济植物研究中心保存的‘金魁’猕猴桃组培苗和2年生扦插苗;其中,组培苗用于植物激素处理以及低温和高温胁迫实验,扦插苗用于 NaCl 和干旱胁迫实验, SA、MeJA、ACC、ABA、低温、NaCl 和高温胁迫实验每处理 16 株苗,干旱胁迫实验每处理 8 株苗,均重复 3 次。实验前组培苗需在生根培养基(含  $0.6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  NAA 的 1/2MS 培养基)中培养 1 个月,培养条件为温度约  $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、空气相对湿度 40%、光照时间  $16 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 、光照度  $2000 \text{ lx}$ ;扦插苗种植于塑料营养盆(上口径 13 cm、高度 20 cm)中,培养基质为 V(泥炭土):V(蛭石):V(珍珠岩) = 7:2:1 的混合基质,置于温度约  $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、空气相对湿度 60%、光照时间  $16 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 、光照度  $2000 \text{ lx}$  的光照培养箱中培养。

实验用 SA、MeJA、ACC 和 ABA 均购自美国 Sigma 公司, DNA 消化酶(Code No. D2215)、反转录试剂盒(Code No. RR047Q)、荧光定量试剂 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup>(Code No. DRR041A)等购自宝生物工程(大连)有限公司。ABI 7300 实时荧光定量 PCR 仪为美国 ABI 公司产品。

### 1.2 方法

1.2.1 处理方法 激素处理方法:参考张计育等<sup>[12]</sup>的方法进行植物激素处理。将  $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  SA、 $0.05 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  MeJA、 $0.01 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  ACC 和  $0.01 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  ABA 分别喷洒在组培苗叶片的表面,每株组培苗喷洒处理溶液约 15 mL,使叶片表面湿润;在喷洒 0(CK)、4、12 和 48 h 后,每个处理组随机选择 4 株组培苗,采集所有叶片,迅速放入液氮中冷冻并置于  $-70 \text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存、备用。

低温处理方法:选取已生根的组培苗,置于  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  低温条件下进行胁迫处理;在处理 0(CK)、4、12 和 48 h 后,分别随机选择 4 株组培苗,采集所有叶片,迅速放入液氮中冷冻并置于  $-70 \text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存、备用。

NaCl 处理方法:将  $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl 溶液直接浇灌在扦插苗的根部,每株扦插苗浇灌约 300 mL;在浇灌 0(CK)、4、12 和 48 h 后,分别随机选择 4 株扦插苗,采集植株顶部嫩叶,迅速放入液氮中冷冻并置于  $-70 \text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存、备用。

高温处理方法:选取已生根的组培苗,置于  $48 \text{ }^{\circ}\text{C}$  培养箱中进行胁迫处理;在处理 0(CK)、2 和 4 h 后,分别随机选择 4 株组培苗,采集所有叶片,迅速于液氮中冷冻并置于  $-70 \text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存、备用。并且,在处理 4 h 后将组培苗置于  $23 \text{ }^{\circ}\text{C}$  条件下进行恢复培养,在恢复培养 6 h 后随机选择 4 株组培苗,采集所有叶片,迅速放入液氮中冷冻并置于  $-70 \text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存、备用。

干旱处理方法:对扦插苗停止浇水并模拟土壤干旱胁迫,以正常浇水的扦插苗为对照,处理 14 d 后分别在对照及干旱处理组中随机选择 4 株扦插苗,采集植株顶部嫩叶,迅速放入液氮中冷冻并置于  $-70 \text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存、备用。

1.2.2 qRT-PCR 检测方法 参考张计育等<sup>[13]</sup>的方法提取叶片的总 RNA,根据 DNA 消化酶使用说明书对总 RNA 中的 DNA 进行消化;取消化后的总 RNA  $1 \text{ } \mu\text{g}$ ,参考反转录试剂盒使用说明书进行 cDNA 合成;将合成的 cDNA 稀释 10 倍后置于  $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存、备用。

根据 3 个目的基因片段序列分别设计引物,其中, *AdRAV1* 基因的引物为 RAV1F(5'-GCTTTTCCCGTTCAGGTCCAG-3') 和 RAV1R(5'-ACACCCAAATCCCAACATCTCC-3'); *AdRAV2* 基因的引物为 RAV2F(5'-TCGGCGGGAAGAAACAATGC-3') 和 RAV2R(5'-GGTATCACCAGCCTGTTTCAGC-3'); *AdRAV3* 基因的引物为 RAV3F(5'-TTTGAAGGCGGGCGATGTC-3') 和 RAV3R(5'-ACTACTATCAACACCACCACTCAC-3')。以 *AdActin*<sup>[14]</sup> 为内参基因,引物为 AdActinF(5'-TGCA TGAGCGATCAAGTTTCAAG-3') 和 AdActinR(5'-TGTCCCATGTCTGGTTGATGACT-3')。用 ABI 7300 实时荧光定量 PCR 仪进行 PCR 扩增,具体操作参照张计育等<sup>[15]</sup>的方法。

### 1.3 数据分析

采用 7300 System 软件和  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  法<sup>[16]</sup> 进行数据分析,并采用 SPSS 17.0 统计分析软件进行方差分析。

## 2 结果和分析

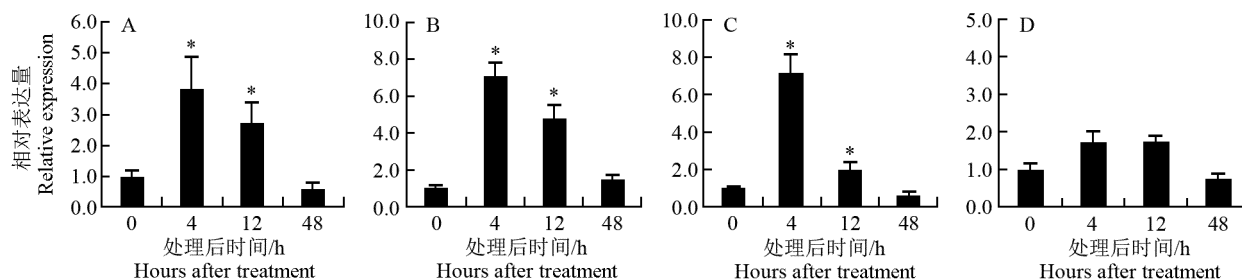
### 2.1 经植物激素处理后‘金魁’猕猴桃 3 个 *AdRAVs* 基因的表达特性分析

2.1.1 *AdRAV1* 基因的表达特性 经不同植物激素处理后,‘金魁’猕猴桃组培苗 *AdRAV1* 基因的相对表

达量见图1。

由图1可以看出:经  $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  SA (图1-A)、 $0.05 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  MeJA (图1-B)、 $0.01 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  ACC (图1-C) 和  $0.01 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  ABA (图1-D) 处理后,‘金魁’猕猴桃 *AdRAVI* 基因的相对表达量均随时间推移呈现先升高后降低的变化趋势。经 SA、MeJA

和 ACC 处理后,该基因的相对表达量在处理 4 h 最高且显著 ( $P < 0.05$ ) 高于处理后 0 h,在处理 12 h 也显著高于处理后 0 h;经 ABA 处理后,该基因的相对表达量在处理 4 和 12 h 相近且均高于处理后 0 h,但差异不显著。



\*: 表示与处理后 0 h 差异显著 ( $P < 0.05$ ) Representing the significant difference with 0 h after treatment ( $P < 0.05$ ).

A:  $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  SA; B:  $0.05 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  MeJA; C:  $0.01 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  ACC; D:  $0.01 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  ABA.

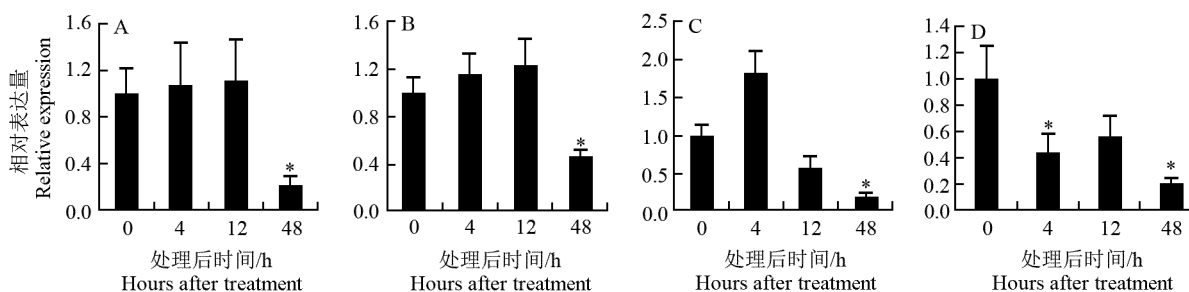
图1 水杨酸(SA)、茉莉酸甲酯(MeJA)、1-氨基环丙烷-1-羧酸(ACC)和脱落酸(ABA)处理后‘金魁’猕猴桃组培苗 *AdRAVI* 基因相对表达量的变化

Fig. 1 Change in relative expression of *AdRAVI* gene from tissue culture seedling of *Actinidia deliciosa* ‘Jinkui’ after treated by salicylic acid (SA), methyl jasmonate (MeJA), 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) and abscisic acid (ABA)

2.1.2 *AdRAV2* 基因的表达特性 经不同植物激素处理后,‘金魁’猕猴桃组培苗 *AdRAV2* 基因的相对表达量见图2。

由图2可以看出:经  $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  SA (图2-A)、 $0.05 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  MeJA (图2-B) 和  $0.01 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  ACC (图2-C) 处理后,‘金魁’猕猴桃 *AdRAV2* 基因的相对表达量均随着时间推移呈现先升高后降低的变化趋势;其中,经 SA 和 MeJA 处理后,该基因的相对

表达量在处理 12 h 最高但仅略高于处理后 0 h,在处理 48 h 最低且显著 ( $P < 0.05$ ) 低于处理后 0 h;经 ACC 处理后,该基因的相对表达量在处理 4 h 最高但仅略高于处理后 0 h,在处理 48 h 最低且显著低于处理后 0 h。经  $0.01 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  ABA 处理后,‘金魁’猕猴桃 *AdRAV2* 基因的相对表达量随时间推移呈波动但总体降低的变化趋势,并在处理后 4 和 48 h 显著低于处理后 0 h (图2-D)。



\*: 表示与处理后 0 h 差异显著 ( $P < 0.05$ ) Representing the significant difference with 0 h after treatment ( $P < 0.05$ ).

A:  $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  SA; B:  $0.05 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  MeJA; C:  $0.01 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  ACC; D:  $0.01 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  ABA.

图2 水杨酸(SA)、茉莉酸甲酯(MeJA)、1-氨基环丙烷-1-羧酸(ACC)和脱落酸(ABA)处理后‘金魁’猕猴桃组培苗 *AdRAV2* 基因相对表达量的变化

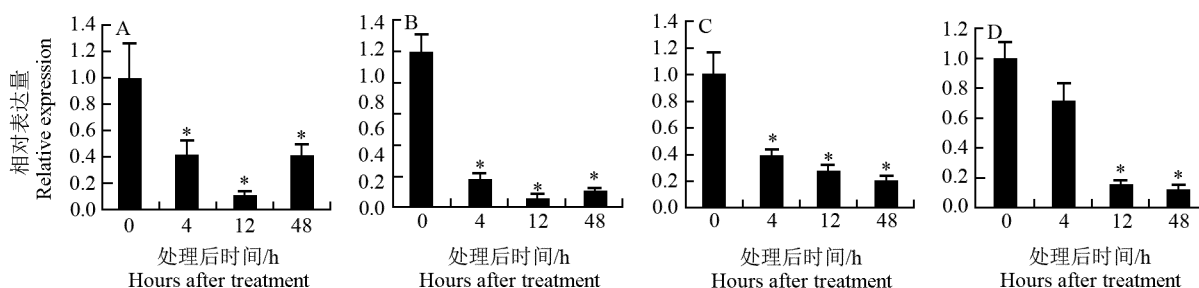
Fig. 2 Change in relative expression of *AdRAV2* gene from tissue culture seedling of *Actinidia deliciosa* ‘Jinkui’ after treated by salicylic acid (SA), methyl jasmonate (MeJA), 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) and abscisic acid (ABA)

2.1.3 *AdRAV3* 基因的表达特性 经不同植物激素处理后,‘金魁’猕猴桃组培苗 *AdRAV3* 基因的相对表达量见图3。

由图3可以看出:经  $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  SA(图3-A)和  $0.05 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  MeJA(图3-B)处理后,‘金魁’猕猴桃 *AdRAV3* 基因的相对表达量均随时间推移呈现先降低后升高的变化趋势,且均在处理后12 h降至最低;并在处理后4、12和48 h显著( $P < 0.05$ )低于处理后0 h。经  $0.01 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  ACC

(图3-C)和  $0.01 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  ABA(图3-D)处理后,‘金魁’猕猴桃 *AdRAV3* 基因的相对表达量均随时间推移呈现逐渐下降的变化趋势;其中,ACC处理后4、12和48 h以及ABA处理后12和48 h该基因的相对表达量均显著低于处理后0 h。

总体上看,在‘金魁’猕猴桃的3个 *AdRAVs* 基因中,经不同植物激素处理后 *AdRAV1* 基因的相对表达量最高,*AdRAV2* 基因的相对表达量次之,而 *AdRAV3* 基因的相对表达量最低。



\*: 表示与处理后0 h差异显著( $P < 0.05$ ) Representing the significant difference with 0 h after treatment ( $P < 0.05$ ).

A:  $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  SA; B:  $0.05 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  MeJA; C:  $0.01 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  ACC; D:  $0.01 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  ABA.

图3 水杨酸(SA)、茉莉酸甲酯(MeJA)、1-氨基环丙烷-1-羧酸(ACC)和脱落酸(ABA)处理后‘金魁’猕猴桃组培苗 *AdRAV3* 基因相对表达量的变化

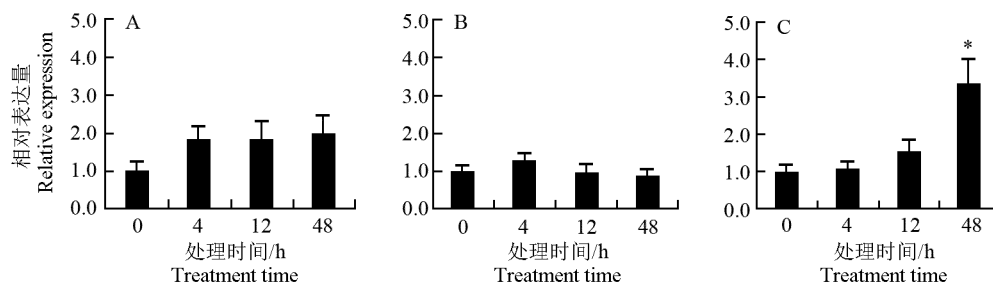
Fig. 3 Change in relative expression of *AdRAV3* gene from tissue culture seedling of *Actinidia deliciosa* ‘Jinkui’ after treated by salicylic acid (SA), methyl jasmonate (MeJA), 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) and abscisic acid (ABA)

## 2.2 环境胁迫条件下‘金魁’猕猴桃3个 *AdRAVs* 基因的表达特性分析

2.2.1 低温胁迫条件下3个 *AdRAVs* 基因的表达特性 在  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  低温胁迫条件下‘金魁’猕猴桃组培苗3个 *AdRAVs* 基因的相对表达量见图4。

结果显示:在低温胁迫条件下,*AdRAV1* 基因的相

对表达量在胁迫4、12和48 h时变化较小但均略高于胁迫0 h(图4-A);*AdRAV2* 基因的相对表达量在胁迫4、12和48 h时变化较小且均与胁迫0 h时无显著差异(图4-B);*AdRAV3* 基因的相对表达量随胁迫时间延长呈现逐渐升高的变化趋势(图4-C),并在胁迫48 h时达到最高且显著高于胁迫0 h。



\*: 表示与处理0 h差异显著( $P < 0.05$ ) Representing the significant difference with treating for 0 h ( $P < 0.05$ ).

A: *AdRAV1*; B: *AdRAV2*; C: *AdRAV3*.

图4 低温( $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ )胁迫条件下‘金魁’猕猴桃组培苗3个 *AdRAVs* 基因相对表达量的变化

Fig. 4 Change in relative expression of three *AdRAVs* genes from tissue culture seedling of *Actinidia deliciosa* ‘Jinkui’ under condition of low temperature ( $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) stress

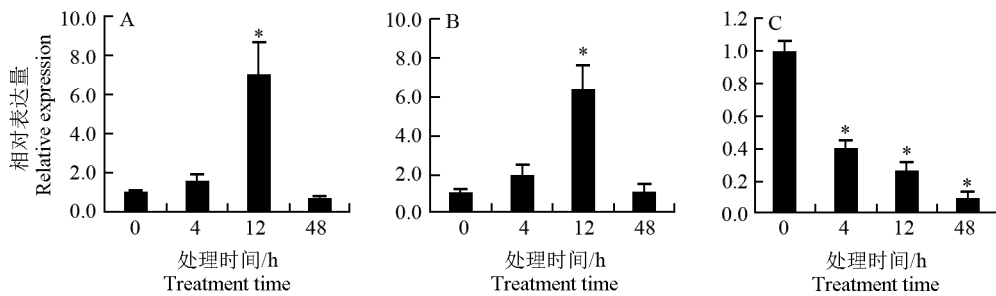
总体上看,低温胁迫处理0~12 h时,3个 *AdRAVs* 基因的相对表达量无明显差异,但在低温胁迫48 h时,*AdRAV3* 基因的相对表达量明显高于 *AdRAV1* 和 *AdRAV2* 基因。

2.2.2 NaCl 胁迫条件下3个 *AdRAVs* 基因的表达特性 在0.2 mol·L<sup>-1</sup> NaCl 胁迫条件下‘金魁’猕猴桃扦插苗3个 *AdRAVs* 基因的相对表达量见图5。

结果显示:在0.2 mol·L<sup>-1</sup> NaCl 胁迫条件下, *AdRAV1* 和 *AdRAV2* 基因的相对表达量随胁迫时间延长呈现先升高后降低的变化趋势(图5-A, B),并在

胁迫12 h时达到最高值且与胁迫0 h时差异显著; *AdRAV3* 基因的相对表达量随胁迫时间延长呈现逐渐下降的变化趋势(图5-C),且在胁迫4、12和48 h时与胁迫0 h时差异显著。

总体上看,NaCl 胁迫12 h时, *AdRAV1* 和 *AdRAV2* 基因的相对表达量明显提高,且明显高于 *AdRAV3* 基因的相对表达量;在整个胁迫过程中, *AdRAV3* 基因的相对表达量低于 *AdRAV1* 和 *AdRAV2* 基因,而后二者相对表达量的差异较小。



\* : 表示与处理0 h 差异显著 ( $P < 0.05$ ) Representing the significant difference with treating for 0 h ( $P < 0.05$ ).

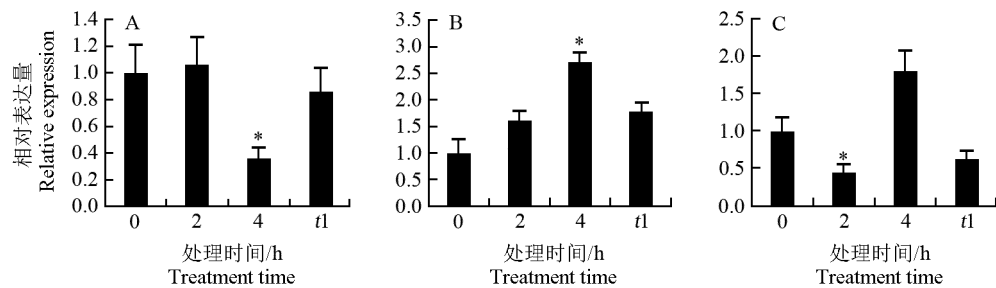
A: *AdRAV1*; B: *AdRAV2*; C: *AdRAV3*.

图5 NaCl(0.2 mol·L<sup>-1</sup>)胁迫条件下‘金魁’猕猴桃扦插苗3个 *AdRAVs* 基因相对表达量的变化  
Fig. 5 Change in relative expression of three *AdRAVs* genes from cutting seedling of *Actinidia deliciosa* ‘Jinkui’ under condition of NaCl (0.2 mol·L<sup>-1</sup>) stress

2.2.3 高温胁迫条件下3个 *AdRAVs* 基因的表达特性 在48℃高温胁迫条件下‘金魁’猕猴桃组培苗3个 *AdRAVs* 基因的相对表达量见图6。

结果显示:在高温胁迫条件下, *AdRAV1* 基因的相对表达量在胁迫2 h时略高于胁迫0 h(图6-A),在

胁迫4 h时显著降低,在恢复培养6 h时虽明显升高但仍低于胁迫0 h; *AdRAV2* 基因的相对表达量随胁迫时间延长呈现逐渐升高的变化趋势,在胁迫4 h时达到最高且显著高于胁迫0 h,在恢复培养6 h时虽明显下降但仍高于胁迫0 h(图6-B); *AdRAV3* 基因的相对



t1: 胁迫4 h后于23℃条件下恢复培养6 h Recovery culturing for 6 h under 23℃ condition after stressed for 4 h; \* : 表示与处理0 h 差异显著 ( $P < 0.05$ ) Representing the significant difference with treating for 0 h ( $P < 0.05$ ).

A: *AdRAV1*; B: *AdRAV2*; C: *AdRAV3*.

图6 高温(48℃)胁迫条件下‘金魁’猕猴桃组培苗3个 *AdRAVs* 基因相对表达量的变化  
Fig. 6 Change in relative expression of three *AdRAVs* genes from tissue culture seedling of *Actinidia deliciosa* ‘Jinkui’ under condition of high temperature (48℃) stress

表达量在胁迫2 h时显著低于胁迫0 h,在胁迫4 h时虽明显升高但仅略高于胁迫0 h,在恢复培养6 h时明显下降且略低于胁迫0 h(图6-C)。

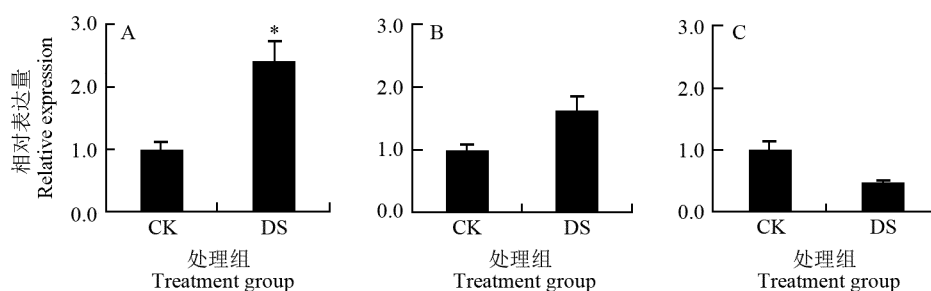
总体上看,在实验过程中,*AdRAV2* 基因的相对表达量相对较高,特别是在胁迫4 h和恢复培养6 h时,其相对表达量明显高于*AdRAV1* 和*AdRAV3* 基因。

2.2.4 经干旱胁迫处理后3个*AdRAVs* 基因的表达特性 经干旱胁迫处理14 d后,‘金魁’猕猴桃扦插苗3个*AdRAVs* 基因的相对表达量见图7。

结果显示:经干旱胁迫14 d后,*AdRAV1* 和

*AdRAV2* 基因的相对表达量均高于对照(正常浇水)(图7-A,B),其中,*AdRAV1* 基因的相对表达量与对照差异显著;*AdRAV2* 基因的相对表达量与对照差异不显著;*AdRAV3* 基因的相对表达量低于对照,但无显著差异(图7-C)。

总体上看,对照条件下3个*AdRAVs* 基因的相对表达量基本处于同一水平;但经干旱胁迫14 d后,3个*AdRAVs* 基因中,*AdRAV2* 基因的相对表达量显著提高,而*AdRAV3* 基因的相对表达量则有所降低。



CK: 对照(正常浇水) The control (normal watering); DS: 干旱胁迫 Drought stress. \*: 表示与对照差异显著( $P < 0.05$ ) Representing the significant difference with the control ( $P < 0.05$ ).

A: *AdRAV1*; B: *AdRAV2*; C: *AdRAV3*.

图7 干旱胁迫14 d后‘金魁’猕猴桃扦插苗3个*AdRAVs* 基因相对表达量的变化

Fig. 7 Change in relative expression of three *AdRAVs* genes from cutting seedling of *Actinidia deliciosa* ‘Jinkui’ after drought stressed for 14 d

### 3 讨论和结论

相关研究结果表明:植物激素和环境因子胁迫均能够诱导植物*RAV* 基因的表达。Sohn等<sup>[10]</sup>和Kim等<sup>[17]</sup>认为,SA、乙烯和NaCl胁迫均能够显著诱导辣椒品种‘Bukang’(*Capsicum annuum* ‘Bukang’)中*CaRAV1* 基因的表达,而ABA、甘露醇和冷害胁迫则对该基因的表达无明显影响;SA、MeJA、乙烯和ABA处理以及NaCl胁迫、冷害和伤害均能够显著诱导辣椒品种‘Nockwang’(*C. annuum* ‘Nockwang’)中*CaRAV1* 基因的表达。Zhuang等<sup>[18]</sup>认为,受低温、NaCl和聚乙二醇(PEG)胁迫后油菜品种‘HuYou 15’(*Brassica napus* ‘HuYou 15’)的*BnaRAV-1-HY15* 基因均可表达,但该基因表达不受ABA诱导。吴致君等<sup>[19]</sup>的研究结果表明:高温、低温和NaCl胁迫均能够诱导茶树品种‘安吉白茶’(*Camellia sinensis* ‘Anjibaica’)和‘迎霜’(*C. sinensis* ‘Yingshuang’)中

*CsRAV2* 基因的表达,PEG胁迫则对该基因的表达无明显影响。综上所述,不同植物种类或不同作物品种以及不同基因家族成员在植物激素和环境胁迫条件下的表达模式各异。

本研究中,0.1 mmol · L<sup>-1</sup> SA、0.05 mmol · L<sup>-1</sup> MeJA、0.01 mmol · L<sup>-1</sup> ACC和0.01 mmol · L<sup>-1</sup> ABA处理后4和12 h‘金魁’猕猴桃组培苗*AdRAV1* 基因的相对表达量均显著提高,但经0.01 mmol · L<sup>-1</sup> ABA处理后该基因的相对表达量则未能显著提高;而这4种植物激素处理后48 h‘金魁’猕猴桃*AdRAV2* 和*AdRAV3* 基因的相对表达量显著降低,处理后4和12 h*AdRAV3* 基因的相对表达量也显著降低。4℃低温胁迫能够诱导*AdRAV1* 基因的表达但诱导效果不显著,胁迫48 h能显著诱导*AdRAV3* 基因的表达,但4℃低温胁迫对*AdRAV2* 基因的表达无明显影响。0.2 mol · L<sup>-1</sup> NaCl胁迫12 h能显著诱导*AdRAV1* 和*AdRAV2* 基因的表达,并显著抑制*AdRAV3* 基因的表达。48℃高温胁迫2 h能显著抑制*AdRAV3* 基因的表

达,而胁迫 4 h 能显著诱导 *AdRAV2* 基因的表达并显著抑制 *AdRAV1* 基因的表达。干旱胁迫 14 d 能诱导 *AdRAV1* 和 *AdRAV2* 基因的表达,并且对 *AdRAV1* 基因的表达有显著影响,但对 *AdRAV3* 基因的表达有一定抑制效应。因此,在不同植物激素处理及环境胁迫条件下‘金魁’猕猴桃 *AdRAVs* 基因的表达模式各异,它们的基因功能也存在差异。

依据上述实验结果,推测‘金魁’猕猴桃的 *AdRAV1*、*AdRAV2* 和 *AdRAV3* 基因可能参与 SA、MeJA、ACC 和 ABA 信号转导途径;并且,*AdRAV1* 基因还可能参与植株抵抗盐害、高温和干旱胁迫的过程,*AdRAV2* 基因还可能参与植株抵抗盐害和高温胁迫的过程,*AdRAV3* 基因还可能参与植株抵抗冷害、盐害和高温胁迫的过程。然而,关于‘金魁’猕猴桃这 3 个 *AdRAVs* 基因的功能则需要通过转基因技术或基因敲除技术等进行进一步的深入研究。

#### 参考文献:

- [1] 张计育,王庆菊,郭忠仁. 植物 AP2/ERF 类转录因子研究进展[J]. 遗传, 2012, 34(7): 835-847.
- [2] 张慧敏,张雷,马永硕,等. 调控黄瓜苦味基因 *Bi* 的 AP2/ERF 家族转录因子[J]. 园艺学报, 2014, 41(4): 672-680.
- [3] NAKANO T, SUZUKI K, FUJIMURA T, et al. Genome-wide analysis of the ERF gene family in *Arabidopsis* and rice[J]. *Plant Physiology*, 2006, 140(2): 411-432.
- [4] ZHUANG J, PENG R H, CHENG Z M, et al. Genome-wide analysis of the putative AP2/ERF family genes in *Vitis vinifera*[J]. *Scientia Horticulturae*, 2009, 123(1): 73-81.
- [5] ZHUANG J, CAI B, PENG R H, et al. Genome-wide analysis of the AP2/ERF gene family in *Populus trichocarpa*[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008, 371(3): 468-474.
- [6] ZHUANG J, DENG D X, YAO Q H, et al. Discovery, phylogeny and expression patterns of AP2-like genes in maize[J]. *Plant Growth Regulation*, 2010, 62(1): 51-58.
- [7] ZHUANG J, YAO Q H, XIONG A S, et al. Isolation, phylogeny and expression patterns of AP2-like genes in apple (*Malus × domestica* Borkh.)[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2010, 29(1): 209-216.
- [8] ALONSO J M, STEPANOVA A N, LEISSE T J, et al. Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*[J]. *Science*, 2003, 301: 653-657.
- [9] HU Y X, WANG Y H, LIU X F et al. *Arabidopsis* RAV1 is down-regulated by brassinosteroid and may act as a negative regulator during plant development[J]. *Cell Research*, 2004, 14(1): 8-15.
- [10] SOHN K H, LEE S C, JUNG H W, et al. Expression and functional roles of the pepper pathogen-induced transcription factor RAV1 in bacterial disease resistance, and drought and salt stress tolerance[J]. *Plant Molecular Biology*, 2006, 61(6): 897-915.
- [11] ZHANG J Y, HUANG S N, MO Z H, et al. De novo transcriptome sequencing and comparative analysis of differentially expressed genes in kiwifruit under waterlogging stress [J]. *Molecular Breeding*, 2015, 35(11): 208.
- [12] 张计育,佟兆国,高志红,等. SA、MeJA、ACC 和苹果轮纹病病原菌诱导湖北海棠 *MhWRKY1* 基因的表达[J]. 中国农业科学, 2011, 44(5): 990-999.
- [13] 张计育,渠慎春,董畅,等. 水杨酸诱导湖北海棠全长 cDNA 文库的构建及应用[J]. 西北植物学报, 2010, 30(8): 1527-1533.
- [14] YIN X R, ALLAN A C, ZHANG B, et al. Ethylene-related genes show a differential response to low temperature during ‘Hayward’ kiwifruit ripening[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2009, 52(1): 9-15.
- [15] 张计育,乔玉山,渠慎春,等. 湖北海棠 *MhPRIa* 基因的克隆与表达特性分析[J]. 植物资源与环境学报, 2012, 21(3): 1-7.
- [16] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [17] KIM S Y, KIM Y C, LEE J H, et al. Identification of a CaRAV1 possessing an AP2/ERF and B3 DNA-binding domain from pepper leaves infected with *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* 8ra by differential display [J]. *Biochimica et Biophysica Acta: Gene Structure and Expression*, 2005, 1729(3): 141-146.
- [18] ZHUANG J, SUN C C, ZHOU X R et al. Isolation and characterization of an AP2/ERF-RAV transcription factor BnaRAV1-HY15 in *Brassica napus* L. HuYou15 [J]. *Molecular Biology Reports*, 2010, 38(6): 3921-3928.
- [19] 吴致君,黎星辉,房婉萍,等. 茶树 *CsRAV2* 转录因子基因的克隆与表达特性分析[J]. 茶叶科学 2014, 34(3): 297-306.

(责任编辑:佟金凤)