

湖北海棠 *MhPRIa* 基因的克隆与表达特性分析

张计育^{1,2}, 乔玉山¹, 渠慎春¹, 高志红¹, 郭忠仁^{2,①}, 章 镇^{1,①}

[1. 南京农业大学园艺学院, 江苏 南京 210095; 2. 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]

摘要: 以水杨酸诱导的湖北海棠 [*Malus hupehensis* (Pamp.) Rehd.] 全长 cDNA 文库和基因组 DNA 为模板, 克隆其 *PRIa* 基因 (*MhPRIa*) 的全编码区序列, 并对该序列进行生物信息学分析; 在此基础上利用荧光定量 RT-PCR 技术对湖北海棠根、茎和叶中该基因的表达特性及经过 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA、4 $^{\circ}\text{C}$ 低温处理及苹果蚜虫 (*Aphis citricola* van der Goot) 侵染后叶中该基因的表达特性进行了测定。结果表明: 克隆获得的 *MhPRIa* 基因全长 518 bp, 最大开放阅读框为 492 bp, 编码 162 个氨基酸残基; 编码的蛋白质为酸性蛋白, 其相对分子质量为 16 960, 等电点 pI 5.46; 其基因组 DNA 序列与 cDNA 序列完全一致, 说明 *MhPRIa* 基因内部没有内含子。湖北海棠 *MhPRIa* 基因与苹果 (*M. domestica* Borkh.) 和沙梨 [*Pyrus pyrifolia* (Burm. f.) Nakai] *PRI* 基因的 cDNA 序列及其编码的氨基酸序列同源性均较高, 其中 cDNA 序列的同源性均为 97%, 氨基酸序列的同源性分别为 95% 和 97%; 系统树也显示 *MhPRIa* 基因编码的氨基酸序列与苹果和沙梨的亲缘关系最近, 聚为一类。*MhPRIa* 基因编码的氨基酸序列具有 SCP 保守结构域, 含有 1 个信号肽和 6 个保守的半胱氨酸残基。在湖北海棠的叶、茎和根中 *MhPRIa* 基因均能表达, 在根中的表达量最高。10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA 和 4 $^{\circ}\text{C}$ 低温处理 48 h 后均可诱导 *MhPRIa* 基因的表达, 且相对表达量明显高于对照 (处理 0 h); 苹果蚜虫也可诱导 *MhPRIa* 基因的表达, 说明 *MhPRIa* 基因在湖北海棠抵抗植食昆虫和低温胁迫的过程中可能发挥着重要作用。

关键词: 湖北海棠; *MhPRIa*; 克隆; 序列; 表达特性; 胁迫

中图分类号: Q78; S661.4.035.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-7895(2012)03-0001-07

Cloning and expression characteristics analysis of *MhPRIa* gene in *Malus hupehensis* ZHANG Ji-yu^{1,2}, QIAO Yu-shan¹, QU Shen-chun¹, GAO Zhi-hong¹, GUO Zhong-ren^{2,①}, ZHANG Zhen^{1,①} (1. College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Institute of Botany, Jiangsu Province and the Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2012, 21(3): 1-7

Abstract: Taking full-length cDNA library and genomic DNA of *Malus hupehensis* (Pamp.) Rehd. treated by salicylic acid (SA) as the templates, the whole coding region sequence of *PRIa* gene of *M. hupehensis* (*MhPRIa*) was cloned and its bioinformatics was analyzed. On the basis, the expression characteristics of *MhPRIa* gene in root, stem and leaf of *M. hupehensis* and that in leaf after treated by 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA, 4 $^{\circ}\text{C}$ low temperature and infected by *Aphis citricola* van der Goot were determined by fluorescence quantitative RT-PCR technology. The results show that the full length of *MhPRIa* gene is 518 bp with the biggest open reading frame of 492 bp, it encodes 162 amino acid residues, its encoding protein is acidic protein with a relative molecular weight of 16 960 and isoelectric point of pI 5.46. Its genomic DNA sequence is full identical with its cDNA sequence, indicating that there is no intron in *MhPRIa* gene. The homology of cDNA sequence of *MhPRIa* gene of *M. hupehensis* and *PRI* gene of *M. domestica* Borkh. and *Pyrus pyrifolia* (Burm. f.) Nakai and that of amino acid sequence encoded by those genes all are higher. In which, both homology of cDNA sequence reach 97%, while that of amino acid sequence reaches 95% and 97%, respectively. Also, phylogenetic tree shows that amino acid sequence encoded by *MhPRIa* gene has a closest genetic relationship with that of *M. domestica* and *P. pyrifolia*,

收稿日期: 2011-09-02

基金项目: 国家“863”计划项目(2011AA100204); 现代园艺科学优势学科建设工程专项资金项目

作者简介: 张计育(1982—), 男, 山西沁县人, 博士, 助理研究员, 主要从事果树分子生物学研究。

①通信作者 E-mail: zhongrenguo@cnbg.net; zhangzh@njau.edu.cn

which are clustered together. The amino acid sequence encoded by *MhPRIa* gene contains a conserved SCP domain, including one signal peptide and six conserved cysteine residues. *MhPRIa* gene can express in leaf, stem and root of *M. hupehensis* with the highest expression in root. The expression of *MhPRIa* gene can be induced after treated by $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA and $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ low temperature for 48 h, and the relative expression is obviously higher than that of the control (treated for 0 h). And the expression of *MhPRIa* gene can also be induced by *Aphis citricola*. It is suggested that *MhPRIa* gene may play an important role in resistance of *M. hupehensis* to phytophagous insects and low temperature stresses.

Key words: *Malus hupehensis* (Pamp.) Rehd.; *MhPRIa*; cloning; sequence; expression characteristics; stress

植物的系统获得性抗病性(systemic acquired resistance, SAR)是植物受到病原菌感染后所激发的一种防卫反应。这种反应由植物抗病基因(*R*)与病原菌无毒基因(*Avr*)相互识别开始,由*R*基因下游的一些基因整合不同的抗病信号,通过水杨酸(salicylic acid, SA)将抗病信号传递下去。这一信号途径在SA下游受非诱导免疫(*NIM/NPR*)基因的调控,激活病程相关蛋白非表达子(*non-expression of pathogenesis related genes 1, NPR1*),其编码的NPR1蛋白由细胞质进入细胞核,与*bZIP*类转录因子*TGA*相互作用,进而诱导病程相关蛋白基因(*pathogenesis related genes, PRs*)的表达,最终建立具有广谱抗性的SAR^[1-7]。病程相关蛋白基因是SAR下游的关键基因,对病原微生物具有直接的抵抗作用。近几十年来,有关病程相关蛋白基因的研究主要集中于禾本科(Poaceae)植物,对木本植物尤其是果树中病程相关蛋白基因的研究很少。而*PRI*基因是病程相关蛋白基因之一,是许多物种SAR的标记基因,在植物的抗病过程中起着非常重要的作用^[4,8-9]。有关*PRI*基因在SAR方面的作用已有较为深入的研究,但针对该基因在抗逆境胁迫以及抗虫方面的作用研究尚不多见。

湖北海棠[*Malus hupehensis* (Pamp.) Rehd.]是苹果(*M. domestica* Borkh.)的重要砧木之一,具有较强的抗逆境能力。相关研究表明^[10-11]:SA、MeJA和ACC可以诱导湖北海棠*PRIa*基因的表达,苹果轮纹病菌(*Physalospora piricola* Nose)也可以诱导该基因的表达。说明湖北海棠*PRIa*基因参与SAR,是湖北海棠SAR中的标记基因,并且可能参与SA和JA/ET介导的交叉通路。

为了更全面了解和研究湖北海棠中*PRIa*基因的功能,作者以经过水杨酸处理的湖北海棠为实验材料,根据苹果的*PRIa*基因序列,在其编码区的两端

设计基因特异引物对其全长cDNA文库和基因组DNA进行PCR扩增,克隆得到*PRIa*基因的cDNA和相应的基因组DNA序列,利用多种生物信息学软件对序列进行分析,并利用荧光定量RT-PCR技术分析该基因在湖北海棠各组织(叶、茎、根)中的表达特性,以及经过植物激素ABA和苹果蚜虫(*Aphis citricola* van der Goot)生物胁迫及 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温非生物胁迫处理后的表达特性,以期为进一步通过基因工程技术手段培育多抗性苹果新品种奠定理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

实验用湖北海棠组培苗由山东农业大学郝玉金教授惠赠。使用的dNTPs、DL2000 Marker、*rTaq* DNA聚合酶、ABA、DNA消化酶、反转录试剂盒和pMD18-T载体等均购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.2 方法

1.2.1 *MhPRIa*基因的克隆和测序 水杨酸处理条件以及湖北海棠叶总RNA提取、全长cDNA文库的构建和保存均参照文献[12]的方法进行;基因组DNA的提取以及基因组DNA中RNA的消化参考佟兆国等^[13]的方法。将全长cDNA文库和基因组DNA均稀释10倍,用于*MhPRIa*基因的克隆。

根据GenBank中登录的苹果*PRIa*基因序列(登录号:DQ318212)设计特异引物PR1F1和PR1R1,引物序列分别为:5'-CATTAACATGGGGTTGTGCAAT-3'以及5'-AGAGTGGTTGTTGATTCCTCCATAG-3'。cDNA序列和基因组DNA序列的扩增条件相同,反应体系总体积均为25 μL ,包含1.0 μL 模板、2.5 μL 10 \times PCR缓冲液、2.0 μL 2.5 mmol \cdot L⁻¹ dNTPs、1.5 μL 25 mmol \cdot L⁻¹ MgCl₂、10 $\mu\text{mol} \cdot$ L⁻¹上下游引物各

1 μL 和 0.125 μL 5 U \cdot μL^{-1} *Taq* DNA 聚合酶,用双蒸水补足至 25 μL 。PCR 反应程序为:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,54 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,共 35 个循环反应;最后于 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。取 10 μL PCR 扩增产物用质量体积分数 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳检测。

按照琼脂糖凝胶回收试剂盒说明书进行目的片段的回收,将回收片段与 pMD18-T 载体连接,转化大肠杆菌感受态细胞 DH5 α ,并进行蓝白斑筛选,挑取白色菌落,通过 PCR 鉴定筛选阳性克隆,交由华大生物技术有限公司进行测序。

1.2.2 *MhPRIa* 基因核苷酸和氨基酸的序列分析
将测序得到的 *MhPRIa* 基因的核苷酸序列和推导出的氨基酸序列分别在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 上用 BLASTn 和 BLASTp 进行序列相似性分析;用 BioEdit 软件中的 Clustal W 程序对 GenBank 数据库中收录的各物种 *PRI* 基因序列进行多序列比对,并通过邻接法用 MEGA 4.0 软件绘制无根分子进化树。用 ProtParam 软件 (<http://au.expasy.org/tools/protparam.html>) 分析克隆获得的 *MhPRIa* 基因编码蛋白质的相对分子质量和等电点等理化性质;利用 Signal P 程序分析 N-末端的信号肽序列 (<http://genome.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)。

1.2.3 *MhPRIa* 基因表达特性分析 将湖北海棠组培苗在温度 23 $^{\circ}\text{C}$ ~ 25 $^{\circ}\text{C}$ 、光照时间 16 h \cdot d $^{-1}$ 和光照度 12 000 lx 的条件下进行生根培养,生根培养基为含 0.1 mg \cdot L $^{-1}$ IBA 的 1/2MS 培养基;生根培养 3 周后进行 ABA 和低温处理。ABA 处理方法为:将 10 $\mu\text{mol} \cdot$ L $^{-1}$ ABA 溶液喷于组培苗叶片上,每株 2 mL,

只喷洒 1 次,4、12 和 48 h 后分析基因的表达情况。低温处理方法为:将组培苗放在培养箱中于 4 $^{\circ}\text{C}$ 分别培养 4、12 和 48 h。2010 年 5 月上旬选取 2 年生湖北海棠盆栽苗进行苹果蚜虫处理,方法为:将蚜虫置于叶片上侵染 1 周。取经过前述处理的湖北海棠叶片,迅速置于液氮中冷冻,-70 $^{\circ}\text{C}$ 保存、备用。每处理 4 株苗,各重复 3 次。分别取生根培养 3 周的组培苗根、茎、叶进行组织特异性表达分析,各重复 3 次。

参考蔡斌华等^[14]的方法进行总 RNA 的提取,根据 DNA 消化酶(编号:D2215)使用说明书的方法进行总 RNA 中 DNA 的消化;取 1 μg 消化后的总 RNA,参考反转录说明书进行 cDNA 第一链的合成,将合成的 cDNA 第一链稀释 10 倍后于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。根据 *MhPRIa* 序列和 GenBank 登录的湖北海棠 *Mhtubulin* 序列(登录号:GU317944)设计引物,*MhPRIa* 引物 PR1F2 和 PR1R2 的序列分别为:5'-CCACAAAGAG AACAAACCATTAAC-3'和 5'-GACCAACGCCTACTG CTG-3';*Mhtubulin* 引物 TF 和 TR 的序列分别为:5'-AGGATGCTACAGCCGATGAG-3'和 5'-GCCGAAGAA CTGACGAGAATC-3'。参照张计育等^[15]的方法进行荧光定量 RT-PCR 分析,采用 7300 Real Time PCR System 软件和 2 $^{-\Delta\Delta\text{C}_T}$ 方法^[16]进行数据分析。

2 结果和分析

2.1 湖北海棠 *MhPRIa* 基因的克隆与序列分析

根据 GenBank 登录的苹果基因序列设计特异引物,对湖北海棠全长 cDNA 文库进行 PCR 扩增,并推导出相应的氨基酸序列,测序和分析结果见图 1。

```

1  CATTAAC ATG GGG TTG TGC AAT ATT TCC CTA GCT CTC CTT TTA ATT TTA GGC TCA GCC CTA ATA CAAT CCT CTCT CAT GCC CAAG AC A CA
   M G L C N I S L A L F I L G S A L I Q S S H A Q D T
89  CCCCAAGACTCACTCAATCCCACAAACGCCGCTCGAGCAGCAGTAGGCGTTGCTCCCTTGACGTTGGCATGACAATCTAGCAGGCTATGCA
   P Q D Y L N S H N A A R A A V G V G P L T W D N V A G Y A
179 CAAAACACTACGCCAACCAACATGTTGGCGACTGCCAATCTCGTGCATCCGGTGGCCATACGGTGA AAAACCTTGCCATGAGCAGCTGGTAC
   Q N Y A N Q H V G D C N L V H S G G P Y G E N L A M S T G D
269 ATCTCGGCAACAGCGGCTCTGACCTGTGGTGGCGGAGAAAGCCGACTACAGTTATGAGTCCAACTCCTGTGCTGCTGGAAGCTGTGT
   M S G T A A V D L W V A E K A D Y S Y E S N S C A A G K V C
359 GGGCATTATACAGGTGTTGGCGTAACTGGCTGCTGAGGTCGCGAAAAGTGAGCTGCAGCACTGGGGTACCTTCATTGGATGC
   G H Y T Q V V W R N S A R V G C A K V R C S S G G T F I G C
449 AACTATGATCCCCAGGCAACTATGTTGGCGAGAAGCCTTACTAGCTATGGAAGAATCAACAACCACTCT
   N Y D P P G N Y V G E K P Y *

```

*: 终止密码子 Stop codon.

图 1 湖北海棠 *MhPRIa* 基因的 cDNA 序列及推导的氨基酸序列

Fig. 1 The cDNA sequence and deduced amino acid sequence of *MhPRIa* gene of *Malus hupehensis* (Pamp.) Rehd.

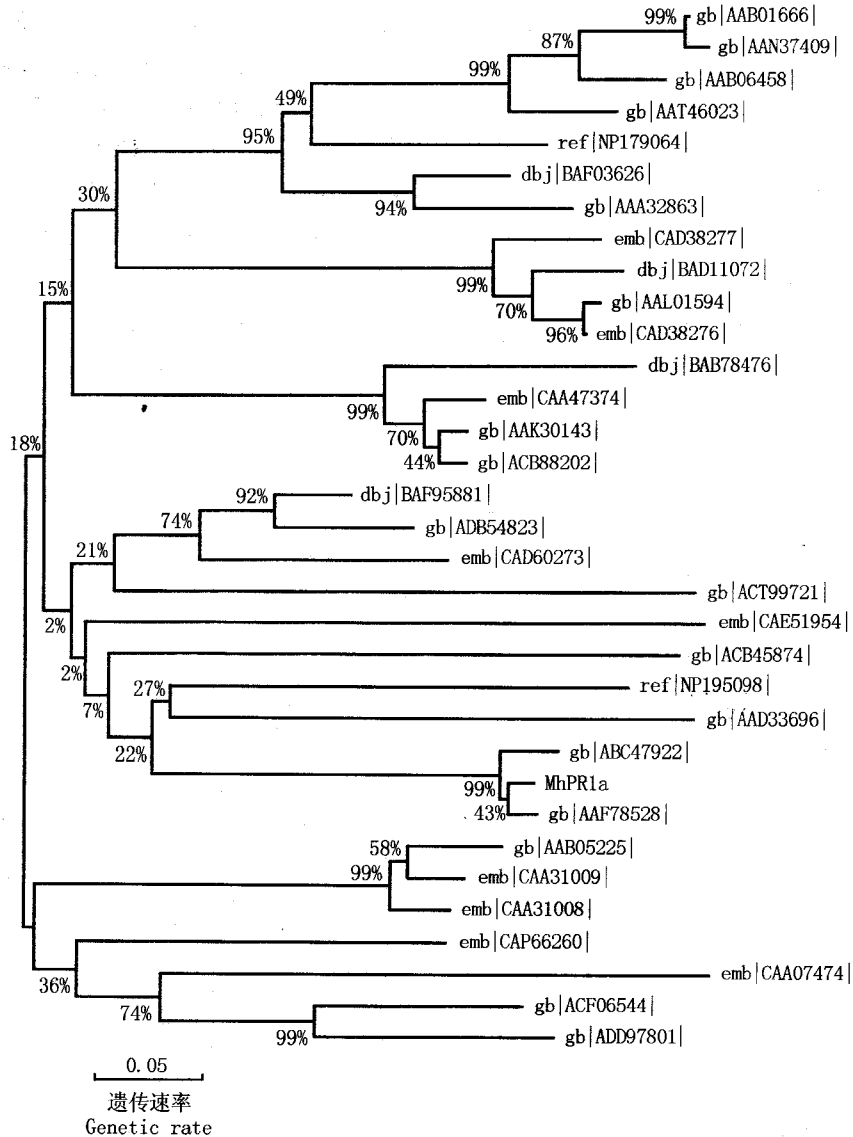
由图1可见:扩增得到的片段长度为518 bp,最大开放阅读框为492 bp,共编码162个氨基酸残基,其编码的蛋白质相对分子质量为16 960,命名为*MhPR1a*。通过比较可见:获得的基因组DNA序列与cDNA序列完全一致,说明*MhPR1a*基因内部没有内含子。

2.2 湖北海棠*MhPR1a*基因编码的氨基酸序列分析

湖北海棠*MhPR1a*基因的cDNA序列与苹果和

沙梨[*Pyrus pyrifolia* (Burm. f.) Nakai] *PR1* 基因的cDNA序列(GenBank登录号分别为DQ318212和AF195237)的同源性较高,均为97%;湖北海棠*MhPR1a*基因编码的氨基酸序列与苹果、沙梨和葡萄(*Vitis vinifera* L.) *PR1* 基因编码的氨基酸序列(GenBank登录号分别为ABC47922、AAF78528和BAF95881)的同源性分别达95%、97%和64%。

由系统发育树(图2)可见:湖北海棠*MhPR1a*基



MhPR1a: 湖北海棠*MhPR1a*基因编码的氨基酸序列 Amino acid sequence encoded by *MhPR1a* gene of *Malus hupehensis* (Pamp.) Rehd.; gb|ABC47922|: 苹果 *PR1* 基因编码的氨基酸序列 Amino acid sequence encoded by *PR1* gene of *M. domestica* Borkh.; gb|AAF78528|: 沙梨 *PR1* 基因编码的氨基酸序列 Amino acid sequence encoded by *PR1* gene of *Pyrus pyrifolia* (Burm. f.) Nakai; 另外的登录号代表 NCBI 中其他植物 *PR1* 基因编码的氨基酸序列 Other accession numbers represent the amino acid sequences encoded by *PR1* gene of other plants in NCBI. 百分数表示分支的自展支持率 Percentages indicate the bootstrap values of branches.

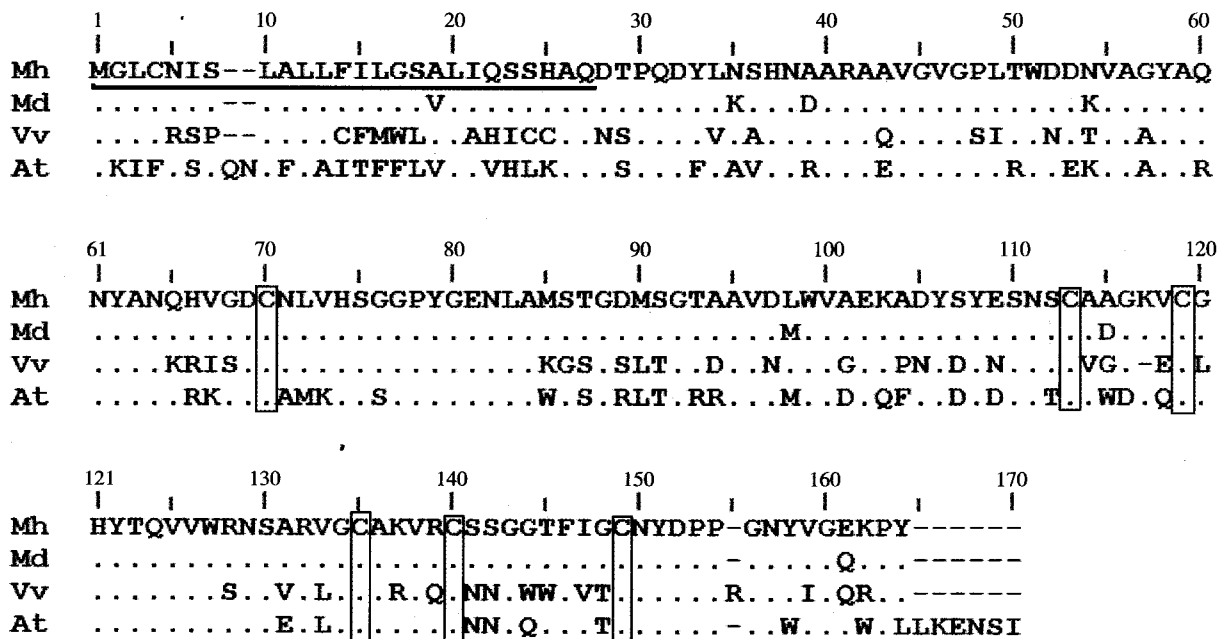
图2 基于 *PR1* 基因编码的氨基酸序列的湖北海棠和其他植物的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of *Malus hupehensis* (Pamp.) Rehd. and other species based on amino acid sequences encoded by *PR1* gene

因编码的氨基酸序列与苹果和沙梨 *PRI* 基因编码的氨基酸序列亲缘关系最近,聚为一类。推导出的湖北海棠 *MhPRIa* 基因编码的蛋白质等电点为 pI 5.46; 为酸性蛋白。

湖北海棠 *MhPRIa* 基因编码的氨基酸序列与苹果、葡萄和拟南芥 [*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.] *PRI* 基因编码的氨基酸序列的对比分析结果见图 3。

结果表明:拟南芥 *PRI* 基因编码的氨基酸序列含有 169 个氨基酸残基,而苹果和葡萄 *PRI* 基因编码的氨基酸序列以及湖北海棠 *MhPRIa* 基因编码的氨基酸序列均含有 161 个氨基酸残基。湖北海棠 *MhPRIa* 基因编码的氨基酸序列具有植物防御体系中病程相关蛋白 SCP 的保守结构域,并含有 1 个信号肽和 6 个保守的半胱氨酸残基。



Mh: 湖北海棠 *Malus hupehensis* (Pamp.) Rehd.; Md: 苹果 *Malus domestica* Borkh.; Vv: 葡萄 *Vitis vinifera* L.; At: 拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. 序列上方的数字表示氨基酸残基的位点 Digital above sequences indicate the site of amino acid residues; “.”: 与第 1 行的氨基酸残基相同 Representing the same amino acid residue as the first row; -: 氨基酸残基缺失 Amino acid residue deletes; 下划线表示信号肽 Underline indicates the signal peptide; 方框表示保守的半胱氨酸残基 Boxes show the conserved cysteine residues.

图 3 湖北海棠 *MhPRIa* 基因以及其他植物 *PRI* 基因编码的氨基酸序列比较

Fig. 3 Comparison of amino acid sequences encoded by *MhPRIa* gene of *Malus hupehensis* (Pamp.) Rehd. and *PRI* gene of other species

2.3 湖北海棠 *MhPRIa* 基因的表达特性分析

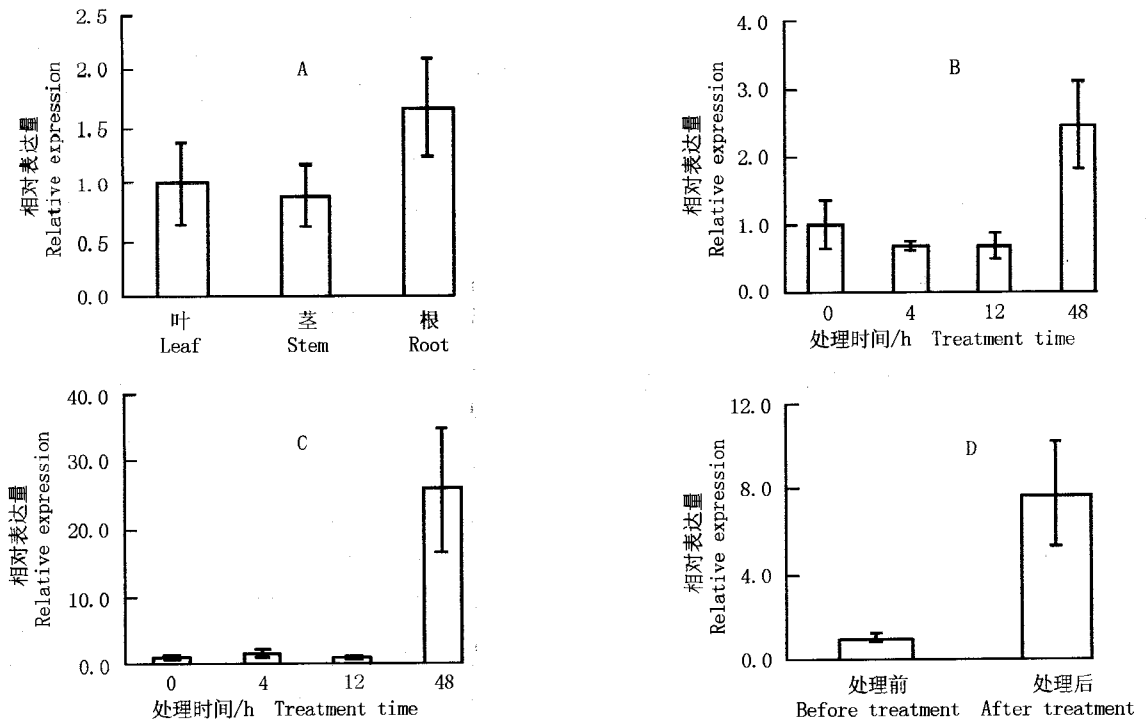
用 *Mhtubulin* 作为内参基因,通过荧光定量 RT-PCR 技术分析了 *MhPRIa* 基因在湖北海棠各组织(叶、茎、根)中的表达特性,以及经过 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA 处理和苹果蚜虫(生物胁迫)侵染及 $4 \text{ } ^\circ\text{C}$ 低温(非生物胁迫)处理后湖北海棠 *MhPRIa* 基因的表达特性,结果见图 4。由图 4-A 可见:在湖北海棠的根、茎和叶中均可以检测到 *MhPRIa* 基因的相对表达量,且在根中的相对表达量最高,茎中的相对表达量最低。

在 ABA 处理后的 12 h 内, *MhPRIa* 基因的相对表达量均低于对照(处理 0 h); 处理 48 h 后, 该基因

的相对表达量明显增加(图 4-B)。与对照(处理 0 h)相比,在 $4 \text{ } ^\circ\text{C}$ 低温处理的 12 h 内, *MhPRIa* 基因的相对表达量没有明显变化; 处理 48 h 后, 该基因的相对表达量显著增加(图 4-C)。苹果蚜虫侵染后湖北海棠 *MhPRIa* 基因的相对表达量较侵染前显著增加(图 4-D)。

3 讨论和结论

序列分析结果表明:采用根据 GenBank 中登录的苹果 *PRIa* 基因序列设计的特异引物,从湖北海棠中克隆获得的基因组 DNA 序列和 cDNA 序列完全一



A: 组织特异性表达量 Tissue specific expression; B: $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA 处理后的表达量 Expression after treated by $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA; C: $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 低温处理后的表达量 Expression after treated by low temperature of $4 \text{ }^\circ\text{C}$; D: 苹果蚜虫处理后的表达量 Expression after treated by *Aphis citricola* van der Goot.

图4 湖北海棠 *MhPRIa* 基因的表达特性分析
Fig. 4 Analysis on expression characteristics of *MhPRIa* gene of *Malus hupehensis* (Pamp.) Rehd.

致,命名为 *MhPRIa*,序列全长 518 bp,编码 162 个氨基酸残基;*MhPRIa* 基因编码的蛋白质相对分子质量为 16 960,推测该蛋白质的等电点为 pI 5.46。湖北海棠 *MhPRIa* 基因的 cDNA 序列及其编码的氨基酸序列与苹果和沙梨 *PR1* 基因的 cDNA 序列及其编码的氨基酸序列的同源性较高,均在 95% 以上;该基因编码的氨基酸序列具有 1 个信号肽和 6 个保守的半胱氨酸残基。

Santamaria 等^[17] 从拟南芥中分离出 *AtPR1* 基因,并认为该基因在拟南芥的根、茎和花中均能够表达,但在叶片中没有表达。本研究结果表明:*MhPRIa* 基因在湖北海棠的根、茎和叶中均能够表达,而且在根中的相对表达量最高。说明在不同植物间 *PR* 基因的组织特异性表达存在一定的差异。已有的研究表明:当植物受到病原菌和虫害侵染时,可以诱导体内病程相关蛋白基因的表达^[18];烟粉虱 (*Bemisia argentifolii* Bellows et Perring) 可以显著诱导番茄 (*Lycopersicon esculentum* Miller) 几丁质酶基因的表

达^[19];在抗性较强的水稻 (*Oryza sativa* L.) 品种中,褐稻虱 [*Nilaparvata lugens* (Stal)] 可以诱导几丁质酶活性的增强,并对褐稻虱有高度或中度的抗性^[20]。本研究表明:苹果蚜虫可以诱导湖北海棠 *MhPRIa* 基因的表达,说明 *MhPRIa* 基因可能在湖北海棠抗虫过程中发挥作用。Sarowar 等^[9] 的研究结果表明:在转基因烟草 (*Nicotiana tabacum* L.) 中,过量表达 *CABPR1* 基因可以提高烟草对重金属毒害的抵抗能力,但是未能增强烟草对盐和渗透胁迫的抵抗力;Hong 等^[8] 认为:在拟南芥中过量表达胡椒 (*Piper nigrum* L.) *PR1* 基因可以增强拟南芥植株的抗氧化胁迫能力。而在本研究中,低温可以诱导湖北海棠 *MhPRIa* 基因的表达,说明湖北海棠 *MhPRIa* 基因参与了植物抵抗冷害的过程。

综合分析结果表明:*PR1a* 基因在植物抗病过程中起着非常重要的作用,该基因的功能在不同种类间相对保守,但在抵抗其他逆境过程中,不同种类的 *PR1a* 基因的作用有一定差异。

参考文献:

- [1] RYALS J A, NEUENSCHWANDER U H, WILLITS M G, et al. Systemic acquired resistance [J]. *Plant Cell*, 1996, 8: 1809-1819.
- [2] ZHANG Y L, FAN W H, KINKEMA M, et al. Interaction of NPR1 with basic leucine zipper protein transcription factors that bind sequences required for salicylic acid induction of the *PR-1* gene [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96: 6523-6528.
- [3] ZHOU J M, TRIFA Y, SILVA H, et al. NPR1 differentially interacts with members of the TGA/OBF family of transcription factors that bind an element of the *PR-1* gene required for induction by salicylic acid [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2000, 13: 191-202.
- [4] DONG X N. NPR1, all things considered [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2004, 7: 547-552.
- [5] MOU Z L, FAN W H, DONG X N. Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes [J]. *Cell*, 2003, 113: 935-944.
- [6] TADA Y, SPOEL S H, PAJEROWSKA-MUKHTAR K, et al. Plant immunity requires conformational changes of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins [J]. *Science*, 2008, 321: 952-956.
- [7] LOAKE G, GRANT M. Salicylic acid in plant defence: the players and antagonists [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2007, 10: 466-472.
- [8] HONG J K, HWANG B K. Induction of enhanced disease resistance and oxidative stress tolerance by overexpression of pepper basic *PR-1* gene in *Arabidopsis* [J]. *Physiologia Plantarum*, 2005, 124: 267-277.
- [9] SAROWAR S, KIM Y J, KIM E N, et al. Overexpression of a pepper basic *pathogenesis-related protein 1* gene in tobacco plants enhances resistance to heavy metal and pathogen stresses [J]. *Plant Cell Reports*, 2005, 24: 216-224.
- [10] ZHANG J Y, DU X L, WANG Q J, et al. Expression of pathogenesis related genes in response to salicylic acid, methyl jasmonate and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in *Malus hupehensis* (Pamp.) Rehd. [J]. *BMC Research Notes*, 2010, 3: 208-213.
- [11] ZHANG J Y, QIAO Y S, LV D, et al. *Malus hupehensis* NPR1 induces pathogenesis-related protein gene expression in transgenic tobacco [J]. *Plant Biology*, 2012, 14: 46-56.
- [12] 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.
- [13] 佟兆国, 王富荣, 章镇, 等. 一种从果树成熟叶片提取 DNA 的方法 [J]. *果树学报*, 2008, 25(1): 122-125.
- [14] 蔡斌华, 张计育, 高志红, 等. 一种改良的提取草莓属叶片总 RNA 的方法 [J]. *江苏农业学报*, 2008, 24(6): 875-877.
- [15] 张计育, 佟兆国, 高志红, 等. SA、MeJA、ACC 和苹果轮纹病菌原菌诱导湖北海棠 *MhWRKY1* 基因的表达 [J]. *中国农业科学*, 2011, 44(5): 990-999.
- [16] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25: 402-408.
- [17] SANTAMARIA M, THOMSON C J, READ N D, et al. The promoter of a basic *PRI*-like gene, *AtPR1*, from *Arabidopsis* establishes an organ-specific expression pattern and responsiveness to ethylene and methyl jasmonate [J]. *Plant Molecular Biology*, 2001, 47: 641-652.
- [18] MUTHUKRISHNAN S, LIANG G H, TRICK H N, et al. Pathogenesis-related proteins and their genes in cereals [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2001, 64: 93-114.
- [19] MCKENZIE C L, SHATTERS R G, DOOSTDAR H, et al. Effect of geminivirus infection and *Bemisia* infestation on accumulation of pathogenesis-related proteins in tomato [J]. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 2002, 49: 203-214.
- [20] ALAGAR M, SURESH S, SARAVANAKUMAR D, et al. Feeding-induced changes in defence enzymes and PR proteins and their implications in host resistance to *Nilaparvata lugens* [J]. *Journal of Applied Entomology*, 2010, 134: 123-131.

(责任编辑: 佟金凤)