

沙向红,严建萍. 低温胁迫对幼苗期棉花根系 *ADHa* 与 *BADH* 表达的影响[J]. 江苏农业科学,2013,41(8):37-38.

低温胁迫对幼苗期棉花根系 *ADHa* 与 *BADH* 表达的影响

沙向红, 严建萍

(南通高等师范学校,江苏南通 226001)

摘要:海棉 7124 号棉花种子在常规花盆土壤中种植发芽,待棉花幼苗长至 2 叶 1 心时,将其随机分为对照组和试验组,分别置于常温(25 ℃)和低温(5 ℃)植物培养箱中,光照/黑暗 12 h 交替培养,每天适量浇水。各组分别在 0、12、24、48、96 h 取根尖组织,并提取 RNA,以逆转录、荧光定量 PCR 法测定亚型乙醇脱氢酶(*ADHa*)和甜菜碱醛脱氢酶(*BADH*)基因的表达。结果显示,在各时间点下,低温组 *ADHa* 和 *BADH* 表达量均明显高于常温组。说明幼苗期棉花根系 *ADHa* 和 *BADH* 表达量在低温胁迫条件下升高与低温抗逆性有关。

关键词:棉花;幼苗期;低温胁迫;*ADHa*; *BADH*; 表达

中图分类号: S562.01 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)08-0037-02

低温是影响作物分布和产量的最主要生态因子之一,也是农业生产田间条件下经常遇见的一种作物生长逆境。在低温胁迫下,作物体内的主要生理过程都会受到影响,植物光合作用降低,呼吸作用增强,蛋白质合成受阻,消耗增强,植物处于饥饿状态。因此,低温会严重影响植物正常生长发育,甚至会导致植物死亡,同时还会诱导相关多个基因的表达,以提高植物的抗逆性。棉花是长江中下游一带春季广泛种植的农作物,低温又是这一地区早春常见的气象特点,在棉花发育的初期阶段会影响棉花幼苗生长,对其生长产生不利影响,但棉花对低温逆境的响应表现出积极主动的应激过程。乙醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase, ADH)和甜菜碱醛脱氢酶(betaine-aldehyde dehydrogenase, BADH)都与植物的抗逆性相关。本研究通过海棉 7124 号亚型乙醇脱氢酶(*ADHa*)和 *BADH* 基因在低温胁迫下相对表达量的变化,研究低温对幼苗期棉花生长发育和生理特性的影响,以期为研究棉花作物抗寒机理提供一些理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

海棉 7124 号种子,由南通大学生命科学学院棉花分子育种课题组提供。RNAiso Plus 总 RNA 提取试剂盒、SYBR® PrimeScript™ RT-PCR Kit 购自 TaKaRa 公司,引物由上海英俊公司合成,其他各种化学试剂均为进口或国产分析纯。ABI 7500 Realtime-PCR 系统、ABI 2720 型 PCR 仪由美国

Applied Biosystems 公司生产。

1.2 方法

1.2.1 棉花幼苗的培养及低温处理 棉花种子置常规花盆土壤中发芽,待棉花长至 2 叶 1 心时,随机分为室温对照组、低温处理组,分别置于常温(25 ℃)和低温(5 ℃)植物培养箱中。通过培养箱自动控制进行光照/黑暗 12 h 交替培养,每天适量浇水。各组分别在 0、12、24、48、96 h 时取根尖组织,自来水下冲洗干净,立即提取 RNA。

1.2.2 总 RNA 的提取 剪取各组的根尖 4~5 根,每根约长 1 cm,置于匀浆器中,加入 RNAiso Plus 1 mL 抽提液研磨,静置 5 min,加入 0.2 mL 三氯甲烷,振荡混匀,静置 5 min,12 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液,加入等体积异丙醇,混匀,室温静置 10 min,12 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,用 75% 乙醇洗涤沉淀,12 000 r/min 离心 5 min,弃乙醇,待剩余乙醇完全挥发后,用适量的 DEPC 水溶解 RNA。

1.2.3 反转录 取各个样品的总 RNA 1 μL 进行反转录,依次加入 2 μL 5 × Buffer、0.5 μL Mix、0.5 μL 随机引物、1 μL RNA,DEPC 水补足至 10 μL。37 ℃ 保温 15 min,85 ℃ 保温 10 s,终止反应,-20 ℃ 保存。

1.2.4 Real-time PCR 反应 根据 GenBank 中登录的目的基因 *ADHa*、*BADH* 和内参 *actin* 序列,应用 NCBI Primer-blast 工具(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome)设计引物(表 1)。

表 1 引物资料

基因	GenBank 登录号	引物序列(3'→5')	预期产物长度(bp)
<i>ADHa</i>	AF085064	GATCAGTCCAACCGCCCCGC;CTTCAGCGCGGCAAGACCA	152
<i>BADH</i>	AY461804	TGGCGAGTGGAGAGAGCCCA;TACTTGGCACGGACACGCC	192
<i>actin</i>	EF464673	CACCACCACAGCCGAACGGG;CGGGGCATCTGAAACGTTACGA	173

以上述方法逆转录合成的 cDNA 为模板,按照 SYBR®

PrimeScript™ RT-PCR Kit II 试剂盒说明操作,每管总反应体积为 25 μL,其中 cDNA 模板 2 μL、上下游引物(10 pmol/μL)各 1 μL、2 × Mix 12.5 μL、水 8.5 μL。以 *actin* 为内参,并设 3 个重复管,以 0 h 为参考进行相对定量。采用 ABI 7500 Software 2.0.4 进行数据处理,使用 Microsoft Office Excel 2003 软

收稿日期:2013-02-05

作者简介:沙向红(1966—),女,江苏泰州人,副教授,研究方向为分子遗传学。Tel:(0513)81585691;E-mail:ntgsxh@163.com。

件作图。

2 结果与分析

2.1 低温胁迫下棉花的生长状况

常温对照组根系的主根和侧根长势良好,根毛发达,而低温胁迫组的主根、侧根、根毛细而短,随着时间的延长,室温对照组和低温胁迫组的差异逐步增大,低温胁迫组的幼苗明显

矮小,茎发软,叶萎靡不振,发育不良。

2.2 低温对 *ADHa* 表达的影响

由表 2 可知,与对照组相比,低温组 *ADHa* 表达量在各个时间点下均高于对照组,其中 24、96 h 时极显著 ($P < 0.01$),分别高 2.5、1.23 倍,而 12、48 h 的差异不显著。对照组和低温组的 *ADHa* 表达量呈现 2 个高峰时间,第 1 个高峰位于 24 h,第 2 个高峰位于 96 h。

表 2 低温对棉花幼根 *ADHa* 表达量的影响

处理	不同时间的 <i>ADHa</i> 表达量				
	0 h	12 h	24 h	48 h	96 h
对照	1.00 ± 0.36	0.11 ± 0.03	1.19 ± 0.33	0.55 ± 0.23	3.42 ± 0.75
低温	1.00 ± 0.36	0.41 ± 0.18	4.22 ± 1.15 *	1.34 ± 0.67	7.62 ± 1.15 *

注: * 表示在 0.01 水平差异显著 ($P < 0.01$)。表 3 同。

2.3 低温对 *BADH* 表达的影响

由表 3 可知,与常温对照组相比,在各个时间点下,低温胁迫组 *BADH* 表达量均高于对照组,其中 24、48、96 h 的差异

极显著 ($P < 0.01$),而 12 h 不显著。对照组和低温组的 *BADH* 表达量高峰均位于 24 h。

表 3 低温对棉花幼根 *BADH* 表达量的影响

处理	不同时间的 <i>BADH</i> 表达量				
	0 h	12 h	24 h	48 h	96 h
对照	1.00 ± 0.30	0.85 ± 0.35	6.16 ± 1.88	3.36 ± 1.89	2.10 ± 1.75
低温	1.00 ± 0.30	1.70 ± 0.87	10.80 ± 1.88 *	5.47 ± 1.92 *	4.22 ± 1.11 *

3 结论与讨论

温度对棉花生长发育、产量及产品质量的形成影响很大。低温是长江下游早春常见的环境因素,严重影响播期及苗期棉花生长发育。目前,对棉花生长、光合效率、生理生化特性、产量及品质等的影响研究较多,但关于低温胁迫对棉花生长发育以及各种代谢的影响机制还不清楚。

ADH 是广泛存在于植物体中的酶,与植物的抗逆生理有重要的关系,ADH 是植物在低氧状态下表达升高的主要酶系之一^[1]。赵森等采用荧光定量 PCR 技术测定了 FR13A 水稻水淹不同时间后叶片中 *ADH2* 表达量的变化,发现表达量高出很多倍^[2]。刘登望等观察到淹涝时花生根系 ADH 的活性大幅增加^[3]。本研究中,棉花在低温条件下,ADH 表达量相对于常温下呈现出显著上升的趋势。Christie 等 1991 年报道,冷害低温提高了玉米和水稻幼苗 ADH 活性和 *ADHa* 基因的表达量,这有利于幼苗在冷害逆境中的存活^[4]。本研究结果与上述研究的结论吻合。经低温驯化处理,冬小麦 ADH 活性提高了 2~3 倍,也提高了小麦随后的抗寒能力^[5]。低温环境下棉花 *ADHa* 的表达量促进了棉花体内的能量释放,从而提高了棉花的抗寒和应急能力,棉花和冬小麦的抗逆机制一致,笔者认为棉花的 *ADHa* 的抗逆性相对于小麦、水稻的更为显著。

研究表明,植物中甜菜碱醛脱氢酶的基因表达与多种非生物胁迫相关^[6-8]。本试验中棉花幼苗根系在低温胁迫下, *BADH* 的表达量明显高于常温组,24 h 时升高得最显著,随着胁迫时间延长,表达量呈下降趋势,但在各个时间点上仍高于

常温组。说明 *BADH* 的表达量与低温抗逆性相关。*ADHa* 和 *BADH* 表达量在 48 h 前变化相似,但 96 h 之后 *ADHa* 呈上升趋势,而 *BADH* 却呈下降趋势,说明二者对低温抗逆作用的途径和机制可能有差异,有待于进一步研究。

参考文献:

[1] Johnson J R, Cobb B G, Drew M C. Hypoxic induction of anoxia tolerance in roots of *ADH1* null *Zea mays* L. [J]. Plant Physiology, 1994, 105(1): 61-67.

[2] 赵 森, 陈永华, 陈 昊, 等. 荧光定量 PCR 检测淹涝胁迫下水稻 *ADH2* 基因的表达式变化 [J]. 中国生态农业学报, 2008, 16(2): 455-458.

[3] 刘登望, 李 林. 湿涝对幼苗期花生根系 ADH 活性与生长发育的影响及相互关系 [J]. 花生学报, 2007, 36(4): 12-17.

[4] Christie P J, Hahn M, Walbot V. Low-temperature accumulation of alcohol dehydrogenase-1 mRNA and protein activity in maize and rice seedlings [J]. Plant Physiology, 1991, 95(3): 699-706.

[5] Andrews C J. A comparison of glycolytic activity in winter wheat and two forage grasses in relation to their tolerance to ice encasement [J]. Annals of Botany, 1997, 79: 87-91.

[6] Khan M S, Yu X, Kikuchi A, et al. Genetic engineering of glycine betaine biosynthesis to enhance abiotic stress tolerance in plants [J]. Plant Biotechnology, 2009, 26: 125-134.

[7] 严建萍, 梁燕, 谭湘陵. 淹涝和低温胁迫对小麦幼根 *ADH* 与 *BADH* 表达的影响 [J]. 江苏农业科学, 2011, 39(6): 153-154.

[8] 严建萍, 梁 燕, 谭湘陵. 淹涝和低温胁迫对小麦幼根 *BADH* 表达的影响 [J]. 湖北农业科学, 2011, 50(23): 4804-4806.