

梁 燕. 盐胁迫下不同盐敏感型水稻幼根乙醇脱氢酶 3 的表达比较[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(11): 33–35.

# 盐胁迫下不同盐敏感型水稻幼根乙醇脱氢酶 3 的表达比较

梁 燕

(南通高等师范学校, 江苏南通 226001)

**摘要:** 为了比较盐胁迫下耐盐性不同水稻品种幼根中乙醇脱氢酶 3 (alcohol dehydrogenase 3, ADH3) 的表达变化, 将扬两优 6 号 (耐盐型) 和通梗 981 (敏盐型) 种子分别置于培养皿内的滤纸上, 加入 1/2 霍格兰氏液, 室温下促发芽。待幼根生长至 1 cm 时, 随机分为对照组和试验组。对照组仍置于 1/2 霍格兰氏液中, 试验组则置于含 100 mol/L NaCl 的 1/2 霍格兰氏液中, 各组分别在 0、12、24、48、96、192 h 取根, 提取 RNA, 逆转录, 荧光定量 PCR 法测定 ADH3 表达。结果发现, 在正常栽培条件下, 扬两优 6 号和通梗 981 幼根中 ADH3 表达未具有明显的差异性; 盐胁迫下, 扬两优 6 号幼根 ADH3 表达明显高于通梗 981。耐盐型水稻中 ADH3 表达的增加是对盐胁迫逆境的“适应性反应”, 提示 ADH3 基因与水稻的耐盐性相关。

**关键词:** 水稻; 耐盐型; 敏盐型; 盐胁迫; ADH3 表达

**中图分类号:** S511.01 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002–1302(2013)11–0033–02

近年来, 土壤盐碱化日益严重。据有关报道, 全球约 20% 的耕地存在不同程度的盐碱化, 而且还在不断加重。按照目前的趋势, 预计到 2050 年, 盐碱化耕地的面积将会超过耕地总面积的 50%<sup>[1]</sup>。而在我国的现有耕地中, 至少有 800 万  $\text{hm}^2$  的土地由于盐分积累不同程度地影响了作物的产量<sup>[2]</sup>。盐胁迫已成为限制作物生长和产量的主要非生物胁迫之一。

水稻属于中度盐敏感作物, 高盐度可使水稻产量减少和死亡率升高。长期以来, 研究者们对于水稻盐胁迫下的生理生化变化以及从分子、细胞、组织到整个植株耐盐机理遗传机制进行了深入的研究, 以期能提高水稻的耐盐性, 这对有效利用盐碱地、保证水稻生产持续稳定增长有重要意义。近几年来, 越来越多的研究者认为, 通过育种途径培育出新的耐盐水稻品种才是解决问题的关键所在。常规育种方法实现耐盐品种的选育需要的周期长, 效率低。如果通过研究盐胁迫下有关基因的表达确定耐盐基因, 则会大大提高工作效率。

乙醇脱氢酶 (alcohol dehydrogenase, ADH) 是乙醇代谢的主导酶, 催化乙醛和乙醇间的氧化还原反应, 在植物无氧呼吸过程中起重要作用。研究表明, 乙醇脱氢酶与植物的抗逆性相关<sup>[3]</sup>, 但与其相关抗逆性的机制还未见报道。本研究比较了同一种属 2 个不同品系—扬两优 6 号 (耐盐型) 和通梗 981 (敏盐型) 在盐胁迫下 ADH3 表达变化的差异, 为寻找与耐盐有关的基因及深入研究水稻的抗逆机理研究提供数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料及分组

扬两优 6 号水稻种子 (由江苏里下河地区农业科学研究

所提供)、通梗 981 水稻种子 (由江苏沿江地区农业科学研究所提供) 分别置于培养皿内的滤纸上, 加入 1/2 霍格兰氏营养液于室温下促发芽。待幼根生长至 1 cm 时, 随机分为试验组和对照组, 2 组均置于室温下, 对照组仍置于 1/2 霍格兰氏营养液中, 试验组则置于含 100 mol/L NaCl 的营养液中。试验组、对照组每天定时更换营养液, 以保持浓度稳定, 分别在胁迫后 0、12、24、48、96、192 h 取 0.5 cm 根尖 10 根, 作为试验材料。

### 1.2 主要试剂与仪器

RNAiso Plus 总 RNA 提取试剂盒、SYBR® PrimeScript™ RT–PCR Kit 购自 TaKaRa 公司, 引物由上海英骏公司合成; ABI 7500 Realtime–PCR System 为美国应用生物系统公司产品; 其他各种化学试剂均为进口或国产分析纯试剂, 水由 Millipore 纯水仪制备。

### 1.3 方法

**1.3.1 总 RNA 提取** 取约 0.5 cm 长根尖 10 根于研钵中, 加入 RNAiso Plus 1 mL, 充分研磨, 至裂解液呈透明状。转入离心管中, 室温静置 5 min, 加入 0.2 mL 三氧甲烷, 振荡混匀, 再在室温下静置 5 min, 12 000 r/min 离心 15 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, 然后用适量的 DEPC 水溶解 RNA。

**1.3.2 反转录反应** 取各个样品总 RNA 1  $\mu\text{L}$ , 依次加入 5  $\times$  Buffer 2  $\mu\text{L}$ , Mix 0.5  $\mu\text{L}$ , 随机引物 0.5  $\mu\text{L}$ , DEPC 水补足体积至 10  $\mu\text{L}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  保温 15 min, 85  $^{\circ}\text{C}$  10 s 终止反应, –20  $^{\circ}\text{C}$  保存。

**1.3.3 Real–time PCR 反应** 根据 GenBank 中注册的目的基因 ADH3 (AB267278) 和内参基因 Actin (X16280) 序列, 应用 NCBI Primer–blast 工具 ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?INK\\_LOC=BlastHome](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?INK_LOC=BlastHome)) 设计引物。ADH3 的正向引物为 5'–AGGGGTGACGAGCTTTCCC–

收稿日期: 2013–06–18

作者简介: 梁 燕 (1971—), 女, 副教授, 主要研究方向为分子遗传学。E–mail: lian8888@163.com。

3',反向引物为 5'-AGTCGCGCCAAATCCGGTGG-3',预期产物长度为 323 bp;*Actin* 的正向引物为 5'-TGTATGCCAGTG-GTCGTACCCA-3',反向引物为 5'-TCACAATTTCCCGCTCG-GCCG-3',预期产物长度为 204 bp。

各 cDNA 样品分别以 *ADH3* 和 *Actin* 为引物进行荧光定量 PCR 反应。反应体积为 25  $\mu$ L; Mix (2  $\times$ ) 12.5  $\mu$ L, 正、反向引物各 1  $\mu$ L, cDNA 模板 2  $\mu$ L, 无菌水 8.5  $\mu$ L。配制混合物充分混匀后平均分配到各反应管中。反应条件: 95  $^{\circ}$ C 变性 30 s; 95  $^{\circ}$ C 10 s, 60  $^{\circ}$ C 34 s, 40 个循环。

1.3.4 Real-time PCR 数据分析 采用比较  $C_T$  法 ( $\Delta\Delta C_T$ ), 以 *actin* 为内参, 并设 3 个重复管, 以 0 h 组为参考进行相对定量, ABI 7500 Software v2.0.4 进行数据处理, 使用 Microsoft Office Excel 2003 软件作图。

2 结果与分析

经实时荧光定量 PCR 技术检测, 对照组与盐胁迫下扬两优 6 号和通梗 981 幼根的 *ADH3* 表达结果见表 1。

表 1 不同时间盐胁迫下扬两优 6 号和通梗 981 幼根 ADH3 表达			
品种	组别	时间 (h)	ADH3 相对表达量
扬两优 6 号	对照组	0	1.000 0 $\pm$ 0.25
		12	0.967 9 $\pm$ 1.04
		24	0.480 0 $\pm$ 0.13
		48	3.685 1 $\pm$ 1.02
		96	0.177 6 $\pm$ 0.05
		192	0.255 2 $\pm$ 0.008
	试验组	12	0.271 4 $\pm$ 0.04
		24	22.321 0 $\pm$ 4.22
		48	1.940 0 $\pm$ 0.54
		96	0.251 5 $\pm$ 0.10
		192	29.971 0 $\pm$ 10.01
通梗 981	对照组	0	1.000 0 $\pm$ 0.36
		12	2.720 0 $\pm$ 0.57
		24	1.830 0 $\pm$ 0.15
		48	1.330 0 $\pm$ 0.31
		96	0.130 0 $\pm$ 0.04
		192	0.230 0 $\pm$ 0.05
	试验组	12	0.270 0 $\pm$ 0.38
		24	0.260 0 $\pm$ 0.08
		48	0.580 0 $\pm$ 0.07
		96	0.330 0 $\pm$ 0.12
		192	4.760 0 $\pm$ 1.26

由表 1 可知, 在正常栽培条件下, 水稻扬两优 6 号和通梗 981 幼根中 *ADH3* 表达未具有明显的差异性, 变化趋势基本相似。而在盐胁迫下, 扬两优 6 号 *ADH3* 表达与通梗 981 表现出明显的不同。在胁迫 24 h 后, *ADH3* 表达首先急剧升高, 较对照组高 45.5 倍, 随后虽有下降, 但至 192 h 后, *ADH3* 的表达量再次飙升, 较对照组高出 116.4 倍。而通梗 981 试验组在盐胁迫前 48 h *ADH3* 表达均低于对照组, 直到 192 h 后, *ADH3* 表达才开始明显升高, 但在表达量上远远低于扬两优 6 号。

3 结论与讨论

很早以前, 人们就在生产实践中发现不同的水稻种质间

存在耐盐性差异<sup>[4]</sup>, 后来又有研究发现同一种质的不同发育时期或者不同器官耐盐性也存在较大差异, 并猜测这与盐胁迫响应基因的时空表达调控有关<sup>[5]</sup>。自 2000 年我国启动了水稻基因组测序计划, 并于 2001 年 10 月在全世界率先宣布完成其测序工作并公布测序结果以来, 水稻盐胁迫应答的分子机制研究取得了一些实质性进展, 多个与盐胁迫耐受相关的基因和调控因子被成功鉴定。已有研究者通过转基因技术, 将与有关基因导入水稻, 以提高水稻的耐盐性, 主要涉及的基因有吡咯啉-5-羧酸合成酶 (pyrroline-5-carboxylate synthetase, *P5CS*)<sup>[6]</sup>、胆碱单加氧酶 (choline monooxygenase, *CMO*)<sup>[7]</sup>、甜菜碱醛脱氢酶 (betaine aldehyde dehydrogenase, *BADH*)<sup>[7]</sup>、6-磷酸山梨醇脱氢酶 (glucitol-6-phosphate dehydrogenase, *gutD*)<sup>[8]</sup>、1-磷酸甘露醇脱氢酶 (mannitol-1-phosphate dehydrogenase, *mtlD*)<sup>[9]</sup> 和 *S*-腺苷蛋氨酸脱羧酶 (*S*-adenosylmethionine decarboxylase, *SAMDC*)<sup>[10]</sup> 等。但将单个基因转入水稻, 对培育耐盐品种的作用不太明显。高继平等报告水稻的耐盐性是由多基因控制的数量性状, 并成功克隆了与水稻耐盐相关的数量性状基因 *SKCI*<sup>[2]</sup>。通过各种手段寻找与耐盐有关的基因, 利用转基因技术进行多基因聚合育种, 将不同遗传背景中的多个耐盐性基因聚合到同一品种中, 可以大大提高转基因水稻抵抗盐胁迫的能力。

*ADH* 是植物组织中较为普遍存在的酶, 它们与植物抗逆性的关系已经得到学术界的证实。Huang 等观察到了 *ADH* 与水稻低温耐受性有关<sup>[11]</sup>。Gonzalez-Guzmán 等观察到拟南芥中一种短链的 *ADH* 能催化脱落酸 (ABA) 生物合成中最后阶段的反应, 而 ABA 含量增加将诱导许多相关基因表达来抵御盐胁迫环境<sup>[12]</sup>。张恩平等观察到 *ADH* 在盐处理的耐盐番茄根系中显著增加<sup>[13]</sup>。

扬两优 6 号是江苏里下河地区农业科学研究所选育的两系杂交中粳新组合, 具有丰产性好、抗逆性强、稻米品质优良的特点, 其耐盐性已得到证实<sup>[14]</sup>。通梗 981 是由江苏沿江地区农业科学研究所选育的早熟晚粳稻新品种, 其耐盐性未见报道。本研究中, 水稻扬两优 6 号幼根中 *ADH3* 在转录水平的表达明显高于水稻通梗 981, 这与张恩平等在番茄研究中所观察到的现象<sup>[13]</sup> 有一定的相似性。笔者推测, 耐盐型水稻中 *ADH3* 表达的增加是对盐胁迫逆境的“适应性反应”。可能是因为水稻在遭受盐胁迫时, 会引发细胞内活性氧过量产生、积累并打破平衡, 活性氧导致膜过氧化和脱脂化, 从而使细胞结构和功能都受到破坏<sup>[15]</sup>, *ADH* 通过提高巴斯德效应以维持较高的能荷, 保护膜结构功能的完整性, 延长植物细胞寿命<sup>[16]</sup>; 也可能和 ABA 的形成有一定的关系。水稻 *ADH3* 基因与其耐盐性的关系还有待于进一步证实。本研究为水稻的抗盐机理和培育高品质抗盐耐盐植物品系研究提供了参考资料。

参考文献:

[1] Vinocur B, Altman A. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2005, 16(2): 123-132.  
[2] 高继平, 林鸿宣. 水稻耐盐机理研究的重要进展[J]. 生命科学, 2005, 17(6): 563-565.

阮春燕, 韦银凤, 姚超, 等. 洋桔梗黄烷酮 3-羟化酶基因的克隆及其反义表达载体的构建[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(11): 35-38.

# 洋桔梗黄烷酮 3-羟化酶基因的克隆 及其反义表达载体的构建

阮春燕, 韦银凤, 姚超, 陈崇顺

(南京师范大学生命科学学院/江苏省生物多样性与生物技术重点实验室, 江苏南京 210023)

**摘要:**黄烷酮 3-羟化酶(flavanone 3-hydroxylase, F3H)是花青素生物合成途径中的关键酶,对花色的形成具有重要作用。以洋桔梗试管苗叶片基因组 DNA 为模板,通过设计分别带有酶切位点 *Bam*H I 和 *Xba*I 的 1 对特异引物,进行 PCR 扩增,克隆了洋桔梗 *F3H* 基因;对克隆得到的 *F3H* 基因进行测序鉴定,再将该基因反向插入 pBI121 质粒,成功构建了植物反义表达载体 pBI121-*F3H*,为利用植物基因工程技术调控洋桔梗 *F3H* 基因的表达提供了重要基础。

**关键词:**洋桔梗;黄烷酮 3-羟化酶基因;克隆;反义表达载体构建

**中图分类号:** Q943.2; S682.1<sup>+</sup>90.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)11-0035-04

洋桔梗[*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn.]别称草原龙胆,是龙胆科草原龙胆属的观赏植物。洋桔梗株态轻盈潇洒,花形别致可爱,是国际上十分流行的切花和盆花种类之一<sup>[1]</sup>。颜色、香味及形态是观赏植物的三大重要性状。随着经济发展和社会进步,人们对花卉尤其是那些在色、香、形方面能够标新立异的新品种的需求越来越强烈。其中,花的颜色具有特别重要的审美价值,分子育种新技术——植物基因工程可定向、高效获得更丰富和奇美的观赏植物新品种。

花青素广泛存在于被子植物中,对花色形成具有重要作用。而黄烷酮 3-羟化酶(flavanone 3-hydroxylase, F3H)是

花青素生物合成途径中的关键酶<sup>[2]</sup>。研究表明,反义核酸技术主要通过碱基互补原理,利用人工或生物合成特异互补的 DNA 或 RNA 片段(或化学修饰产物)与目的序列核酸结合,通过空间位阻效应或诱导 RNase 活性的降解作用,在复制、转录、剪接、mRNA 转运及翻译等水平上,抑制或封闭目的基因的表达<sup>[3-4]</sup>。

目前,*F3H* 基因已经从多种植物的不同器官中克隆得到,如红巴梨成熟果皮<sup>[5]</sup>、苹果果皮<sup>[6]</sup>、洋桔梗花瓣<sup>[7]</sup>、苦荞幼苗<sup>[8]</sup>、芜菁块根<sup>[9]</sup>、龙眼胚胎<sup>[10]</sup>、猕猴桃内果皮<sup>[11]</sup>、非洲菊花瓣<sup>[12]</sup>、核桃叶片<sup>[13]</sup>。Elomaa 等成功运用反义核酸技术调控了非洲菊、金鱼草等植物中花青素生物合成相关酶基因的表达<sup>[14-15]</sup>,进而改变了花色。

本研究以洋桔梗叶片为试材,提取基因组 DNA,通过设计 1 对特异性引物,进行 PCR 扩增,克隆 *F3H* 基因;对该克隆基因进行 DNA 序列测定、鉴定,再将其反向插入 pBI121 质粒,构建洋桔梗 *F3H* 基因反义表达载体,为利用植物基因工程技术调控洋桔梗 *F3H* 基因的表达,进而改变其花色及创建

收稿日期:2013-04-26

基金项目:国家基础科学人才培养基金(编号:J1103507);江苏高校优势学科建设工程项目。

作者简介:阮春燕(1990—),女,浙江宁波人,本科生,从事植物生物技术与分子生物学研究。E-mail: 695206842@qq.com。

通信作者:陈崇顺,博士,主要从事植物生物技术与分子生物学研究。E-mail: chenchongshun@njnu.edu.cn。

[3] Magneschi L, Perata P. Rice germination and seedling growth in the absence of oxygen[J]. *Annals of Botany*, 2009, 103(2): 181-196.

[4] 应存山. 中国稻种资源[M]. 北京:中国农业出版社,1993: 79-80.

[5] 鄂志国, 张丽靖. 水稻盐胁迫应答的分子机制[J]. 杂交水稻, 2010, 25(2): 1-5.

[6] 曲雪萍, 贺道耀, 余叔文. 水稻中 *p5cs* 基因的存在及其在高脯氨酸变异系中的作用[J]. 植物生理学报, 1998, 24(1): 49-54.

[7] 潘丽娟, 黄骥, 王州飞, 等. 水稻胆碱单加氧酶基因的克隆与表达分析[J]. 分子植物育种, 2007, 5(1): 8-14.

[8] 王慧中, 卢德赵, 颜美仙, 等. 6-磷酸山梨醇脱氢酶基因转化水稻(*Oryza sativa* L.)研究[J]. 科技通报, 2002, 18(6): 441-445.

[9] 王慧中, 刘俊君, 卢德赵, 等. 1-磷酸甘露醇脱氢酶基因转化水稻的研究[J]. 中国水稻科学, 2003, 17(1): 6-10.

[10] 李子银, 张劲松, 陈受宜. 水稻盐胁迫应答基因的克隆、表达及染色体定位[J]. 中国科学: C 辑, 1999, 29(6): 561-570.

[11] Huang W, Ma X, Wang Q, et al. Significant improvement of stress tolerance in tobacco plants by overexpressing a stress-responsive aldehyde dehydrogenase gene from maize (*Zea mays*) [J]. *Plant Molecular Biology*, 2008, 68(4/5): 451-463.

[12] González-Guzmán M, Apostolova N, Bellés J M, et al. The short-chain alcohol dehydrogenase ABA2 catalyzes the conversion of xanthoxin to abscisic aldehyde[J]. *The Plant Cell*, 2002, 14(8): 1833-1846.

[13] 张恩平, 张淑红, Cordewener J, 等. 盐胁迫下不同盐敏感型番茄在蛋白质表达上的差异[J]. 沈阳农业大学学报, 2005, 36(1): 25-28.

[14] 孙公臣, 赵庆雷, 陈峰, 等. 几个水稻品种的耐盐性鉴定试验[J]. 山东农业科学, 2011(6): 24-25, 29.

[15] 时冉冉. 盐胁迫下蚕豆幼苗抗氧化酶动态变化研究[J]. 农业科技通讯, 2009(3): 35-37.

[16] 陈鹭真, 林鹏, 王文卿. 红树植物淹水胁迫响应研究进展[J]. 生态学报, 2006(2): 586-592.