

非生物胁迫下山腊梅 *CpCBF* 基因的表达模式分析

刘晓丹,王 霞,杨祥波

(吉林农业科技学院 生物工程学院,吉林 吉林 132101)

摘要:为探讨腊梅 *CpCBF* 基因在非生物胁迫下的响应机制,对山腊梅幼苗分别进行低温、干旱、NaCl 和 ABA 处理,利用 qRT-PCR 技术对 *CpCBF* 基因的表达进行检测。结果表明:腊梅 *CpCBF* 基因能快速响应低温、盐、干旱和 ABA 胁迫,其中对低温和干旱的响应较为显著和持久。4 ℃低温处理 12 h 后,其表达量达峰值;对于干旱胁迫,处理 6 h 后表达量最大。初步推测 *CpCBF* 基因可能在腊梅抵御低温、干旱和高盐等非生物胁迫时发挥重要作用。

关键词:山腊梅;*CpCBF* 基因;非生物胁迫;表达模式

中图分类号:S945.78 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2017)12-0018-03 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2017.12.0018

干旱、盐碱、低温等非生物逆境是影响植物生长发育及产量的主要限制因子^[1]。为适应环境,植物进化产生一系列的生理生化反应或通过基因表达的调节以降低或消除危害^[2-3]。非生物逆境的抗性机制研究表明,转录因子在逆境信号传导中起重要作用^[4]。其中 DREB/CBF 转录因子可激活一系列抗逆功能基因的表达,从而增强植物对干旱、低温及高盐等逆境的抗性^[5]。因此 DREB/CBF 转录因子成为植物抗逆基因过程研究的热点之一。近年来已经从很多草本植物(拟南芥^[6]、水稻^[7]、小麦^[8]、大豆^[9]、玉米^[10]等)和木本植物(棉花^[4]、杨树^[11]、麻疯树^[12]、香樟树^[1]、扁桃^[13]、榛木^[14]等)中分离鉴定出 DREB/CBF 基因,尽管 CBF/DREB 转录因子在植物中高度保守,均含有典型 AP2 结构域和 2 个特征基序 PKKR/PAGR_xKFxETRHP 和 DSAWR^[15],但它们响应非生物胁迫的表达模式却存在很大差异^[4]。腊梅属落叶灌木,具有极强的耐寒和耐旱性,可能存在更为复杂的逆境响应机制。本研究在前期克隆得到 *CpCBF* 基因的基础上,分析不同逆境胁迫下 *CpCBF* 基因的表达模式,旨在为植物抗逆分子机制的研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

山腊梅种子购自源茂种业。

收稿日期:2017-10-24

基金项目:吉林省教育厅“十二五”科学技术研究资助项目(吉教科合字[2015]第 372 号)

第一作者简介:刘晓丹(1981-),女,吉林省吉林市人,博士,讲师,从事抗逆基因工程研究。E-mail: liuxiaodan1981@126.com。

1.2 方法

2016 年 3 月将山腊梅种子播种于腐殖土中,置于吉林农业科技学院专业实验室光照培养箱中,22 ℃恒温培养约 60 d,选取生长状态一致的幼苗进行后续试验。

1.2.1 不同胁迫处理 (1)低温处理:将土培幼苗置于 4 ℃培养箱中,分别于 0、1、2、4、6、12 和 24 h 采集叶片,投放到液氮中固定后,保存于 -80 ℃冰箱备用。(2)干旱和高盐处理:将山腊梅幼苗分别置于 25% 的 PEG 6000 溶液和 200 mmol·L⁻¹ NaCl 溶液中,采集叶片的时间点和保存方法同上。(3)ABA 处理:使用 100 μmol·L⁻¹ 的 ABA 溶液均匀喷洒于幼苗叶片表面,于低温处理相同的时间节点采集和保存叶片。

1.2.2 定量实时 PCR(qRT-PCR)分析 使用上海生工柱式植物总 RNA 抽提纯化试剂盒对处理后的材料提取总 RNA,使用 RNase-Free DNA 清除试剂盒去除基因组的污染,使用 M-MLV 反转录酶合成 cDNA 第一条链。qRT-PCR 反应以腊梅 *Actin* 基因^[16] 为内参,qRT-PCR 体系及程序参照 SYBR Premix Ex TaqTM 试剂盒。反应体系为 2×SYBR Premix Ex Taq 10.0 μL,稀释的 cDNA 2.0 μL,ROX Reference Dye II 0.4 μL,引物(上游引物:GCATTGATGAGAAGTGT;下游引物:CAGAGATTGAGGTACATC)各 0.4 μL,ddH₂O 6.8 μL。反应程序为:95 ℃ 30 s;95 ℃ 5 s,58 ℃ 40 s,40 cycles;95 ℃ 15 s;60 ℃ 1 min,95 ℃ 30 s。正常条件下未处理时 CBF 表达量设为 1,采用 2^{-ΔΔCT} 法分析数据,计算基因的

相对表达量。每个样品进行3次重复。

1.2.3 数据分析 利用 ABI-7500 荧光定量 PCR 仪自带软件 ABI 7500 V2.0.6 进行基因表达分析;统计数据在 Excel 2017 中转化成线性形式,并用 SPSS 软件进行数据统计分析。

2 结果与分析

2.1 山腊梅 *CpCBF* 基因在低温胁迫下的表达模式

由图1可知,山腊梅 *CpCBF* 基因,能够持续且强烈的响应低温信号。4℃低温处理下,山腊梅 *CpCBF* 基因表达量迅速积累,处理1 h后其表达量明显高于未处理时的表达量。随着处理时间的延长,其表达量明显升高。处理12 h时,其表达量达到峰值,为未处理的433.2倍。当处理时间增至24 h,相对表达量仍维持在较高水平。

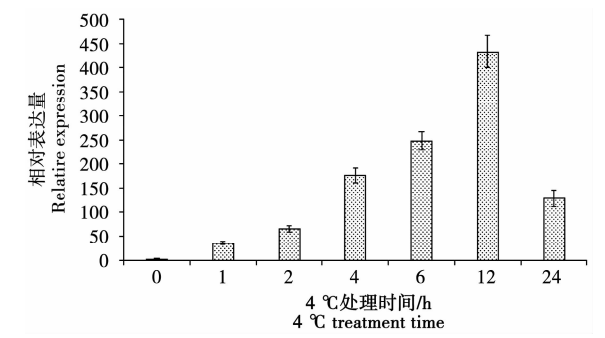


图1 低温胁迫下 *CpCBF* 基因的表达情况
Fig.1 The expression profiling of *CpCBF* gene under low temperature stress

2.2 山腊梅 *CpCBF* 基因在干旱胁迫下的表达模式

25%的 PEG 6000 溶液模拟干旱胁迫,山腊梅 *CpCBF* 基因的表达迅速被诱导(见图2),随着处理时间的延长,*CpCBF* 基因的表达量逐渐升高。干旱处理6 h表达量达到峰值,为未处理的114.5倍。随着处理时间的增加,其表达水平虽明显降低,但相对表达量也维持在较高水平。

2.3 山腊梅 *CpCBF* 基因在高盐胁迫下的表达模式

200 mmol·L⁻¹ NaCl 溶液处理,山腊梅 *CpCBF* 基因的表达被诱导(见图3)。*CpCBF* 基因对高盐胁迫的响应较为迅速,处理2 h达到峰值。但其表达量的积累远不及低温和干旱胁迫处理仅为未处理表达量的8.2倍。盐胁迫处理12 h, *CpCBF* 基因相对表达量稍有回升后又降低。

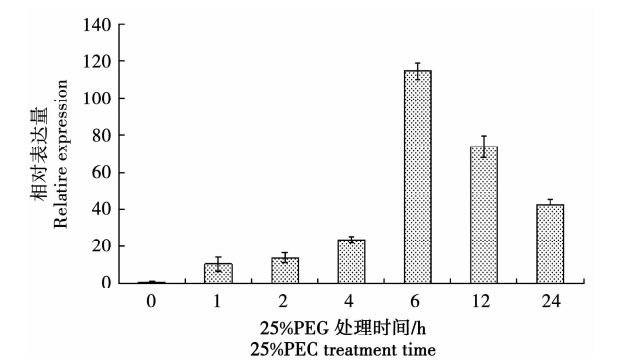


图2 干旱胁迫下 *CpCBF* 基因的表达情况
Fig.2 The expression profiling of *CpCBF* gene under drought stress

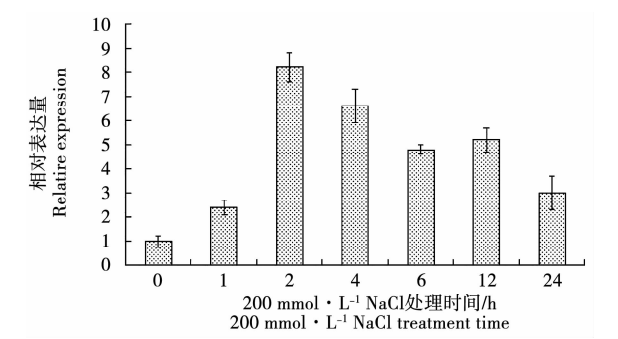


图3 高盐胁迫下 *CpCBF* 基因的表达情况
Fig.3 The expression profiling of *CpCBF* gene under high salt stress

2.4 山腊梅 *CpCBF* 基因在 ABA 胁迫下的表达模式

由图4可知,100 μmol·L⁻¹ ABA 胁迫下, *CpCBF* 基因迅速积累。处理1 h达到最大值。随后其相对表达量呈缓慢减少的趋势,但仍明显高于未处理的基因表达量。

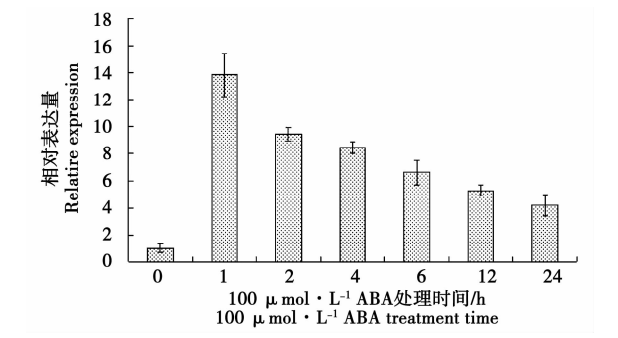


图4 ABA胁迫处理下 *CpCBF* 基因的表达情况
Fig.4 The expression profiling of *CpCBF* gene under ABA stress treatment

3 结论与讨论

不同植物来源的 *CBF* 基因被鉴定出的抗逆

功能各不相同,其对不同非生物胁迫的响应存在很大差异^[2,11,17]。如拟南芥 *AtCBFs* 基因的转录水平在低温、干旱和高盐胁迫下明显被诱导^[6]。水稻 *OsDERB1A* 基因在低温和高盐条件下被诱导,*OsDERB1B* 基因仅对低温有响应,而 *OsDERB1C* 基因则对多种胁迫无响应^[7]。玉米 *ZmDREB2A* 基因仅响应干旱和高盐胁迫^[10]。扁桃 *AcCBF2* 转录因子只在低温和干旱下不同程度地表达,对高盐胁迫和 ABA 处理均没有响应^[13]。海岛棉 *GbCBFs* 基因在不同逆境胁迫下的表达差异很大,其中仅 *GbCBF1* 和 *GbCBF4* 基因在低温胁迫下上调表达;而干旱和高盐条件下,*GbCBFs* 基因的表达被抑制^[4]。本研究中山腊梅 *CpCBF* 基因的表达明显受低温、干旱、高盐和 ABA 诱导,与小麦 *DREB2* 基因^[8]、大豆 *GmDREBa* 基因^[9]、山荆子 *MbDREB1* 基因^[18]、胡杨 *PeuCBFs* 基因^[11]、香樟 *CcCBF* 基因^[1]、平欧杂交榛 *ChaCBF1* 基因^[14] 的表达相似,受多种逆境诱导。山腊梅 *CpCBF* 基因对低温的响应最显著,山腊梅 *CpCBF* 基因在低温处理 1 h 时大量积累,处理 12 h 后,表达量均达峰值。胡杨 *PeuCBFs* 基因在低温、高温、盐、干旱和 ABA 处理 1 h 时快速被诱导,其中响应低温的程度最高^[11]。平欧杂交榛 *ChaCBF1* 基因的转录水平在处理 2 h 迅速提高,并于处理后的第 12 h 达到峰值^[14]。总体来说,木本植物对低温、干旱、高盐和 ABA 胁迫的响应更为强烈,可能与其逆境调控机制更为复杂有关,对于木本植物的抗逆调控机制及功能研究更具应用潜力。山腊梅 *CpCBF* 基因对 ABA 的响应也很明显,推测可能与 ABA 信号通路有关。山腊梅 *CpCBF* 基因对多种非生物胁迫的响应,表明该基因在抵御低温、干旱和高盐等非生物胁迫时发挥重要作用。本研究丰富了木本植物逆境响应机制的研究。为进一步验证腊梅 *CpCBF* 基因的抗逆功能,目前正在进行抗逆相关生理指标的检测及转化模式植物的研究。

参考文献:

- [1] 李勇鹏,张力维,张佳佳,等. 香樟 *CcCBFs* 基因的克隆及表达模式[J]. 东北林业大学学报,2016,44(8):34-40.
- [2] 李科友,朱海兰. 植物非生物逆境胁迫 DREB/CBF 转录因子的研究进展[J]. 林业科学,2011,47(1):124-134.
- [3] Pagter M, Arora R. Winter survival and deacclimation of perennials under warming climate: physiological perspectives [J]. *Physiologia Plantarum*, 2013, 147(1): 75-87.
- [4] 李月,代培红,刘超,等. 海岛棉 5 个 *CBF/DREB* 基因的克隆与表达分析[J]. 棉花学报, 2016, 28(1): 42-51.
- [5] Agarwal P K, Agarwal P, Reddy M K, et al. Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants[J]. *Plant Cell Rep*, 2006, 25(12): 1263-1274.
- [6] Shi H, Qian Y, Tan D, et al. Melatonin induces the transcripts of CBF/DREB1s and their involvement in both abiotic and biotic stresses in *Arabidopsis* [J]. *J Pineal Res*, 2015, 59(3): 334-342.
- [7] Dubouzet J G, Sakuma Y, Ito Y, et al. *OsDREB* genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high salt- and cold-responsive gene expression[J]. *Plant Journal*, 2003, 33: 751-763.
- [8] Egawa C, Kobayashi F, Ishibashi M, et al. Differential regulation of transcript accumulation and alternative splicing of a DREB2 homolog under abiotic stress conditions in common wheat[J]. *Genes Genet Syst*, 2006, 81(2): 77-91.
- [9] Li X, Tian A, Luo G, et al. Soybean DRE-binding transcription factors that are responsive to abiotic stresses[J]. *Theor Appl Genet*, 2005, 110(8): 1355-1362.
- [10] Gu L, Zhang Y, Zhang M, et al. ZmGOLS2, a target of transcription factor ZmDREB2A, offers similar protection against abiotic stress as ZmDREB2A[J]. *Plant Mol Biol*, 2016, 90(1-2): 157-170.
- [11] 贾会霞,李建波,孙佩,等. 胡杨 *CBF* 基因家族的鉴定及表达特性分析[J]. 分子植物育种, 2017, 15(2): 492-500.
- [12] 严君,孙煥,王雪华,等. 麻疯树 *JcCBF3* 基因的克隆及其抗寒功能初探[J]. 四川大学学报(自然科学版), 2016, 53(6): 1369-1374.
- [13] 郭淑朋,张亮,李疆,等. 扁桃 *AcCBF2* 基因的克隆及其在逆境胁迫下的表达分析[J]. 分子植物育种, 2017, 15(3): 814-820.
- [14] 雷恒久,苏淑叙,马履一,等. 平欧杂交榛 *CBF/DREB1* 转录因子 *ChaCBF1* 基因的克隆与功能分析[J]. 北京林业大学学报, 2016, 38(10): 69-79.
- [15] Jaglo K R, Kleff S, Amundsen K L, et al. Components of the *Arabidopsis* C-repeat/dehydration-responsive element binding factor cold-response pathway are conserved in *Brassica napus* and other plant species[J]. *Plant Physiol*, 2001, 127(3): 910-917.
- [16] Liu D F, Sui S Z, Ma J, et al. Transcriptomic Analysis of flower development in wintersweet (*Chimonanthus praecox*) [J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e86976.
- [17] Wang Z, Wang F, Tang J, et al. C-repeat binding factor gene family identified in non-heading Chinese cabbage is functional in abiotic and biotic stress response but different from that in *Arabidopsis* [J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2014, 36(12): 3217-3229.
- [18] Yang W, Liu X D, Chi X J, et al. Dwarf apple MbDREB1 enhances plant tolerance to low temperature, drought, and salt stress via both ABA-dependent and ABA-independent pathways[J]. *Planta*, 2011, 233(2): 219-229.

秋水仙碱诱导狭叶薰衣草多倍体形成条件的研究

王美妮¹, 杨佳利¹, 文 斌¹, 谷 焱¹, 缪天琳²

(1. 佳木斯大学 农业与环境生物技术研究所, 黑龙江 佳木斯 154007; 2. 佳木斯大学 生命科学学院, 黑龙江 佳木斯 154007)

摘要:为培育性状优良的薰衣草多倍体植株, 利用正交法和单因素分析法, 进行薰衣草多倍体优良性状筛选试验, 探究秋水仙碱诱导染色体加倍的最适浓度和处理时间, 聚乙二醇诱导原生质体融合的分子量、工作浓度和诱导时间的最适条件。结果表明: 采用秋水仙碱法联合 PEG 法进行薰衣草多倍体诱导, 筛选出具有优良性状的多倍体植株, 其中分子量为 6 000 Da 的 PEG 在浓度为 40% 的条件下诱导 25 min 时, 获得的原生质体融合率较高, 达到 19.6%; 薰衣草外植体在浓度为 0.2% 的秋水仙碱 MS 诱导培养基中处理 48 h 诱变频率达 60%。运用薰衣草多倍体诱导的试验方法, 可快速实现薰衣草多倍体品种的选育, 缩短育种周期。

关键词:薰衣草; 诱变率; 融合率; 多倍体植株

中图分类号: S573.9; Q813.1⁺2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-2767(2017)12-0021-04 DOI: 10.11942/j.issn1002-2767.2017.12.0021

狭叶薰衣草 (*Lavandula angustifolia*) 是一种唇形科薰衣草属草本, 原产于地中海西部; 其花汁液为有效的皮脂调节剂, 提取的精油具有镇定安神、抗抑郁、抑制细菌生长等作用。近年来薰衣草作为园林观赏植物受到广泛关注, 市场前景广

阔^[1-3]。目前我国栽培的薰衣草品种主要依靠国外引种, 由于环境以及地理位置等因素的限制, 逐渐凸显出狭叶薰衣草种子萌芽率低、薰衣草精油品质下降等问题, 制约了薰衣草产业链的快速发展^[4-6]。寻找薰衣草高效快速且可推广性强的研究方法势在必行。倍性育种方式, 可以改良植物的遗传性状, 拓展其遗传资源^[7]。本试验以狭叶薰衣草为材料, 进行薰衣草多倍体诱导, 研究秋水仙碱浓度、处理时间对诱导多倍体变异率的影响^[7-8], 以此培育具有优良性状的多倍体植株, 进而提高薰衣草精油产量, 为缓解黑龙江省替代传统农作物种植品种短缺的现状提供基础研究。

收稿日期: 2017-10-27

基金项目: 黑龙江省大学生创新创业训练计划资助项目(201710222059)

第一作者简介: 王美妮(1996-), 女, 黑龙江省绥滨县人, 在读学士, 从事环境生物学相关研究。E-mail: 664526498@qq.com。

通讯作者: 缪天琳(1985-), 女, 黑龙江省佳木斯市人, 硕士, 高级实验师, 从事生物学相关研究。E-mail: miaotlin@126.com。

Expression Profiling Analysis of *CpCBF* Gene from *Chimonanthus praecox* Under Abiotic Stress

LIU Xiao-dan, WANG Xia, YANG Xiang-bo

(School of Biological Engineering, Jilin Agricultural Science and Technology University, Jilin, Jilin 132101)

Abstract: In order to explore the mechanism of *CpCBF* gene from *Chimonanthus praecox* in response to abiotic stress, the seedlings were treated with low temperature, drought, NaCl and ABA, respectively, the expression of *CpCBF* gene were detected using quantitative real-time PCR. The results showed that *CpCBF* gene was induced immediately in response to low temperature, drought, salt and ABA, among them, the response to low temperature and drought was more significant and lasting. At 4 °C for 12 h, the expression reached its peak. For drought stress treatment, the expression level reached the maximum after 6 h. It is preliminarily speculated that *CpCBF* gene may play an important role in resistance to abiotic stress such as low temperature, drought and salt stress.

Keywords: *Chimonanthus praecox*; *CpCBF* gene; abiotic stress; expression profiling