

光质对矮化黄瓜膨脹素基因表达的影响

王多佳, 孙莉莉, 黄莎莎, 李凤兰, 胡宝忠

(东北农业大学 生命科学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘 要:以矮生黄瓜“D0462”和蔓生黄瓜“129”为试材,研究不同光质对其膨脹素基因表达的影响。结果表明:不同光质对黄瓜下胚轴的伸长起到或抑制或促进的作用;通过 Real-time PCR 定量分析推测红光抑制膨脹素基因的表达;蓝光对膨脹素基因 *Cs-EXPA1*, *Cs-EXPA2* 的表达先抑制后促进;推断黄瓜“D0462”的矮化性状与膨脹素基因表达关系密切,其中 *Cs-EXPA1* 基因的影响尤为关键。

关键词:光质;膨脹素;矮化;表达

中图分类号:S 642.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)02-0084-05

膨脹素是一类存在于植物细胞壁上,家族成员众多的超级基因家族^[1]。膨脹素广泛参与植物生长发育中的多个过程,并且受多种激素和外界环境的调控,其中光照对膨脹素活性的调控有很大的影响。Cosgrove 等^[2]在研究燕麦胚芽鞘时发现,对黑暗培养 4 d 的燕麦胚芽鞘照白光处理 8~10 h 之后,生长突然停止,然而细胞壁中的膨脹素的活性没有下降,只是量上稍有降低,随着照光的持续,生长才逐渐恢复。柴胡(*Stellaria longipes*)在遮光条件下伸长生长与膨脹素蛋白调节的细胞壁伸展性密切相关^[3]。蓝光处理对黄瓜矮化影响较大,矮化黄瓜品种“D0462”经蓝光处理后下胚轴长极显著低于正常株高品种“129”^[4]。现利用红光和蓝光处理矮化黄瓜,以白光作为对照,研究不同光质对其膨脹素基因表达的影响,以期对光质调控下的膨脹素基因表达有进一步的了解。

1 材料与方法

1.1 试验材料

矮化黄瓜品种“D0462”和蔓生黄瓜“129”均由东北农业大学园艺学院黄瓜课题组提供。试验于 2010 年 3—6 月在东北农业大学园艺试验站温室内进行,选取饱满的黄瓜种子,浸泡 3 h 后置于 25℃ 的恒温培养箱中催芽,出芽后播种于 8 cm×8 cm 的营养钵中,每钵播

1 粒种子,置于温室中自制的白光、蓝光和红光铁架内培养,每个处理“129”和“D0462”各 120 株幼苗,随机区组排列。白天温度 25~30℃,夜间温度 18~20℃,每 2 d 浇 1 次水。

1.2 试验方法

1.2.1 光质处理 光质处理方法参照参考文献^[4]。

1.2.2 生物学性状观察 对黄瓜矮化品种“D0462”及其植株发育过程进行跟踪调查。取不同光质处理 3、6、9、12、15 d 后,选取生长状态一致的幼苗 10 株,使用直尺和卷尺分别对其下胚轴长度记录,拍照,并用 Image J 进行分析和测量,同时对所得数据进行了统计分析。

1.2.3 RNA 提取和 *Cs-EXPA1*, *Cs-EXPA2* 的 RT-PCR Trizol (Invitrogen 公司)提取黄瓜下胚轴总 RNA,通过 Takara 公司的 PrimeScript™ RT-PCR Kit 反转录成 cDNA。根据 *Cs-EXPA1*, *Cs-EXPA2* 基因登录号在 Genbank 上寻找相关序列,通过 Primer 5.0 设计特异引物,然后按下列程序进行 PCR 反应:94℃ 30 s, 57.8℃ 30 s, 72℃ 1 min, 35 个循环。扩增所用引物见表 1。所用内参为 β -actin,扩增时所用引物为 R1、R2、R3、R4。扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶上做电泳分析,用 Lab Assistant™ Gel 3000 Series 凝胶成像分析仪检测条带亮度,对反转录产物进行 RT-PCR 半定量分析。

表 1 引物设计

Table 1	Primer design	
扩增目的	引物名称	引物序列
Objective	Primer name	Primer sequence
<i>Cs-EXPA1</i>	上游引物 R1	5'-TTGCTAATCTCCCTTTCTTCC-3'
	下游引物 R2	5'-GTGTTTCGCGTTTTGTGTGTT-3'
<i>Cs-EXPA2</i>	上游引物 R3	5'-TCTGCTCCATCCTTACTTCTTCATC-3'
	下游引物 R4	5'-CACCCCTAAACCCACGATCCTAGAC-3'
β -actin	R5	5'-GTGTGAGTCACACTGTTCCATC-3'
	R6	5'-AGCAAGGTCCAAACGAGAA-3'

第一作者简介:王多佳(1982-),女,博士,讲师,研究方向为遗传学与分子生物学。E-mail:wduojia2009@163.com.

责任作者:胡宝忠(1962-),男,教授,研究方向为植物学。E-mail:bzhu@neau.edu.cn.

基金项目:高等学校博士后专项科研基金资助项目(200802240008);黑龙江省自然科学基金资助项目(230340)。

收稿日期:2014-09-09

1.2.4 Real-time PCR 染料法测定 *Cs-EXPA1*、*Cs-EXPA2* 基因的不同时空表达量,利用 Primer Express 2.0 设计荧光定量引物,在检测探针所在靶序列的两端设计普通引物(P1:5'-GGTGGTGTAACCCCTCCGCTT-3',R1:5'-CCCTGTAAATGCCGATCTTCTG-3';P2:5'-GGTGGTGTAACCCCTCCGCTT-3',R2:5'-CCCTGTAAATGCCGATCTTCTG-3'),扩增 200~500 bp 片段作为阳性克隆基因。以黄瓜 β -actin 基因(登录号为 AB010922)为内参,设计探针内参(p3:5'-GTGTGAGT-CACACTGTTCCCATC-3';r3:5'-AGCAAGGTC-CAAACGGAGAA-3')。引物由南京博仕公司合成,仪器为 ABI PRISM 7500 实时定量 PCR 仪。以各个取样时间点的 cDNA 为模板,按照试验手册进行 PCR 扩增。反应程序:预变性 95℃ 30 s,PCR 反应 40 个循环,95℃ 5 s,58℃ 34 s。反应结束后分析扩增曲线。每个反应 3 次重复,Ct 值取平均值。根据 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 测定基因的相对表达量,每样品 3 次重复。

2 结果与分析

2.1 不同光质对黄瓜下胚轴生长的影响

经红光处理,白光作为对照(CK),2 个品种的下胚轴在 15 d 内的表型变化如图 1 所示,下胚轴长度测定结

果见图 2。“129”经红光处理后,其下胚轴长度显著大于白光;“D0462”在红光处理后,下胚轴显著增长;由此可认为红光对“D0462”和“129”均有促进下胚轴增长的作用。

经蓝光处理,白光作为对照,2 个品种的下胚轴在 15 d 内表型变化见如图 3 所示,下胚轴长度测定结果见图 4。“129”经蓝光处理后,其下胚轴长度显著大于白光,而蓝光和红光之间则差异不明显;“D0462”在蓝光处理后,下胚轴比对照还要短。由此可认为蓝光对“D0462”的下胚轴伸长具有抑制作用,对“129”却起到促进作用。

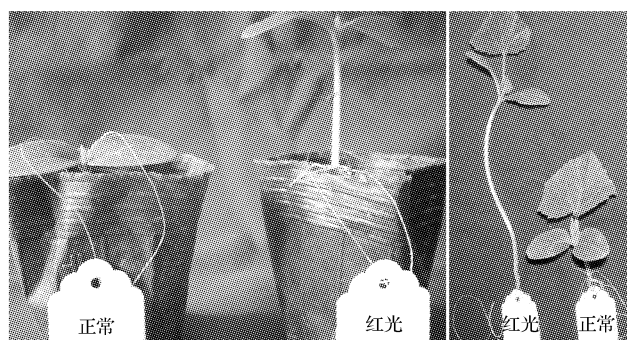
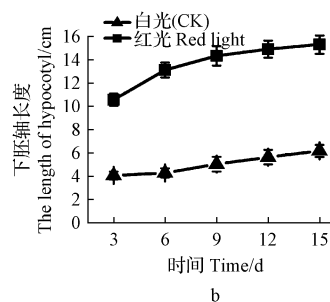
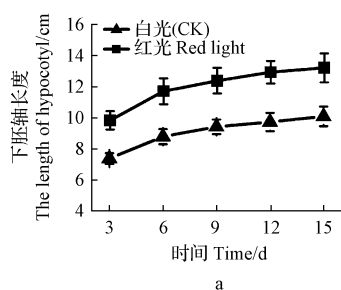


图 1 “D0462”在红光处理后的表型变化

Fig. 1 The phenotype of the “D0462” treated by Red light



注:a为“129”,b为“D0462”。图4同。

Note:a means “129”;b means “D0462”. The same as Fig. 4.

图 2 红光对黄瓜下胚轴的长度的影响

Fig. 2 The length of hypocotyl treated by Red light

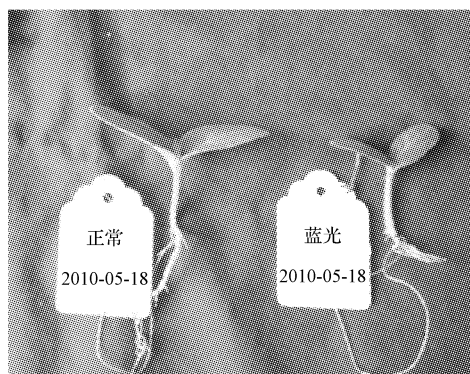


图 3 “D0462”在蓝光处理后的表型变化

Fig. 3 The phenotype of the “D0462” treated by Blue light

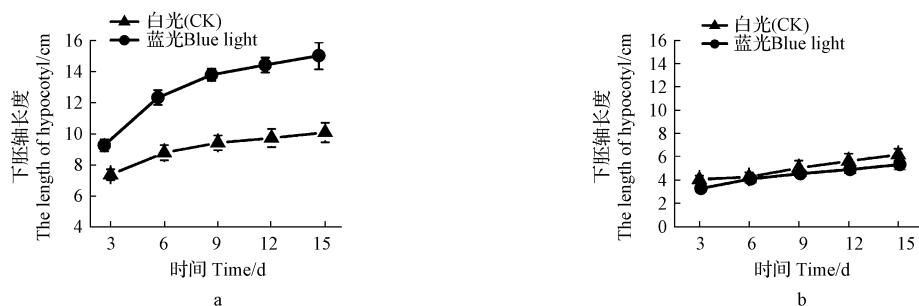


图 4 蓝光对黄瓜下胚轴的长度的影响

Fig. 4 The length of hypocotyl treated by Blue light

2.2 不同光质影响黄瓜下胚轴膨脹素基因的 RT-PCR 分析

分别取经红光和蓝光处理 12、24、36、48 h 的黄瓜下胚轴,提取总 RNA,进行 RT-PCR 半定量分析。以 β -actin 作为内参。由图 5 可知,48 h 内红光抑制矮化黄瓜“D0462”膨脹素基因 *Cs-EXPA1* 的表达,蓝光对 *Cs-EXPA1* 膨脹素基因则有略微的促进作用;但红光和蓝光对 *Cs-EXPA2* 基因的表达影响似乎并不显著。而红光则能促进“129”中 *Cs-EXPA1* 的表达,而蓝光则抑制 *Cs-EXPA1* 的表达,同样对 *Cs-EXPA2* 基因表达作用不显著。

2.3 不同光质影响黄瓜下胚轴膨脹素基因的 Real-Time PCR 分析

提取“D0462”经红光和蓝光处理 3、6、9、12、15 d 的黄瓜下胚轴总 RNA,反转录得到 cDNA,以 cDNA 为模板, β -actin 作为内参,利用 Real-time PCR 的方法定量分析膨脹素基因表达。由图 6、7 可以看出,*Cs-EXPA1*,*Cs-EXPA2* 的表达量明显受红光抑制。*Cs-EXPA1* 受蓝光抑制,其表达量始终保持在低水平基本不变。*Cs-EXPA2* 基因受蓝光调控的表达模式则为降低-升高-降低,与 CK 基本一致。

总而言之,红光对“D0462”的下胚轴有明显的促进

生长的作用,但却抑制膨脹素基因的表达。蓝光对“D0462”的下胚轴的生长起抑制的作用,但在某些时间却能分别促进 *Cs-EXPA1*、*Cs-EXPA2* 的表达。

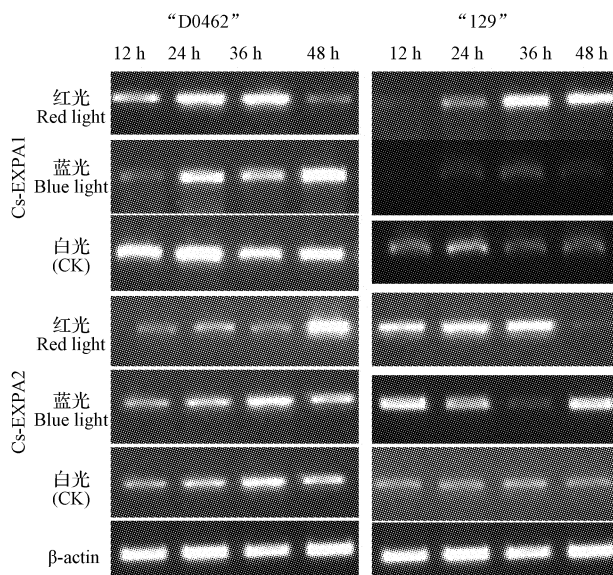


图 5 不同光质对膨脹素基因表达的影响

Fig. 5 Effect of different photo on expression of expansin genes



注:a 为 *Cs-EXPA1*;b 为 *Cs-EXPA2*。图 7 同。

Note:a means *Cs-EXPA1*;b means *Cs-EXPA2*. The same as Fig. 7.

图 6 红光对膨脹素基因表达的影响

Fig. 6 Effect of Red light on expression of expansin gene

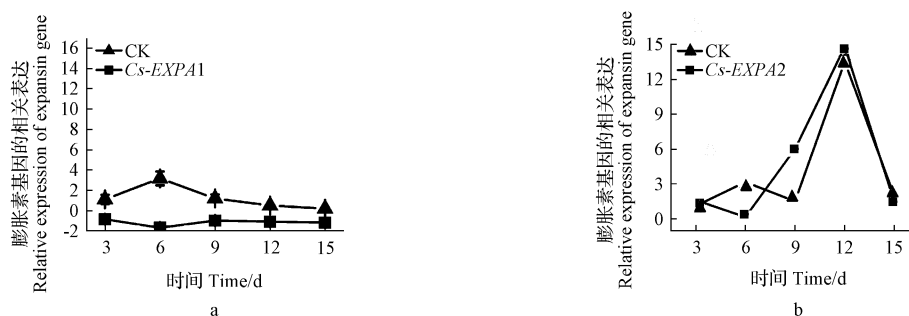


图7 蓝光对膨脹素基因的影响

Fig. 7 Effect of Blue light on expression of expansin gene

3 结论与讨论

光对植物生长发育作用显著,无论是光形态建成还是进行光合作用,都必须有光的参与^[5]。光是叶绿素形成和叶绿体发育成熟的必需条件,植物通过光合作用,将无机物合成有机物。另一方面,光能抑制细胞的延长,促进细胞的成熟和分化,也能抑制枝、叶的生长。

崔瑾等^[6]的研究显示,红光对促进植株茎的伸长有重要作用:在补充红光的条件下,黄瓜和番茄幼苗的株高均得到显著的提高,杜健芳等^[7]在研究光质对油菜幼苗生长的影响时也得到相同的结果;而蓝光则对茎伸长有抑制作用,张瑞华等^[8]研究表明蓝光极显著抑制了番茄下胚轴的伸长。与白光相比,绿光和红光对姜植株高度的增加具有促进作用,蓝光却显著减少了株高但显著增加了茎粗,绿光条件下茎粗显著减少,而蓝光和绿光均显著减少了姜植株的单株干物质质量^[9]。

该研究发现,随着蓝光处理时间的增加,“D0462”下胚轴长度一直低于CK,红光处理后“D0462”下胚轴极显著高于CK,说明蓝光对“D0462”下胚轴的伸长具有抑制作用,红光具有促进作用,这与之前的红光、蓝光对下胚轴伸长影响的报道结果相一致^[10]。孙莉莉等^[4]认为蓝光促进了 IAA 氧化酶的表达,使植物体内 IAA 水平降低,从而抑制了下胚轴的伸长。但具体的机制仍需要深入研究。

该试验结果表明红光抑制膨脹素基因的表达,蓝光对膨脹素基因的表达大部分起抑制作用,但在某些时间却能分别促进 Cs-EXPA1、Cs-EXPA2 的表达。推断黄

瓜矮化品种“D0462”下胚轴过度矮化与膨脹素基因表达异常有密切关系,当膨脹素基因表达被抑制时,矮化突变体的下胚轴就会得以延伸。而 Cs-EXPA1 基因的表达则与之重要相关。至今膨脹素基因表达与光质之间关系的研究较少,对光质如何影响膨脹素基因的表达机制尚不明确,未来仍需进行大量的工作对其进行深入研究。

参考文献

- [1] Sampedro J, Cosgrove D J. The expansin superfamily[J]. Genome Biology, 2005, 6(12): 242.
- [2] Cosgrove D J. How do Plant cell wall extend? [J]. Plant Physiology, 1993, 102: 1-6.
- [3] Sasidharan R, Chinnappa C C, Voesenek L A C J, et al. The regulation of cell wall extensibility during shade avoidance: a study using two contrasting ecotypes of *Stellaria longipes*[J]. Plant Physiology, 2008, 148: 1557-1569.
- [4] 孙莉莉, 李凤兰, 秦智伟, 等. 光质对矮生黄瓜生长及生理特性的影响[J]. 中国蔬菜, 2011(8): 65-70.
- [5] 张微慧, 张光伦. 光质对果树形态建成及果实品质的生理生态效应[J]. 中国农学通报, 2007, 23(1): 78-83.
- [6] 崔瑾, 马志虎, 徐志刚, 等. 不同光质补光对黄瓜、辣椒和番茄幼苗生长及生理特性的影响[J]. 园艺学报, 2009, 36(5): 663-670.
- [7] 杜健芳, 廖祥儒, 叶步青, 等. 光质对油菜幼苗生长及抗氧化酶活性的影响[J]. 植物学通报, 2002(19): 743-745.
- [8] 张瑞华, 徐坤, 董灿兴, 等. 光质对姜生长及光能利用特性的影响[J]. 园艺学报, 2008, 35(5): 673-680.
- [9] 张欢, 徐志刚, 崔瑾, 等. 不同光质对萝卜芽苗菜生长和营养品质的影响[J]. 中国蔬菜, 2009(10): 28-32.
- [10] Lin C. Blue light receptors and signal transduction[J]. Plant Cell, 2002, 14: 207-225.

Effect of Light Quality on the Expression of Expansin Gene in Dwarf Cucumber

WANG Duo-jia, SUN Li-li, HUANG Sha-sha, LI Feng-lan, HU Bao-zhong

(Institute of Life Science, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030)

DOI:10.11937/bfyy.201502025

锈叶杜鹃愈伤组织诱导和增殖研究

周 敏¹, 龙秀琴², 刘 燕³

(1. 遵义医药高等专科学校, 贵州 遵义 563000; 2. 贵州省山地资源所, 贵州 贵阳 550001; 3. 贵州省生物研究所, 贵州 贵阳 550009)

摘 要:以锈叶杜鹃无菌种子萌发后的胚轴和子叶为试材,对影响其愈伤组织诱导和增殖的几个关键因子进行了研究。结果表明:MS培养基较适宜愈伤组织的诱导和培养;TDZ和NAA浓度对愈伤组织诱导有很大影响,TDZ 0.50 mg/L+NAA 0.05 mg/L对愈伤组织诱导效果较好,诱导率为77.78%;MS+TDZ 0.10 mg/L+NAA 0.05 mg/L对愈伤组织增殖效果较好,增殖率为96.67%,增殖倍数为4.50;愈伤组织需及时转瓶,转瓶时间较晚容易褐化死亡,转瓶时间以40 d为宜。

关键词:锈叶杜鹃;愈伤组织;诱导;增殖

中图分类号:S 685.21 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)02-0088-03

锈叶杜鹃(*Rhododendron siderophyllum* Franch.)为常绿野生杜鹃,花期3—6月,冬季偶见开花植株,株型优美,花冠筒状钟形,花色淡雅丰富,有白色、淡红色、淡紫色或偶见玫瑰红色,花冠内面上方通常有黄绿色、红色或杏黄色斑点^[1],有较高观赏价值。目前,锈叶杜鹃主要靠种子繁殖,但种子萌发率低、繁育时间长;扦插生根困难,加之季节和资源限制,需行之有效的快繁方法对其进行繁殖和保护。组织培养技术是当代兴起的一种快速繁殖的培养途径,不仅简单、迅速、繁殖速度快,更利于植物新品种的推广和规模化生产。愈伤组织诱导和增殖是组培快繁中的关键环节,关于锈叶杜鹃组织培养方面研究尚鲜见报道。现对锈叶杜鹃组培快繁中愈伤组织诱导和增殖方面做了细致研究,力求为今后锈叶杜鹃的快速育苗技术打下坚实基础,可为商品化生产

提供一定的科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为锈叶杜鹃无菌种子萌发后的胚轴和子叶,种子采自贵州百里杜鹃自然保护区和贵阳乌当区可龙村万亩杜鹃林多年生锈叶杜鹃植株。

1.2 试验方法

1.2.1 培养条件 试验所用培养基均加入30 mg/L蔗糖、10 g/L琼脂、1 g/L PVP(聚乙烯吡咯烷酮),pH 5.4~5.8。培养条件为温度(25±1)℃,光照时间1 h/d,光照强度1 500~2 000 lx。

1.2.2 筛选愈伤组织诱导最适培养基 以MS、1/2MS、1/4MS 3种培养基为基本培养基,附加TDZ 0.10 mg/L和NAA 0.05 mg/L,对愈伤组织进行诱导培养,筛选适合愈伤组织培养的培养基配方。50 d后记录诱导结果。

1.2.3 筛选愈伤组织诱导最适激素浓度 以MS培养基为基本培养基,以NAA 0.05 mg/L为基本生长素和浓度,附加不同浓度TDZ(0.10~1.50 mg/L),对愈伤组织诱导进行研究,筛选诱导愈伤组织的TDZ最适宜浓度。在筛选出TDZ适宜浓度基础上,以TDZ 0.50 mg/L为基本细胞分裂素,附加不同浓度NAA(0.01~

第一作者简介:周敏(1980-),女,贵州遵义人,硕士,讲师,现主要从事植物组培及栽培技术等研究工作。E-mail: minzhou211@126.com.

责任作者:刘燕(1981-),女,贵州贵阳人,硕士,副研究员,现主要从事花卉开发与繁殖等研究工作。

基金项目:贵州省科技厅重大专项基金资助项目(黔科合重大专项字[2011]6001);贵阳市科技局资助项目(筑科合同[2012]027)。

收稿日期:2014-07-28

Abstract: Taking sprawl cucumber(*Cucumis sativus* L.) '129' and dwarf cucumber 'D0462' as experimental materials, the effects of different light qualities on expression of the expansin were studied. The results showed that the hypocotyls length of 'D0462' was longer or shorter by different light treatment. The expression of expansin was detection by Real-time PCR. The red light inhibited the expression of expansin and blue light inhibited at first but promoted after that. It was inferred that the dwarf character of 'D0462' was related to the expression of expansin, especially with the Cs-EXPA1.

Keywords: light quality; expansin; dwarf; expression