

Ptcor8 表达与枳生理落叶及温度的关系

罗坤^{1a,2,3}, 龙桂友^{1a,2,3*}, 袁飞荣^{1a,2,3}, 焦徕^{1a}, 邓子牛^{1a,2,3}, 饶力群^{1b}

(1.湖南农业大学 a.园艺园林学院; b.生物科学技术学院, 湖南 长沙 410128; 2.国家柑橘改良中心 长沙分中心, 湖南 长沙 410128; 3.湖南作物种质创新与资源利用重点实验室, 湖南 长沙 410128)

摘要: 将干径粗度相近的2年生枳实生容器苗60株从田间移入温室(20~25℃),以田间10株为对照.从2008年11月14日至2009年1月3日,每10d从温室随机搬出3株置于田间,研究枳叶片中*Ptcor8*的表达与枳生理落叶及环境温度的关系.结果表明,温室里的枳冬季不落叶;从温室搬至田间的枳,随着搬出温室时间的延后,其落叶期推迟;12月中旬后搬出温室的枳,即使经历冬季低温也不落叶.在落叶和未落叶的枳叶片中,均能检测到*Ptcor8*的表达,qPCR结果表明,*Ptcor8*的表达与枳的生理落叶无关,其表达量的明显增加与骤然降温和持续低温有关,与低温关系密切.

关键词: 枳; *Ptcor8*; 温度; 生理落叶; 半定量聚合酶链式反应; 定量聚合酶链式反应

中图分类号: Q344⁺.13; S666 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2010)04-0418-04

Ptcor8 expression related to defoliation of *Poncirus trifoliata* Raf. and temperature

LUO Kun^{1a,2,3}, LONG Gui-you^{1a,2,3*}, YUAN Fei-rong^{1a,2,3}, JIAO Lai^{1a}, DENG Zi-niu^{1a,2,3}, RAO Li-qun^{1b}

(1.a.College of Horticulture and Landscape; b.College of Bioscience and Biotechnology, HNAU, Changsha 410128, China; 2. Changsha Sub-Center, National Center for Citrus Improvement, Changsha 410128, China; 3.Hunan Provincial Key Laboratory of Crop Germplasm Innovation and Utilization, Changsha 410128, China)

Abstract: To study *Ptcor8* expression related to the defoliation of *Poncirus trifoliata* Raf. and the temperature, 2-year-old seedlings of 60 potted *Poncirus trifoliata* Raf. with similar diameter, in the temperature-controlled chamber (20~25℃), were transferred to the field every 10 d from the 14th November, 2008 to January of next year, meanwhile, another 10 seedlings were put in the field as the control. The *Poncirus trifoliata* Raf. seedlings in the temperature-controlled chamber and those transferred to the field after the 14th December were non-deciduous. However, those transferred to the field before the 14th December was deciduous, and their defoliating period delayed along with the time outside the temperature-controlled chamber. In the deciduous and the non-deciduous the expression of *Ptcor8* gene was both detected. Furthermore, by qPCR, the more changes of temperature and the longer duration of low temperature, the higher expression of *Ptcor8*. Therefore, the expression of *Ptcor8* gene may not be directly related to the physiological defoliation of *Poncirus trifoliata* Raf., but rather closely related to low temperature induction.

Key words: *Poncirus trifoliata* Raf.; *Ptcor8*; temperature; physiological defoliation; RT-PCR; qPCR

柑橘常因遭受低温伤害而造成损失^[1].枳在冬季落叶后能耐受-26℃的低温,是柑橘中最抗寒的种类^[2].与易受低温伤害的柑橘品种相比,枳拥有低温响应的基因或蛋白质,以增强其抗寒性^[3-10].笔

收稿日期: 2010-01-22

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2008BAD92B05-2); 湖南农业大学人才科学基金(09WD48)

作者简介: 罗坤(1984—),女,湖南株洲人,硕士研究生;*通讯作者, longgy63@163.com

者从枳中克隆到 1 个与低温锻炼相关的基因 *Ptcor8*(EU077497)。该基因属于植物 WCOR413 冷诱导蛋白家族,具有 1 个 621 bp 的潜在开放阅读框,编码 206 个氨基酸残基的蛋白质,其相对分子质量为 2.28×10^6 ,等电点为 9.4,具有 5 个疏水区,5 个跨膜螺旋,6 个丝氨酸磷酸化位点。亚细胞定位和分子系统发育分析均表明,该基因编码的蛋白为质膜型冷诱导蛋白^[11]。枳一般在 11 月下旬开始落叶,进入休眠状态。笔者探讨 *Ptcor8* 的表达与枳生理落叶及环境温度的关系,旨在了解枳抗寒的分子机理。

1 材料与方 法

1.1 材 料

干径粗度相近的 2 年生枳实生容器苗 70 株。

主要试剂盒与仪器为 Trizol 试剂盒、qPCR 试剂盒(TaKaRa, SYBR[®]Premix Ex Taq TM, Perfect Real-time)、UV-1800 紫外分光光度计、电泳仪、PCR 仪、ABI 7300 定量 PCR 仪等。

1.2 方 法

1.2.1 试验设计

将 60 株枳苗置于温室(温度 20~25 °C,相对湿度约 70%),10 株置于田间(对照)。容器苗常规水肥管理和病虫害防治。2008 年 11 月 14 日至 2009 年 1 月 3 日,每 10 d 从温室随机搬出 3 株枳苗置于田间,共搬 6 次,分别设为处理 1 至处理 6。记录温度和枳生理落叶的情况。田间枳苗(对照)落叶时采集未脱落叶片。从温室搬至田间的枳苗进入落叶期时,采集未脱落叶片;搬出温室 1 个月未进入落叶期的处理,于搬出后 1 个月采集叶片。每处理 3 株混合采样,所采集的叶片用液氮速冻后,于 -80 °C 冰箱保存,用于 RNA 的提取和反转录,进行 RT-PCR 和 qPCR 检测,以研究枳叶片中 *Ptcor8* 的表达与枳生理落叶及环境温度的关系。

所用引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成,qPCR 在湖南省作物种质创新与资源利用重点实验室完成,其余试验均在国家柑橘改良中心长沙分中心完成。

1.2.2 RNA 的提取与反转录

提取叶片总 RNA, DNase I 消化 DNA, 测定总 RNA 浓度, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性, 然后进行反转录, 合成单链 cDNA。反转录体系为 5×RT-Buffer 5 μL, 1 μmol/L dNTP 5 μL, 4 μmol/L dT18 Primer 0.5 μL, 40 U/μL RNasin 0.5 μL, 200 U/μL M-MLV 0.5 μL, RNA 2 μg, 加 DEPC 水至总体积 25 μL。反转录条件为 42 °C 持续 60 min, 95 °C 持续 5 min, 16 °C 保存。反转录获得的 cDNA 转入 -20 °C 保存, 用于 RT-PCR 和 qPCR 检测。

1.2.3 半定量 RT-PCR 检测

以 β -actin 为内参基因, 设计、合成上游引物 5'-CACACTGGAGTGATGGTTGG-3' 和下游引物 5'-ATTGGCCTTGGGGTTAAGAG-3', 扩增片段长度 228 bp。反应体系(15 μL)为: 1 μmol/L dNTP 3.0 μL, 10× PCR Buffer 1.5 μL, 2.5 μmol/L 上游引物和下游引物各 1.5 μL, 2 U/μL Taq 0.4 μL, cDNA 模板 1 μL, 加 DEPC 水至 15 μL。PCR 反应程序为: 94 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 45 s, 47 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 90 s, 35 个循环, 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保存。1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

在 *Ptcor8* 基因编码区内, 设计、合成上游引物 5'-CATGAGGGCTGGTGGGGTGA-3' 和下游引物 5'-GCTCGGATGTGTTCTTGCAG-3', 扩增片段长度 483 bp。根据内参基因扩增确定的 cDNA 模板用量, 进行 RT-PCR 反应。反应体系及 PCR 反应程序与内参基因扩增相同, 仅退火温度改为 58 °C, 最后用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

1.2.4 qPCR 检测

在 *Ptcor8* 编码区内, 设计合成上游引物 5'-TGTTGCTCCCAGTTT-3' 和下游引物 5'-GCCCAGGCAGGATAGA-3', 以 β -actin 为内参基因。内参基因的引物与半定量 RT-PCR 内参引物相同。反应体系(20 μL)为 ddH₂O 5.1 μL, SYBR[®]Premix Ex Taq TM(2×) 10.0 μL, 2.5 μmol/L 上游引物和下游引物各 1.5 μL, ROX Reference Dye (50×) 0.4 μL, cDNA 模板 1.5 μL。每个处理设 3 次重复。反应条件为 95 °C 预变性 30 s, 95 °C 变性 5 s, 55 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 31 s, 40 个循环。72 °C 延伸时收集信号, 获得溶

解曲线。

1.2.5 数据处理

用Excel 2007和ABI 7500系统软件处理数据，采用 $2^{-\Delta C_t}$ 法计算*Ptcor8*的表达值^[12]。

2 结果与分析

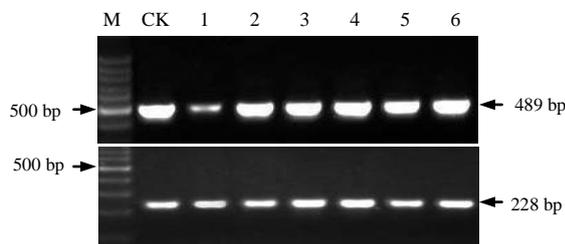
根据试验设计，确定各处理枳叶片采样时间如表1。试验结果表明，置于温室的枳，冬季叶片不脱落。田间的枳(对照)，在11月下旬开始落叶。2008年11月14日至12月4日前后3次从温室搬至田间的枳，搬至田间后分别约17、19、30 d开始落叶，比田间枳落叶时间分别延迟3、15、36 d；12月14日至2009年1月3日搬至田间的枳，直至2009年2月中旬均未落叶。

表1 各处理枳叶片的采样时间及落叶情况

Table 1 Sampling time and defoliation of *Poncirus trifoliata* Raf. under different treatments

处理	材料搬出温室时间	叶片取样时间	落叶情况
CK		2008-11-28	11月28日开始落叶
1	2008-11-14	2008-12-01	比对照迟3 d落叶
2	2008-11-24	2008-12-13	比对照迟15 d落叶
3	2008-12-04	2009-01-04	比对照迟36 d落叶
4	2008-12-14	2009-01-14	不落叶
5	2008-12-24	2009-01-24	不落叶
6	2009-01-03	2009-02-03	不落叶

由图1可见，落叶和未落叶的枳叶片中均能检测到*Ptcor8*的表达，除处理1枳叶片中*Ptcor8*的表达明显较弱外，其他处理之间差异不明显。



M为marker；CK为田间对照；1~6分别为处理1至处理6。

图1 *Ptcor8*在不同处理枳叶片中的RT-PCR表达结果
Fig.1 RT-PCR result of *Ptcor8* in *Poncirus trifoliata* Raf. under different treatments

qPCR检测结果(图2)表明，*Ptcor8*在落叶和未落叶枳叶片中均表达。在落叶的4个处理的枳叶片

中，该基因表达量的变化很大，田间对照、处理1、处理2和处理3基因的表达量分别为542.6、44.81、13.56和32.58；在未落叶的3个处理的枳叶片中，该基因表达量的变化也很大，处理4、处理5和处理6基因的表达量分别为34.89、100.57和584.47，所以，*Ptcor8*表达量与枳是否落叶没有关系。

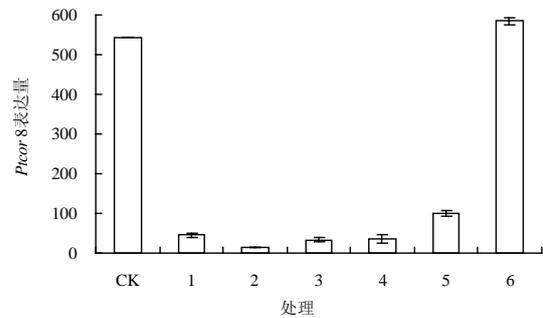


图2 *Ptcor8*在不同处理枳叶片中的qPCR表达结果
Fig.2 qPCR results of *Ptcor8* in *Poncirus trifoliata* Raf. with different treatments

从*Ptcor8*表达量(图2)来看，对照和处理6的表达量大大高于其他处理，这可能是*Ptcor8*的表达与骤然降温和持续低温有关。田间对照的枳在采样前1个月的日平均最低温度均在15℃左右，日平均最高温度达25℃；采样当天最高温度达31℃，最低温度仅6℃。骤然的低温导致该基因的大量表达。处理1至处理5的枳，从2008年11月中旬至2009年1月下旬，经历了逐渐降温的过程，*Ptcor8*表达量的变化不大，维持在13.56~44.81，仅处理5有明显的上升。处理6的枳经历了2009年1月上旬至2月上旬的严寒期，*Ptcor8*的表达量高达584.47。

3 结论与讨论

温室里的枳冬季不落叶。将枳从温室搬至田间，11月中旬至12月上旬搬出的枳，随着搬出温室时间的延后，枳的落叶期推迟；12月中旬后搬出的枳，即使经历冬季低温也不落叶。

*Ptcor8*来源于经过自然低温锻炼的枳，与低温诱导有关^[11]，所以，研究该基因是否与枳冬季生理落叶有关非常有必要。植物冬季落叶休眠是植物长期适应冬季低温进化的结果，温度的降低是主要因子之一^[13-14]。冬季落叶的冬红果置于塑料大棚可延

迟落叶,从而延长观赏期^[15]。枳是栽培柑橘中唯一冬季落叶的种类,将枳置于温室(20~25℃)则冬季不落叶。这与在四季如春的云南省富民县发现的一种常绿枳情况相似。

从温室搬至田间的枳,12月中旬之前搬出的落叶,而12月中旬之后搬出的不落叶,可见,低温不是枳冬季生理落叶的唯一因子。在适温生长条件下,日照时间的缩短不会导致枳生理落叶,但在低温条件下,日照时间的缩短会导致枳生理落叶。除低温以外,还有其他因子影响植物冬季的生理落叶^[16]。本试验中的半定量RT-PCR和qPCR^[17-20]检测结果表明,*Ptcor8*基因的表达及表达量的高低与枳落叶没有关系,而与低温诱导直接相关,证实该基因是一个冷诱导基因。该基因是否与枳的高度耐寒有关,还有待研究。

参考文献:

- [1] 沈洪波,陈学森,张艳敏.果树抗寒性的遗传与育种研究进展[J].果树学报,2002,19(5):292-297.
- [2] 龙桂友,刘杰,饶力群,等.枳落叶前的抗寒能力分析[J].湖南农业大学学报:自然科学版,2007,33(6):700-704.
- [3] 马海慧.北京地区引种常绿阔叶植物主要限制因子的研究[D].北京:北京林业大学园林学院,2004.
- [4] 江勇,贾士荣,费云标,等.抗冻蛋白及其在植物抗冻生理中的作用[J].植物学报,1999,41(7):677-685.
- [5] 王瑞云,贺润喜,岳文斌.植物抗寒性基因工程研究进展[J].中国生态农业学报,2004,12(1):26-29.
- [6] 王子成,邓秀新.柑橘原生质体的超低温保存[J].河南大学学报:自然科学版,2002,32(3):41-43.
- [7] 龙桂友,刘杰,饶力群.植物蛋白质组研究方法[J].湖南农业大学学报:自然科学版,2005,31(3):342-346.
- [8] 邓伯勋,曾凤.5个柑橘体细胞杂种的抗寒性研究[J].林业科学,2001(6):6.
- [9] 郭金铨.在冻害过程中咖啡离体叶细胞透性变化的研究[J].林业科学,2001(5):9.
- [10] 龙桂友,刘杰,饶力群,等.柑橘抗寒研究的现状与展望[J].生物技术通报,2006(增刊):58-62.
- [11] 龙桂友.柑橘低温诱导相关基因的克隆及表达分析[D].长沙:湖南农业大学园艺园林学院,2007.
- [12] Michael W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR[J]. Nucleic Acids Research, 2001, 29: 2002-2007.
- [13] Snyder R L, Spano D, Duce P, et al. Temperature data for phenological models[J]. International Journal of Biometeorology, 2001, 45(4): 178-183.
- [14] 张福春.气候变化对中国木本植物物候的可能影响[J].地理学报,1995,50(5):403-408.
- [15] 胡忠惠,张晓玉,杨丽芳,等.延长冬红果盆景观赏期的措施[J].落叶果树,2006(6):51-52.
- [16] 徐雨晴,陆佩玲,于强.气候变化对植物物候影响的研究进展[J].资源科学,2004,26(1):129-136.
- [17] 欧阳松应,杨冬,欧阳红生,等.实时荧光定量PCR技术及其应用[J].生命的化学,2004,24(1):74-76.
- [18] Yyagi S, Bratu D P, Kramer F R. Multicolor molecular beacons for allele discrimination[J]. Nature Biotechnology, 1998, 16(1): 49-53.
- [19] Yajima T, Yagihashi A, Kameshima H. Quantitative reverse transcription-PCR assay of the RNA component of human telomerase using the Taq Man fluorogenic detection system[J]. Clinical Chemistry, 1998, 44(12): 2441-2445.
- [20] Hiibner P, Waiblinger H U, Pietsch K, et al. Validation of PCR methods for quantitation of genetically modified plants in food[J]. Journal of AOAC International, 2001, 84(6): 1855-1864.

责任编辑:王赛群
英文编辑:罗文翠