

不同花生品种抗旱生理与*AhNCED1*基因表达的关系

陈艳萍, 何金丽, 李丽梅, 李玲*

华南师范大学生命科学学院, 广东省植物发育工程重点实验室, 广州510631

摘要: 利用隶属函数对山东产地的4个花生品种进行抗旱性综合评价, 同时分析4个品种*AhNCED1*基因的表达情况, 研究*AhNCED1*基因与不同花生品种抗旱性的相关性。结果表明, 花生品种间的抗旱性有显著差异, 抗旱性强弱为: ‘鲁花14号’>‘花育33号’>‘海花1号’>‘花育24号’。干旱胁迫下, 叶片*AhNCED1*的表达量与其抗旱性呈正相关, *AhNCED1*基因可以作为筛选抗旱花生品种分子指标。

关键词: *AhNCED1*基因; 花生; 干旱胁迫; 抗旱性; 隶属函数

The Relationship between the Expression of *AhNCED1* and Drought Resistance Physiology of Different Peanut Varieties

CHEN Yan-Ping, HE Jin-Li, LI Li-Mei, LI Ling*

Guangdong Provincial Key Laboratory of Biotechnology for Plant Development, College of Life Sciences, South China Normal University, Guangzhou 510631, China

Abstract: Four peanut varieties growing in Shandong were screened for drought resistance using the subordinate function value. Meanwhile we analyzed the expression level of *AhNCED1* gene and studied the relationship between the *AhNCED1* expression and the drought resistance. The results showed that drought resistance between different varieties differed remarkably, ‘Luhua 14’>‘Huayu 33’>‘Haihua 1’>‘Huayu 24’. Under drought stress, the expression level of *AhNCED1* genes positively correlated with drought resistance, which showed that the *AhNCED1* gene could as a molecular marker to screen the highly tolerant peanut cultivar.

Key words: *AhNCED1* gene; peanut; drought stress; drought resistance; subordinate function value

花生(*Arachis hypogaea* L.)是世界上重要的经济和油料作物之一, 干旱是花生产量与质量提高的主要限制因子, 严重制约着花生的产量和品质, 抗旱育种是干旱条件下提高作物产量经济有效的手段(梁炫强等2004)。脱落酸是植物体内重要的逆境响应激素, 参与植物对逆境胁迫如干旱、高盐、低温等的应答(Boneh等2012)。在干旱胁迫反应中, 脱落酸通过调节气孔关闭、参与信号通路、诱导相关基因及蛋白表达等途径提高植物抗旱性(Verslues和Zhu 2005)。本课题组前期工作中, 研究了广东产地的10个花生品种抗旱性与其体内ABA水平关系, 发现抗旱能力与体内ABA积累呈正相关(刘吉升和李玲2006)。9-顺式环氧类胡萝卜素双加氧酶(NCED)是调节ABA生物合成的关键限速酶(胡博等2011; Hu等2010), 其表达水平与内源ABA含量相关(Fujii和Zhu 2009)。番茄、玉米和菜豆等作物在干旱胁迫条件下NCED基因表达上调从而增加ABA的积累(Burbidge等1999; Tan

等1997; Qin和Zeevaart 2002)。我们2005年从耐旱花生品种‘粤油7号’叶片中克隆得到*AhNCED1*基因, 异位超表达*AhNCED1*可以显著提高拟南芥的抗旱性(Wan和Li 2005, 2006)。

对于广东产地花生耐旱品种‘粤油7号’和敏旱品种‘汕优523’抗旱性与其体内*AhNCED1*基因及蛋白表达水平的关系, 我们的研究表明, 胁迫早期, 品种抗旱性与*AhNCED1*基因及蛋白表达水平呈正相关(胡博等2012b)。但有关其他地域花生品种*AhNCED1*基因在干旱胁迫下的表达尚无报道, 不同产地不同花生品种间抗旱性与*AhNCED1*基因表达的关系也不清楚。本研究以山东产地的4个花生品种为材料, 分析*AhNCED1*基因在响应干旱时的表达变化, 结合抗旱生理指标的变化, 建立*AhNCED1*基因筛选花生抗旱品种的方法, 为进一

收稿 2013-01-21 修定 2013-02-21

资助 广东省科技计划项目(2010B020301010)。

* 通讯作者(E-mail: liling@scnu.edu.cn; Tel: 020-85211378)。

步探索花生抗旱机理和指导生产提供科学依据。

材料与amp;方法

1 材料

花生(*Arachis hypogaea* L.)供试品种‘鲁花14号’、‘海花1号’、‘花育24号’和‘花育33号’由山东花生研究所馈赠。

2 方法

2.1 花生培养与胁迫处理

选取饱满花生种子浸泡过夜,按2颗·盆⁻¹的密度种植于直径15 cm的盛有泥炭土和珍珠岩(3:1)的塑料花盆中,于30 ℃,光照/黑暗为16 h/8 h培养箱中培养,隔天浇1/4MS营养液,培养至四叶期。随机挑选长势相同的花生品种,将花生带根部取出,自来水洗净土壤,浸泡于20% PEG6000 (W/V)中0、2、12和24 h后取材保存,以蒸馏水处理为对照(刘吉升和李玲2006)。

2.2 叶片萎蔫指数的测定

采用目测法,待花生种子长出两叶一心时,停止浇水,使土壤自然干旱,称重法计算土壤含水量,当含水量达到75%,每隔1 d用数码相机拍照,根据

萎蔫程度评定萎蔫等级(岳桦和孙笑丛2011)。根据花生在干旱过程中形态的动态变化,将花生叶片萎蔫指数分为6级(图1-A):0级,叶片自然外展,叶色鲜绿有光泽,植株坚挺;1级,叶片开始失去水分,无光泽,顶一叶和顶二叶略微下垂;2级,叶片继续失水,皱缩,下垂幅度加剧;3级,部分叶片出现干硬卷曲;4级,所有叶片皱缩下垂,叶色变黄;5级,叶片完全失水,下垂,植株完全死亡。如果萎蔫程度介于两个等级之间,作为半级处理。

2.3 叶片相对含水量测定

按照Fukao等(2011)的方法。

2.4 叶片脯氨酸含量测定

按照张殿忠等(1990)的方法。

2.5 叶片ABA含量测定

参照Yue等(2012)的方法。

2.6 抗旱性评价

运用SPSS Statistics 17.0软件对某一指标性状测定值进行显著性分析。按照张智猛等(2011)的方法利用隶属函数值评价抗旱性。

2.7 *AhNCED1*基因表达分析

RNA抽提及cDNA的合成操作参照Su等

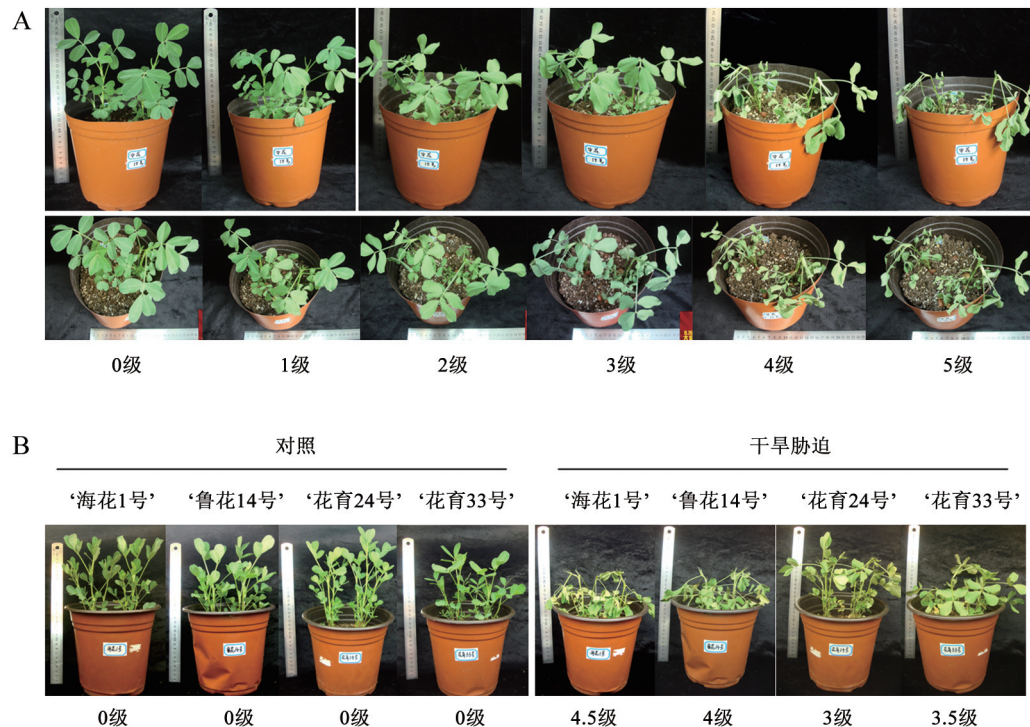


图1 正常生长条件和干旱胁迫下花生叶片表型(A)和萎蔫指数(B)

Fig.1 Leave morphology (A) and withered index (B) of peanuts under normal and drought stress

(2012)的方法。选择花生内参基因(*18S*)和表达基因(*AhNCED1*), 根据已知基因序列, 利用Primer Premier 5.0软件进行引物设计(表1)。qRT-PCR操作过程参照Liu等(2011)的方法。相对表达量采用delta delta CT法。

表1 花生内参基因和目的基因对应引物

基因	引物(5'→3')	扩增片段大小/bp
<i>18S</i>	F: TACGTCCCTGCCCTTTGTAC	168
	R: CCTACGGAAACCTTGTTACGAC	
<i>AhNCED1</i>	F: TTACCTGTGGGATTGTTTC	81
	R: ACATGAGCCTCTACTTCTGC	

2.8 DIG探针制备与Northern杂交

按照Liu等(2011)的方法。总RNA变性后, 1.5%甲醛变性胶分离, 通过20×SSC转移到尼龙膜(Amersham Nylon N⁺)上, 以*AhNCED1*的cDNA为模板采用特异引物(上游引物5'-GTTACGCGCGTGAAAT-TCCACA-3', 下游引物5'-GCGCTTCAATCCAC-CGGATACCA-3')合成探针, 50℃杂交过夜。洗膜条件: 2×SSC含0.1% SDS, 常温2次, 1×SSC含0.1% SDS, 0.1×SSC, 65℃ 2次, 各10 min, 1×封闭液和DIG标记抗体封闭30 min, 洗涤缓冲液洗膜45 min 3次, 探测缓冲液平衡5 min, 压X光片, 显影, 定影, 扫描分析。

实验结果

1 干旱胁迫下不同花生品种叶片的萎蔫指数和含水量变化

山东4个花生品种干旱胁迫处理7 d, ‘海花1号’萎蔫指数最大, ‘花育24号’的萎蔫指数最小(图1-B)。依据萎蔫指数划分标准依次评定为: 4.5级, 4级, 3级, 3.5级。正常生长条件下不同花生品种叶片相对含水量无明显差异, 干旱胁迫下不同花生品种叶片相对含水量均下降。经干旱胁迫24 h后, ‘鲁花14号’叶片相对含水量下降21.1%; ‘花育24号’叶片相对含水量下降33.3% (图2)。

2 干旱胁迫下不同花生品种叶片脯氨酸和脱落酸含量的变化

正常生长条件下花生叶片脯氨酸含量较低, 且品种间无显著性差异。干旱胁迫处理后花生叶片脯氨酸含量急剧升高, 其中‘鲁花14号’与对照组

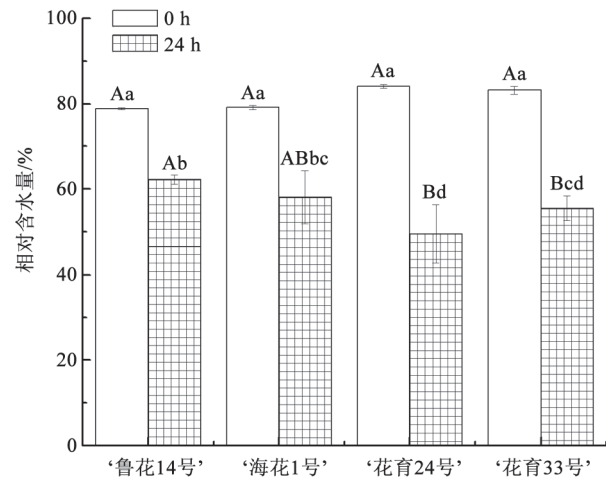


图2 正常生长条件与干旱胁迫下各品种相对含水量的变化

Fig.2 Relative water content of peanut leaves in different cultivars under normal and drought stress

各柱形上不同大写字母表示差异极显著($P<0.01$), 不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

相比, 升高幅度最大, 为对照组的127倍。‘花育24号’的升高幅度最低, 为对照植株的46倍(表2)。干旱胁迫下不同花生品种叶片ABA含量均升高, 品种间有差异, 其中‘鲁花14号’的升高幅度最大, 为对照组花生的20倍。‘海花1号’的升高幅度最低, 为对照的1.1倍(表2)。

3 花生品种抗旱性综合评价

采用与抗旱性密切相关的指标(含水量、脯氨酸含量、ABA含量、萎蔫指数)的隶属函数平均值对花生品种的抗旱性进行综合评价。

表2 正常生长条件与干旱胁迫下不同花生品种脯氨酸和ABA含量变化

Table 2 Proline and ABA contents of peanut leaves in different cultivars under normal and drought stress

处理	品种	脯氨酸含量/ mg·g ⁻¹ (DW)	ABA含量/ μg·g ⁻¹ (DW)
对照	‘鲁花14号’	0.44±0.018 ^{Cc}	0.39±0.001 ^{Dd}
	‘海花1号’	0.70±0.051 ^{Cc}	1.20±0.043 ^{Cc}
	‘花育24号’	0.66±0.038 ^{Cc}	3.34±0.113 ^{Bb}
	‘花育33号’	0.83±0.230 ^{Cc}	1.81±0.042 ^{Bc}
干旱胁迫	‘鲁花14号’	55.60±1.710 ^{Aa}	7.92±0.123 ^{Aa}
	‘海花1号’	55.70±12.660 ^{Aa}	1.33±0.104 ^{Cc}
	‘花育24号’	30.40±0.740 ^{Bb}	4.87±0.248 ^{Bb}
	‘花育33号’	42.90±8.770 ^{ABab}	3.77±0.113 ^{Bb}

同列数据旁不同大写字母表示差异极显著($P<0.01$), 不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

从表3可见,各品种的不同抗旱指标表现并不一致,表现为从0到1的连续变异或巨大差别,而不同品种在同一指标上的表现也不同。通过综合

隶属函数值定量反映出4个品种抗旱性强弱顺序为:‘鲁花14号’>‘花育33号’>‘海花1号’>‘花育24号’。

表3 干旱胁迫下花生叶片生理指标的隶属函数值

Table 3 The subordinate function value of each physiological index of peanut leaves under drought stress

品种	相对含水量	脯氨酸含量	ABA含量	萎蔫指数	平均隶属函数	抗旱性排名
‘鲁花14号’	1.000	1.000	1.000	0.333	0.833	1
‘海花1号’	0.730	0.420	0	0	0.288	3
‘花育24号’	0	0	0.027	1.000	0.257	4
‘花育33号’	0.390	0.069	0.059	0.667	0.296	2

4 不同花生品种在干旱胁迫下叶片*AhNCED1*基因的表达变化

干旱胁迫条件下叶片*AhNCED1*基因表达检测结果表明(图3),4个花生品种在正常生长条件下,基因表达量都呈现低水平;干旱胁迫初期(2 h)基因表达量达到最大值,其中‘鲁花14号’的表达量增幅最大;干旱胁迫12 h以后,基因表达量均逐渐降

低,但高于干旱胁迫0 h的表达水平。在干旱胁迫2 h各品种抗旱性强弱与其基因表达程度成正比(图3)。

讨 论

本试验选择了反映干旱胁迫条件下与抗旱性密切相关的4项指标,采用隶属函数法将其转换成独立的综合指标,评价得到山东省4个花生品种抗旱性大小依次为:‘鲁花14号’>‘花育33号’>‘海花1号’>‘花育24号’,这一结果与这些品种过去在生产上的表现是一致的。虽然利用隶属函数法鉴定作物抗旱性目前应用广泛,但多数生理生化指标测定程序复杂,周期长,不适于大量种质的耐旱性鉴定。

ABA作为响应干旱胁迫的信号因子,植物受到干旱胁迫时积累ABA,并通过蒸腾作用运输到叶肉细胞,通过跨膜转运至保卫细胞中,激活多种耐受水分缺失胁迫基因的表达,并调节气孔关闭,减少蒸腾作用(Hayashi和Kinoshita 2001)。*AhNCED1*基因是花生体内ABA合成的关键酶基因。前期研究表明,广东产地花生品种‘粤油7号’和‘汕优523’在干旱胁迫下,*AhNCED1*均上调,抗旱性较强品种‘粤油7号’上调幅度明显高于抗旱性较弱品种‘汕优523’,与脱水条件下2个品种叶片中ABA含量变化一致(万小荣和李玲2006);两个花生品种响应干旱胁迫后叶片的维管组织中ABA分布增强,含量增加,*AhNCED1*蛋白分布也增强;干旱胁迫初期‘粤油7号’花生*AhNCED1*蛋白分布强于‘汕优523’(胡博等2012b);*AhNCED1*转基因花生植株在干旱胁迫下,*AhNCED1*蛋白及ABA含量均提高(覃铭等

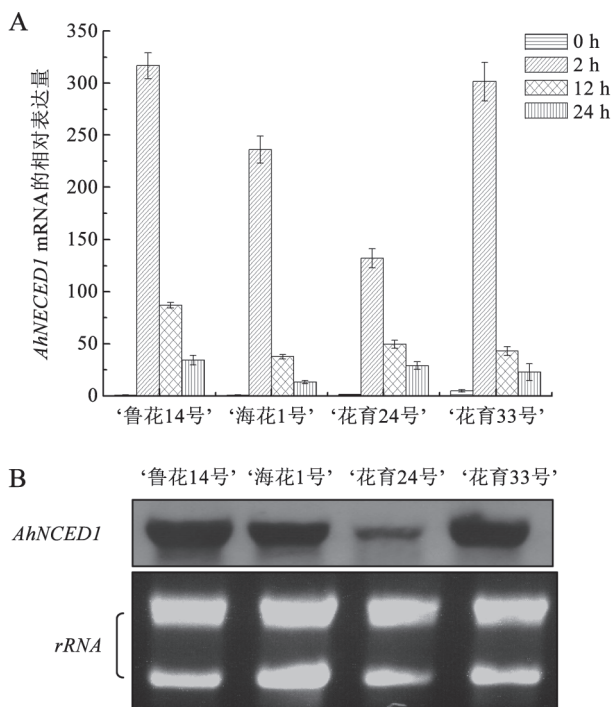


图3 干旱胁迫下不同花生品种叶片*AhNCED1*基因的表达变化

Fig.3 *AhNCED1* gene expression of peanut leaves in different drought resistant cultivars under drought stress

A: 干旱胁迫处理0、2、12和24 h叶片的qRT-PCR分析结果;
B: 干旱胁迫处理2 h叶片的Northern-blot分析结果。

2010); ‘粤油7号’在响应干旱胁迫初期时(1 h)叶片气孔开度下降较快, 引发气孔关闭, 其叶片相对含水量较高, 保水能力较强, 表明干旱胁迫下花生叶片*AhNCED1*蛋白表达可能影响气孔开闭(胡博等2012a)。本实验结果(图3)显示: 干旱胁迫0 h, 4个花生品种叶片*AhNCED1*基因表达量均维持较低水平, 胁迫初期(2 h)表达量迅速上升, 达到峰值, 此时4个花生品种的抗旱性强弱与其基因表达量成正比。可能是干旱胁迫早期, 首先触发根系*AhNCED1*的表达, 促进根源ABA的合成, ABA随维管束运输至叶片(Li等2011), 同时*AhNCED1*启动子存在顺式作用元件ABRE (ABA responsive element)区域, 与*AhNCED1*启动子的结合, 启动*AhNCED1*表达。干旱胁迫和ABA处理均可提高ABA响应元件的活性(Liang等2009), 促进*AhNCED1*大量表达, 合成ABA。随着胁迫时间延长(12 h)表达量均回落; 胁迫末期(24 h), 表达量进一步降低, 但仍高于对照组水平。说明在干旱胁迫早期, *AhNCED1*基因表达量不断增多, 脱落酸的合成不断增加, 随着干旱时间延长, 植株的自我调节能力已遭到不同程度严重破坏, *AhNCED1*分解速率超过合成速率, 表达量下降。干旱胁迫后各品种*AhNCED1*基因表达情况与叶片ABA含量变化情况一致, 说明其高抗旱性与其整株植物体内*AhNCED1*基因表达量显著上调和ABA含量增加有关。此结论与广东省花生品种抗性生理分析的结果相符合(Hu等2013), 说明*AhNCED1*基因表达量一定程度上可以反映花生抗旱性, 具有较普遍的意义, 可以将此阶段(胁迫早期) *AhNCED1*表达量作为判定花生抗旱性的一个依据。这4个品种叶片*AhNCED1*蛋白表达情况, 以及其他产地花生品种的抗旱性与基因表达规律还需进一步研究。

参考文献

- 胡博, 李嘉怡, 游琼英(2011). 花生*AhNCED1*重组蛋白原核表达与二级结构初步分析. 华南师范大学学报, (1): 87~92
- 胡博, 吕滢, 肖素妮, 李玲(2012a). 水分胁迫下花生叶片*AhNCED1*蛋白表达与气孔开度的变化. 植物生理学报, 48 (8): 815~820
- 胡博, 肖素妮, 吕滢, 李玲(2012b). 不同花生品种响应干旱胁迫后叶片内ABA与*AhNCED1*的分布. 中国细胞生物学学报, 34 (10): 1~15
- 梁炫强, 李少雄, 周桂元, 黎穗临, 曹干, 林坤耀(2004). 广东省“十五”期间花生遗传改良研究进展及发展对策. 广东农业科学, (增刊): 17~21
- 刘吉升, 李玲(2006). 不同品种花生的抗旱能力及其与内源ABA的关系. 植物生理学通讯, 42 (6): 1115~1116
- 覃铭, 胡博, 刘璨, 李玲, 罗虹(2010). *AhNCED1*基因转化花生研究. 热带亚热带植物学报, 18 (3): 277~282
- 万小荣, 李玲(2006). 脱水胁迫下抗旱性不同花生品种中某些生理生化指标变化比较. 植物生理学通讯, 42 (6): 1117~1118
- 岳桦, 孙笑丛(2011). PEG渗透胁迫对对开蕨生理特性影响. 北方园艺, (1): 91~94
- 张殿忠, 汪沛洪, 赵会贤(1990). 测定小麦叶片游离脯氨酸含量的方法. 植物生理学通讯, 26 (4): 62~65
- 张智猛, 万淑波, 戴良香, 宋文武, 陈静, 石运庆(2011). 花生抗旱性指标的筛选与评价. 植物生态学报, 35 (1): 100~109
- Boneh U, Biton I, Schwartz A, Ben-Ari G (2012). Characterization of the ABA signal transduction pathway in *Vitis vinifera*. Plant Sci, 187: 89~96
- Burbidge A, Grieve TM, Jackson A, Thompson A, McCarty DR, Taylor IB (1999). Characterization of the ABA-deficient tomato mutant *notabilis* and its relationship with maize *Vp14*. Plant J, 17 (4): 427~431
- Fujii H, Zhu JK (2009). *Arabidopsis* mutant deficient in 3 abscisic acid-activated protein kinases reveals critical roles in growth, reproduction, and stress. Proc Natl Acad Sci USA, 106: 8380~8385
- Fukao T, Yeung E, Bailey-Serres J (2011). The submergence tolerance regulator SUB1A mediates crosstalk between submergence and drought tolerance in rice. Plant Cell, 23: 412~427
- Hayashi M, Kinoshita T (2011). Crosstalk between blue-light and ABA-signaling pathways in stomatal guard cells. Plant Signal Behav, 6: 1662~1664
- Hu B, Liu X, Hong L, Li L, Luo GY (2010). Expression and localization of *Arachis hypogaea* 9-*cis* epoxy-carotenoid dioxygenase 1 (*AhNCED1*) of peanut under water stress. Biotechnol Eq, 24 (1): 1562~1568
- Hu B, Hong L, Liu X, Xiao SN, Lv Y, Li L (2013). Identification of different ABA biosynthesis sites at seedling and fruiting stages in *Arachis hypogaea* L. following water stress. Plant Growth Regul, Published online, 1~10
- Li BB, Feng ZG, Xie M, Sun MZ, Zhao YX, Liang LY, Liu GJ, Zhang JH, Jia WS (2011). Modulation of the root-sourced ABA signal along its way to the shoot in *Vitis riparia* × *Vitis labrusca* under water deficit. J Exp Bot, 62 (6): 1731~1741
- Liang JH, Yang LX, Chen X, Li L, Guo DL, Li HY, Zhang BY (2009). Cloning and characterization of the promoter of the 9-*cis*-epoxy-carotenoid dioxygenase gene in *Arachis hypogaea* L. Biosci Biotech Bioch, 73 (9): 2103~2106
- Liu X, Hong L, Li XY, Yao Y, Hu B, Li L (2011). Improved drought and salt tolerance in transgenic *Arabidopsis* overexpressing a NAC transcriptional factor from *Arachis hypogaea*. Biosci Biotech Bioch, 75: 100614~100618
- Qin X, Zeevaert JAD (2002). Overexpression of a 9-*cis*-epoxy-carote-

- noid dioxygenase gene in *Nicotiana plumbaginifolia* increases abscisic acid and phaseic acid levels and enhances drought tolerance. *Plant Physiol*, 128 (2): 544~551
- Su LC, Xu L, Chen YP, Li L (2012). Isolation of *AhDHNs* from *Arachis hypogaea* L. and evaluation of *AhDHNs* expression under exogenous abscisic acid (ABA) and water stress. *Afr J Biotechnol*, 11 (55): 11221~11229
- Tan BC, Schwartz SH, Zeevaart JA, McCarty DR (1997). Genetic control of abscisic acid biosynthesis in maize. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94 (22): 12235~12240
- Verslues PE, Zhu JK (2005). Before and beyond ABA: upstream sensing and internal signals that determine ABA accumulation and response under abiotic stress. *Biochem Soc Trans*, 33 (2): 375~379
- Wan XR, Li L (2005). Molecular cloning and characterization of a dehydration-inducible cDNA encoding a putative 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase in *Arachis hypogaea* L. *DNA Seq*, 16 (3): 217~223
- Wan XR, Li L (2006). Regulation of ABA level and water-stress tolerance of *Arabidopsis* by ectopic expression of a peanut 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase gene. *Biochem Biophys Res Commun*, 347 (4): 1030~1038
- Yue Y, Zhang MC, Zhang JZ, Tian XL, Duan LS, Li ZH (2012). Overexpression of the *AtLOS5* gene increased abscisic acid level and drought tolerance in transgenic cotton. *J Exp Bot*, 63 (10): 3741~3748