

微管调节试剂对白菜型冬油菜萌动种子 内源激素及抗寒基因表达的影响

田海燕¹,冯秀英²,徐明霞¹,董小云¹,郑国强¹,李 辉¹,
王 莹¹,魏家萍¹,武泽峰¹,崔俊美¹,谭雪莲³,刘自刚¹

(1.甘肃农业大学农学院/甘肃省干旱生境作物学重点实验室/甘肃省作物遗传改良与种质创新重点实验室,甘肃 兰州 730070;
2.武山县农业技术推广中心,甘肃 天水 741300;3.甘肃省农业科学院旱地农业研究所,甘肃 兰州 730070)

摘 要:以‘陇油7号’和‘天油4号’2个抗寒性不同的白菜型冬油菜为试验材料,通过添加400 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 秋水仙碱(微管聚合抑制剂)和50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 紫杉醇(微管聚合促进剂)试剂后,在20℃和0℃下分别处理12 h和24 h,随后采用液相色谱质谱联用仪和荧光定量PCR测定萌动种子内源激素含量及抗寒基因表达量,研究微管调节试剂对白菜型冬油菜萌动种子内源激素和抗寒基因的影响。结果表明:与对照相比,添加秋水仙碱后,在0℃和20℃处理下‘陇油7号’和‘天油4号’ABA、IAA、GA₃、ZT含量明显降低;添加紫杉醇后,‘陇油7号’和‘天油4号’ABA、IAA、GA₃、ZT含量明显升高。添加秋水仙碱后,与0℃处理12 h相比,0℃处理24 h时,‘陇油7号’ α -tubulin、 β -tubulin、MKK2、ICE1、CBF1、BrAFP1的表达量增加,‘天油4号’ α -tubulin、 β -tubulin、CBF1表达量增加,但MKK2、ICE1、BrAFP1的表达量降低;与20℃处理12 h相比,20℃处理24 h时,‘陇油7号’和‘天油4号’ α -tubulin、 β -tubulin、MKK2、ICE1、CBF1、BrAFP1的表达量均增加。添加紫杉醇后,与0℃处理12 h相比,0℃处理24 h时,‘陇油7号’ α -tubulin、 β -tubulin、ICE1、CBF1、BrAFP1的表达量均降低,‘天油4号’ α -tubulin、 β -tubulin、ICE1、CBF1、BrAFP1的表达量增加;与20℃处理12 h相比,20℃处理24 h时,‘陇油7号’和‘天油4号’ α -tubulin、 β -tubulin、MKK2、ICE1、CBF1、BrAFP1的表达量均降低。由此可知,微管调节试剂会影响白菜型冬油菜萌动种子内源激素的含量及抗寒基因的表达。

关键词:白菜型冬油菜;萌动种子;低温;内源激素;抗寒基因表达;秋水仙碱;紫杉醇

中图分类号:S565.4 **文献标志码:**A

Effects of microtubule reagent treatment on endogenous hormone and cold-tolerance related genes of seedling winter rapeseed *Brassica rapa* L.

TIAN Haiyan¹, FENG Xiuying², XU Mingxia¹, DONG Xiaoyun¹, ZHENG Guoqiang¹, LI Hui¹,
WANG Ying¹, WEI Jiaping¹, WU Zefeng¹, CUI Junmei¹, TAN Xuelian³, LIU Zigang¹

(1.College of Agronomy, Gansu Agricultural University/State Key Laboratory of Aridland Crop Science/Gansu Key
Lab. of Crop Improvement & Germplasm Enhancement, Lanzhou, Gansu 730070, China;
2.Wushan County Agricultural Technology Extension Center, Tianshui, Gansu 741300, China;
3.Institute of Dryland Agriculture, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou, Gansu 730070, China)

Abstract: In this study, ‘Longyou 7’ and ‘Tianyou 4’ were treated with 400 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ colchicine (Col) and 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ taxol (Tax) for 12 h and 24 h at 20℃ and 0℃ and followed by the sample liquid chromatography and quantitative PCR to determine the effects of microtubule reagent on endogenous hormones and cold-toler-

收稿日期:2022-06-18

修回日期:2022-07-14

基金项目:甘肃省科技重大专项(22ZD6NA009);省部共建干旱生境作物学国家重点实验室主任基金(GSCS-2021-Z01);甘肃省教育厅产业支撑计划项目(2021CYZC-46);甘肃省教育厅青年博士基金项目(2021QB-035);中央引导地方科技专项(ZCYD2020-2-3);西藏自治区农科院农科所统筹基金项目(2021NKS-TCJ-001);甘肃省教育厅2023年研究生“创新之星”项目(2023CXZX-647)

作者简介:田海燕(1999-),女,甘肃武威人,硕士研究生,研究方向为作物遗传育种。E-mail:2803988480@qq.com

通信作者:刘自刚(1975-),男,甘肃天水人,研究员,主要从事油菜遗传育种研究。E-mail:lzgworking@163.com

ance related genes in seedling winter rapeseed. The results showed that the contents of ‘Longyou 7’ and ‘Tianyou 4’, ABA, IAA, GA₃ and ZT decreased significantly after adding Col, and the levels of ABA, IAA, GA₃ and ZT increased significantly after Tax. After adding Col, compared to the 0℃ treatment for 12 h, when the 0℃ was processed for 24 h, the expressions of ‘Longyou 7’ α -tubulin, β -tubulin, MKK2, ICE1, CBF1, and BrAFP1 were upregulated, ‘Tianyou 4’ α -tubulin, β -tubulin and CBF1 were upregulated, however, the expression level of MKK2, ICE1 and BrAFP1 was downregulated; compared to the 20℃ treatment for 12 h, at 20℃ treatment for 24 h, the expressions of ‘Longyou 7’ and ‘Tianyou 4’ α -tubulin, β -tubulin, MKK2, ICE1, CBF1, and BrAFP1 were upregulated. After adding Tax, compared to the 0℃ treatment for 12 h, when the 0℃ was processed for 24 h, the expressions of ‘Longyou 7’ α -tubulin, β -tubulin, ICE1, CBF1 and BrAFP1 were downregulated. The expression of ‘Tianyou 4’ α -tubulin, β -tubulin, ICE1, CBF1 and BrAFP1 was upregulated; compared to the 20℃ treatment for 12 h, at 20℃ treatment for 24 h, the expressions of ‘Longyou 7’ and ‘Tianyou 4’ α -tubulin, β -tubulin, MKK2, ICE1, CBF1, and BrAFP1 were downregulated. This showed that microtubule regulating reagent affected the endogenous hormone content and the expression of cold resistance genes in cabbage winter rape.

Keywords: winter turnip rapeseed; germinating seeds; low temperature; endogenous hormone; cold resistance gene expression; colchicine; taxol

油菜是我国重要的油料作物,我国 50% 以上的食用油来源于油菜,同时油菜还是动物饲料、蔬菜、绿肥和生物柴油等的重要来源^[1]。长期以来,低温胁迫是限制我国油菜产区北移和高产的主要非生物因素,严重影响我国油菜产业的发展。当植物受到胁迫时,细胞膜上的感受器会首先感知到外界低温,植物接收到冷的信号后迅速调节植物体内的抗寒物质,启动抗寒基因的表达,进而激活相应的代谢调控途径,对植物产生保护屏障^[2]。环境低温信号与转换是植物冷应答的关键环节,细胞膜是植物感受低温最敏感的部位,由中间磷脂双分子层构成基本骨架,物质通过细胞膜进出,冷应激均会引起细胞骨架重排^[3]。细胞骨架是一类蛋白纤维网架体系,由微管、微丝及中间纤维组成,细胞骨架调节细胞膜的物质运输,同时细胞膜骨架整体结构还影响细胞膜上不同通道的离子活性^[4]。细胞骨架与跨质膜的细胞外基质互相联结,低温作用于跨膜的胞外受体,然后将冷信号传递给细胞骨架,由细胞外信号传递给生命活动的控制中心,进而对下游相关基因进行调控,形成了一个统一协调的调控网络。

细胞骨架重组对冷诱导的胞质 Ca²⁺ 浓度的波动(钙信号)非常重要,低温胁迫后,质膜生理状态、Ca²⁺ 内渗、相关质膜蛋白等在冷信号感受和传递的上游途径中发挥重要作用^[5]。在冷胁迫初期, Ca²⁺ 通道和质膜蛋白 CRLK1 / 2 被激活,随后 Ca²⁺ 信号和 MAPK 级联途径被激活,形成由胞外钙库向胞内的跨膜 Ca²⁺ 流。Ca²⁺ 流作为第二信使,通过 MEKK-MPK 激酶途径和 14-3-3s 穿梭途径,分别多泛素化 ICE1 和 CBFs 转录因子,从而调控冷信号通路核心

位置 ICE1-CBF-COR 的途径^[6]。ICE1 被 MAPK 级联中的 MPK3/6 磷酸化,导致 ICE1 被降解,同时, CRPK1 磷酸化的 14-3-3 蛋白从胞浆穿梭到细胞核,促进 CBFs 的降解,从而调节冷防御反应的持续时间,参与植物耐冷性通路^[7]。CBF 转录因子在低温应答调控中起关键作用^[8]。拟南芥中有三个 CBF 基因,即 CBF1、CBF2 和 CBF3,其中 CBF1 和 CBF3 直接感应冷信号,调控通路上的抗寒基因,低温诱导 OST1 激酶的活性,ICE1 和激活状态的 OST1 互作使 ICE1 蛋白磷酸化,提高 ICE1 蛋白的转录活性,从而提高植物的耐冷性^[9]。在冬油菜中抗冻蛋白(AFPs)具有抑制冰晶结合和生长能力,受 ICE1-CBF 冷信号通路的调控^[4]。

秋水仙碱(Colchicine, Col)作为一种微管聚合抑制剂^[10],可以改变细胞的发育进程,阻断染色体,使染色体结构发生变异,当 Col 与正在进行有丝分裂的细胞相遇时,秋水仙碱会与微管蛋白的特定位点结合,进而导致细胞的 α 微管蛋白结构和 β 微管蛋白二聚体变形,微管蛋白组装成微管的过程则会被明显阻断,使细胞停止于有丝分裂中期,从而导致细胞死亡^[11]。紫杉醇(Taxol, Tax)是一种微管促进和稳定已聚合的微管剂,当细胞与 Tax 接触后,会在细胞体内积累大量的微管,微管的积累会阻断细胞分裂^[12],进而促进或诱导微管蛋白聚合、防止解聚,从而能稳定细胞微管的稳定性^[13]。因此,本研究利用微管调节试剂,即微管聚合抑制剂 Col 和微管聚合促进剂 Tax 处理白菜型冬油菜萌动种子,分析微管试剂对不同白菜型冬油菜萌动种子相关内源激素和抗寒基因的变化,为油菜出苗的抗寒防冻提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

以白菜型冬油菜‘陇油 7 号’和‘天油 4 号’为试验材料,‘陇油 7 号’种子由甘肃省干旱生境作物学国家重点实验室油菜课题组提供,‘天油 4 号’种子由天水市农业科学研究所提供。

1.2 试验设计

挑选籽粒饱满、大小均一的种子,先用 75% 的酒精消毒 5 min,再用 ddH₂O 冲洗种子 3 次,灭菌滤纸吸干附着水,发芽盒(12 cm×12 cm)中萌发种子,每盒播种 100 粒。播后将发芽盒置于 SPX-GB 型植物光照培养箱(光照强度 600 μmol·s⁻¹·m⁻²),每天光照 16 h,昼/夜温度(20±1)/(20±1)℃,相对湿度 40%,每天浇 2 mL 50% 浓度的霍格兰营养液。种子萌发 5 d 后,添加 400 μmol·L⁻¹ 的 Col 处理 6 h,随后用 ddH₂O 水冲洗发芽盒 3~5 次,去除残留 Col 溶液。然后将油菜萌动种子放置于 20℃ 和 0℃ 温度下分别处理 12 h 和 24 h 后采样。对照添加等体积 ddH₂O,不加试剂处理。Tax 处理时,添加试剂为 50 μmol·L⁻¹ 的 Tax 处理,其他条件同 Col 处理。

1.3 内源激素含量测定

采用液相色谱质谱联用仪(Agilent LC-MS,安捷伦公司,美国)测定试样中赤霉素(gibberellin, GA₃)、生长素(auxin, IAA)、脱落酸(abscisic acid, ABA)和玉米素(zeatin, ZT)含量。

1.4 白菜型冬油菜中与细胞骨架相关抗寒基因的表达验证

使用 TIANGEN 公司的植物总 RNA 提取试剂盒提取白菜型冬油菜萌动种子总 RNA,用超微量紫外分光光度计检测总 RNA 的浓度和质量,取 OD260/280 值介于 1.9~2.1 的 RNA 样品,按 TIANGEN FastQuant RT 反转录试剂盒反应体系比例要求将 RNA 反转为 cDNA,测定浓度后稀释至 50 ng 于 -20℃ 保存备用。从 GeneBank 中挑选出 3 个拟南芥中与细胞骨架相关的抗寒基因,即 *MKK2*、*α-tubulin*、*β-tubuli*,根据这些抗寒基因在拟南芥序列,在 NCBI 数据库(National Center for Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中进行 BLAST-X(<https://cipptato.org/genebankcip/>)序列同源比对,找到在白菜型油菜中高度同源的相关基因。除上述 3 个抗寒基因外,同时在白菜型油菜中找到冷调控通路上的关键基因(*ICE1*、*CBF1*)和抑制冰核形成抗冻蛋白编码基因(*BrAFP1*)的同源序列。采用 Primer 3 Input(<http://bioinfo.ut.ee/primer3>

-0.4.0/)在线软件设计 real-time PCR 引物(表 1)。以 *Actin* 基因作为内参基因,引物由上海 Sangon Biotech 有限公司合成。扩增程序为:95℃ 预变性 30 s; 95℃ 5 s,60℃ 30 s,95℃ 15 s,40 个循环。待扩增完成后,根据扩增曲线和熔解曲线检测其特异性,并利用 2^{-ΔΔCt} 法对基因表达情况进行分析。

表 1 实时 PCR 定量分析相关基因的引物序列

Table 1 The primer sequence of corresponding genes that were used to real-time PCR analysis

引物名称 Primer name	引物序列(5' - 3') Primer sequence (5' - 3')	产物/bp Production	退火温度/℃ Annealing temperature
<i>Actin-F</i>	GTGTCATGGTTGGGATGGGT	188	61
<i>Actin-R</i>	AAGAACCGGGTGCTCTTCAG	188	61
<i>BrAFP1-F</i>	CCCAACAACCAAGCTCCGTTACC	108	61
<i>BrAFP1-R</i>	CTCCGACACCAACGACATCCAAC	108	61
<i>ICE1-F</i>	ATGCTTGAAGGTGGTGATTGG	89	60
<i>ICE1-R</i>	AATCTGAAGTCTTGCTGGCTCTGC	89	60
<i>CBF1-F</i>	CTGCGGGTCGGAAGAAGTTTCG	104	61
<i>CBF1-R</i>	CTGTTTGGCTCCCTCACCTCAC	104	61
<i>MKK2-F</i>	TTTGAGCTTTGGGAGTGCTTCTGC	128	60
<i>MKK2-R</i>	AGGAGCGGGTTTCAACAATGG	128	60
<i>α-tubulin-F</i>	CACCGATGTTGCTGTCTCTTTGG	96	61
<i>α-tubulin-R</i>	CTGTTGAGGTTCTGTAGTAGGC	96	61
<i>β-tubulin-F</i>	AAGTCCAGCGTCTGTGACATTGC	99	61
<i>β-tubulin-R</i>	GCTCACACGCCTGAACATCTCC	99	61

注:F 表示正向引物,R 表示反向引物。

Note: F represents the forward primer, and R represents the reverse primer.

1.5 数据处理与分析

所有试验数据均采用 Microsoft Excel 2016 和 SPSS 19.0 进行处理和统计分析,数据采用“平均值±标准差”表示,不同试验处理下相应生理性状分别采用 GLM(generalized linear model)模型进行联合方差分析。

2 结果与分析

2.1 微管调节试剂对白菜型冬油菜萌动种子 ABA 含量的影响

由图 1 可知,与 20℃ 处理相比,0℃ 处理使‘陇油 7 号’和‘天油 4 号’萌动种子 ABA 明显上升,而 Col 处理具有降低萌动种子 ABA 含量的作用,在 0℃ 下更加明显。在 20℃ 处理下,与 CK 相比,Col 处理对不同品种白菜型冬油菜萌动种子 ABA 含量的影响存在差异,在 20℃ 处理 12 h 和 24 h 下,Col 处理使‘陇油 7 号’萌动种子 ABA 含量分别降低了 5.26% 和 1.29%,而在 12 h 时 Col 处理使‘天油 4 号’ABA 含量升高了 4.19%,在 24 h 时 Col 处理使 ABA 含量下降了 23.48%。在 0℃ 处理下,Col 处理能使‘陇油 7 号’和‘天油 4 号’萌动种子 ABA 含量显著下降,

0℃处理 12 h 和 24 h 下,‘陇油 7 号’和‘天油 4 号’萌动种子 ABA 含量分别降低了 55.68%、61.16%和 11.22%、52.20%(图 1A)。

Tax 处理能使白菜型冬油菜萌动种子 ABA 含量明显上升;20℃处理 12 h 和 24 h 下,与 CK 相比, Tax 处理使‘陇油 7 号’和‘天油 4 号’ABA 含量分别增加了 76.02%、42.49%和 26.35%、97.39%。在 0℃处理 12 h 和 24 h 下,与 CK 相比, Tax 处理使 ABA 含量分别增加了 17.84%、20.34%和 13.53%、16.52%(图 1B)。综上所述,低温胁迫能使白菜型冬油菜萌动种子 ABA 含量明显上升, Tax 能够促进 ABA 的上升, Col 能够减缓萌动种子 ABA。

2.2 微管调节试剂对白菜型冬油菜萌动种子 IAA 含量的影响

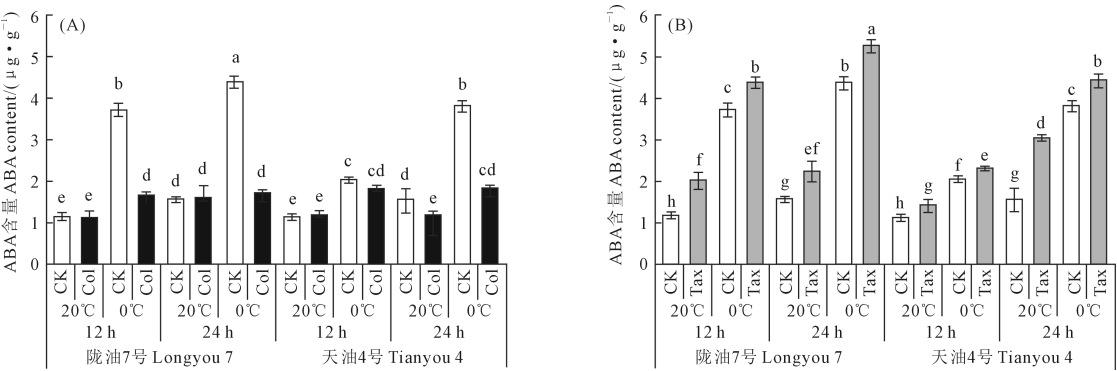
由图 2 可知,与 20℃处理相比,0℃处理使‘陇油 7 号’和‘天油 4 号’萌动种子 IAA 总体上呈现上升趋势,与‘天油 4 号’相比,‘陇油 7 号’的变化趋势更加明显(图 2A);与 CK 相比, Col 处理使萌动种子 IAA 含量明显降低。在 20℃处理 12 h 和 24 h 下,与 CK 相比, Col 处理能使‘陇油 7 号’和‘天油 4 号’萌动种子 IAA 含量显著下降,分别降低了

31.17%、83.68%和47.02%、24.69%;在 0℃处理 12 h 和 24 h 下,与 CK 相比, Col 处理使‘陇油 7 号’和‘天油 4 号’萌动种子 IAA 含量分别降低了65.56%、78.76%和 61.28%、35.70%。

在 Tax 处理下,除‘陇油 7 号’在 20℃处理 12 h 时 IAA 含量降低了 37.01%,其他处理下两个油菜品种萌动种子的 IAA 含量都表现出不同程度的升高(图 2B)。在 0℃处理 12 h 和 24 h 下,与 CK 相比, Tax 处理使‘陇油 7 号’和‘天油 4 号’IAA 含量分别上升了 55.11%、33.30%和 64.13%、421.75%。在 20℃处理 12 h 下,与 CK 相比, Tax 处理使‘天油 4 号’IAA 含量上升了 65.61%;在 20℃处理 24 h 下, Tax 处理使‘陇油 7 号’和‘天油 4 号’IAA 含量分别上升了 75.52%和 241.98%。综上所述,低温胁迫能使白菜型冬油菜萌动种子 IAA 含量明显上升, Tax 能够促进萌动种子体内 IAA 含量增加, Col 能够减缓萌动种子 IAA 的产生。

2.3 微管试剂处理对白菜型冬油菜萌动种子 GA₃ 含量影响

由图 3 可知,与 20℃处理相比,0℃处理后,‘陇油 7 号’和‘天油 4 号’萌动种子 GA₃ 含量均呈现下



注:不同小写字母表示在 0.05 水平下差异显著。下同。
Note: Different lowercase letters indicate significant difference at 0.05 level. The same below.

图 1 不同白菜型油菜品种在不同时长、温度和 Col/Tax 浓度处理下 ABA 含量

Fig.1 The ABA content at different times, temperatures, and Col/Tax concentration treatments in different *Brassica rape*

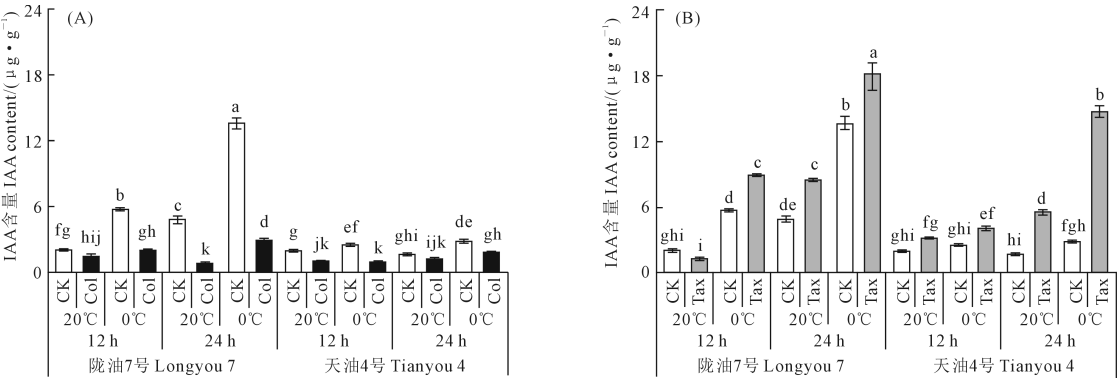


图 2 不同白菜型油菜品种在不同时长、温度和 Col/Tax 浓度处理下 IAA 含量

Fig.2 The IAA content at different times, temperatures, and Col/Tax concentration treatments in different *Brassica rape*

降趋势,且‘天油 4 号’的下降趋势明显强于‘陇油 7 号’;与 CK 相比,Col 处理能使‘陇油 7 号’和‘天油 4 号’萌动种子 GA_3 含量明显下降。在 20℃处理 12 h 和 24 h 下,与 CK 相比,Col 处理使‘陇油 7 号’和‘天油 4 号’ GA_3 含量分别降低了 34.54%、43.74%和 14.61%、30.59%;在 0℃处理 12 h 和 24 h 下,Col 处理使‘陇油 7 号’和‘天油 4 号’ GA_3 含量分别降低了 47.01%、53.49%和 31.95%、26.82%(图 3A)。

与 CK 相比,Tax 处理能使‘陇油 7 号’和‘天油 4 号’萌动种子 GA_3 含量明显上升(图 3B)。在 0℃处理 12 h 和 24 h 下,Tax 处理使‘陇油 7 号’和‘天油 4 号’ GA_3 含量分别上升了 18.26%、16.84%和 24.97%、51.74%。在 20℃处理 12 h 下,Tax 处理使‘陇油 7 号’和‘天油 4 号’的 GA_3 含量明显上升,分别增加了 9.71%和 21.66%。而在 20℃的处理 24 h 下,‘陇油 7 号’和‘天油 4 号’萌动种子的 GA_3 含量在处理前后基本无变化。综上所述,在低温胁迫下使白菜型冬油菜萌动种子 GA_3 含量明显下降,Tax 处理对 GA_3 产生具有显著的促进作用,而 Col 能够减缓萌动种子 GA_3 的产生。

2.4 微管试剂处理对白菜型冬油菜萌动种子 ZT 含量影响

由图 4 可知,与 20℃处理相比,0℃处理使‘陇

油 7 号’和‘天油 4 号’萌动种子 ZT 呈现显著上升趋势,而 Col 处理能够减缓 ZT 的产生(图 4A)。在 20℃处理 12 h 和 24 h 下,与 CK 相比,Col 处理使‘陇油 7 号’和‘天油 4 号’萌动种子 ZT 含量分别降低了 8.57%、70.72%和 5.01%、8.57%。在 0℃处理 12 h 和 24 h 下,Col 处理使‘陇油 7 号’和‘天油 4 号’ZT 含量分别降低了 39.35%、86.80%和 49.20%、85.77%。

与 CK 相比,Tax 处理能使白菜型冬油菜萌动种子 ZT 含量明显上升(图 4B)。在 20℃处理 12 h 和 24 h 下,与 CK 相比,Tax 处理使‘陇油 7 号’和‘天油 4 号’ZT 含量分别增加了 6.89%、17.28%和 11.15%、41.56%。在 0℃处理 12 h 和 24 h 时,与 CK 相比,Tax 处理使‘陇油 7 号’和‘天油 4 号’ZT 含量分别增加了 11.24%、10.30%和 12.79%、12.80%。表明低温胁迫能够促进白菜型冬油菜萌动种子 ZT 的产生,Tax 能够促进 ZT 含量的上升,Col 能够减缓萌动种子 ZT 的产生。

2.5 微管调节试剂处理对白菜型冬油菜抗寒基因表达的影响

由图 5 可知,在 0℃与 20℃处理下,Col 试剂处理使‘陇油 7 号’和‘天油 4 号’*MKK2*、 α -tubulin、 β -tubulin、*ICE1*、*CBF1*、*BrAFP1* 基因的表达量显著高于 Tax 试剂处理。不同品种间比较发现,添加 Col 试剂

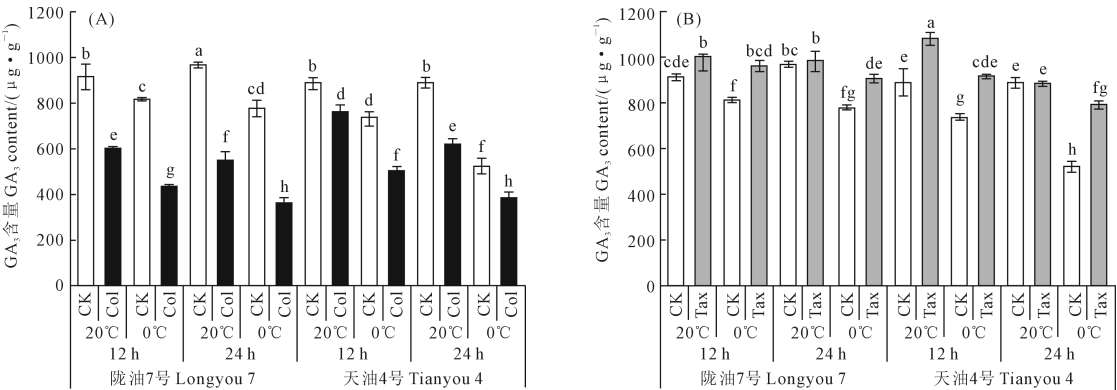


图 3 不同白菜型油菜品种在不同时长、温度和 Col/Tax 浓度处理下 GA_3 含量

Fig.3 The GA_3 content at different times, temperatures, and Col/Tax concentration treatments in different *Brassica rape*

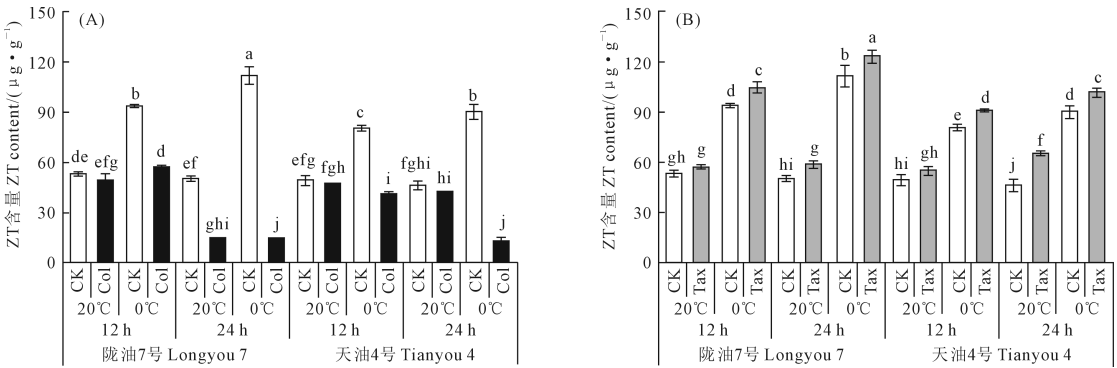


图 4 不同白菜型油菜品种在不同时长、温度和 Col/Tax 浓度处理下 ZT 含量

Fig.4 The ZT content at different times, temperatures, and Col/Tax concentration treatments in different *Brassica rape*

后,与 0℃ 处理 12 h 相比,0℃ 处理 24 h 时,‘陇油 7 号’*MKK2*、 α -*tubulin*、 β -*tubulin*、*ICE1*、*CBF1*、*BrAFP1* 的表达量分别上升了 102.7%、248.1%、195.4%、72.98%、11.00%、274.4%;‘天油 4 号’ α -*tubulin*、 β -*tubulin*、*CBF1* 的表达量分别上升了 39.31%、17.21%、39.69%,*MKK2*、*ICE1*、*BrAFP1* 的表达量分别下降了 17.80%、52.68%、92.48%。添加 Tax 试剂后,与 0℃ 处理 12 h 相比,0℃ 处理 24 h 时,‘陇油 7 号’*MKK2*、 α -*tubulin*、 β -*tubulin*、*ICE1*、*CBF1*、*BrAFP1* 的表达量分别下降了 100%、99.50%、99.90%、99.37%、32.47%、92.05%;‘天油 4 号’*MKK2*、 α -*tubulin*、 β -*tubulin*、*ICE1*、*CBF1*、*BrAFP1* 的表达量分别上升了 79.99%、208.8%、169.5%、94.05%、44.79%、78.62%。添加 Col 试剂后,与 20℃ 处理 12 h 相比,20℃ 处理 24 h 时,‘陇油 7 号’和‘天油 4 号’*MKK2*、 α -*tubulin*、 β -*tubulin*、*ICE1*、*CBF1*、*BrAFP1* 的表达量

分别上升了 601.9%、329.3%、303.5%、228.6%、24.84%、440.6%和 79.77%、3.28%、1.18%、12.72%、10.10%、168.0%;添加 Tax 试剂后,与 20℃ 处理 12 h 相比,20℃ 处理 24 h 时,‘陇油 7 号’和‘天油 4 号’*MKK2*、 α -*tubulin*、 β -*tubulin*、*ICE1*、*CBF1*、*BrAFP1* 的表达量分别下降了 54.46%、32.85%、31.50%、47.76%、22.61%、11.77%和 54.39%、54.45%、46.96%、75.59%、31.91%、76.13%。

3 讨论

3.1 微管调节试剂 Col 和 Tax 对白菜型冬油菜内源激素的影响

植物内源激素对植物的生长发育具有重要的调控作用,当植物在受到低温胁迫时,会受到多种激素的共同调节,增强植物对胁迫的抵抗能力^[14]。研究表明,ABA 在冷胁迫中可以促进植物体内渗透

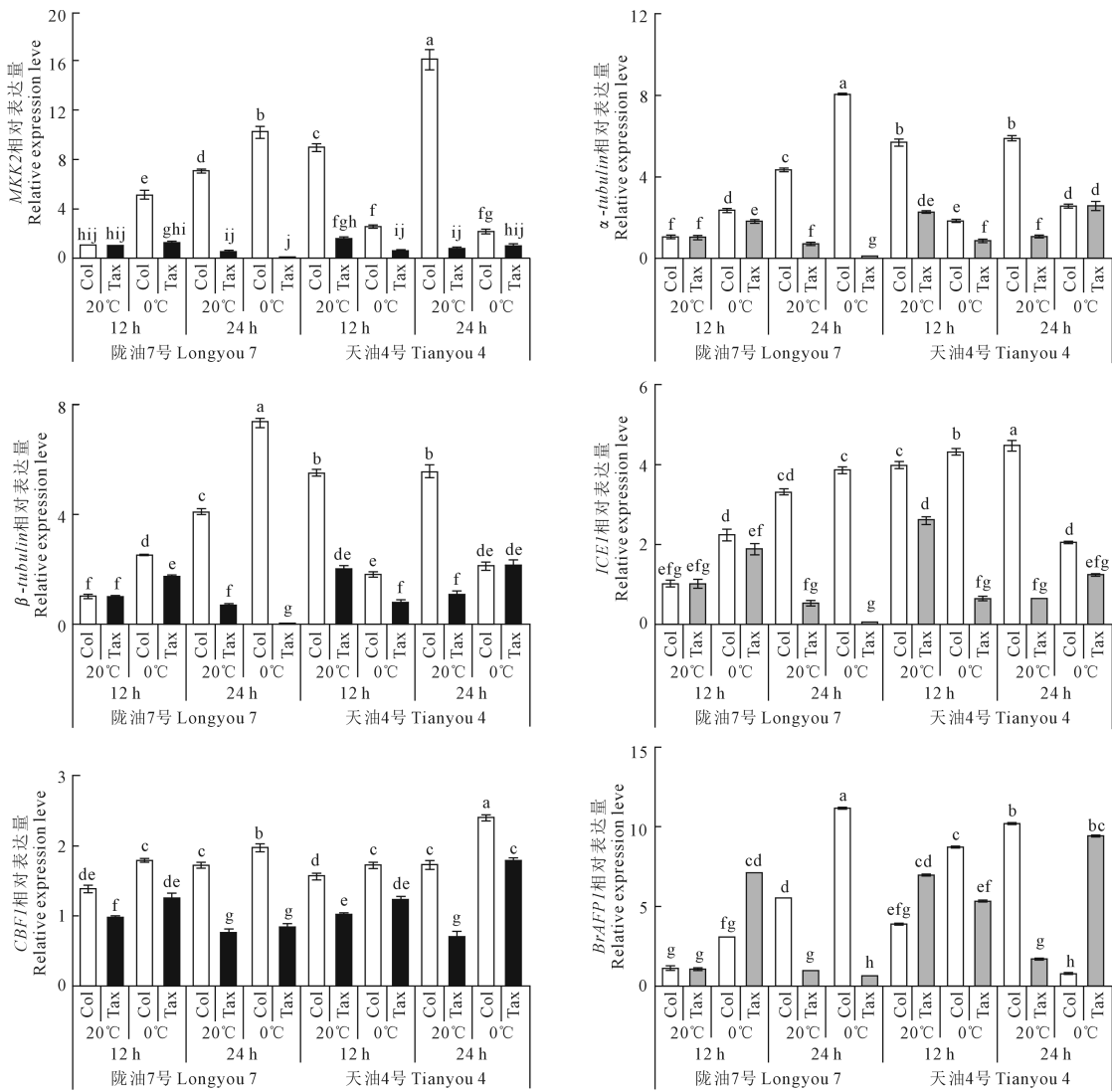


图 5 微管调节试剂处理对白菜型冬油菜萌动种子抗寒基因表达的影响

Fig.5 Effect of microtubule reagent treatment on cold resistance gene expression in seedling of winter rapeseed

调节物质含量的增加^[15],从而稳定细胞膜结构,通过 ICE1-CBF 冷信号通路诱导下游抗寒基因表达等作用,从而提高植物对低温的抵御能力^[16]。前人在小麦^[17]、茶树^[18]及玉米^[19]等作物中研究表明,ABA 可以提高植物的抗寒性。GA₃ 能降低自由水含量,维持细胞膜的稳定性,GA₃ 含量升高可以提高植物的抗寒性^[20]。IAA 的代谢也会影响植物的抗寒性^[21],在一定的低温处理下,IAA 含量升高可以提高油菜的抗寒能力^[22]。ZT 含量增高会加速植物新陈代谢和蛋白质的合成,使有机体迅速增长,从而提高植物抗寒能力,减轻低温对植物的伤害^[23]。本研究发现,内源激素在不同油菜品种、不同微管调节试剂、不同温度和处理下均存在一定差异。施加 Tax 试剂后,在 0℃ 与 20℃ 处理下会引起‘陇油 7 号’和‘天油 4 号’ABA、IAA、GA₃ 和 ZT 含量显著上升,施加 Col 试剂则使‘陇油 7 号’和‘天油 4 号’ABA、IAA、GA₃ 和 ZT 含量下降。说明施加 Col 和 Tax 试剂会影响白菜型油菜萌动种子内源激素含量。

3.2 微管调节试剂 Col 和 Tax 对白菜型冬油菜抗寒基因表达量的影响

在低温胁迫下 MAPK 级联起着重要的作用,典型的 MAPK 级联包含三种蛋白激酶 (MAPKKK、MAP3K 或 MEKK)、MAPK 激酶 (MAP2K、MKK 或 MEK) 和 MAP 激酶 (MAPK),其中 MKK2 与 MPK4 (MAPK4) 和 MPK6 (MAPK6) 相互作用来调节 MKK2 的活性,同时 MKK2 还诱导 *CoR* 基因的表达^[24]。ICE1 与 CBF 基因的启动子区结合激活表达,CBF 结合到其下游目的基因启动子的 DRE 序列上,诱导 *COR* 的表达,从而提高植株的抗寒性^[25]。α-微管蛋白和 β-微管蛋白是植物微管蛋白的主要组成部分,也是细胞骨架的重要组成部分,植物微管蛋白基因会受温度调控^[26]。低温下 α-微管蛋白表达上调会维持细胞骨架的稳定性^[27]。微管在抗寒中的作用与植物的部位以及温度有很大的关系^[28]。AFPs 具有修饰冰晶形态,可以抑制冰晶的生长和重结晶等作用,在抵御外界低温冻害中具有重要作用,可以提高植物的抗寒性^[29]。本研究发现,抗寒基因在不同油菜品种、不同微管调节试剂、不同温度和处理下均存在差异。添加 Col 后,0℃ 处理 24 h 时,‘陇油 7 号’α-tubulin、β-tubulin、MKK2、ICE1、CBF1、BrAFP1 的表达量明显升高,‘天油 4 号’α-tubulin、β-tubulin、CBF1 的表达量上升,但 MKK2、ICE1、BrAFP1 的表达量呈现下降趋势;20℃ 处理 24 h 时,‘陇油 7 号’和‘天油 4 号’α-tubulin、β-tubulin、MKK2、ICE1、CBF1、BrAFP1 的表达量均

呈上调趋势。添加 Tax 后,0℃ 处理 24 h 时,‘陇油 7 号’α-tubulin、β-tubulin、ICE1、CBF1、BrAFP1 的表达量被下调,‘天油 4 号’α-tubulin、β-tubulin、ICE1、CBF1、BrAFP1 的表达量呈现上升趋势;20℃ 处理 24 h 时,‘陇油 7 号’和‘天油 4 号’α-tubulin、β-tubulin、MKK2、ICE1、CBF1、BrAFP1 的表达量均呈下降趋势。说明施加 Col 和 Tax 试剂会影响白菜型油菜萌动种子抗寒基因的表达。

4 结 论

本研究发现,Col 能够降低‘陇油 7 号’和‘天油 4 号’萌动种子的 ABA、IAA、GA₃ 和 ZT 含量,而 Tax 能够增加‘陇油 7 号’和‘天油 4 号’萌动种子的 ABA、IAA、GA₃ 和 ZT 的含量。添加 Col 后,与 0℃ 处理 12 h 相比,0℃ 处理 24 h 时,‘陇油 7 号’α-tubulin、β-tubulin、MKK2、ICE1、CBF1、BrAFP1 的表达量上调,‘天油 4 号’α-tubulin、β-tubulin、CBF1 表达量上调,但 MKK2、ICE1、BrAFP1 的表达量呈现下调;与 20℃ 处理 12 h 相比,20℃ 处理 24 h 时,‘陇油 7 号’和‘天油 4 号’α-tubulin、β-tubulin、MKK2、ICE1、CBF1、BrAFP1 的表达量均上调。添加 Tax 后,与 0℃ 处理 12 h 相比,0℃ 处理 24 h 时,‘陇油 7 号’α-tubulin、β-tubulin、ICE1、CBF1、BrAFP1 的表达量均下调,‘天油 4 号’α-tubulin、β-tubulin、ICE1、CBF1、BrAFP1 的表达量均上调;与 20℃ 处理 12 h 相比,20℃ 处理 24 h 时,‘陇油 7 号’和‘天油 4 号’α-tubulin、β-tubulin、MKK2、ICE1、CBF1、BrAFP1 的表达量均下调。表明 Col 和 Tax 能使白菜型冬油菜细胞骨架结构发生变化,影响白菜型冬油菜萌动种子内源激素的含量及抗寒基因的表达。

参 考 文 献:

- [1] 关周博,田建华,董育红.我国油菜发展的现状、面临的问题以及应对策略[J].陕西农业科学,2016,62(3):99-101.
GUAN Z B, TIAN J H, DONG Y H. The current situation, facing problems and coping strategies of the development of rape in China [J]. Shaanxi Journal of Agricultural Sciences, 2016, 62(3): 99-101.
- [2] 徐明霞,董小云,刘自刚,等.白菜型冬油菜根系形态与抗寒性的相关分析[J].分子植物育种,2021,19(5):1640-1648.
XU M X, DONG X Y, LIU Z G, et al. Analysis on the relationship between roots and cold tolerance of winter turnip rape (*Brassica rapa*) [J]. Molecular Plant Breeding, 2021, 19(5): 1640-1648.
- [3] LIU Z G, SUN W C, ZHAO Y N, et al. Effects of low nocturnal temperature on photosynthetic characteristics and chloroplast ultrastructure of winter rapeseed [J]. Russian Journal of Plant Physiology, 2016, 63(4): 451-460.
- [4] 陈思琪,孙敬爽,麻文俊,等.植物低温胁迫调控机制研究进展[J].中国农学通报,2022,38(17):51-61.
CHEN S Q, SUN J S, MA W J, et al. Regulation mechanism of low temperature stress on plants: research progress [J]. Chinese Agricultural Sci-

ence Bulletin, 2022, 38(17): 51-61.

[5] LIU Z G, DONG X Y, MA L, et al. Separation and identification of *Brassica rapa* BrAFP and its gene cloning and expression under freezing stress[J]. Plant Breeding, 2019, 138(2): 193-201.

[6] MA Y, DAI X Y, XU Y Y, et al. *COLD1* confers chilling tolerance in rice[J]. Cell, 2015, 160(6): 1209-1221.

[7] GUO X Y, LIU D F, CHONG K. Cold signaling in plants: insights into mechanisms and regulation [J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2018, 60(9): 745-756.

[8] ZHAN X Q, ZHU J K, LANG Z B. Increasing freezing tolerance: kinase regulation of ICE1[J]. Developmental Cell, 2015, 32(3): 257-258.

[9] 刘静妍, 施怡婷, 杨淑华. CBF: 平衡植物低温应答与生长发育的关键[J]. 植物学报, 2017, 52(6): 689-698.

LIU J Y, SHI Y T, YANG S H. CBF: a key factor balancing plant cold stress responses and growth [J]. Chinese Bulletin of Botany, 2017, 52 (6): 689-698.

[10] 程仁花. 微管解聚在拟南芥适应低温胁迫中的作用[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2016.

CHENG R H. The role of microtubule depolymerization in *Arabidopsis thaliana* tolerance cold stress[D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2016.

[11] 陈静, 陶雪芬, 应华洲. 微管蛋白秋水仙碱位点抑制剂研究进展 [J]. 中国现代应用药理学, 2011, 28(9): 824-830.

CHEN J, TAO X F, YING H Z. Recent development of colchicine binding site inhibitors [J]. Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy, 2011, 28(9): 824-830.

[12] 王亚茹, 邓高松, 李云, 等. 秋水仙碱对微管蛋白的作用机制及其细胞效应研究进展[J]. 西北植物学报, 2010, 30(12): 2570-2576.

WANG Y R, DENG G S, LI Y, et al. Progress in the mechanism of colchicine function on the tubulin and its cytological effects [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2010, 30(12): 2570-2576.

[13] 周佳, 程新, 李昆太. 现代发酵技术在紫杉醇生产中的应用前景 [J]. 生物技术通报, 2012, (8): 59-63.

ZHOU J, CHENG X, LI K T. Application perspective of modern fermentation technology in taxol production [J]. Biotechnology Bulletin, 2012, (8): 59-63.

[14] 曾光辉, 马青平, 王伟东, 等. 自然低温对茶树内源激素含量的影响[J]. 茶叶科学, 2016, 36(1): 85-91.

ZENG G H, MA Q P, WANG W D, et al. Effect of natural low-temperature on endogenous hormones of *Camellia sinensis* (L.) Kuntze plant [J]. Journal of Tea Science, 2016, 36(1): 85-91.

[15] 张文静, 刘亮, 黄正来, 等. 低温胁迫对稻茬小麦根系抗氧化酶活性及内源激素含量的影响 [J]. 麦类作物学报, 2016, 36(4): 501-506.

ZHANG W J, LIU L, HUANG Z L, et al. Effect of low temperature on antioxidative enzymes activity and endogenous hormone content in wheat root of rice-wheat rotation [J]. Journal of Triticeae Crops, 2016, 36(4): 501-506.

[16] LI C, WU N, LIU S. Development of freezing tolerance in different altitudinal ecotypes of *Salix paraplesia* [J]. Biologia Plantarum, 2005, 49 (1): 65-71.

[17] 刘丽杰, 苍晶, 李怀伟, 等. 外源 ABA 对冬小麦越冬期呼吸代谢关键酶与糖代谢的影响 [J]. 麦类作物学报, 2013, 33(1): 65-72.

LIU L J, CANG J, LI H W, et al. Effects of exogenous abscisic acid on key enzymes of respiratory metabolism and sugar metabolism of winter wheat in the wintering period [J]. Journal of Triticeae Crops, 2013, 33 (1): 65-72.

[18] 徐义群, 胡哲, 胡月朦, 等. 干旱-低温交叉适应性对茶树抗寒性的影响 [J]. 安徽农业大学学报, 2020, 47(1): 1-6.

XU Y Q, HU Z, HU Y M, et al. Effect of cross adaptation of drought-low temperature on cold resistance of tea plants (*Camellia sinensis*) [J]. Journal of Anhui Agricultural University, 2020, 47(1): 1-6.

[19] 石如意, 王腾飞, 李军, 等. 低温胁迫下外源 ABA 对玉米幼苗抗寒性的影响 [J]. 华北农学报, 2018, 33(3): 136-143.

SHI R Y, WANG T F, LI J, et al. Influences of exogenous ABA on cold resistance of maize seedlings under low temperature stress [J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2018, 33(3): 136-143.

[20] 杨勇, 娄燕宏, 杨知建, 等. 低温胁迫对狗牙根激素和碳水化合物代谢的影响 [J]. 草业学报, 2016, 25(2): 205-215.

YANG Y, LOU Y H, YANG Z J, et al. Effect of low temperature on phytohormones and carbohydrates metabolism in Bermuda grass [J]. Acta Prataculturae Sinica, 2016, 25(2): 205-215.

[21] 李静, 崔继哲, 弭晓菊. 生长素与植物逆境胁迫关系的研究进展 [J]. 生物技术通报, 2012, (6): 13-17.

LI J, CUI J Z, MI X J. Progress of studies on relationship between auxin and plant response to abiotic stress [J]. Biotechnology Bulletin, 2012, (6): 13-17.

[22] 呼芳娣, 刘丽君, 马骊, 等. 低温胁迫下甘蓝型冬油菜 *BnYUCCA8* 基因差异表达及内源生长素含量变化 [J]. 干旱地区农业研究, 2022, 40(3): 1-10.

HU F D, LIU L J, MA L, et al. Differential expression of *BnYUCCA8* gene and changes of endogenous auxin content in *Brassica napus* L. under low temperature stress [J]. Agricultural Research in the Arid Areas, 2022, 40(3): 1-10.

[23] 阎世江, 刘洁, 张继宁. 低温弱光下茄子几种内源激素含量及相关分析 [J]. 河北科技师范学院学报, 2013, 27(3): 14-18.

YAN S J, LIU J, ZHANG J N. The endogenous hormones content of eggplant on low temperature and weak light and correlation analysis [J]. Journal of Hebei Normal University of Science & Technology, 2013, 27 (3): 14-18.

[24] LIU J Y, SHI Y T, YANG S H. Insights into the regulation of C-repeat binding factors in plant cold signaling [J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2018, 60(9): 780-795.

[25] RIKIN A, ATSMON D, GITLER C. Chilling injury in cotton (*Gossypium hirsutum* L.): effects of antimicrotubular drugs [J]. Plant and Cell Physiology, 1980, 21(5): 829-837.

[26] 赵金莉, 赵志军, 张红. 黄瓜根尖细胞中微管冷稳定性和微管蛋白与其抗寒性的关系 [J]. 河北大学学报(自然科学版), 2006, 26(2): 188-192.

ZHAO J L, ZHAO Z J, ZHANG H. Relationship between freezing tolerance of root-tip cells and cold stability of microtubules and tubulin in cucumber [J]. Journal of Hebei University (Natural Science Edition), 2006, 26(2): 188-192.

[27] KERR G P, CARTER J V. Tubulin isotypes in ryeroots are altered during cold acclimation [J]. Plant Physiology, 1990, 93(1): 83-88.

[28] 王羽哈, 李子豪, 李世彪, 等. 植物抗冻蛋白研究进展 [J]. 生物技术通报, 2018, 34(12): 10-20.

WANG Y H, LI Z H, LI S B, et al. Research advances on plant anti-freeze proteins [J]. Biotechnology Bulletin, 2018, 34(12): 10-20.

[29] 李永才, 安黎哲, 毕阳. 微管骨架在植物适应低温胁迫中的功能研究进展 [J]. 西北植物学报, 2006, 26(7): 1500-1504.

LI Y C, AN L Z, BI Y. Research advances about the role of microtubule cytoskeleton in plant acclimation to low-temperature stress [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2006, 26 (7): 1500-1504.