

低温冻害对蚕豆幼苗生理生化特性的影响及 RAP—PCR 指纹分析

陈志远^{1,2}, 王国栋¹, 邸丽俊¹, 武永军², 杨佳晔²

(1. 西北农林科技大学理学院, 陕西 杨凌 712100; 2. 西北农林科技大学生命学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要: 0℃冻害分别处理蚕豆幼苗 0、3、6、12 h, 测定了蚕豆幼苗叶片的蛋白质、脯氨酸、还原性谷胱甘肽和丙二醛等生理指标, 进行了蚕豆低温胁迫下的 RAP—PCR 指纹分析和抵抗低温冻害的特异基因序列片段的克隆。结果表明: 随着低温胁迫的加强, 蚕豆幼苗叶片内蛋白质含量呈现先升后降的趋势, 脯氨酸相对百分含量逐渐增加, 还原性谷胱甘肽含量逐渐下降, 丙二醛含量低温胁迫后维持在一个较低的稳定水平。以 8 条随机引物进行 RAP—PCR 指纹分析鉴定出 8 条抵抗冻害的特异性片段, 并成功克隆到其中的 4 条。

关键词: 低温胁迫; 低温伤害; RAP—PCR; 蚕豆

中图分类号: S551⁺.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7601(2011)04-0006-07

近年来全球气候异常, 我国自然灾害频发, 冻雨寒流成为影响我国农业生产的频发性自然灾害之一。对农作物低温抵抗机理的研究有助于合理应对低温对农业生产造成的影响。目前研究已经发现低温会抑制植物许多功能基因的正常代谢反应, 从而产生直接的冷冻伤害^[1,2]。低温还会间接地引起植物渗透压改变、氧化和其他胁迫伤害^[3~5]。多数的植物在受到低温胁迫时都会表现出不同程度的冷害抵抗力^[6,7]。尽管如此, 植物在低温冷害胁迫下的生理生化特性依然所知有限, 而关于低温冻害胁迫下的植物生理生化特性更是鲜有报道。

RNA 随机引物 PCR 指纹分析(RAP—PCR)是研究样品中基因差异表达的有力工具。Takle 等^[8]用 RAP—PCR 技术鉴定了大西洋大麻哈鱼胚胎的压力敏感型基因。Valdecantos 等^[9]用 RAP—PCR 技术鉴定了差显表达于小鼠输卵管的 EBAF 同源 mRNA。

低温胁迫可分为低温冷害($\leq 20^{\circ}\text{C}$)和低温冻害($\leq 0^{\circ}\text{C}$)^[10], 本试验研究范围为低温冻害。本试验分析了蚕豆 0℃低温不同冻害处理时间下的生理特性和基因表达差异情况, 并以 RAP—PCR 技术为基础试图分离克隆出抵抗低温胁迫的特异基因序列片段。

1 材料与方法

1.1 材料及培养

供试品种为临蚕 2 号。选取籽粒饱满、大小一

致的种子, 用 1% H_2O_2 溶液表面灭菌 10 min, 经无菌水反复冲洗后, 置于培养皿中, 双层纱布覆盖后放入恒温培养箱催芽, 恒温箱温度为 25°C ; 相对湿度: 70%~75%, 待胚根长至 3 cm 长左右, 光合培养室培养, 温度: 昼/夜 $27^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C} / 21^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$; 湿度: $65\% \pm 5\%$; 光照条件: 昼/夜 14 h/10 h, 光强: $150 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 。播于蛭石中, 添加 Hoagland 营养液进行培养, 保证植株正常生长。

1.2 方法

1.2.1 材料低温处理方法 将正常条件下培养三周的新鲜蚕豆幼苗移入冷库中进行处理, 处理温度为 0°C , 设三次重复。在 0°C 低温环境下分别处理 0、3、6、12 h, 分别检测低温逆境生理指标蛋白质、脯氨酸、还原性谷胱甘肽和丙二醛的含量。另取以上低温处理植株的部分样品进行 RNA 提取, 以供 RAP—PCR 指纹图谱分析。

1.2.2 生理指标的检测 蛋白质、脯氨酸、还原性谷胱甘肽和丙二醛的检测方法均参考高俊凤主编的《植物生理学实验指导》^[11], 实验重复三次。

1.2.3 RNA 的提取 分别从 0°C 低温处理 0、3、6、12 h 的植株(见 1.2.1 中所述)上摘取相同部位大小基本一致的新鲜叶片 1 片, 然后剪取 100 mg 叶片用于 RNA 的提取。使用 TIANGEN 生化科技有限公司的 TRNzol Total RNA Reagent 总 RNA 提取试剂盒, 按照公司说明书提取蚕豆叶片的 RNA, 具体过程如

收稿日期: 2010-12-14

基金项目: 国家自然科学基金(30600384); 西北农林科技大学青年骨干支持项目

作者简介: 陈志远(1981—), 男, 山西文水人, 在读博士, 主要从事植物应对非生物胁迫的信号转导和分子遗传机制及生物物理方面的研究。E-mail: smaller3593@yahoo.com.cn。

通讯作者: 武永军(1974—), 男, 副教授。E-mail: yongjunwu2005@yahoo.com.cn。

下。取 100 mg 新鲜叶片在液氮中充分研磨,加入 1 mL TRNzol。将匀浆样品在 15℃~30℃放置 5 min。按 1:0.2 (匀浆:氯仿)的体积比加入氯仿,盖好管盖,剧烈振荡 15 s,室温放置 3 min。4℃ 12 000 rpm 离心 10~15 min,将上层水相(约 600 μ l)转移到新的离心管中。向水相溶液中加入等体积异丙醇,混匀,室温放置 20~30 min。4℃ 12 000 rpm 离心 10 min,去上清。加入 1 mL 75% 乙醇(DEPC 处理过的水配制)洗涤沉淀。4℃ 5 000 rpm 离心 3 min,倒出液体,剩余的少量液体短暂离心,然后用枪头吸出。室温放置 2~3 min 后,加入 40 μ l RNase-free ddH₂O,反复吹打,混匀,充分溶解 RNA。

1.2.4 RNA 质量检测 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 提取质量,上样量统一为 3 μ l,电泳参数为 5 V/cm,电泳时间 40 min。

1.2.5 cDNA 的合成 使用 TIANGEN 公司的 TIAN—Script RT Kit (cDNA 第一链合成试剂盒),按照公司说明书对提取的 RNA 进行逆转录,使用产品附带的随机引物(d5’NNNNNN3’)作为反义链引物合成 cDNA。

1.2.6 RAP—PCR 扩增及检测 采用由 Invitrogen 公司合成的 8 条随机引物。为了提高随机引物扩增的成功率,8 条随机引物选自己已经报道的用于扩增豆科类植物 RAPD 遗传标记随机引物^[12~15]。引物编号及碱基序列见表 1。

表 1 选用的随机引物

Table 1 Random primers in the experiment

引物编号 Primer number	引物序列 Primer sequence
S1	d5’ (GTGACGTAGG) 3’
S2	d5’ (CCGAATTCCTC) 3’
S3	d5’ (GGCTGCAGAA) 3’
S4	d5’ (GGTGCGGAA) 3’
S5	d5’ (GCGTTTTTGC) 3’
S6	d5’ (GGCACTGAGG) 3’
S7	d5’ (CACTCTCCTC) 3’
S8	d5’ (CACTCTCCTC) 3’

PCR 扩增反应体系的总体积为 25 μ L,包括 cDNA 模板 2 μ L,10 $\times$ Buffer 2 μ L,MgCl₂ (25 mmol/L) 2 μ L,dNTPs (2 mmol/L) 2 μ L,引物(10 μ mol/L) 2 μ L,Taq DNA 聚合酶(5 U/ μ L) 0.25 μ L,ddH₂O 到 25 μ L;扩增反应程序为 94℃ 预变性 5 min 后,94℃ 变性 30 s,40℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 90 s,40 次循环;72℃ 延伸 7 min。采用 1% 琼脂糖凝胶(加入 EB 使其终浓度为 0.5 μ g/mL)电泳检测 PCR 扩增产物。

1.2.7 特异片段的克隆及测序 使用购自 TIAN—GEN 公司的 DH5 α 感受态细胞,采用 Invitrogen 公司生产的 pMD—19T 的克隆试剂盒进行片段的连接并进行转化。在含有 X—gal,IPTG 和 Amp 的 LB 培养基上 37℃ 静置培养 2 d,之后挑选白斑进行 PCR 检测。检测 PCR 反应体系同上,其中引物使用通用引物 M13—47 和 RV—M,模板为挑取的菌落,扩增反应程序为 94℃ 预变性 20 min,94℃ 变性 30 s,55℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 90 s,40 次循环;72℃ 延伸 7 min。所获得的阳性克隆经液体摇床培养后,由北京华大基因完成测序。

1.2.8 冷害条带比率计算方法 以条带所在位置离点样孔之间的距离为依据,对所有条带进行统计,距离相同的条带则合计为 1 条。分别统计出总条带数、冷害特异性条带数以及只在冷害下表达的条带数,其中冷害特异性条带数包括正常冷害情况均表达的条带和只在冷害下表达的条带。最终,冷害条带比率(%)=(冷害特异性条带数或者只在冷害下表达的条带数 $\div$ 总条带数 $\times$ 100%)。

2 结果与分析

2.1 低温胁迫对蚕豆幼苗生理特性的影响

为了分析低温冻害胁迫对蚕豆幼苗生理状况的影响,分别检测了低温胁迫处理情况下的抗逆性指标蛋白质、脯氨酸、还原性谷胱甘肽和丙二醛的含量。正常的蚕豆叶片蛋白质含量维持在一个稳定水平,经冻害处理 3 h 后,叶片内蛋白含量迅速上升,之后随着低温处理时间的延长逐渐下降(图 1A);随着处理时间的延长,脯氨酸含量逐渐升高(图 1B);随着处理时间的延长,还原性谷胱甘肽含量逐渐降低(图 1C);蚕豆正常植株叶片丙二醛含量维持在一个较高水平,经冻害处理后迅速降低,之后维持在一个稳定水平(图 1D)。

2.2 RNA 质量分析

为避免提取过程造成的 RNA 降解,对 RNA 进行电泳检测(图 2)。从图 2 中可以看出未经冻害胁迫的叶片提取的 RNA 质量良好,具有清晰的 28S、18S、5S 三条带。这说明试验操作良好,未造成 RNA 的降解。而经冻害处理的植株的 RNA 电泳条带随着处理时间的延长表现出规律性变化。3 h 处理后尚有可见的 28S、18S、5S 三条带,6 h 处理后三条带已十分模糊,12 h 处理后只剩余 5S 有模糊条带。这说明随着冻害处理时间的延长,植株叶片内 RNA 开始发生不同程度的降解,处理 12 h 后,叶片内的 RNA 已基本降解完全。

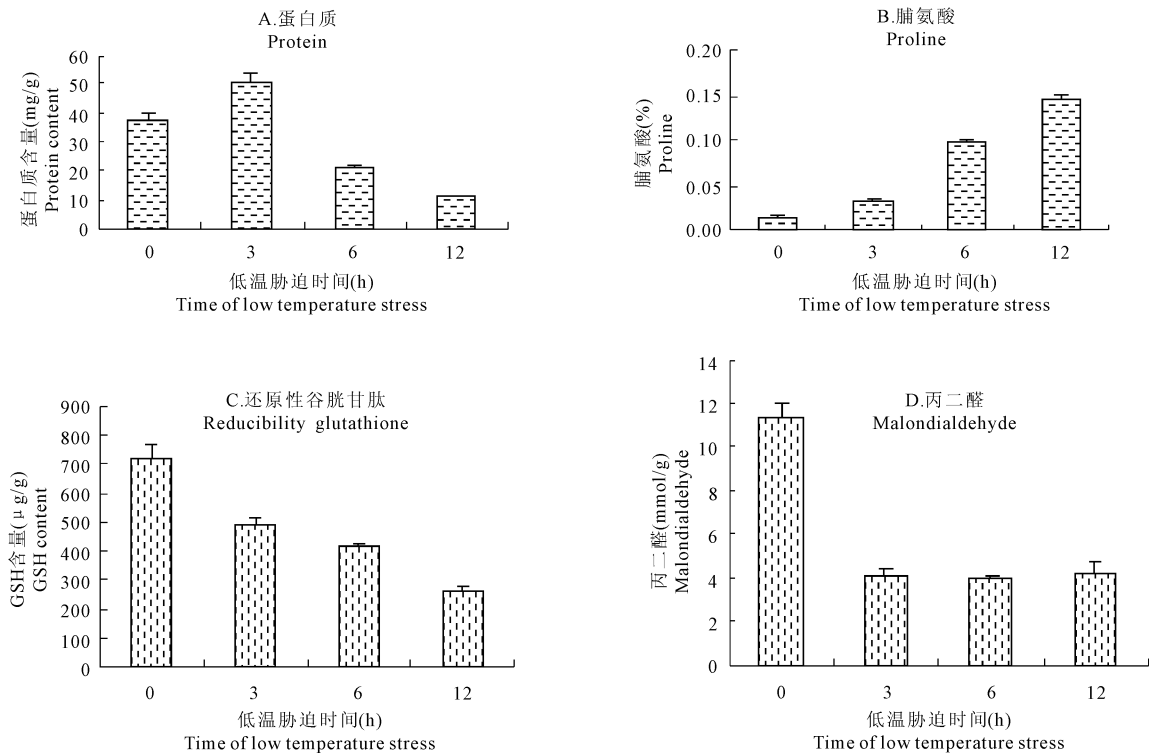


图 1 低温胁迫下的蚕豆幼苗叶片的生理指标

Fig.1 Physiological indexes of *Vicia faba* under low temperature in leaves of seedling

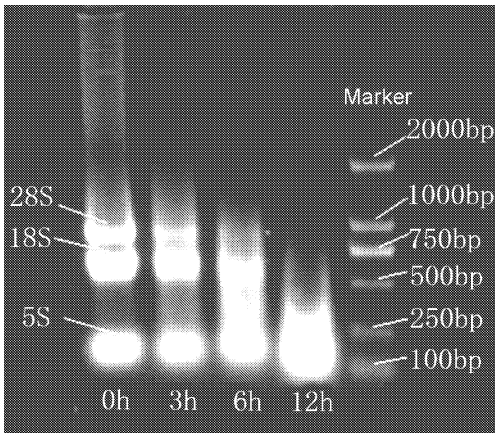


图 2 不同低温时间处理下蚕豆幼苗叶片 RNA 质量的电泳图谱

Fig.2 Electrophoresis pattern of RNA in leaves of seedling under various process time with low temperature

2.3 蚕豆低温冻害处理的 RAP-PCR 指纹分析

以 0、3、6、12 h 冻害处理的 RNA 为模板,进行逆转录反应,所得 cDNA 产物分别标记为 T0、T3、T6、T12。以 T0、T3、T6、T12 为模板,S1~S8 为引物进行 PCR 反应。电泳检测后获得 RAP-PCR 多态性图谱。如图 3 所示,电泳条带基本上可以分为 3 种情况:(1)随着冻害处理时间的延长,条带逐渐弱化或消失,这种情况条带的大多数;(2)正常情况下无

条带,经一定时间处理后有条带出现;(3) 0、3、6 h 处理均有清晰条带出现,12 h 处理后条带全部消失。从图中结果来看,8 条随机引物一共鉴定出 8 条冻害下表达的特异基因片段,其中 a、d、e、h 只在 0℃处理 6 h 时有表达,b、c、f、g 在 0℃处理 0、3、6 h 均有清晰表达。对条带进行统计,合计条带总数为 32 条,鉴定出的冻害特异性条带为 8 条,占到了总条带数的 25%,其中只在冻害下表达的条带占到了 12.5%。

2.4 低温特异 EST 序列的克隆及测序

由 RAP-PCR 电泳图谱筛选出蚕豆在冻害胁迫下表达的 8 条特异基因片段,以该 8 条序列片段相对应的 cDNA 为模板进行 PCR 大量扩增,对目的片段经切胶纯化后连接至 TMD-19T 载体。最终克隆到了 4 条 EST 序列并进行了测序,测序结果见表 2。

对测序所获得的 4 条序列在 NCBI 的 Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)工具中执行 Tblastx,执行参数为 DATABASE:Nucleotide collection;限定物种:*Vicia faba*。d、e、f 三条序列未发现具有高相似序列(相似度≥50%)。g 序列与蚕豆基因组数据库中的 Ban HI 重复元件具有很高的相似度,相似度达到了 79%;与逆转录酶类似蛋白有较高的相似度,相似度为 33%。

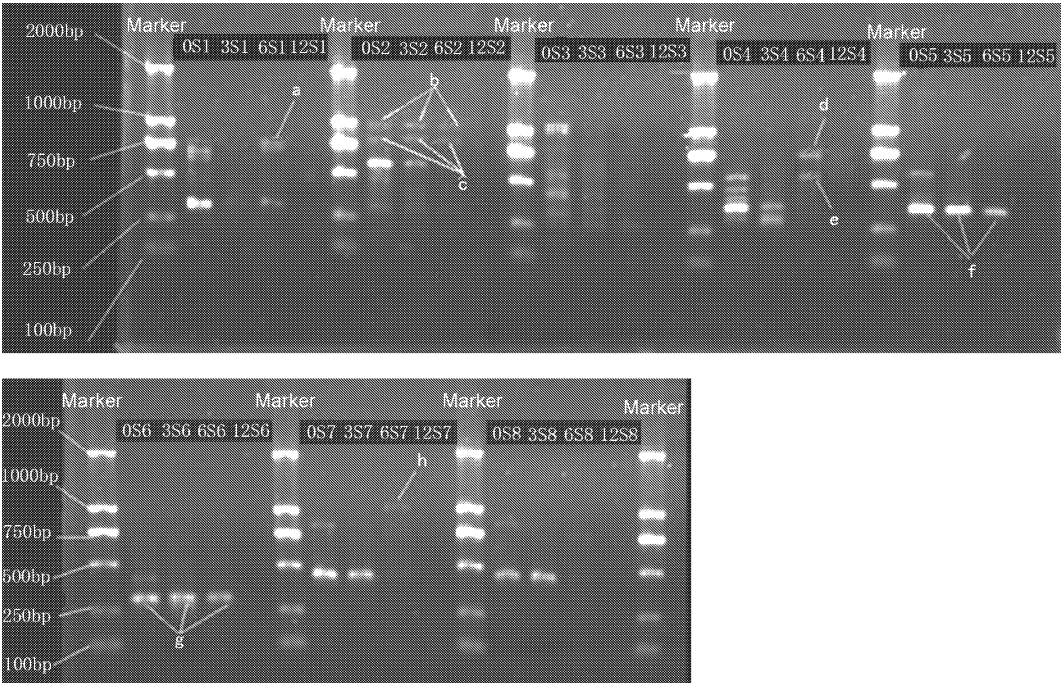


图 3 RAP—PCR 指纹分析图谱

Fig.3 RAP—PCR fingerprint analysis profiles

注：0S1 表示在 0℃低温环境下处理 0 h,以随机引物 S1 为 PCR 扩增引物进行反应得到的电泳谱图。其余标记 xSy(*x* 为低温处理温度,*x* = 0,3,6,12;*y* 为随机引物编号,*y* = 1,2,3,4,5,6,7,8)可依次类推。

Note: The symbol of 0S1 means that sample had been treated on 0℃ for 0 h, and primers in PCR reaction were S1. Other symbols xSy (where *x* is the treatment temperature, *x* = 0,3,6,12; where *y* is the serial number for random primer, *y* = 1,2,3,4,5,6,7,8) were the same to 0S1.

3 讨 论

3.1 低温冻害对蚕豆生理特性的影响

脯氨酸、还原性谷胱甘肽和蛋白质的含量是反应植株抵抗逆境伤害的主要指标,常用来分析植物对逆境比如盐害、冷害、干旱等环境的抵抗作用。李世成等^[16]在 20℃~5℃范围内研究发现低温处理时间越长温度越低,甘蓝中游离脯氨酸的积累越高。阙生全等^[17]对金边瑞香的研究同样发现低温胁迫越强,游离脯氨酸含量越高的趋势。罗娅等^[18]研究发现低温处理时间越长草莓叶片内还原性谷胱甘肽含量越低。吴锦程等^[19]研究发现经-3℃处理后枇杷幼果内谷胱甘肽还原酶受到明显抑制。陆新华等^[20]研究发现菠萝幼苗中的蛋白质含量表现出随低温胁迫程度加剧而先增加后减小的趋势。本试验对脯氨酸、还原性谷胱甘肽、蛋白质的含量研究结果与前人研究基本一致。在 0℃条件下对蚕豆幼苗进行低温处理,其脯氨酸含量随着低温处理时间的延长而呈明显增大的趋势,还原性谷胱甘肽含量随着低温处理时间的延长而呈明显减小的趋势,蛋白质含量则呈先增加后减小的趋势。

MDA 含量高低是反映膜脂过氧化作用强弱和

质膜破坏程度的指标。刘荣梅等^[21]研究发现经 4℃和 15℃低温胁迫处理转基因烟草后,MDA 的含量要比 24℃高 4.14 倍和 1.99 倍。龚束芳等^[22]在 20℃~5℃范围内研究发现偃麦草和高羊茅中的 MDA 含量会随着温度的降低表现出明显的积累效应。陆新华等^[23]对 10 个菠萝品种的 5℃低温胁迫研究表明,菠萝幼苗表现出低温处理时间越长 MDA 含量越高的现象。这些研究都表明在轻度低温胁迫处理时,植物体内的 MDA 的含量会随着处理程度的加重而增加。但是植物在受到重度低温胁迫时,MDA 的变化不再符合这一规律。李慧等^[24]研究发现 0℃低温处理葫芦巴幼苗超过 24 h 时,叶片中 MDA 含量开始出现明显下降,超过 36h 后,叶片 MDA 含量维持在一个稳定水平。刘光立等^[25]研究发现当处理温度低于-15℃时,叶片内的 MDA 含量开始出现急剧下降。这些研究说明植物在受到重度低温胁迫伤害时,叶片内的 MDA 含量会出现急剧的下降,之后会维持在一个稳定水平。本试验研究表明 0℃处理 3 h 后蚕豆幼苗叶片的 MDA 含量就已经低于正常叶片,且处理 3、6、12 h 的 MDA 含量差异很小。这说明 0℃处理 3 h 已经对蚕豆幼苗造成了非常严重的冷冻伤害。

表 2 测序结果
Table 2 Results of sequencing

编号 No .	序列结果 Result of sequencing	序列长度 (bp) Length of sequences	高相似序列 Height similarity sequences
d	TTGCTGCGGGAATGACGAGGCATTTTCATGGCGGTCCGAGCGACTGCTCGCCACCACCCTACCG GGCCGAGATCCTCGAGGCGGACGACCGCCACACGGGCCACGATCTGGCCGAAGGAACCGCCT GTCATGGCGGTAATAGGACGGACTCGACGAAGAACCAGCCATCGGGCATCCACATAGGCCA GCCTCCGCCCCGGATGACTGCTGGGCCAAAGATGGCGCTGGCCAATACCATAGAGGCACCCC AGTCGATGATGAGGGCACCGATCCGTTTGACCAACTAGCCAGTGAACCGCGCCCTCAGCG GGCAGCCCGATCGAGACTCCTGGGGCTGCCTCGGTTCCACTACCCCGGTGAATCCTACCGGCA CGACCTGTTACACGCTCGAAACACAACAGTGACGGTCGAGCAACTCATACGAACTACCGTAA AGCACATACCAGTCACTTGATGAGGAAAGATGTTCCAAGTCCCGACGACCTGCTTGCC TATGTCAAAGAAGGAGGGCATCGAGATGATCGATGTCCGCTTCTGTGACCTTATCGGTATCAT GCAGCACTTCACCGTTCGCCGACCA	585	无 None
e	TTGCTGCGGGAACATCAAGCAAGCTCAAAGGAACTTCAGGCCTCATTTCAAATTTGCTACATTC CCATATTTCAAACCTTGACTGAACAAGGTAATTTACAACCTTCTATCTCCTTATTTAGACATCCTT AAGCTTAGGTTTGTAAGCAAAAATGTAGTTTAAATGTGCTTGACTTGACATATGCATAGCT TCCATTATATTGACTGAGCTAGGAGTATTTGATAGTTGAACCTTGCTGAAAATTTTAGGCCAG AAATTAGGGGTGACAAAATTTCTCTGATCTTTGAGAGTTAGGTCAAGTTTTTTATATCAATG GAATCGTGAATAAAATGCTACAAGTTTCATGTGCAAGATTTTGTTTTTAAGCACCTATGCA GGAGTTACAGTTTGAACAAGGCGACGCGCATTTTTTTTGTCTGAAGGACAGGGATGAAGTGG GAGTGGGCTTGGCCTGCTTTGTCTGACTATTGACACCCCTGTTTTACTTCCCGCACCA	501	无 None
f	TGCGGTTTGTGAATCAGGACAACTATGGAGTGAAGGCTGTATGAAATACATTAAGGCTGAAAGT GCTAAAGCCAACACTCACATGGTTACACGGTTTGACCGCCATAGCCACAACCTTCATTGTGAAAAG AGACAATTGACCACAATGAAGGCGCTGGCAAGACAAGAATACAGGGTCATTTTACCTTCTCAATG GTGCGATTGTGCGCAGGTTTCAAGCTTTTTCGTATGCCCTTGCTCTCATGTGCTATTGCCGCTTGTGCTCA TACCCATCAGGACCGCGCTTCAACTGCTCTCAAAACGTTTTATAAATCTGAAACGTTGCTCACTGTTT ACAACAACAACITTCCTTTGCTGGCAAAAACCGCAA	358	无 None
g	GATTGGCACTGAGGCAGACAGGAAAGAGCTAAAGATTGGCACTGAGGTAGACAGGAAAGAGCTA AAGATTGGCACTGAGGCAGACAGGAAAGAGCTAAAGATTGGTGCCAACCTAGAGCTCAGCGTGA AGCAACGGTTAACCAAGATGTTACATGACTATATGGAGATCTTTGCCTGGTCTACGAAGACATG CCAGGCTTGGATACCGATATTGTTGTCCATCATTTGCCGACCAGAGAAGACTGCCCTCCAGTTAAA CAAAAGGTCGCTCGGATGCGTCCAGAGATGTCGAGAAGATTAAAGGCCGAGGTGATGAAACAGT TTGATGCCGGGTTTCTTGCACTGACTTCTTACCCTCACTGCCAATCG	370	BamHI 重复元件;蚕豆 mRNA 逆转录类蛋白 BamHI repetitive ele- ment (M16855.1); Vi- cia faba mRNA for re- verse transcriptase-like protein (AB007466.1)

3.2 低温冻害对蚕豆转录水平的影响

低温胁迫会引起植物转录水平上非常显著的变化^[10]。据估计拟南芥有 4% 的基因与冷害抵抗有关^[26,27]。有研究表明冷害诱导时 ICE1—CBF (C—repeat binding factors) 转录因子家族成员^[28,29] 及与 Ca²⁺ 信号传递相关的基因有表达^[30]。Kim 等^[31] 对水稻低温特异蛋白 OsRZs 的转录水平进行分析发现植物是在转录水平上对冷害做出调控反应的,由此 Kim 等提出对 mRNA 输出的调控是植物对压力环境的适应性反应之一。这些研究结果都间接说明植物受到冷害时,许多基因都会出现应激性的表达。从本试验结果来看,在转录水平上正常叶片细胞 RNA 含量维持在一个很高的水平,受到冷冻伤害后,部分 RNA 开始降解,冻害 12 h 时,蚕豆叶片几乎完全丧失转录能力,转录的 RNA 基本上完全降解。

3.3 蚕豆低温冻害处理的 RAP—PCR 指纹图谱

RAP—PCR 指纹图谱分析表明植物的基因表达

在受到低温冻害胁迫时基本上可分为 3 种情况。(1) 多数维持植株正常生理功能的基因都将随着冻害时间的延长而丧失活性,外在表现为植株萎焉,失水;(2) 发生冻害时,部分高表达量的基因如看家基因、某些转录因子等依然能保持一定水平的表达,这为植株成功地抵抗低温造成的伤害提供了生理基础;(3) 某些特异基因在受到冻害时开始表达,发挥出抵抗冷冻伤害的作用。试验中发现冻害抵抗特异的多态性条带占到了总数的 25%,其中只在冻害下表达的条带占到了 12.5%。Hannah 等^[32] 利用统计学方法分析了低温处理 14d 的拟南芥基因组,预估出拟南芥与低温抵抗相关的基因可能约占总数的 4%。鉴于拟南芥为越冬植物,而蚕豆为非越冬植物,因此与低温抵抗相关的基因可能远高于先前估计的 4%。Lee 等^[33] 使用 712 条 cDNA 组成的微正列方法分析了拟南芥低温胁迫时的基因表达情况,发现不仅是先前发现的各种低温胁迫调控基因如

CBF1 等有大量表达,而且还发现很多候选基因如乙醇脱氢酶和转录抑制子也有大量表达。这些证据从侧面证明与低温抵抗相关的基因远高于先前 Han—nah 等的估计。

试验中从鉴定出的 8 条特异基因片段中成功克隆了其中的 4 条并对其进行测序。RAP—PCR 分析中采用的引物为随机引物,所获得的序列片段前后段具有一致的序列,因此其直接获得的片段纯化产物不能直接测序,只能克隆至载体后再测序。其次 RAP—PCR 多态性条带浓度不一致,个别条带仅适合观察,而不能满足大量扩增和切胶纯化的基本要求。这些原因都为特异性片段的成功获取造成了技术上的困难。但是考虑到冷害特异基因鉴定的困难性,RAP—PCR 分析技术依然是筛选并克隆环境胁迫抵抗特异性基因片段的有效方法之一。

参 考 文 献:

[1] Heidarvand L, Amiri R M. What happens in plant molecular responses to cold stress? [J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2010, 32 (3): 419—431.

[2] Xiong L M, Schumaker K S, Zhu J K. Cell signaling during cold, drought, and salt stress[J]. *Plant Cell*, 2002, 14: 165—183.

[3] Gotoh M, Iguchi A, Kakumu S, et al. Central suppressive effect of octreotide the hyperglycemic response to 2-deoxy-D-glucose injection or cold-swim stress in awake rats: possible mediation role of hypothalamic noradrenergic drive [J]. *Brain Research*, 2001, 895 (1—2): 146—152.

[4] Rose R, Haase D. Chlorophyll fluorescence and variations in tissue cold hardiness in response to freezing stress in Douglas-fir seedlings [J]. *New Forests*, 2002, 23(2): 81—96.

[5] Sun Z J, Sapozhnikov V. Chronic cold exposure increases oxidative stress[J]. *Faseb Journal*, 2006, 20(5): A1255—A1255.

[6] Sjursen H, Holmstrup M. Cold and drought stress in combination with pyrene exposure: studies with *Protaphorura amata* (Collembola: Onychiuridae) [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2004, 57 (2): 145—152.

[7] Minami A, Nagao M, Ikegami K, et al. Cold acclimation in bryophytes: low-temperature-induced freezing tolerance in *Physcomitrella patens* is associated with increases in expression levels of stress-related genes but not with increase in level of endogenous abscisic acid [J]. *Planta*, 2005, 220(3): 414—423.

[8] Takle H, Baeverfjord G, Andersen O. Identification of stress sensitive genes in hyperthermic Atlantic salmon (*Salmo salar*) embryos by RAP—PCR [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2004, 30 (3—4): 275—281

[9] Valdecantos P A, Arganaraz M E, Abate C M, et al. RNA fingerprinting using RAP—PCR identifies an EBAF homologue mRNA differentially expressed in rat oviduct [J]. *Biocell*, 2004, 28(3): 287—297.

[10] Chinnusamy V, Zhu J, Zhu J K. Cold stress regulation of gene expression in plants [J]. *Trends in Plant Science*, 2007, 12(10): 444—

451.

[11] 高俊凤.植物生理学实验指导[M].北京:高等教育出版社, 2006.

[12] 栾非时,祖元刚.菜豆种质资源 RAPD 多样性的研究 I [J].植物研究, 2002, 22(4): 473—478.

[13] 栾非时,祖元刚.菜豆种质资源 RAPD 多样性的研究 II [J].植物研究, 2002, 22(3): 322—327.

[14] 王振东,贾利,孙仓,等.大豆抗旱种质资源遗传多样性的 RAPD 分析[J].大豆科学, 2009, 28(1): 26—31.

[15] 韩颖.北野豌豆及其近缘种基因组 DNA 的提取和 RAPD 稳定的反应体系的建立[J].西南科技大学学报, 2009, 24(2): 74—77.

[16] 李世成,牛俊义,盖玥.零下低温处理对不同甘蓝型油菜品种抗寒性的影响[J].干旱地区农业研究, 2007, 25(6): 40—44.

[17] 阙生全,甘志凯.低温胁迫对金边瑞香生理生化变化的影响[J].北方园艺, 2010, (10): 169—170.

[18] 罗娅,汤浩茹,张勇.低温胁迫对草莓叶片 SOD 和 AsA—GSH 循环酶系统的影响[J].园艺学报, 2007, 34(6): 1405—1410.

[19] 吴锦程,梁杰,陈建琴,等.GSH 对低温胁迫下枇杷幼果叶绿体 AsA—GSH 循环代谢的影响[J].林业科学, 2009, 45(11): 15—19.

[20] 陆新华,孙德权,叶春海,等.低温胁迫下菠萝幼苗生长与生理特性变化[J].西北植物学报, 2010, 30(10): 2054—2060.

[21] 刘荣梅,李凤兰,徐永清,等.低温胁迫对转基因烟草生理生化的影响[J].湖北农业科学, 2010, 49(11): 2819—2821.

[22] 龚束芳,杨涛,董宝龙,等.低温胁迫对偃麦草与高羊茅抗性生理生化指标的影响[J].作物杂志, 2010, (6): 72—74.

[23] 陆新华,孙光明,叶春海.低温胁迫对菠萝幼苗膜透性、丙二醛和叶绿素含量的影响[J].安徽农业科学, 2010, 38(16): 8374—8375.

[24] 李慧,张昕欣,彭立新,等.低温胁迫对胡芦巴幼苗抗氧化酶活性和膜脂过氧化的影响[J].安徽农业科学, 2010, 38(26): 14258—14259.

[25] 刘光立,周鑫,潘远志,等.低温胁迫对黄金香柳抗寒性生理指标的影响[J].安徽农业科学, 2010, 38(22): 12062—12064.

[26] Lee B H, Henderson D A, Zhu J K. The Arabidopsis cold-responsive transcriptome and its regulation by ICE1 [J]. *Plant Cell*, 2005, 17 (11): 3155—3175.

[27] Bieniawska Z, Espinoza C, Schlereth A, et al. Disruption of the Arabidopsis circadian clock is responsible for extensive variation in the cold-responsive transcriptome [J]. *Plant Physiology*, 2008, 147(1): 263—279.

[28] Yang J S, Wang R, Meng J J, et al. Overexpression of Arabidopsis CBF1 gene in transgenic tobacco alleviates photoinhibition of PSII and PSI during chilling stress under low irradiance [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2010, 167(7): 534—539.

[29] Achard P, Gong F, Cheminant S, et al. The cold-inducible CBF1 factor-dependent signaling pathway modulates the accumulation of the growth-repressing DELLA proteins via its effect on gibberellin metabolism [J]. *Plant Cell*, 2008, 20(8): 2117—2129.

[30] Sangwan V, Foulds I, Singh J, et al. Cold-activation of Brassica napus BN115 promoter is mediated by structural changes in membranes

and cytoskeleton , and requires Ca^{2+} influx[J] . Plant Journal , 2001 , 27(1) ;1—12 .

[31] Kim J Y , Kim W Y , Kwak K J , et al . Zinc finger-containing glycine-rich RNA-binding protein in *Oryza sativa* has an RNA chaperone activity under cold stress conditions [J] . Plant Cell and Environment , 2010 ,33(5) ;759—768 .

[32] Hannah M A , Heyer A G , Hincha D K . A global survey of gene regulation during cold acclimation in *Arabidopsis thaliana* [J] . Plos Genetics , 2005 ,1(2) ;179—196 .

[33] Lee J Y , Joo H , Choy Y H , et al . Using Specialized cDNA Microarrays to Analyze *Arabidopsis* Gene Expression Under Cold Stress [J] . Journal of Plant Biology , 2010 ,53(3) ;240—250 .

Effect of low temperature freezing injury on physiological and biochemical characteristics of *Vicia faba* at the seedling stage and RAP—PCR fingerprint analysis

CHEN Zhi-yuan^{1,2} , WANG Guo-dong¹ , DI Li-jun¹ , WU Yong-jun² , YANG Jia-ye²
(1 . College of Sciences , Northwest A & F University , Yangling , Shaanxi 712100 , China ;
2 . College of life Science , Northwest A & F University , Yangling , Shaanxi 712100 , China)

Abstract : Protein content , proline , reduced glutathione , malondialdehyde of *Vicia faba* at seedling stage were measured in 0℃ , RAP—PCR fingerprint analysis was conducted and chilling damage-resistance gene segments were cloned . The results showed that proline increased with the time at 0℃ , reduced glutathione decreased with the time , protein content increased first but decreased then , and malondialdehyde stayed at a steady level after freezing injury . Eight chilling damage-resistance genes were identified with 8 random primers and RAP—PCR , and four of them were successfully cloned .

Keywords : cold stress ; freezing injury ; RAP—PCR ; *Vicia faba*