



水分胁迫下不同抗旱性小麦品种 叶片转录因子表达差异研究

秦 鹏, 刘秉焱, 韩翠英, 刘虎岐*

(西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西杨陵 712100)

摘 要: 通过研究不同抗旱性小麦品种中转录因子表达水平的差异, 为阐明小麦抗旱机制奠定基础。依据候选基因序列设计 PCR 引物, 以干旱胁迫后 0、3、6、9、12 和 24 h 的小麦叶片为实验材料, 以 26S rRNA 为内参, 运用荧光定量 PCR 技术, 检测 *Wdreb2*、*Wlip19* 基因在干旱敏感性和干旱耐受性小麦叶片中的相对表达量。定量 PCR 结果显示: 干旱胁迫后, *Wdreb2*、*Wlip19* 基因在干旱敏感性小麦叶片中的表达明显低于干旱耐受性小麦, 在不同品种叶片中的响应时间和表达趋势存在差异。研究认为, *Wdreb2*、*Wlip19* 基因在不同品种小麦受到干旱胁迫后的表达差异, 与该品种小麦的抗旱能力具有一定的相关性。

关键词: 小麦; 干旱胁迫; 转录因子; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: Q786 **文献标志码:** A

Comparative Expression of Two Function-known Transcription Genes in Different Drought Tolerance Wheat Cultivars under Water Deficit Stress

QIN Peng, LIU Bingyan, HAN Cuiying, LIU Huqi*

(College of Life Science, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: This study aimed to investigate the expression of *Wdreb2* and *Wlip19* in ten different varieties of wheat leaves under drought stress, and lay a foundation for wheat drought resistance mechanism. Primers were designed according to gene sequences, using wheat leaves under different degrees of drought stress (including 0, 3, 6, 9, 12 and 24 h) as experimental materials, and 26S rRNA as the internal control. The florescent real-time quantitative PCR was used to detect relative expression levels of *Wdreb2* and *Wlip19* in different varieties of wheat. RT-PCR results showed that, the expression of *Wdreb2* and *Wlip19* gene in drought sensitivity wheat leaf significantly lower than that in drought tolerant wheat under drought stress. There are some differences in response time and express trends in different varieties. These results indicated that the different expression levels of *Wdreb2* and *Wlip19* in different varieties of wheat under drought stress were related to the drought resistant ability.

Key words: wheat; drought stress; transcription factor; real-time quantitative PCR

收稿日期: 2016-04-16; 修改稿收到日期: 2016-11-15

基金项目: 西北农林科技大学青年学术骨干研究基金(01140302)

作者简介: 秦 鹏(1988—), 男, 在读硕士研究生, 主要从事植物抗逆分子生物学研究。E-mail: 77824518@qq.com

* 通信作者: 刘虎岐, 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事植物分子遗传学、昆虫杀虫剂抗性分子机理和脑缺氧损伤分子机理研究。E-mail: liuhuqi@yahoo.com.cn

干旱是影响西北地区作物产量的重要因素之一。植物在受到干旱胁迫时,体内会被诱导产生多种调控因子和功能蛋白来对抗干旱胁迫^[1,2]。转录因子作为调控因子,它可以激活一系列胁迫耐受应答基因表达,产物包括相溶性溶质、胚胎晚期丰富蛋白、活性氧清道夫和热激蛋白等等,从而综合提高植物的胁迫耐受能力。现已有多种调控干旱相关基因表达的转录因子基因被克隆出来。在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中,已经有超过 50 个家族至少 1 700 个编码转录因子的基因被克隆出来^[3-7],其中有相当一部分与干旱胁迫应答相关^[8-9]。例如:bZIP 家族的 AREB/ABF 基因可对于旱产生响应^[10], AP2/ERF 基因家族的 DREB1 亚家族转录因子受脱水和冷诱导^[11], NAC 家族的 ANACO19、ANACO55 和 ANACO72 则被干旱、高盐和 ABA 诱导表达^[12]。大量研究表明,在植物对抗干旱胁迫过程中,转录因子起着非常重要的作用^[13-16]。

根据文献报道,DREB 和 bZIP 这两类转录因子在小麦对抗干旱过程中扮演着重要角色^[17-19]。在前人的研究当中,*Wdreb2*、*Wlip19* 被证实是能够明显提高小麦抗旱能力的 2 个基因^[20-21]。本研究通过 SYBR Green 染料实时定量 PCR,以小麦基因 26S rRNA 为内参,采用相对定量方法,从 mRNA 转录水平定量检测 *Wdreb2* 和 *Wlip19* 这 2 个基因在西北地区常见的 10 种不同品种小麦(5 种干旱敏感性,5 种干旱耐受性)受到干旱胁迫后叶片中的表达差异,试图发现不同抗旱转录因子在小麦抗旱机理中发挥的作用程度,进一步为小麦抗旱机理的研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 植物材料与处理

植物材料为 10 个品种的小麦幼苗,分为干旱敏感性:西农 979、西农 165、中麦 895、小偃 22、周麦 18;干旱耐受性:晋麦 47、运早 805、普冰 9946、普冰 143、普冰 151。

采用水培法,种子用蒸馏水清洗 2 次,然后用 10 %次氯酸钠消毒 10 min,再用蒸馏水清洗干净。在培养皿底部铺 2 层滤纸,将种子均匀铺上,加入蒸馏水,暗室催芽 12 h~24 h,出芽后置于光照恒温培养箱(32 ℃、光照 12 h)中培养。在小麦生长至 6~7 d 时,采用 20 % PEG 6000 模拟干旱胁迫,并相应设置水处理对照。取经干旱胁迫处理 0、3、6、9、12 和 24 h 及对照植株的叶片,用液氮速冻,置-70 ℃保

存备用。

1.2 候选基因与引物

根据 *Wdreb2*(GenBank 登记号为 AB193608)、*Wlip19*(GenBank 登记号为 AB193552)基因在 NCBI 上公布的序列,使用 Primer Premier 5.0 软件,分别设计 2 对特异性引物,上游引物 *Wdreb2*-F:(5'-AGATGTTGCTTCTTCCTTGCC-3');*Wlip19*-F:(5'-CAGCCTCGTTTCTTCCACTTT-3'),下游引物 *Wdreb2*-R:(5'-GATGTGCTCCTTGAAATGCTTG-3');*Wlip19*-R:(5'-GACATGGTCGGTCGGGTTTC-3')。内参根据小麦 26S rRNA(GenBank 登记号为 NC022714)基因的序列,设计 1 对特异性引物,上游引物 26S-F:(5'-GAAGAAGGTCCCAAGGGTTC-3'),下游引物 26S-R:(5'-TCTCCCTTTAACACCAACGG-3')。引物由华大基因公司合成。通过梯度 PCR 确定最佳退火温度,作为实时荧光定量 PCR 的退火温度,20 g/L 的琼脂糖凝胶电泳鉴定引物的正确性。

1.3 RNA 提取与反转录

采用 Trizol 试剂(TaKaRa 公司),按其说明书的方法提取小麦幼叶总 RNA。经超微量紫外分光光度计检测,计算 OD₂₆₀/OD₂₈₀、OD₂₆₀/OD₂₃₀,确定 RNA 的纯度,再利用琼脂凝胶电泳检测 RNA 的完整性。选取较完整、纯度高且没有降解的 RNA 进行 cDNA 合成,cDNA 第 1 链合成参照 PrimeScript RT reagent Kit With gDNA Eraser(TaKaRa 公司)操作方法。

1.4 PCR 条件的优化

对设计出的引物按照退火温度 55~65 ℃、引物浓度 0.2~0.6 mol/L、循环数 30~35 分别进行普通 PCR 扩增,以得到扩增产物凝胶电泳结果没有非特异性条件,并且目的条带清晰的最佳 PCR 条件,并按照该条件进行下一步的实时荧光定量 PCR 扩增。

1.5 实时荧光定量 PCR

采用 TaKaRa 公司 SYBR Premix EX TaqTM (Perfect Real Time)试剂盒,10 μL 体系里包含 5 μL SYBR[®] Premix EX TaqTM、上下游引物各 0.2 μL、0.8 μL cDNA 模板、3.8 μL 灭菌超纯水。使用 CFX96 型号 PCR 仪(Bio-Rad 公司)进行反应,每个样品重复检测 3 次。PCR 反应采用 2 步法:95 ℃预变性 5 min,95 ℃变性 10 s,T_m ℃退火及延伸 30 s,循环 35 次,延伸阶段收集荧光信号;反应结束后 65 ℃ 5 s,并以 0.5 ℃/s 的速度升至 95 ℃进行溶解曲线分析。

1.6 数据的分析

实验采用实时定量 PCR 相对定量方法,选择 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法^[22] 计算胁迫处理的样品和对照组样品中目标基因的相对表达量。

2 结果与分析

2.1 小麦叶片总 RNA 质量的检测

不同处理时间和不同品种小麦叶片样品的总 RNA 经超微量紫外分光光度计检测表明,OD₂₆₀/OD₂₈₀ 均在 1.8~2.1,OD₂₆₀/OD₂₃₀ 在 1.9~2.2,说明提取的 RNA 纯度较高;经变性琼脂糖凝胶电泳检测得知,各组织总 RNA 均有较清晰的 3 条带,分别为 5S、18S 和 28S rRNA,且无严重弥散现象(图 1)。说明提取样品的总 RNA 无明显降解现象,完全能够满足后续试验要求。

2.2 Wdreb2、Wlip19 与 26S rRNA 的反转录检测

琼脂糖凝胶电泳检测结果(图 2)显示,PCR 扩增产物条带单一,无非特异性扩增及引物二聚体出现,Wdreb2、Wlip19 与 26S rRNA 均与预期片段大

小一致,说明引物可以正确扩增出响应片段,可用于实时定量 PCR 分析。

2.3 Wdreb2 与 Wlip19 表达的实时荧光定量 PCR 检测

按照公式相对表达量 = $2^{-\Delta\Delta C_t}$,以 26S rRNA 为内参基因,以水培养的小麦叶片组织的 Wdreb2、Wlip19 基因为参照因子,设为 1,分别得到受到干旱胁迫处理 3、6、9、12 和 24 h 的叶片组织中 Wdreb2、Wlip19 基因的表达数据曲线(图 3,图 4)。

2.3.1 Wdreb2 在不同小麦品种中的表达 与水培对照组相比,5 个敏感性小麦(西农 979、西农 165、小偃 22、周麦 18、中麦 895)在处理组中 Wdreb2 基因的表达均呈现先上调后下调且趋于稳定的趋势,表达量到达峰值的时间大部分集中在 6 h 处,其中,小偃 22 集中在 9 h 处,较其他 2 个品种慢。

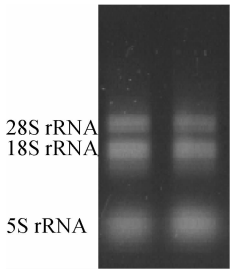
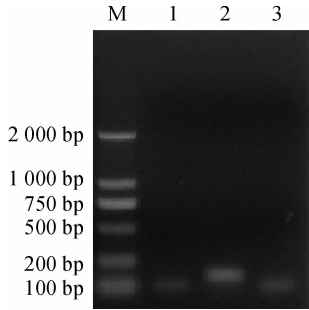


图 1 小麦叶片总 RNA 的电泳检测结果
Fig. 1 Agarose gel analysis of total RNA of wheat leaves



M. DNA marker D2000;1. 26S rRNA;2. Wdreb2;3. Wlip19
图 2 Wdreb2、Wlip19 和内参基因 26S rRNA PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳检测结果

Fig. 2 PCR amplification product of Wdreb2, Wlip19 and reference gene 26S rRNA

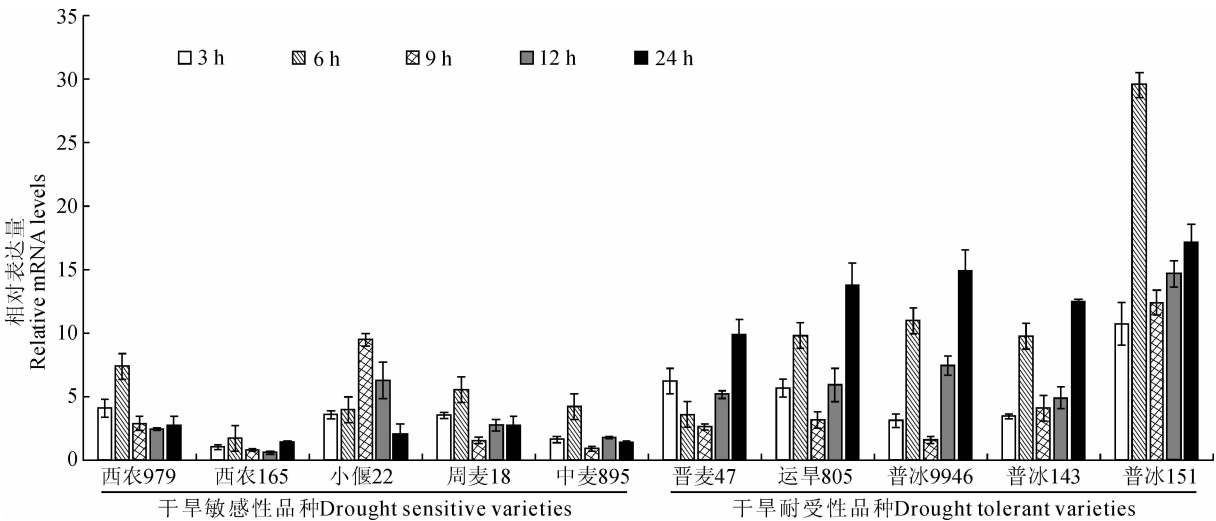


图 3 10 种小麦品种中 Wdreb2 基因相对表达量的变化
Fig. 3 Relative expression levels of Wdreb2 in leaves of ten wheat varieties

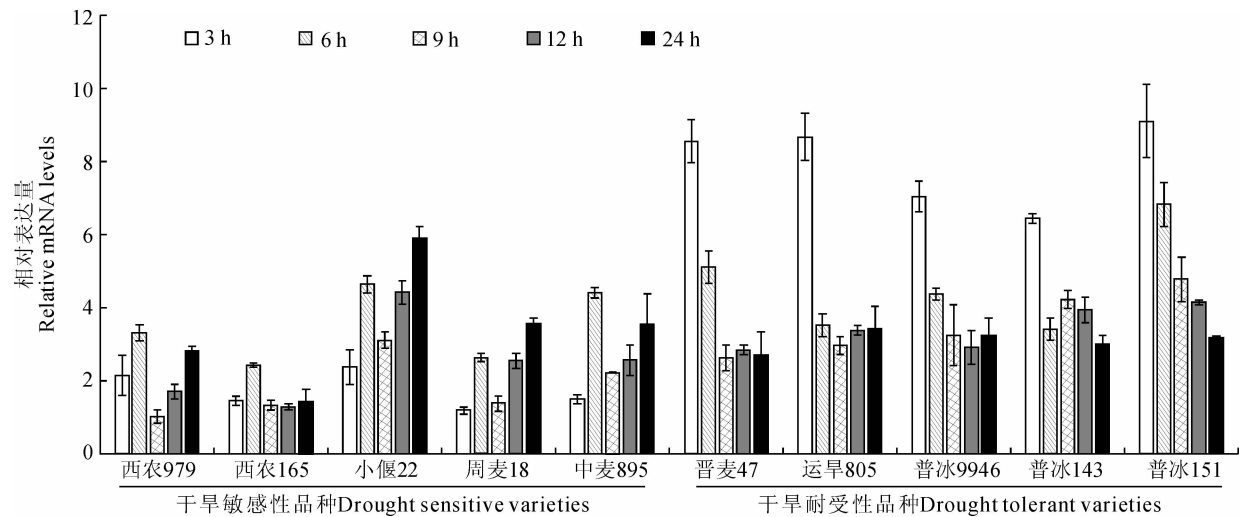


图 4 10 种小麦品种中 *Wlip19* 基因相对表达量的变化

Fig. 4 Relative expression levels of *Wlip19* in leaves of ten wheat varieties

5 个耐受性小麦(晋麦 47、运早 805、普冰 9946、普冰 143、普冰 151)经处理后,5 个处理组中的表达均呈现先上调后下调再上调的趋势,具有两个表达峰值,主要集中在 6 h 处和 24 h 处(晋麦 47 集中在 3 h 和 24 h 处)。虽然 *Wdreb2* 基因在各个品种中的相对表达量不一样,但具有大体一致的表达趋势,进一步说明 *Wdreb2* 基因参与干旱应答过程。

2.3.2 *Wlip19* 在不同小麦品种中的表达 与水培对照组相比,敏感性小麦(西农 979、小偃 22、周麦 18、西农 165 和中麦 895)经处理后,5 个敏感性品种处理组中 *Wlip19* 的表达均呈现先上调后下调再上调的趋势,均具有两个表达峰值,且均集中在 6 h 处和 24 h 处,这两个峰值与对照组均呈现显著性差异;同时所有处理组的表达均无下调现象。其中西农 979 和小偃 22 在 3 h 处表达明显高于对照组,均在 2 倍以上,说明 *Wlip19* 基因在这 2 个品种中对干旱响应较其他 3 个品种早。

5 个耐受性小麦(晋麦 47、运早 805、普冰 9946、普冰 143、普冰 151)经处理后,所有品种处理组中的表达量与对照组相比均有显著性差异,其中在 3 h 处表达量最高,为对照组的 6~10 倍,随后逐渐下降且趋于稳定。

3 讨论

Wdreb2、*Wlip19* 在小麦受到干旱胁迫后作为正调控因子对小麦干旱胁迫起调控作用。*Wdreb2*、*Wlip19* 在干旱耐受性小麦与干旱敏感性小麦叶片中的表达都受干旱胁迫影响呈上调趋势,这与已报

道的研究结论基本一致^[23-26]。这表明 *Wdreb2*、*Wlip19* 在小麦对抗干旱过程中起着比较重要的调控作用。

Wdreb2、*Wlip19* 在不同品种小麦叶片中呈现差异性表达。从结果中可以看出,*Wdreb2*、*Wlip19* 在干旱耐受性小麦叶片中表达量明显比在干旱敏感性小麦叶片中高。说明 *Wdreb2*、*Wlip19* 存在基因型表达特异性。在小麦受到干旱胁迫后,*Wdreb2*、*Wlip19* 在干旱诱导下表达量开始上调,从而合成更多的转录因子,与顺式作用元件结合,调控不同的抗旱基因的表达,对干旱胁迫做出响应。

Wdreb2、*Wlip19* 在不同品种小麦叶片中胁迫响应时间存在差异。*Wdreb2* 基因在干旱耐受性小麦与干旱敏感性小麦叶片中对于 PEG 胁迫的响应时间都集中在 6 h,而 *Wlip19* 基因在干旱耐受性小麦叶片中对于 PEG 胁迫的响应时间要比干旱敏感性小麦叶片中早,前者集中在 3 h,后者集中在 6 h。原因分析可能是由于 *Wlip19* 的表达受 ABA 的诱导,在不同品种小麦中,ABA 的含量变化不同,在干旱耐受性小麦受到干旱胁迫后,ABA 含量增加的速度快,所以 *Wlip19* 在干旱耐受性小麦叶片中对干旱胁迫响应的时间要比敏感性小麦早。

Wdreb2、*Wlip19* 在不同品种小麦叶片中表达趋势存在差异。在干旱耐受性小麦叶片的实时定量结果中,*Wdreb2* 出现了两个表达峰,在第一次表达量上调到峰值后,其表达量开始出现下调,待下调到一定程度后,表达量又会上调,即表现出“上调-下调-上调”的趋势;*Wlip19* 出现了一个表达峰,在上

调到峰值后,开始逐渐下调,并趋于稳定。在敏感性小麦叶片中,*Wdreb2* 只出现了一个表达峰,在表达量上调到峰值后,其表达量开始下调,到达一定程度后趋于稳定;*Wlip19* 出现了两个表达峰,表现出一个“上调-下调-上调”的趋势。分析原因,我们认为这是由于品系间差异性所致,调控抗旱基因表达的途径和转录因子太多,其表达在不同品系中具有选择性。

在干旱胁迫下,各品种小麦均有多个信号途径协同作用,且发挥的作用不同,响应时间也各不相同^[17],这从本实验得到的结果中得到了验证。从当前

我们研究的这两个基因来看,不同品种间也是存在一定共性的,如:这两个基因均在敏感品种“西农 165 中”表达量最低、在抗旱品种“普冰 151”中表达量最高、抗旱品种中的表达均明显高于敏感品种,等等。通过实验结果可以看出,*Wdreb2*、*Wlip19* 作为正调控因子对小麦干旱胁迫起调控作用,在小麦对抗干旱的分子机制中起着重要作用,并与该品种小麦抗旱能力正相关。对于 *Wdreb2*、*Wlip19* 与其他抗旱基因相比较,作用于小麦对抗干旱过程中的重要程度,还有待于进一步的研究。

参考文献:

[1] NAKASHIMA K, ITO Y, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in *Arabidopsis* and grasses[J]. *Plant Physiol.*, 2009, **149**(1): 88-95.

[2] SHOU H, BORDALLO P, FAN J B, *et al.* Expression of an active tobacco mitogen-activated protein kinase kinase enhances freezing tolerance in transgenic maize[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004, **101**(9): 3 298-3 303.

[3] YANG S, VANDERBELD B, WAN J, *et al.* Narrowing down the targets: towards successful genetic engineering of drought-tolerant crops[J]. *Mol. Plant*, 2010, **3**(3): 469-490.

[4] PALANISWAMY S K, JAMES S, SUN H, *et al.* AGRIS and AtRegNet. a platform to link *cis*-regulatory elements and transcription factors into regulatory networks[J]. *Plant Physiology*, 2006, **140**(3): 818-829.

[5] RIANO-PACHON D M, RUZICIC S, DREYER I, *et al.* PlnTFDB: an integrative plant transcription factor database [J]. *BMC Bioinformatics*, 2007, **8**: 42.

[6] GUO A Y, CHEN X, GAO G, *et al.* PlantTFDB: a comprehensive plant transcription factor database[J]. *Nucleic Acids Res*, 2008, **36**(Database issue): D966-D969.

[7] XIONG Y, LIU T, TIAN C, *et al.* Transcription factors in rice: a genome-wide comparative analysis between monocots and eudicots[J]. *Plant Mol. Biol.*, 2005, **59**(1): 191-203.

[8] BARTELS D D U D, SUNKAR R. Drought and salt tolerance in plants[J]. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2005, **24** (1): 23-58.

[9] UMEZAWA T, FUJITA M, FUJITA Y, *et al.* Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring genes to unlock the future[J]. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2006, **17**(2): 113-122.

[10] OH S J, SONG S I, KIM Y S, *et al.* Arabidopsis CBF3/DREB1A and ABF3 in transgenic rice increased tolerance to abiotic stress without stunting growth[J]. *Plant Physiology*, 2005, **138**(1): 341-351.

[11] LIU Q, KASUGA M, SAKUMA Y, *et al.* Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell*, 1998, **10**(8): 1 391-1 406.

[12] TRAN L S, NAKASHIMA K, SAKUMA Y, *et al.* Isolation and functional analysis of *Arabidopsis* stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought-responsive *cis*-element in the *early responsive to dehydration stress 1* promoter[J]. *Plant Cell*, 2004, **16**(9): 2 481-2 498.

[13] QIN F, SAKUMA Y, LI J, *et al.* Cloning and functional analysis of a novel DREB1/CBF transcription factor involved in cold-responsive gene expression in *Zea mays* L[J]. *Plant Cell Physiology*, 2004, **45**(8): 1 042-1 052.

[14] 才 华,朱延明,柏 锡,等. 野生大豆 DREB 基因 cDNA 的克隆与分析[J]. 草业科学, 2009,**26**(8): 17-23.

[15] CAI H, ZHU Y M, BO Y, *et al.* Cloning and analysis of a novel DREB gene of *Glycine soja*[J]. *Pratacultural Science*. 2009,**26**(8): 17-23.

[16] SAKAMOTO H, MARUYAMA K, SAKUMA Y, *et al.* Arabidopsis Cys2/His2-type zinc-finger proteins function as transcription repressors under drought, cold, and high-salinity stress conditions[J]. *Plant Physiology*, 2004, **136**(1): 2 734-2 746.

[17] 刘艳香,董宽虎. 转录因子 CBF 及其抗寒作用机制[J]. 草业

科学, 2009, **26**(5): 86-94.

LIU Y X, DONG K H. Transcription factor CBF and its cold tolerance mechanism[J]. *Pratacultural Science*(草业科学), 2009, **26**(5): 86-94.

[17] 唐益苗, 赵昌平, 高士庆, 等. 植物抗旱相关基因研究进展[J]. 麦类作物学报, 2009, **29**(1): 166-173.

TANG Y M, ZHAO CH P, GAO SH Q, *et al.* Advances in genes related to plant drought tolerance[J]. *Journal of Triticeae Crops*, 2009, **29**(1): 166-173 .

[18] 倪志勇, 徐兆师, 李连城, 等. DREB 转录因子在植物抗逆胁迫中的作用机理及应用研究进展[J]. 麦类作物学报, 2008, **28**(6): 1 100-1 106.

NI ZH Y, XU ZH S, LI L CH, *et al.* Mechanism and application prospect of DREB transcription factors in plant stress resistance[J]. *Journal of Triticeae Crops*, 2008, **28**(6): 1 100-1 106.

[19] JAKOBY M, WEISSHAAR B, DROGE-LASER W, *et al.* bZIP transcription factors in Arabidopsis[J]. *Trends Plant Sci.*, 2002, **7**(3): 106-111.

[20] EGAWA C, KOBAYASHI F, ISHIBASHI M, *et al.* Differential regulation of transcript accumulation and alternative splicing of a DREB2 homolog under abiotic stress conditions in common wheat [J]. *Genes Genet Syst.*, 2006, **81**(2): 77-91.

[21] KOBAYASHI F, MAETA E, TERASHIMA A, *et al.* Development of abiotic stress tolerance via bZIP-type transcription factor LIP19 in common wheat[J]. *J. Exp. Bot.*, 2008, **59**(4): 891-905.

[22] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method[J]. *Methods*, 2001, **25**(4): 402-408.

[23] GILMOUR S J, FOWLER S G, THOMASHOW M F. Arabidopsis transcriptional activators CBF1, CBF2, and CBF3 have matching functional activities[J]. *Plant Mol. Biol.*, 2004, **54**(5): 767-781.

[24] CHEN M, WANG Q Y, CHENG X G, *et al.* GmDREB2, a soybean DRE-binding transcription factor, confer-red drought and high-salt tolerance in transgenic plants[J]. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2007, **353**(2): 299-305.

[25] AGARWAL P, AGARWAL P K, NAIR S, *et al.* Stress-inducible DREB2A transcription factor from *Pennisetum glaucum* is a phosphoprotein and its phosphorylation negatively regulates its DNA-binding activity[J]. *Mol. Genet. Genomics*, 2007, **277**(2): 189-198.

[26] CHEN B, WANG Y, HU Y, *et al.* Cloning and characterization of a drought-inducible MYB gene from *Boea crassifolia*[J]. *Plant Science (Oxford)*, 2005, **168**(2): 493-500.

(编辑: 宋亚珍)