

小麦脱水素 *wzy1-2* 基因的遗传转化及干旱胁迫下不同生育期表达水平

田野,于正阳,史学英,齐玉红,张大鹏,张林生

(西北农林科技大学生命科学院,旱区作物逆境生物学国家重点实验室,陕西 杨凌 712100)

摘要:根据同源分析,在脱水素 *wzy1-2* 基因序列中选择 298bp 的 cDNA 序列作为干扰片段,将其插入高效植物干扰表达载体 pTCK303 的多克隆位点,成功构建含反向重复序列的 RNA 干扰表达载体。采用基因枪法轰击 2512 个郑引 1 号小麦的幼胚愈伤组织,获得再生植株 26 株,对其 T₀ 代再生植株进行特异引物 PCR 检测,获得 6 株阳性植株,阳性转化率为 0.24%。对脱水素 *wzy1-2* 基因实时定量分析发现,小麦中目的基因表达量显著下降。为进一步了解该基因在小麦整个生长过程中表达模式,选取 2 个不同抗旱性小麦品种(陕合 6 号和郑引 1 号),分别在小麦 4 个不同生长时期(苗期、分蘖期、拔节期和开花期)进行干旱胁迫处理,分析脱水素 *wzy1-2* 基因的表达规律。结果表明,随着干旱程度增加小麦 WZY1-2 蛋白的表达量升高;苗期小麦 WZY1-2 蛋白的表达量均高于其它 3 个生长时期。Western blot 分析显示陕合 6 号和郑引 1 号的非特异性条带单一,表明小麦脱水素 *wzy1-2* 是干旱诱导型基因。

关键词:脱水素;小麦;干旱胁迫;基因枪;干旱诱导型基因

中图分类号:S432.1 **文献标志码:**A

Genetic transformation of wheat with dehydrin *wzy1-2* gene and the expression level at different growth stages under drought stress

TIAN Ye, YU Zhengyang, SHI Xueying, QI Yuhong, ZHANG Dapeng, ZHANG Linsheng

(College of Life Sciences, State Key Laboratory of Crop Stress Biology in Arid Area,
Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Based on the principle of RNA interference and the homology analysis, a 298 bp cDNA sequence between 0~298 bp in the dehydrin *wzy1-2* gene was selected as the interference fragment, and then cloned interfering fragment was inserted into the efficient plant expression vector pTCK303, clone site, to successfully constructed RNA interference expression vectors containing inverted repeats. Using immature embryos of Zhengyin 1 wheat as explants, 2512 immature embryo calli was bombarded by particle bombardment, and 26 regenerated plants were obtained with a regeneration rate of 1.03%. Using the specific primers of the *Hpt* gene on the expression vector, 26 T₀ generation regenerated plants were subjected to PCR analysis. Six *Hpt* gene positive plants were detected, and the positive conversion rate of the *Hpt* gene was 0.24%. Through quantitative real-time analysis of the dehydrin *wzy1-2* gene, it was found that the expression of the target gene significantly decreased. To lay the foundation for further study of dehydrin *wzy1-2* gene function, two drought tolerant wheat varieties (Shaanhe 6 and Zhengyin 1), were treated with drought stress at four growth stages (seedling, tillering, jointing, and flowering), and expression of wheat WZY1-2 protein was studied. The expression level of WZY1-2 protein in wheat incread with increasing drought degree and at the seedling stage it was higher than that in the other three growth stages. Western blot results showed that the size of the non-specific bands of Shaanhe 6 and Zhengyin 1 were different. The wheat *wzy1-2* derived from the molecular level was a drought-inducible gene.

Keywords: dehydrin; wheat; water stress; particle bombardment; drought-inducible gene

干旱是限制农业生产的一个重要环境因素,我国干旱、半干旱地区面积约占全国土地面积的 50%,主要分布于西北地区。小麦是主要粮食作物之一,干旱造成 10%~20% 的作物减产。研究小麦的抗旱机理对粮食增产具有重要意义^[1]。目前人们在小麦抗逆研究领域做了大量工作,但由于小麦基因组非常庞大,对于逆境胁迫响应的分子生理机制仍然不清。揭示小麦耐逆境胁迫的分子机制和改良小麦抗逆性已经成为当前农业研究的主要目标之一^[2]。

研究表明,胚胎发育晚期丰富蛋白(LEA)是植物在非生物胁迫过程中防御逆境的重要功能蛋白之一,在减少环境胁迫对自身伤害中起到重要作用^[3]。脱水素是胚胎发育晚期丰富蛋白第二家族蛋白,通常以无规则卷曲形态存在,这种形态是高度水合状态,当细胞失水时,其构象会发生变化,从而行使多种功能^[4]。脱水素属于热稳定的水溶性蛋白,它受寒冷、高温、干旱以及盐胁迫等逆境诱导,对保护生物代谢可能起到分子伴侣的作用,对细胞膜结构的稳定性起保护作用,从而减轻干旱对植物造成的伤害。近年来研究逆境胁迫(低温、干旱和高盐等)下,部分脱水素的表达还受到脱落酸(ABA)的诱导作为功能蛋白大量表达^[5]。脱水素一般包含有 Y((V/T)D(E/Q)YGNP)、S(5~7 个 Ser 残基)和 K(EKKGIMDKIKEKLPG)3 个保守的氨基酸片段,而 K 片段是脱水素所共有的。按照脱水素 Y、S、K 保守区片段的组合及排列顺序,将其分为 5 个亚类:YnSKn、YnKn、SKn、KnS 和 Kn^[6]。

为研究 *wzy1-2* 基因的抗旱功能及建立完整的转基因体系,本试验通过基因枪介导法^[7],将 *wzy1-2* 干扰载体转入郑引 1 号小麦中,获得稳定遗传的转基因植株。通过研究干旱胁迫处理下小麦 WZY1-2 蛋白的表达量,分析该基因在小麦不同生育期的表达规律,探索脱水素 *wzy1-2* 基因在植物抗旱方面的功能,为筛选抗旱小麦品种提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试小麦品种郑引 1 号和陕合 6 号由西北农林科技大学生命科学院提供。

大肠杆菌 JM109、干扰表达载体 pTCK303 由西北农林科技大学生命科学院保存;pMD18-T 载体和 DNA Marker 均购自 Takara 公司;凝胶回收试剂盒及小量质粒提取试剂盒均购自天根生化技术(北

京)有限公司;RNA 提取试剂 Trizol 购自 Invitrogen 公司;序列测定由华大基因(深圳)科技有限公司完成。

1.2 构建载体及鉴定

取 10 μ g 使用 Trizol 试剂提取的叶片总 RNA 进行反转录^[8],并将扩增的 cDNA 片段克隆到 pMD18-T 载体。将连接产物转化至大肠杆菌 *E.coli*,筛选具有氨苄抗性的克隆,提取质粒 DNA,酶切鉴定重组质粒并测序。将 pMD18-T-正向片段和 pMD18-T-反向片段,分别通过 SacI/ SpeI 和 BamHI/ KpnI 限制性内切酶连接到 RNAi 表达载体 pTCK303 中,转化 Top10 感受态细胞。菌落 PCR 鉴定挑选阳性克隆,提质粒后分别用 SacI/ SpeI 和 BamHI/ KpnI 限制性内切酶对重组质粒进行酶切验证^[9]。

1.3 基因枪转化

1.3.1 供体材料 选用小麦品种为“郑引 1 号”,在西北农林科技大学小麦试验田种植,正常管理。收集生长 70~90 d 的小麦麦穗,从穗中剥出颖果,用 70%乙醇将小麦颖果灭菌。无菌环境显微镜下分离幼胚并且切除胚轴,将 10~20 个盾片放置在包含诱导培养基的培养皿,放在 22℃ 黑暗条件下预培养 1~2 d^[10]。

1.3.2 基因枪转化 参考苏君艺等^[11]的方法对小麦进行愈伤组织诱导和转化。转化后的愈伤组织转入恢复培养基培养 2~3 d,再于分化培养基中培养 28~35 d。将分化出的幼苗转入生根壮苗培养基中,在幼苗根长 2~3 cm 时转入 4℃ 培养箱春化 28 d,后移栽入花盆中培养。

1.4 转基因 T_0 代植株 PCR 鉴定及 qRT-PCR 鉴定

待幼苗长到三叶一心期,利用 CTAB 法提取小麦基因组 DNA。利用潮霉素抗性基因(491bp)设计引物并合成^[12]。PCR 鉴定体系和程序参考 2 $\times$ Taq-Master Mix(Takara)说明书进行,退火温度为 57℃,循环数为 35 cycle,扩增产物通过 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。将鉴定为阳性的植株移至 13 cm² 大小盒中培养。利用 *wzy1-2* 基因序列设计特异性定量引物并合成,利用 Trizol(Takara)提取小麦总 RNA 以小麦 β -Actin 基因为内参^[13],使用 CFX 96 Touch Real-time PCR Detection System(Bio-Rad),按照 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] 试剂盒(Takara)说明书进行 qRT-PCR。

1.5 干旱胁迫处理及 WZY1-2 蛋白的表达分析

1.5.1 小麦干旱胁迫处理 用直径 30 cm、高 20 cm 的塑料花盆种植小麦,土壤持水量约为 21.98%,每

盆装土 8 kg,将陕合 6 号和郑引 1 号小麦品种分别种植 30 盆,正常生长的盆栽试验小麦的土壤含水量保持在田间持水量的 70%~75%。培养地点为西北农林科技大学组织培养室内,用称重法控水。2 个不同品种的小麦生长到苗期、分蘖期、拔节期和开花期,用称重法控水进行干旱处理^[14]。试验设为 3 个处理,正常组土壤含水量为田间持水量($\theta_{\text{田}}$)的 75%,中度干旱胁迫含水量为 50% $\theta_{\text{田}}$,重度干旱胁迫含水量为 35% $\theta_{\text{田}}$,对各处理小麦叶片进行采样^[15],样品-80℃ 保存备用。分别在 4 个生长时期进行干旱处理,生长其余过程均进行正常灌溉,直至小麦成熟。

1.5.2 叶片可溶性蛋白提取及测定 参照植物蛋白提取试剂盒说明书提取可溶性叶片蛋白^[16],参照 Bradford 蛋白定量试剂盒的说明书测定小麦可溶性蛋白含量。将提取定量后的蛋白稀释一定比例后与蛋白上样缓冲液混匀,煮沸变性 10 min,进行 SDS-PAGE 电泳和 Western blot 检测。

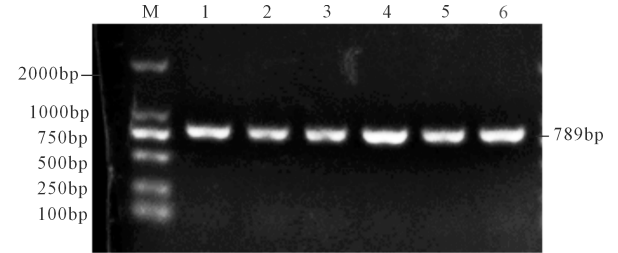
2 结果与分析

2.1 目的基因 *wzy1-2* 的获得

采用 Trizol 法提取的郑引 1 号小麦总 RNA 纯度较高,无明显降解,可满足反转录的要求。以反转录 cDNA 为模板,用两端含有合适酶切位点的引物进行 PCR 扩增后,回收扩增产物,将回收产物与克隆载体 pMD-18T 连接,转化。对阳性克隆进行检测后,得到大小为 789bp 的条带,与预期大小相符。测序结果表明目的基因克隆正确(图 1)。

2.2 质粒转化大肠杆菌

当质粒转化大肠杆菌后,进行菌落 PCR 检测和酶切鉴定,挑取单克隆培养后,进行菌落 PCR 检测(图 2)。对于阳性菌液进行了酶切检测,图 3 为酶切检测结果,证明挑取的单克隆是阳性菌株,质粒成功地转入到大肠杆菌中。



注:M;Marker;1~6 泳道:脱水素基因 *wzy1-2* 产物。
Note: M; Marker; 1~6 lane: Product of dehydrin gene *wzy1-2*.

图 1 脱水素基因 *wzy1-2* 序列扩增

Fig.1 Amplification of dehydration gene *wzy1-2* sequence

2.3 基因枪介导幼胚转化过程

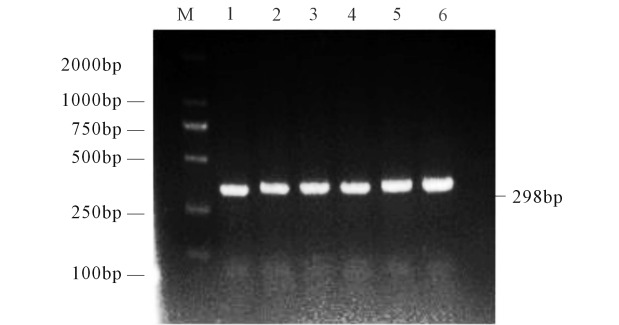
图 4 展示了转基因小麦幼胚的各个生长阶段。遗传转化的转化率比较低,最终仅得到 9 株再生植株(表 1)。

2.4 抗性植株的 PCR 检测结果

对来源于郑引 1 号的再生植株进行 PCR 检测,以初步确定其中的转基因阳性株系。对这 9 株植株进行了 *Hpt* 基因的 PCR 检测,图 5 是再生植株中标记基因 *Hpt* 的 PCR 检测结果,目标条带长度 504 bp。综上可以初步确定,共获得 6 株阳性植株。

2.5 T_0 代转基因小麦中 *wzy1-2* 基因表达量的检测

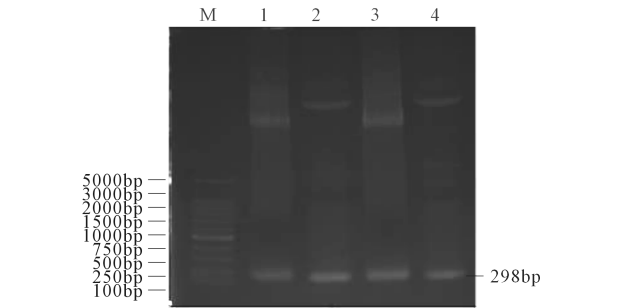
利用定量 PCR 对 T_0 代 RNAi 转基因小麦植株的 *wzy1-2* 基因表达量进行分析(图 6),与野生型郑引 1 号相比,检测的 6 株 T_0 代转基因小麦植株表达量均有不同程度下降,其中前 2 个株系的表达量下降达 40%~70%,株系 6 下降 80%左右,而株系 7~9 下降 70%~80%,选择株系 5~9 作为后续试验研究的材料。



注:M;Marker;1~3 泳道:正向片段阳性克隆;4~6 泳道:反向片段阳性克隆。
Note: M; Marker; 1~3 lane: Positive fragment positive clones; 4~6 lane: Reverse fragment positive clones.

图 2 重组质粒的菌落 PCR 验证

Fig.2 Colony PCR validation of recombinant plasmids



注:M;Marker;1,3 泳道:正向片段重组载体酶切鉴定检测结果;2,4 泳道:反向片段重组载体酶切鉴定检测结果。

Note: M; Marker; 1, 3 lane: Identification of the positive segment recombinant vector by enzyme digestion; 2, 4 lane: Reverse strand recombinant vector identification by enzyme digestion.

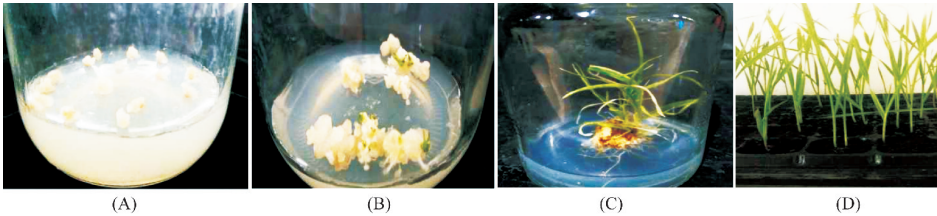
图 3 重组 pTCK303 载体酶切鉴定

Fig.3 Identification of recombinant pTCK303 vector digested

2.6 干旱胁迫下不同发育时期小麦脱水素 WZY1-2 表达量分析

通过对陕合 6 号和郑引 1 号小麦 4 个不同生长

时期进行不同程度的干旱胁迫处理,可溶性蛋白 SDS-PAGE 分析结果如图 7~图 10 所示,陕合 6 号和郑引 1 号 2 种小麦苗期分子量在 25kDa~70kDa 的蛋



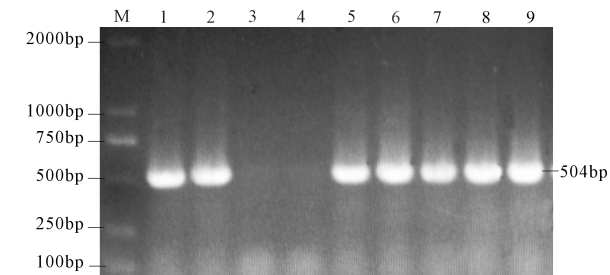
注:A:诱导培养基上的幼胚愈伤组织;B:分化筛选培养基上的愈伤组织;C:生根培养的再生苗;D:在营养土上生长的再生苗移栽成株。
Note: A. Callus of immature embryos on induction medium; B. Callus on differentiation screening medium; C. Regeneration seedlings grown in rooting; D. Transplantation of regenerated seedlings grown on nutrient soil strain.

图 4 转基因小麦的获得
Fig.4 Obtaining of transgenic wheat

表 1 基因枪转化小麦幼胚统计

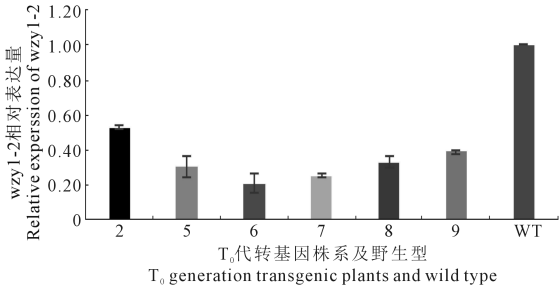
Table 1 Regenerated plants of transformed immature embryos of wheat

小麦品种 Wheat variety	幼胚接种数 Immature embryo inoculation	轰击幼胚数 Bombardment of immature embryos	筛选后的再生植株数 Number of regenerated plants	抗性苗获得率 Resistant seedling rate/%	移栽成活植株数 Number of transplanted plants	PCR 检测阳性植株数 PCR detection of positive plants	转化率/% Conversion rate
郑引 1 号 Zhengyin 1	2872	2512	26	1.03	9	6	0.24



注:M:Marker;1:重组载体;3:空白对照;4:野生型植株;2,5~9:为不同的 T₀代 RNAi 转基因植株。
Note: M: Marker; 1: Recombinant vector; 3: Blank control; 4: Wild type plants; 2, 5~9: Different T₀ generation RNAi transgenic plants.

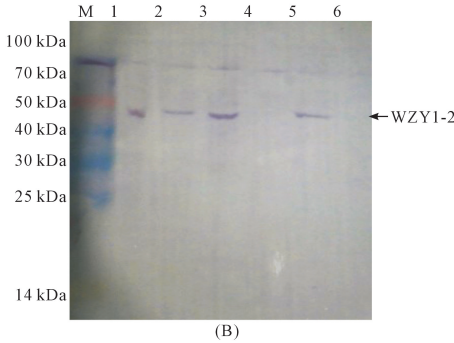
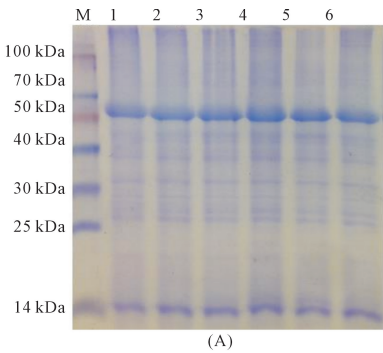
图 5 转基因小麦 T₀代植株 Hpt 基因 PCR 检测结果
Fig.5 PCR results of Hpt gene in T₀ generation transgenic wheat plants



注:2,5~9 为不同转基因株系。WT: 野生型小麦植株。
Note: 2,5~9 are different transgenic lines. WT: Wild-type wheat plants.

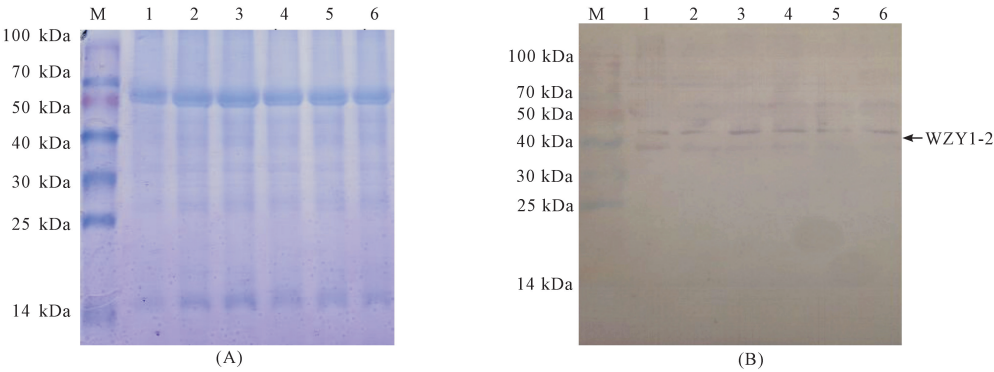
图 6 RT-PCR 检测 T₀代 RNAi 转基因植株中 wzy1-2 基因表达量

Fig.6 RT-PCR detection of wzy1-2 gene expression in T₀ generation RNAi transgenic plants



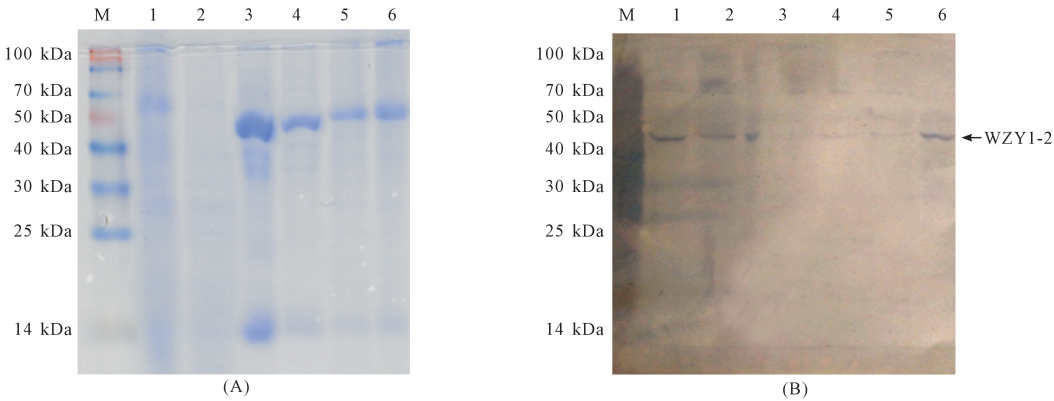
注:M:蛋白 marker;设置 CK 为正常组,75% $\theta_{田}$;50% $\theta_{田}$ 为中度干旱胁迫;35% $\theta_{田}$ 为重度干旱胁迫。下同。1:郑引 1 号,50% $\theta_{田}$;2:陕合 6 号,50% $\theta_{田}$;3:陕合 6 号,35% $\theta_{田}$;4:陕合 6 号,CK;5:郑引 1 号,35% $\theta_{田}$;6:郑引 1 号,CK。
Note: M: Protein marker; CK is normal, 75% $\theta_{田}$;50% $\theta_{田}$ is moderate drought stress; 35% $\theta_{田}$ is severe drought stress. The same below. 1: 50% $\theta_{田}$ of Zhengyin 1;2: 50% $\theta_{田}$ of Shaanhe 6; 3: 35% $\theta_{田}$ of Shaanhe 6; 4: CK of Shaanhe 6; 5: 35% $\theta_{田}$ of Zhengyin 1; 6: CK of Zhengyin 1.

图 7 2 种小麦苗期可溶性蛋白在不同程度干旱处理下 SDS-PAGE(A) 和 WZY1-2 蛋白 Western blot 分析(B)
Fig.7 SDS-PAGE (A) of soluble protein in seedling stage of two wheat varieties under different drought-stresses and Western blot analysis (B)



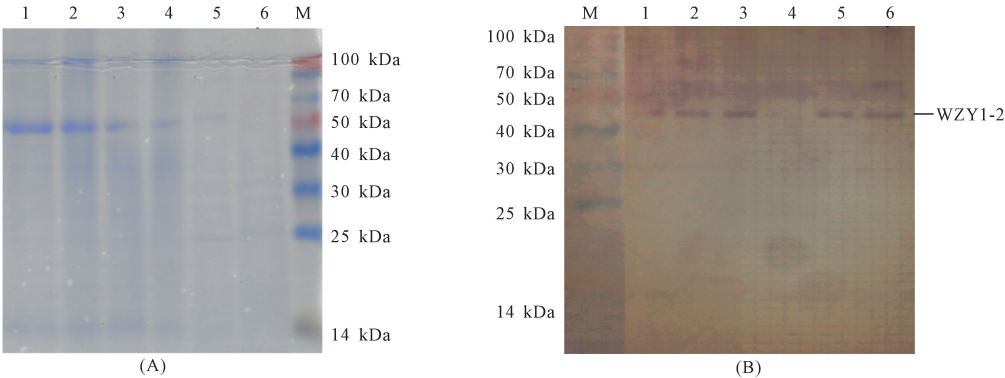
注:M:蛋白 marker。1:陕合 6 号,CK;2:郑引 1 号,CK;3:陕合 6 号,35% $\theta_{田}$;4:郑引 1 号,35% $\theta_{田}$;5:陕合 6 号,50% $\theta_{田}$;6:郑引 1 号,50% $\theta_{田}$ 。
Note: M: Protein marker. 1: CK of Shaanhe 6; 2: CK of Zhengyin 1; 3: 35% $\theta_{田}$ of Shaanhe 6; 4: 35% $\theta_{田}$ of Zhengyin 1; 5: 50% $\theta_{田}$ of Shaanhe 6; 6: 50% $\theta_{田}$ of Zhengyin 1.

图 8 2 种小麦分蘖期可溶性蛋白在不同程度干旱处理下 SDS-PAGE(A) 和 WZY1-2 蛋白 Western blot 分析 (B)
Fig.8 SDS-PAGE (A) of soluble protein in tillering stage of two wheat varieties under different drought stresses and Western blot analysis (B)



注:M:蛋白 marker。1:陕合 6 号,35% $\theta_{田}$;2:郑引 1 号,50% $\theta_{田}$;3:陕合 6 号,50% $\theta_{田}$;4:陕合 6 号,CK;5:郑引 1 号,CK;6:郑引 1 号,35% $\theta_{田}$ 。
Note: M: Protein marker. 1: 35% $\theta_{田}$ of Shaanhe 6; 2: 50% $\theta_{田}$ of Zhengyin 1; 3: 50% $\theta_{田}$ of Shaanhe 6; 4: CK of Shaanhe 6; 5: CK of Zhengyin 1; 6: 35% $\theta_{田}$ of Zhengyin 1.

图 9 2 种小麦拔节期可溶性蛋白在不同程度干旱处理下 SDS-PAGE(A) 和 WZY1-2 蛋白 Western blot 分析 (B)
Fig.9 SDS-PAGE (A) of soluble protein in jointing stage of two wheat varieties under different drought stresses and Western blot analysis (B)



注:M:蛋白 marker。1:陕合 6 号,CK;2:陕合 6 号,50% $\theta_{田}$;3: 陕合 6 号,35% $\theta_{田}$;4:郑引 1 号,CK;5:郑引 1 号,50% $\theta_{田}$;6:郑引 1 号,35% $\theta_{田}$ 。
Note: M: Protein marker. 1: CK of Shaanhe 6; 2: 50% $\theta_{田}$ of Shaanhe 6; 3: 35% $\theta_{田}$ of Shaanhe 6; 4: CK of Zhengyin 1; 5: 50% $\theta_{田}$ of Zhengyin 1; 6: 35% $\theta_{田}$ of Zhengyin 1.

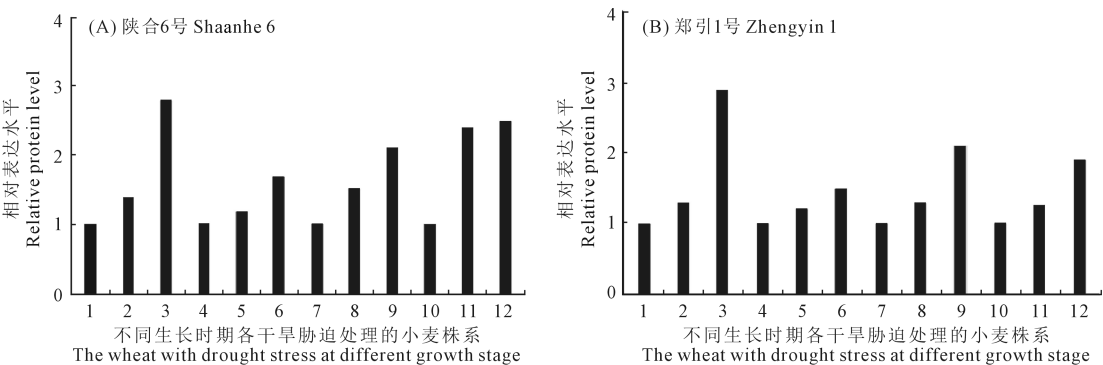
图 10 2 种小麦开花期可溶性蛋白在不同程度干旱处理下 SDS-PAGE(A) 和 WZY1-2 蛋白 Western blot 分析 (B)
Fig.10 SDS-PAGE (A) of soluble protein in flowering stage of two wheat varieties under different drought stresses and Western blot analysis (B)

白条带比较多,而且条带颜色比较深;分蘖期也是 25kDa~70kDa 的蛋白条带较多,但是颜色较苗期淡;拔节期的蛋白条带在 30kDa~70kDa 的蛋白条带较多,条带数较苗期和分蘖期少,集中在 40kDa~70kDa,颜色较分蘖期淡;开花期和拔节期 2 种小麦的蛋白条带相似,拔节期蛋白条带颜色较淡。随着干旱程度的增加,小麦蛋白条带数量减少。陕合 6 号和郑引 1 号小麦可溶性蛋白的 SDS-PAGE 分析结果相似。

为进一步研究小麦 WZY1-2 蛋白在不同生育期的抗旱性,通过 Western blot 分析,2 种小麦 4 个不同生长时期干旱处理均在 60kDa 有一条特异性蛋白条带,即小麦 WZY1-2 蛋白(图 7B,8B,9B,10B)。苗期陕合 6 号在干旱胁迫下杂交的非特异条带多,且条带颜色比较深,郑引 1 号的杂交的非特异条带很少,而小麦 WZY1-2 蛋白在 60 kDa 杂交的蛋白条带深度相当。分蘖期的陕合 6 号和郑引 1 号的杂交的非特异条带相当,且随着干旱胁迫的增加,非特异条带减少,而陕合 6 号小麦 WZY1-2 蛋白在 60kDa 杂交的蛋白条带颜色较郑引 1 号深。拔节期陕合 6 号和郑引 1 号的杂交的非特异条带很少,2 种小麦 WZY1-2 蛋白在 60kDa 杂交的蛋白条带颜色相当。开花期 2 种小麦的非特异性条带相当,并且较多,2 种小麦 WZY1-2 蛋白在 60kDa 杂交的蛋白条带颜色相当。苗期和拔节期、开花期 2 种小麦 WZY1-2 蛋白杂交的特异性条带深度相当,而分蘖期郑引 1 号 WZY1-2 蛋白杂交的特异性条带较陕合 6 号浅。小麦 WZY1-2 蛋白

在 2 种小麦的 4 个不同时期的表达结果趋势一致,随着干旱程度的增加,WZY1-2 蛋白的条带明显比正常生长组的条带颜色深,条带粗,特别是重度胁迫时 WZY1-2 蛋白的条带颜色最深。

通过 Quantity One V 4.6.2(Bio-Rad)软件对小麦陕合 6 号和郑引 1 号 Western blot 分析,如图 11 所示,分别将 4 个时期的正常生长组的蛋白表达量设为 1,苗期中度干旱胁迫和重度胁迫的陕合 6 号 WZY1-2 蛋白表达量分别是正常组生长的 1.3 倍和 2.9 倍,郑引 1 号 WZY1-2 蛋白表达量分别是正常组生长的 1.4 倍和 2.8 倍;分蘖期中度干旱胁迫和重度胁迫的陕合 WZY1-2 蛋白量表达量分别是正常组生长的 1.1 倍和 1.8 倍,郑引 1 号 WZY1-2 蛋白量表达量分别是正常组生长的 1.3 倍和 1.5 倍;拔节期中度干旱胁迫和重度胁迫的陕合 6 号 WZY1-2 蛋白表达量分别是正常组生长的 1.3 倍和 2 倍,郑引 1 号 WZY1-2 蛋白表达量分别是正常组生长的 1.5 倍和 2.1 倍;开花期中度干旱胁迫和重度胁迫的陕合 6 号 WZY1-2 蛋白量表达量分别是正常组生长的 1.3 倍和 1.9 倍,郑引 1 号 WZY1-2 蛋白量表达量分别是正常组生长的 2.4 倍和 2.5 倍。小麦 WZY1-2 蛋白在陕合 6 号和郑引 1 号小麦 4 个不同时期的表达趋势一致,随着干旱程度的增加,2 种小麦 WZY1-2 蛋白表达量增加,特别是重度干旱胁迫下小麦 WZY1-2 蛋白的表达量达到了峰值。



注:1.苗期正常组;2.苗期中度干旱胁迫;3.苗期重度干旱胁迫;4.分蘖期正常组;5.分蘖期中度干旱胁迫;6.分蘖期重度干旱胁迫;7.拔节期正常组;8.拔节期中度干旱胁迫;9.拔节期重度干旱胁迫;10.开花期正常组;11.开花期中度干旱胁迫;12.开花期重度干旱胁迫。

Note: 1: Normal seedling stage; 2: Moderate drought stress during seedling stage; 3: Severe drought stress during seedling stage; 4: Normal tillering stage; 5: Moderate drought stress during tillering stage; 6: Severe drought stress during tillering stage; 7: Normal jointing stage; 8: Moderate drought stress during jointing stage; 9: Severe drought stress during jointing stage; 10: Normal flowering stage; 11: Moderate drought stress during flowering stage; 12: Severe drought stress during flowering stage.

图 11 光密度测定免疫印迹条带强度

Fig.11 Densitometric Western blot band intensity

3 结 论

通过小麦 *WZY1-2* 蛋白的表达量随着干旱程度的增加而升高,苗期小麦 *WZY1-2* 蛋白的表达量均高于其它3个生长时期,表明小麦脱水素 *wzy1-2* 是干旱诱导型基因。

另外,本研究得到了脱水素 *WZY1-2* 在小麦苗期、分蘖期、拔节期和开花期干旱处理的表达规律。2个不同抗旱性小麦品种,陕合6号(干旱耐受型)和郑引1号(干旱敏感型)在4个生长时期随着干旱程度增加,*WZY1-2* 蛋白的表达量升高,其机理有待进一步研究。

4 讨 论

小麦遗传转化研究相比于其他植物而言起步虽晚,但发展较快。Vasil等^[17]利用基因枪介导法将 *bar* 基因导入小麦品种“Pavon”,获得了世界上第一例转基因小麦植株,为展开小麦分子育种奠定了基础^[17]。许多研究者利用不同方法将多种基因导入了小麦,获得了不同性状的转基因植株。Weeks等^[18]利用基因枪介导法分别将 β -葡萄糖苷酸标记基因(*GUS*)、*bar*基因导入了小麦,初步建立了基因枪法转化小麦的技术体系^[18]。随后基因枪法在单子叶植物方面的转化技术越来越成熟,很多学者通过基因枪法获得了不同抗性的转基因小麦^[19]。虽然农杆菌介导法具有操作简单、成本低廉等优点,但小麦并不是农杆菌的天然宿主,转化效率低,小麦外植体受到的伤害较大,进而对转基因的效率产生影响^[20]。

目前常用的农杆菌介导法和基因枪法分别占到小麦遗传转化的15.9%和68.8%^[21]。本试验通过基因枪法成功获得 *wzy1-2* 基因的遗传转化植株,但转化效率低的问题仍然存在,这与受体处理方式及时间、受体培养及筛选、外植体的基因型和转化条件等相关^[22],过低的转化率一直是限制基因枪法广泛应用的关键因素之一^[23]。

脱水素属于 *LEA2* 家族,是目前研究较为深入的一类 *LEA* 蛋白。其二级结构含有大量极性氨基酸,其中赖氨酸和甘氨酸含量最高;具有较强的亲水性和热稳定性,缺乏非极性疏水氨基酸(半胱氨酸、色氨酸)^[24]。在逆境胁迫下,部分脱水素的表达还受到脱落酸(*ABA*)诱导作为功能蛋白大量表达^[5]。本试验成功构建含反向重复序列的 *RNA* 干扰表达载体,通过基因枪转化获得再生植株26株,再生率为1.03%。利用表达载体上 *Hpt* 基因的特异

引物,检测到6株 *Hpt* 基因阳性植株,*Hpt* 基因阳性转化率为0.24%。收获6株转基因植株种子。此次研究得到的转基因植株较少,无法准确地进行表型鉴定。需要对后代进一步调查统计,研究脱水素在小麦中的作用,为进一步探索脱水素 *wzy1-2* 基因功能奠定基础。

参 考 文 献:

- [1] 樊磊,陈娟,张艳娥,等.水分胁迫下小麦 *TaWS18* 基因的电子克隆及生物信息学分析[J]. 干旱地区农业研究, 2016,34(4):69-76.
- [2] 朱维宁. 逆境胁迫下小麦脱水蛋白 *wzy1-2*、*wzy2* 基因及启动子的功能研究[D]: 咸阳:西北农林科技大学, 2014.
- [3] Zhang H M, Zhang L S, Liu L, et al. Changes of dehydrin profiles induced by drought in winter wheat at different developmental stages[J]. *Biologia Plantarum*, 2013,57(4):797-800.
- [4] Wang X, Zhang L, Zhang Y, et al. *Triticum aestivum* WRAB18 functions in plastids and confers abiotic stress tolerance when overexpressed in *Escherichia coli* and *Nicotiana benthamiana*[J]. *Plos One*, 2017,12(2):e0171340.
- [5] 豆玲.水分胁迫下小麦叶片类脱水素的表达与亚细胞定位的研究[D]:杨凌:西北农林科技大学,2011.
- [6] 张红梅. 小麦干旱胁迫响应与 *LEA* 蛋白的蛋白质组学研究[D]: 杨凌:西北农林科技大学,2014.
- [7] Satish K M, Guruprasad M, Sridevi V, et al. An efficient regeneration and genetic transformation of maize through *Agrobacterium* and particle bombardment in immature embryos[J]. *Indian Journal of Agricultural Research*, 2016. 50(OF).
- [8] Hill W, Jin X L, Zhang X H. Expression of an arctic chickweed dehydrin, *CarDHN*, enhances tolerance to abiotic stress in tobacco plants[J]. *Plant Growth Regulation*, 2016. 80(3):1-12.
- [9] Han Y, Blechl A, Wang D. The distribution of cotransformed transgenes in particle bombardment-mediated transformed wheat[J]. *Transgenic Research*, 2015,24(6):1055-1063.
- [10] 刘光快,曹珍珍,韦克苏,等.水稻白二硫键异构酶基因沉默载体构建及其转基因后代的高温结实特性分析[J]. 作物学报, 2013,39(5):816-826.
- [11] 苏君艺,陆璇璇,朱维宁,等.小麦 *WZY2* 基因 *RNA* 干扰表达载体的构建及遗传转化[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2012,40(11):66-72.
- [12] 陈红敏,陈明,魏安智,等. 抗逆相关基因 *GmAREB* 转基因小麦的获得与鉴定[J]. 植物遗传资源学报, 2010,11(6):749-754.
- [13] 张晓娟,张林生,杨颖. 水分胁迫下小麦类脱水素基因表达的半定量 RT-PCR 分析[J]. 西北植物学报, 2007,27(11):2158-2162.
- [14] Amara I, Odena A, Oliveira E, et al. Insights into maize *LEA* proteins: from proteomics to functional approaches[J]. *Plant & Cell Physiology*, 2012,53(2):312.
- [15] Amara I, Zaidi I, Masmoudi K, et al. Insights into Late Embryogenesis Abundant (*LEA*) proteins in plants: From structure to the functions[J]. *American Journal of Plant Sciences*, 2014, 5(22): 3440-3455.