

## 研究报告

### A Letter

## 冷诱导基因 *wcs19* 与小麦抗寒性关系研究

闫小燕<sup>1</sup>, 司红起<sup>1</sup>, 徐恩静<sup>1</sup>, 周志良<sup>1</sup>, 王永玖<sup>2</sup>, 马传喜<sup>1</sup>

1. 安徽农业大学农学院, 合肥, 230036

2. 安徽省怀远县龙亢农场, 怀远, 233428

✉ 通讯作者: [sihq2002@163.com](mailto:sihq2002@163.com); ✉ 作者

分子植物育种, 2011年, 第9卷, 第45篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0045

收稿日期: 2011年02月17日

接受日期: 2011年02月28日

发表日期: 2011年04月14日

这是一篇采用 Creative Commons Attribution License 进行授权的开放获取论文。只要对本原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

引用格式:

闫小燕等, 2011, 冷诱导基因 *wcs19* 与小麦抗寒性关系研究, 分子植物育种 Vol.9 No.45 (doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0045)

**摘要** 低温伤害不仅会限制农作物的栽种范围, 也会造成农作物减产。为了阐明冷诱导基因 *wcs19* DNA 序列与小麦幼苗抗寒性的关系, 对来自于全国各个麦区及部分外引种质共 233 份小麦资源进行了幼苗抗寒性鉴定及 *wcs19* 基因 STS 检测, 结果表明 233 份小麦品种间 *wcs19* 基因在 DNA 水平上没有差异, 其幼苗抗寒性可能与 *wcs19* 基因表达水平有关; 进一步的序列分析表明, *wcs19* 基因 DNA 序列含有一段 121bp~122 bp 的内含子, 且该内含子序列中包含一个 SNP, 即, 内含子序列 +9bp 处 G 碱基的插入和缺失, 此内含子及内含子中的 SNP 与幼苗抗寒性的关系还需进一步研究确定。

**关键词** 小麦; 冷诱导基因; *wcs19*; 抗寒性

## Research on the Relationship Between Cold Regulated Gene *wcs19* and Cold Resistance in Wheat

Yan Xiaoyan<sup>1</sup>, Si Hongqi<sup>1</sup>, Xu Enjing<sup>1</sup>, Zhou Zhiliang<sup>1</sup>, Wang Yongjiu<sup>2</sup>, Ma Chuanxi<sup>1</sup>

1. Anhui Agricultural University, hefei, 230036, P.R. Chin

2. Longkang Farm of Huaiyuan County, Huaiyuan, 23342, P.R. China

✉ Corresponding author, [sihq2002@163.com](mailto:sihq2002@163.com); ✉ Authors

**Abstract** Injury by low temperature not only restricts the plant range of crop, but also causes yield reduction. For clarify the relationship between cold induced gene *wcs19* DNA sequence and cold resistance of wheat seedlings, in this research, we selected 233 cultivars from the different wheat growing zones in China and some of introduced varieties to identify the seedlings cold resistance, and detect the *wcs19* gene at DNA level using the primers designed based on the *wcs19* gene mRNA sequence. The results indicated that *wcs19* gene without difference in DNA level among 233 wheat cultivars, cold resistance of seedlings may related to *wcs19* gene expression. Further sequence analysis demonstrated that the DNA sequence of *wcs19* gene has an 121-122bp intron, which contains an SNP, namely, at the +9bp has one insertion and deletion of G base in the intron sequence. Further study is to needed on the relationship between the SNP of intron and cold resistance of wheat seedlings.

**Keywords** Wheat (*Triticum aestivum* L.); Cold induced gene; *wcs19*; Cold resistance

### 研究背景

低温是限制小麦生长、发育以及分布的主要因素之一, 并有时会导致小麦的严重减产。因此增强小麦的抗寒性已经成为育种工作者的首要目标。小麦的抗寒基因是一种诱发基因, 在遭受冻害前, 如果经过一段时间的非冻低温胁迫后, 抗寒性增强, 这一现象称为冷驯化或冷锻炼(cold acclimation CA) (Hughes et al., 1996)。一般来说, 当冷冻发生时, 冬性品种相对于春性品种具有更好的保护机制来抵御低温, 这种遗传学差异为冬性小麦在低温状态下

的生长提供了竞争优势(Chauvin et al., 1993)。潘杰、简令成等在诱导合成冬小麦抗寒特异性蛋白的试验中证实植物的抗寒性是一种累积性的数量性状, 是由多基因控制的(潘杰和简令成, 1990), 也就是说, 植物的抗寒性是由多种特异的基因调控的。在小麦 21 对染色体中至少有 10 对参与抗寒性的调节, 且抗寒基因只有在一定条件(主要是低温和短日照)的诱导下, 才能表现为抗寒力。冷驯化过程涉及多种基因的表达, 如 COR (cold-regulated)基因、LTI78 (low temperature induced78)、LEA(late

embryogenesis abundant)蛋白基因等。COR 基因是冷诱导基因, 在它的启动子区域含有 5 个碱基核心序列 CCGAC 的脱水反应元素 DRE (Dehydration responsive element), DRE 作为顺式作用启动子元素能在低温胁迫时激活 COR 基因的表达(Novillo and Alonso, 2004)。植物冷驯化的机制一般认为有 2 种: 一种是依赖于 ABA (abscisic acid), 另一种是不依赖于 ABA 的。小麦中受 ABA 诱导的 COR 基因包括 *wrab15* (Kobayashi et al., 2004), *wrab17* (Tsuda et al., 2000; Kobayashi et al., 2008), *wrab18* (Kobayashi et al., 2004), *wrab19* (Tsuda et al., 2000; Egawa et al., 2006), 而不受 ABA 诱导的基因包括 *wcs19* (Fowler et al., 2001), *wcor14* (Tsvetanov et al., 2000), *wcor15* (Takumi et al., 2003)。

植物耐冻性的形成是低温下新陈代谢活跃和基因表达增强的结果(Guy, 1990), 在冷驯化时数个蛋白质以及对应的 mRNA 积累较多, 在某些情况下, 这些积累物与植物或组织发展为耐冻性的能力有关(Perras, 1989), 而另外一些基因在低温下表达量增多, 则由其他因子诱导, 比如 ABA, 水分胁迫等。在低温时积累的蛋白质首先被认为具有物种专一性, 但是后来的研究结果显示它们是家族特有的(Houde et al., 1992)。在低温下这些蛋白质的富集显示耐冻性的形成与其数量有密切关系。这些蛋白质在耐冻性中的确切功能还需进一步研究。由于耐冻性是由多基因控制的, 要研究某个独立的基因就必须理解冷诱导和耐冻性发生过程中全部的遗传起源和生理学基础。*wcs19* 基因在禾本科植物的绿色叶片组织中优先表达, 并且同时需要低温和光照, 另外, 此基因不受 ABA、干旱、热休克、盐分、创伤以及缺氧压力的影响(Chauvin et al., 1993)。本文根据 NCBI 公布的 *wcs19* 的 mRNA 序列设计引物, 采用体外扩增技术对小麦冷诱导基因 *wcs19* 进行克隆与序列分析, 并结合实验室抗寒性鉴定研究 *wcs19* 基因在小麦抗寒中所起的作用。

## 1 结果与分析

### 1.1 233 个品种抗寒性分析

从图 1 可知, 233 个品种的抗寒性分布广泛, 品种间差异极显著, 所有品种的抗寒性变幅为 0.0~1.0, 表现出较为明显的表型差异。

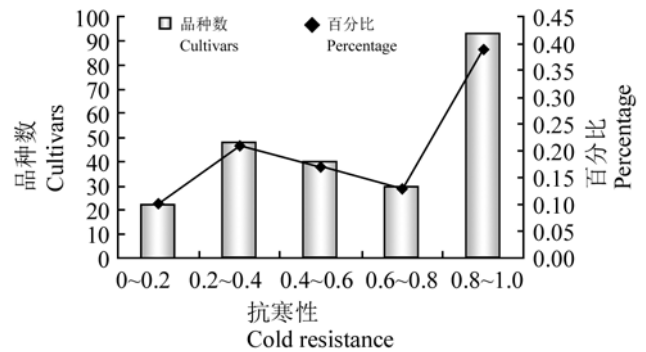


图 1 233 个品种的抗寒性分布

Figure 1 distribution of cold resistance in 233 cultivars

### 1.2 *wcs19* 基因 PCR 检测

经过引物筛选, 结果表明编号为 *wcs19a* 引物扩增特异性较好, 预计目标片段 422 bp, 但实际扩增出了 500 bp 的片段。采用该对引物对 233 份材料进行 *wcs19* 基因检测(图 2), 结果发现, 该对引物虽然特异性较好, 但在品种间没有多态性, 233 份材料均检测出 *wcs19* 基因。

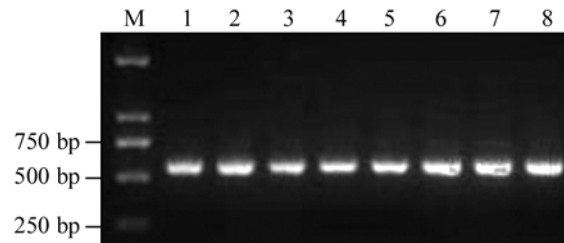


图 2 *wcs19a* 引物对部分材料的检测

注: 1: 津 0483; 2: 石 B02-5289; 3: 徐 4036; 4: B94142-3-2; 5: 郑农 20; 6: 04 中 36; 7: 02P157; 8: 邯郸 6172; M: D2000 ladder marker

Figure 2 Identification of *wcs19a* primer in partial materials

Note: 1: jin0483; 2: shiB02-5289; 3: xu4036; 4: B94142-3-2; 5: zhengnong20; 6: 04zhong36; 7: 02P157; 8: handan6172; M: D2000 ladder marker

### 1.3 *wcs19* 基因片段序列分析

为了寻找 *wcs19* 基因序列变异与幼苗抗寒性的关系, 从 233 个品种中随机挑选了 20 个抗寒性分别为强、中、弱的品种进行测序, 测序由上海英骏公司完成。应用 DNAMAN6.0 软件对测序结果与 NCBI 上面公布的 *wcs19* 序列相似性的分析结果表明, 20 条序列与 GenBank 登录号为 L13437 的 mRNA 序列相似性为 62.88%(图 3)。20 条序列都含

有一段 121 bp~122 bp 的内含子序列, 该内含子序列中包含一个 SNP: 内含子序列+9bp 处 G 碱基的插入和缺失(图 3 和图 4)。



图 3 20 个测序品种与已知冷诱导基因 *wcs19* 序列的相似性比较  
Figure 3 Comparison of *wcs19* sequence similarity among 20 sequenced species

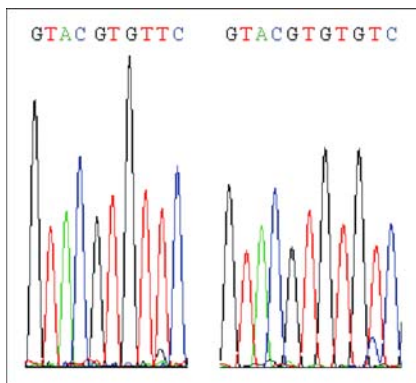


图 4 测序结果 chromas 分析图谱  
注: 左图: G 碱基的缺失; 右图: G 碱基的插入  
Figure 4 chromas analysis atlas of sequencing results  
Note: Left picture is G base deletion; Right picture is G base insertion

## 2 讨论

针对冷诱导基因 *wcs19* 设计的引物其扩增结果没有出现差异性条带, 而且序列特征分析结果与原序列基本一致, 可以推断冷诱导基因 *wcs19* 在小麦的抗寒性中所起的作用很小, 或者说不是主效基因。

分析这种结果产生的原因主要有两个: 一是目前从小麦中分离鉴定的冷诱导基因有 *wcs120*、*wcs200*、*wcs66*、*wcs19* 等, 主要受低温胁迫的影响(Guo et al., 1990), 本文只对 *wcs19* 作了初步研究, 再加上植物的抗寒性是由多基因控制的, 是多种基因共同起作用的结果, 其作用机制十分复杂, 所以 *wcs19* 基因在 DNA 水平上与植物抗寒性不能紧密关联也不足为奇。二是 Stockinger 等(1997)在研究

拟南芥在低温胁迫下如何调节 COR 基因表达的分子机制时, 采用酵母单杂交方法分离鉴定出一种 cDNA, 其编码产物能识别 COR 基因中的 CRT/DRE (C-repeat/dehydration-responsive element) 元件并与其特异结合, 故命名为 CRT/DRE 结合因子即 CBF1 (CRT/DRE-binding factor 1)。Thomashow(1998)后来发现 CBF1 的过量表达可以诱导一组 COR 基因表达, 从而提高植物的抗寒性。CBF 通过结合于下游 COR 基因的启动子区域来激活 COR 基因表达, 增加植物抗寒性。目前已经从多种植物中分离出不同类型 CBF 类似蛋白, 包括抗寒植物和不抗寒植物。从小麦中分离出来的 CBF 基因至少有 7 种 (Jaglo et al., 2001; Kume et al., 2005; Skinner et al., 2005), 这些 CBF 基因对小麦的抗寒性起着重要的作用。另有研究指出 ICE (Inducer of CBF expression) 是在低温时可以诱导 CBF 家族表达的转录激活因子, 在低温时它能结合在 CBF 的启动子序列上, 诱导 CBF 表达, 而后 CBF 结合到其下游目的基因启动子的 DRE 序列上, 诱导 COR 表达, 从而提高植株的抗寒性 (Thomashow et al., 2001)。所以, *wcs19* 基因在小麦抗寒过程中的作用可能与其表达水平有关, 也可能与其上游 CBF、ICE 基因有关。

植物抗冷冻能力是由一系列起直接或间接作用的基因控制的, 所以研究某一冷诱导基因启动子序列或者上游调控基因与植物抗寒能力的关系也许能揭示抗寒性形成的遗传物质基础, 因此对多个冷诱导基因综合分析以及研究 CBF 和 ICE 对小麦抗寒性的影响将成为下一步工作的目标。

### 3 材料与方法

全国各个麦区, 2008~2009 年种植于安徽怀远龙亢农场, 其中用来克隆 *wcs19* 基因片段并进行测序的品种见表 1。

#### 3.1 试验材料

试验所收集的 233 份小麦育种亲本材料来自于

表 1 *wcs19* 基因测序品种及其相关特性

Table 1 Sequencing varieties of *wcs19* gene and correlation properties

编号 Number	品种名称 Name of cultivars	冬春性 Spring and winter	抗寒性 Cold resistance	G 缺失 G deletion
1	安农 9267 Annong 9267	1	1.00	+
2	Erandu Erandu	5-	1.00	+
3	OLSB 573 OLSB 573	3+	1.00	+
4	白颖冬 Baiyingdong	3	0.98	+
5	02P157 02P157	5	0.09	
6	邯鄯 6172 Handan6172	1	0.60	+
7	DH 6197 DH 6197	1	0.57	
8	97-149-11-1 97-149-11-1	3+	0.57	+
9	石 B02-5289 Shi B02-5289	3-	0.55	
10	淮核 0308 Huaihe 0308	3	1.00	
11	04 中 36 04 zhong 36	3	1.00	+
12	济麦 19 Jimai 19	1	1.00	
13	济麦 20 Jimai 20	1	1.00	
14	FARO FARO	1	1.00	
15	TupatecoR TupatecoR	3	1.00	
16	津 0483 Jin 0483	5	0.56	
17	石 L5206-10 Shi L5206-10	3	0.00	
18	郑农 20 Zhengnong 20	3	0.00	
19	B94142-3-2 B94142-3-2	3-	0.55	
20	徐 4036 Xu 4036	3	0.55	

注: 冬春性为田间记录, +表示内含子序列+9 bp 处 G 碱基的缺失

Note: Spring and winter was field growth examination, + indicates at the +9 bp has deletion of G base

### 3.2 试验方法

#### 3.2.1 小麦抗寒性鉴定

采用麦芽冰冻恢复力鉴定法, 具体方法为: 随机挑选 50 粒小麦种子, 放在铺有湿润滤纸的培养皿内, 室内发芽。当麦芽长到 1 cm~2 cm 时, 将其移到 4℃ 冰箱锻炼 10 d, 然后放置到 -20℃ 冰冻 12 h, 取出后移到 4℃ 冰箱解冻一天, 最后在室温下恢复生长 3 d, 记录麦芽总数和存活麦芽数, 计算麦芽

冰冻恢复率(董玉琛等, 2000)。

麦芽冰冻恢复率=存活麦芽数/麦芽总数×100%  
根据麦芽冰冻恢复率, 比较小麦样品间的抗寒性。

#### 3.2.2 引物的设计与合成

基于 GenBank 登录号为 L13437 的 mRNA 序列, 运用 Primer premier 5.0 软件进行引物设计, 并用 Oliger 软件对引物进行分析, 共设计分析了 4 对引物, 详见表 2。

表 2 *wcs19* 基因的特异引物序列

Table 2 Specific primers sequence of *wcs19* genes

引物编号 Primer name	引物序列 Primer sequence	引物位置 Primer location	Tm	目标长度 Target length
Wcs19a	F: 5'-GACCAATGGCTTCTTCTTCC-3' R: 5'-GGCGACTTTGTCCGTGAT-3'	44 465	59.7℃	422 bp
Wcs19b	F: 5'-CTACCTACCCACCCATCC-3' R: 5'-ACATTAACAGTGCGGTAATCCT-3'	7 631	57.7℃	625 bp
Wcs19c	F: 5'-GACCAATGGCTTCTTCTTCC-3' R: 5'-TGAGCGATACAGATCGGACTA-3'	44 530	58.9℃	487 bp
Wcs19d	F: 5'-CACAACCTACCCTACCCACC-3' R: 5'-CTCCTCCGTCGCCTTCTT-3'	1 414	59.2℃	414 bp

以上引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成。

#### 3.2.3 基因组总 DNA 的提取

采用 SDS—Tris 饱和酚法提取小麦基因组总 DNA(Gale et al., 2001), 用 1.5% 琼脂糖电泳检测 DNA 质量。

#### 3.2.4 PCR 检测

PCR 扩增于 BIO-RAD My Cycler 1.0 上进行。反应体系为: 总体积 10 μL, 其中含有 0.25 mmol/L dNTP, 1×PCR Buffer, 2.5 mmol/L Mg<sup>2+</sup>, 上下游引物各 0.25 μmol/L, 0.5 U DNA *Taq* 聚合酶, 40 ng 模板 DNA。

PCR 反应条件为: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 1 min, 50℃~60℃ 退火 1 min; 72℃ 延伸 1 min, 共 38 个循环; 最后 72℃ 延伸 8 min, 4℃ 保存。PCR 扩增产物用 2.0% 琼脂糖凝胶, 以 120V 恒压电泳分离, EB 染色, 凝胶成像系统照相保存。

#### 3.2.5 序列测序与分析

测序由上海英骏公司(www.invitrogen.com)完

成, 应用 DNAMAN6.0 软件对测序获得的序列进行比对分析。

#### 作者贡献

闫小燕、周志良、徐恩静是本研究的实验设计和实验研究的执行人; 司红起、闫小燕完成数据分析, 论文初稿的写作; 周志良、徐恩静参与实验设计, 试验结果分析; 王永玖为本实验提供实验材料; 马传喜、司红起是项目的构思者及负责人, 指导实验设计, 数据分析, 论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

#### 致谢

本研究由现代农业产业技术体系专项经费和国家科技支撑计划(2009BADA6B01)共同资助, 本文中提到了我们实验中涉及的有关试剂供应商和测序服务商, 这并非我们为这些试剂供应商和测序服务商的产品和服务提供推荐或背书。

#### 参考文献

- Chauvin L.P., Houde M., and Sarhan F., 1993, A leaf-specific gene stimulated by light during wheat acclimation to low temperature, *Plant Molecular Biology*, 23: 255-265
- Dong Y.C., and Zheng D.S., 2000, Chinese wheat Genetic resources, Agricultural Press, Beijing, China, pp.240-242

- (董玉琛, 郑殿升, 编著, 2000, 中国小麦遗传资源, 中国农业出版社, 中国, 北京, pp.240-242)
- Egawa C., Kobayashi F., Ishibashi M., Nakamura T., Nakamura C., and Takumi S., 2006, Differential regulation of transcript accumulation and alternative splicing of a DREB2 homolog under abiotic stress conditions in common wheat, *Genes & Genetic Systems*, 81: 77-91
- Fowler D.B., Breton G., Limin A.E., Mahfoozi S., and Sarhan F., 2001, Photoperiod and temperature interactions regulate low-temperature-induced gene expression in barley, *Plant Physiology*, 127: 1676-1681
- Guo W., Ward R.W., and Thomashow M.F., 1990, Characterization of a Cold-Regulated Wheat Gene Related to *Arabidopsis cor47*, *Plant Physiol*, 100: 915-922
- Houde M., Dhindsa R.S., and Sarhan F., 1992, A molecular marker to select for freezing tolerance in gramineae, *Mol Gen Genet*, 234: 43-48
- Hughes M., and Dunn M., 1996, The molecular biology of plant acclimation to low temperature, *J.Exp.Bot*, 47: 291-305
- Jaglo K.R., Kle V.S., Amundsen K.L., Zhang X., Haake V., Zhang J.Z., Deits T., and Thomashow M.F., 2001, Components of the *Arabidopsis* C-repeat/dehydration-responsive element binding factor cold-response pathway are conserved in *Brassica napus* and other plant species, *Plant Physiol*, 127: 910-917
- Kobayashi F., Takumi S., and Nakamura C., 2008, Increased freezing tolerance in an ABA-hypersensitive mutant of common wheat, *Journal of Plant Physiology*, 165: 224-232
- Kobayashi F., Takumi S., Nakata M., Ohno R., Nakamura T., and Nakamura C., 2004, Comparative study of the expression profiles of the *Cor/Lea* gene family in two wheat cultivars with contrasting levels of freezing tolerance, *Physiologia Plantarum*, 120: 585-594
- Kume S., Kobayashi F., Ishibashi M., Ohno R., Nakamura C., and Takumi S., 2005, Differential and coordinated expression of *Cbf* and *Cor/Lea* genes during long-term cold acclimation in two wheat cultivars showing distinct levels of freezing tolerance, *Genes Genet Syst*, 80: 185-197
- Novillo F., and Alonso J.M., 2004, Cold acclimation of *Arabidopsis thaliana*: Affect on plasma membrane lipid composition and defreeze-induced lesions, *Plant Biology*, 11: 3985-3990
- Pan J., and Jian L.C., 1990, Advances of the Studies on Biomembranes and Proteins in Plant Freezing Injury and Cold Hardness, *Zhiwuxue Tongbao*(Chinese Bulletin of Botany), 7(1): 1-5 (潘杰, 简令成, 1990, 植物寒害和抗寒机制中膜与蛋白质研究的进展, *植物学通报*, 7(1): 1-5)
- Perras M., and Sarhan F., 1989, Synthesis of freezing tolerance proteins in leaves, crown and roots during cold acclimation of wheat, *Plant Physiol*, 89: 577-585
- Skinner J.S., Von Zitzewitz J., Szucs P., Marquez-Cedillo L., Filichkin T., Amundsen K., Stockinger E.J., Thomashow M.F., Chen T.H., and Hayes P.M., 2005, Structural, functional, and phylogenetic characterization of a large CBF gene family in barley, *Plant Mol Biol*, 59: 533-551
- Stockinger E.J., Gilmour S.J., and Thomashow M.F., 1997, *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit, *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 1035-1040
- Takumi S., Koike A., Nakata M., Kume S., Ohno R., and Nakamura C., 2003, Cold-specific and light-stimulated expression of a wheat (*Triticum aestivum* L.) *Cor* gene *Wcor15* encoding a chloroplast-targeted protein, *Journal of Experimental Botany*, 54: 2265-2274
- Thomashow M.F., 1998, Role of cold-responsive genes in plant freezing tolerance, *Plant Physiol*, 118: 1-7
- Thomashow M.F., Gilmour S.J., and Stockinger E.J., 2001, Modification of fatty acid composition in rice plants by transformation with a tobacco microsomal 23 fatty acid desaturase gene, *Physic Plant*, 112: 171-175
- Tsuda K., Tsvetanov S., Takumi S., Mori N., Atanassov A., and Nakamura C., 2000, New members of a cold-responsive group-3 *Lea/Rab*-related *Cor* gene family from common wheat (*Triticum aestivum* L.), *Genes & Genetic Systems*, 75: 179-188
- Tsvetanov S., Ohno R., and Tsuda K., 2000, A cold-responsive wheat (*Triticum aestivum* L.) gene *wcor14* identified in a winter-hardy cultivar Mironovska, 808, *Genes & Genetic Systems*, 75: 49-57