

核桃脱水素 *JrDHN* 基因对干旱胁迫的响应

张宇航^{1,2}, 章漫漫^{1,2}, 马宇航², 王克涛², 胡恒康², 黄坚钦², 张启香^{1,2}

(1. 浙江农林大学 浙江省森林芳香植物康养功能研究重点实验室, 浙江 杭州 311300; 2. 浙江农林大学 省部共建亚热带森林培育国家重点实验室, 浙江 杭州 311300)

摘要: 【目的】探究奇异核桃 *Juglans hindsii* × *J. regia* *JrDHN* 过表达株系在干旱过程中体内的生理与分子响应及其分子机制, 为培育核桃 *J. regia* 抗旱品种提供理论依据。【方法】对生长健壮的过表达 *JrDHN* 核桃苗 (*JrDHN*1、2、3) 进行不同时间的聚乙二醇 (PEG) 模拟干旱胁迫处理, 野生型奇异核桃苗 (WT) 为对照。从核桃苗的表型、抗氧化酶活性、活性氧含量等多方面观察过表达 *JrDHN* 株系对干旱胁迫的响应。通过荧光定量 PCR (qPCR) 对体内的抗旱相关基因 *MYB*、*ADH*、*CAM* 做了表达量分析。【结果】阳性植株经 qPCR 验证, 证实 *JrDHN* 基因在核桃苗中过表达, 在 *JrDHN*1、2、3 中的表达量分别为 WT 的 2.55、1.72、1.49 倍; 干旱处理 0–28 d 下过表达株系的表型均优于 WT, 干旱处理 14 d 时, *JrDHN* 过表达株系的气孔开度比均显著低于 WT; 抗氧化酶 (SOD、POD、CAT) 活性均呈先升高后降低的趋势, 且在 14 d 时达到最大值, 其中 *JrDHN*1 的过氧化酶活性均高于 WT, SOD 及 POD 差异极显著 ($P < 0.01$), CAT 活性差异显著 ($P < 0.05$); 干旱处理 28 d 时叶绿素质量分数达到最小值, 此时 *JrDHN* 过表达株系叶绿素极显著高于 WT ($P < 0.01$); 丙二醛 (MDA)、过氧化氢 (H_2O_2) 和超氧阴离子自由基 ($O_2^{\cdot-}$) 含量随着干旱时间的延长呈逐渐上升趋势, 在 28 d 时达到最大值, *JrDHN*1 的 MDA、 H_2O_2 和 $O_2^{\cdot-}$ 含量均极显著低于 WT; 抗旱相关基因 *MYB*、*ADH*、*CAM* 的表达量均呈先上升后下降的趋势, 14 d 时, *MYB*、*ADH*、*CA* 基因表达量均显著高于 WT ($P < 0.05$)。【结论】*JrDHN* 过表达转基因核桃苗在 PEG 模拟干旱胁迫下的表型、光合能力和抗氧化能力均强于 WT, *JrDHN* 在模拟干旱胁迫下可以有效提升抗氧化酶系统活力, 清除活性氧, 减少细胞受到的损伤, 从而提高植株的抗旱性。图 8 表 1 参 34

关键词: 核桃; 干旱; *JrDHN*; 过表达; 功能分析

中图分类号: Q943.2 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2024)06-1150-10

Response of dehydrin *JrDHN* gene in walnut to drought stress

ZHANG Yuhang^{1,2}, ZHANG Manman^{1,2}, MA Yuhang², WANG Ketao²,

HU Hengkang², HUANG Jianqin², ZHANG Qixiang^{1,2}

(1. Zhejiang Provincial Key Laboratory of Forest Aromatic Plants-based Healthcare Functions, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China; 2. State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China)

Abstract: [Objective] This purpose was to investigate the physiological and molecular responses, as well as the molecular mechanisms, of *Juglans hindsii* × *J. regia* overexpressing line *JrDHN* during drought stress, to provide theoretical basis for breeding drought-resistant *J. regia* (walnut) cultivars. [Method] Healthy overexpressing walnut *JrDHN* were subjected to drought stress at different time points. The response of the overexpressing *JrDHN* line to drought stress was observed from various aspects including phenotype,

收稿日期: 2024-04-08; 修回日期: 2024-06-11

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2023YFD2200305); 国家自然科学基金重点项目 (32330069); 国家级高等学校大学生创新创业训练计划项目 (202310341073)

作者简介: 张宇航 (ORCID: 0009-0004-4943-2020), 从事果树分子生物学研究。E-mail: 2013583634@qq.com。通信作者: 张启香 (ORCID: 0000-0002-6657-5101), 教授, 博士生导师, 从事植物发育分子生物学研究。E-mail: qxzhang@zafu.edu.cn

antioxidant enzyme activity, and reactive oxygen species content. Quantitative PCR was conducted to analyze the expression levels of drought-related genes *MYB*, *ADH*, and *CAM* in plant tissues, exploring the molecular mechanism by which overexpression of *JrDHN* gene affects plant drought resistance. [Result] The results confirmed the overexpression of *JrDHN* gene in walnut seedlings, with expression levels in *JrDHN*1, 2, 3 being 2.55, 1.72, and 1.49 times higher than the WT respectively. Phenotypic traits of the overexpressing *JrDHN* line were superior to WT after 1–4 weeks of drought treatment, with significantly lower stomatal aperture in the overexpressing *JrDHN* line compared to WT after 2 weeks of drought treatment. The activities of antioxidant enzymes (SOD, POD, CAT) showed an initial increase followed by a decrease trend, reaching maximum values at 2 weeks, with SOD and POD activities in *JrDHN*1 significantly higher than WT ($P < 0.01$), and CAT activity showing significant difference ($P < 0.05$). Chlorophyll content reached its minimum after 4 weeks of drought treatment, with significantly higher levels in the overexpressing *JrDHN* line compared to WT. Levels of MDA, H_2O_2 , and $O_2^{\cdot-}$ increased gradually with prolonged drought stress, reaching maximum values at 4 weeks, with significantly lower levels in *JrDHN*1 compared to WT. Expression levels of drought-related genes *MYB*, *ADH*, *CAM* showed an initial increase followed by a decrease trend, with significantly higher levels in the overexpressing *JrDHN* line compared to WT after 2 weeks. [Conclusion] The overexpressing *JrDHN* transgenic walnut seedlings exhibited superior phenotype, photosynthetic capacity, and antioxidant capacity under PEG-simulated drought stress compared to WT. Overexpression of *JrDHN* gene in walnut seedlings effectively enhanced the activity of antioxidant enzyme system, scavenged reactive oxygen species, reduced cell damage, thereby improving plant drought resistance. [Ch, 8 fig. 1 tab. 34 ref.]

Key words: walnut; drought; *JrDHN*; overexpression; functional analysis

核桃 *Juglans regia* 是胡桃科 Juglandaceae 核桃属 *Juglans* 核桃组植物^[1]。中国种植核桃的历史可追溯到 3 000 a 前, 且核桃分布广泛^[2], 品种繁多, 产量高。中国为核桃六大主产国之一^[3]。有关研究显示, 在城区内大面积种植核桃, 并搭配其他园林植物, 可有效减轻颗粒物污染浓度。核桃具有极高的生态价值^[4]。核桃木材外观优美、质地坚硬、材性优良, 可做家具、木地板等; 核桃青皮中的萜醌类物质可作染料, 黄酮类物质可作抗氧化药品^[5]。核桃果实富含蛋白质、磷脂以及维生素 B1 等能增强细胞活力、提高脑神经功能的物质, 具有极高的药用价值, 被称为“21 世纪的超级食品”^[6–7]。

恶劣的生长环境会导致核桃停止发育甚至死亡, 如重度干旱环境等^[8]。中国干旱、半干旱区面积约占国土面积的 1/3 以上, 干旱地区降水稀少, 水资源匮乏, 无法满足核桃生长需求^[9–10]。目前研究发现, 抗旱关键酶基因包括 α 糖类、脯氨酸合成酶、甜菜碱, 抗旱相关联蛋白包括 LEA (late embryogenesis abundant) 家族蛋白、蛋白激酶 SnRK2 等, 其中 LEA 第二家族成员脱水素蛋白 (dehydrin, DHN) 最早于受水分胁迫的水稻 *Oryza sativa* 中被发现, 后来被证实广泛存在于植物细胞中^[11]。许多研究都表明: 非生物逆境胁迫下, 植物中 DHN 基因的表达和积累与植物适应逆境的能力相关。如刘慧春等^[12]将牡丹 *Paeonia suffruticosa* PsDHN1 基因转入拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 中, 发现转基因拟南芥耐涝抗旱水平明显优于野生型。史学英等^[13]从小麦 *Triticum aestivum* 中获得的 DHN14 基因转入大肠埃希菌 *Escherichia coli*, 发现可以提高在低温、干旱、金属离子等非生物胁迫下大肠埃希菌的存活率。LIU 等^[14]将玉米 *Zea mays* 中提取的 ZmDHN13 转入烟草 *Nicotiana tabacum*, 发现可显著提升转基因烟草对氧化损伤的耐受性。DHN 可以结合金属离子, 从根本上减少活性氧 (ROS) 的产生; DHN 还可以结合 DNA, 保护其不受外界环境压力带来的损害; DHN 非特异性地与生物膜结合, 从而维持生物膜结构的稳定性等^[15]。

在全球干旱的大背景下, 水资源短缺仍会是未来中国甚至全球面临的主要问题, 因此, 研究植物的抗旱机制及挖掘抗旱基因都具有重要意义^[16]。本研究分析了核桃脱水素 *JrDHN* 基因对于干旱逆境胁迫的响应机制, 为该基因进一步应用于核桃抗旱分子标记辅助育种提供参考依据, 为利用基因工程手段培育抗旱核桃新品种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

野生型核桃 (WT) 来自浙江农业大学省部共建亚热带森林培育国家重点实验室的奇异核桃 *J. hindsii* × *J. regia* 苗。前期已获得奇异核桃 *JrDHN* 过表达体胚, 并萌发获得 *JrDHN* 过表达株系幼苗, 后经扩繁并分为 *JrDHN1*、*JrDHN2*、*JrDHN3* 等 3 个株系, 获得每株系 50 株生长健壮, 长势一致的组培苗后, 进行后续阳性鉴定及干旱胁迫试验 (图 1)。核桃苗于培养室中培养, 培养室温度为 (25±2) °C, 湿度为 80%~85%, 光照强度为 15 000~20 001 lx, 光照周期黑暗 8 h/光照 16 h。

1.2 方法

1.2.1 核桃 *JrDHN* 过表达植株相对表达量的分析

选用北京天根生化科技有限公司的多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒提取核桃体胚的 RNA, 基因克隆及后续的验证过程采用 TaKaRa 公司的 cDNA 反转录试剂盒。以反转录 cDNA 为模板进行荧光定量 PCR (qPCR) 表达分析, 采用 NCBI 网站在线设计引物, 引物见表 1。qPCR 反应体系为: TB Green 0.5 μL, F/R primer 0.2 μL, cDNA 0.4 μL, ddH₂O 4.2 μL。反应程序为: 95 °C 10 min, 95 °C 10 s, 60 °C 31 s, 40 个循环; 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 95 °C 30 s, 60 °C 15 s。

1.2.2 阳性再生植株的荧光检测 在体式荧光显微镜下观察再生 *JrDHN* 过表达植株茎和茎横切中绿色荧光标记蛋白 (GFP) 荧光激发情况, 散发绿色荧光的植株为阳性植株。

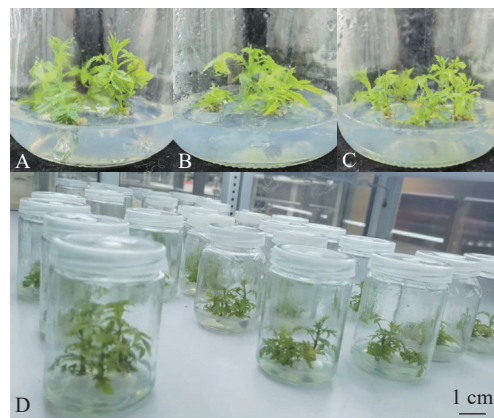
1.2.3 模拟干旱胁迫下核桃 *JrDHN* 过表达株系表型测定 配置质量分数为 5% PEG 8000 的 DKW 固体培养基, 模拟干旱胁迫处理, 分别设置模拟干旱胁迫时间分别为 7、14、21、28 d 的处理组, 以培养于 DKW 正常培养基 (001) 中的核桃体苗为对照组, 每组设置 3 个生物学重复。

1.2.4 模拟干旱胁迫下再生植株叶片气孔开度及叶绿体分析 在模拟干旱环境中处理 0 和 14 d 后, 分别剪取同一部位 WT 和 *JrDHN* 过表达植株的叶片, 在叶片下表面涂抹 1 层指甲油, 风干后撕下盖上盖玻片在生物显微镜下观察并拍照。取 0 d 叶片加石英砂研磨, 在显微镜下观察并记录叶绿体形态。

1.2.5 模拟干旱胁迫下核桃 *JrDHN* 过表达植株的组织化学染色分析 分别剪取干旱胁迫处理 7、14、21、28 d 的 *JrDHN* 过表达株系和 WT 叶片, 于大试管中加入 20 mL 配置好的 DAB (1.0 g·L⁻¹)、NBT (0.5 g·L⁻¹) 染液。室温下避光染色 1~3 h, 加入 30 mL 体积分数为 95% 的乙醇, 将大试管置于 100 °C 沸水中水浴加热 15 min, 将叶绿素完全洗脱干净, 之后固定拍照。

1.2.6 核桃 *JrDHN* 过表达株系的生理指标测定 分别取 WT 及 *JrDHN1* 干旱胁迫 7、14、21、28 d 的叶片 0.1 g, 加入 10 mL 体积分数为 95% 的乙醇溶液。黑暗条件下浸提 48 h。以体积分数为 95% 乙醇为空白对照, 测定波长 663 和 646 nm 处的吸光度, 按叶绿素总质量分数=[20.2D(645)+8.2D(663)]×[V/(1 000W)] 公式计算, 其中 V 表示叶绿素提取液总体积, W 表示所用叶片鲜质量。超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化酶 (POD)、过氧化氢酶 (CAT) 活性及超氧阴离子自由基 (O₂⁻)、过氧化氢 (H₂O₂)、丙二醛 (MDA) 均使用苏州科铭生物技术有限公司试剂盒进行测定。具体方法见使用说明书。

1.2.7 核桃 *JrDHN* 过表达株系的抗逆基因表达量测定 Ca²⁺ 与 CaM 形成的复合物可以与线粒体膜上的 NADKc 结合, 驱动 RBOH 蛋白产生细胞外 ROS^[17], 从而促进胞外 ROS 向胞内转移^[18]。通过这种方式, 可以改变细胞质中信号成分的氧化还原状态, 从而调节多种蛋白质和转录因子^[19], 后续可以调节一系列抗旱相关基因的表达, 如 *ADH*、*SOD*、*POD* 基因等^[20]。因此, 对 WT 及 *JrDHN1* 在干旱胁迫 28 d 下核



A. *JrDHN1* 株系; B. *JrDHN2* 株系; C. *JrDHN3* 株系;
D. 长势一致的 *JrDHN1*、2、3 过表达株系组培苗。

图 1 核桃 *JrDHN* 过表达株系培养图

Figure 1 Culture diagram of *JrDHN* overexpressed in walnut

表 1 qPCR 引物

引物	序列(5'→3')
Actin-F	ATGATGTCAAGGTTAAGGACTC
Actin-R	CACAATGATCTCAGCTCCG
Q <i>JrDHN</i> -F	ATTCAGCTCACCGACGAACA
Q <i>JrDHN</i> -R	CTCCTCATGCTGCTGCTTCT

桃基因组中的 ABA 信号转导通路途径中的关键节点基因 *MYB*、*ADH*、*CAM* 表达量进行 qPCR 检测。测定方法同上。

2 结果与分析

2.1 核桃 *JrDHN* 基因过表达株系阳性鉴定

从图 2A 可以看出：在白光视野下，WT 和 *JrDHN*1、2、3 过表达株系的形态相似；在蓝色激发光 (488 nm) 下，WT 的茎及横切面无荧光激发，*JrDHN*1、2、3 过表达株系在蓝色激发光下呈现绿色荧光。以上表明 *JrDHN*1、2、3 过表达株系体内均表达了 GFP 荧光蛋白，为阳性植株。

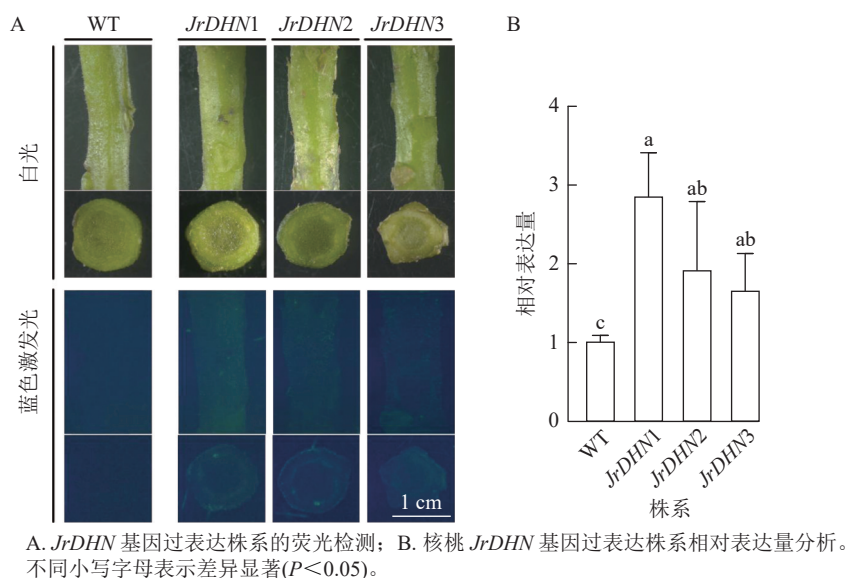


图 2 核桃 *JrDHN* 基因过表达株系阳性鉴定
Figure 2 Positive identification of walnut *JrDHN* gene overexpression strain

实时荧光定量 PCR 结果 (图 2B) 显示：核桃 *JrDHN* 过表达再生株系 *JrDHN* 基因相对表达量均显著高于野生型 ($P < 0.05$)，*JrDHN*1 株系的相对表达量为野生型的 2.55 倍，*JrDHN*2 株系的相对表达量为野生型的 1.72 倍，*JrDHN*3 株系的相对表达量为野生型的 1.49 倍，差异均显著。*JrDHN*1、2、3 之间基因表达量差异不显著，但 *JrDHN*1 株系过表达量最高。

2.2 核桃 *JrDHN* 基因过表达对试管苗表型的影响

2.2.1 核桃 *JrDHN* 基因过表达对试管苗形态的影响 由图 3 可见：WT 和 3 个 *JrDHN* 过表达株系在 001 培养条件下均能正常生长，28 d 时其表型无明显差异。在 PEG 处理下，随着胁迫时间延长，WT 和过表达株系叶片逐渐黄化脱落。干旱胁迫处理 14 d 时，WT 叶片大部分已经脱落，而 *JrDHN* 过表达株系叶片脱落较少，初步说明 *JrDHN* 过表达株系的抗旱能力强于 WT。

2.2.2 核桃 *JrDHN* 基因过表达对气孔形态的影响 如图 4 所示：在 0 d 时，WT 及 *JrDHN*1、2、3 的气孔开度 (宽长比) 分别为 0.57、0.46、0.45、0.51。3 种 *JrDHN* 过表达株系的气孔开度与 WT 差异不显著。而在 PEG 胁迫 14 d 时，WT 和 *JrDHN* 过表达株系气孔开度均缩小，其中 WT 气孔开度为 0.46，*JrDHN*1、2、3 气孔开度分别为 0.15、0.23、0.26，*JrDHN* 过表达株系的气孔开度显著低于 WT ($P < 0.05$)，其中，*JrDHN*1 的气孔开度显著低于 *JrDHN*3 ($P < 0.05$)。说明过表达 *JrDHN* 基因可降低植株在干旱胁迫下的气孔开度，从而提高核桃对干旱的耐受能力。

2.3 核桃 *JrDHN* 基因过表达对叶绿体及叶绿素质量分数的影响

在显微镜下观察发现：3 个核桃 *JrDHN* 过表达株系叶肉细胞中的叶绿体更致密 (图 5A)。*JrDHN* 过表达株系中叶绿体表面积与单层细胞表面积的比率显著高于 WT ($P < 0.05$)，WT 叶绿体表面积与单层细胞表面积的平均比率为 0.65，3 个 *JrDHN* 过表达株系叶绿体表面积与单层细胞表面积的比率分别为 0.77、0.76、0.78，与 WT 相比分别增加了 18.5%、17%、20% (图 5B)。进一步分析发现，在胁迫 0

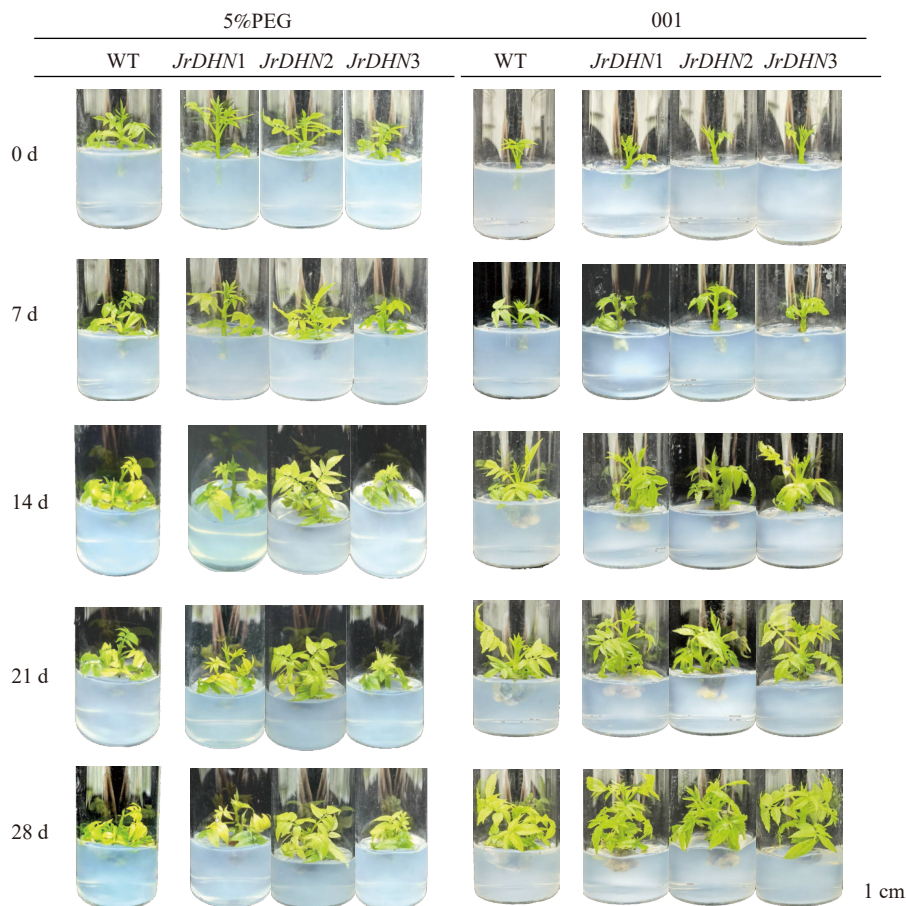


图 3 植株试管幼苗表型分析

Figure 3 Phenotype of test-tube plant let under drought stress

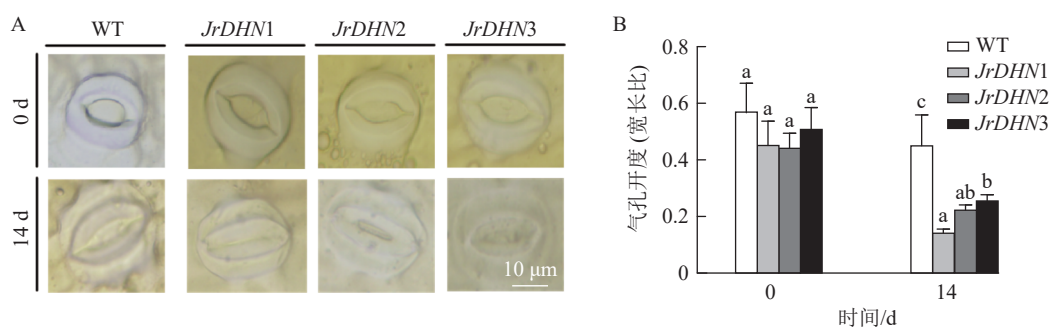
A. 14 d 处理下的气孔表型; B. 气孔开度的宽长比。不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

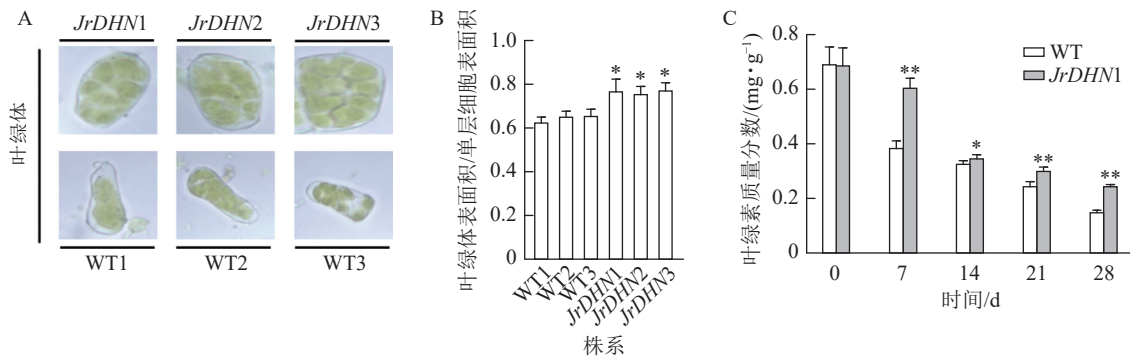
图 4 干旱胁迫下气孔表型及开度分析

Figure 4 Analysis of stomatal phenotype and stomatal opening under drought stress

d 时, WT 及 *JrDHN* 过表达株系的叶绿素质量分数无显著差异 (图 5C)。随着干旱胁迫时间的延长, WT 及 *JrDHN1* 中的叶绿素质量分数均出现下降趋势。但在处理 7 d 后, WT 中的叶绿素质量分数迅速下降到 $0.39 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 而此时 *JrDHN1* 中的叶绿素质量分数为 $0.61 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 显著高于 WT。在此后的 14~28 d, WT 叶绿素质量分数下降渐缓, 分别为 0.33、0.25、 $0.15 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, *JrDHN1* 中的叶绿素质量分数分别为 0.35、0.31、 $0.25 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, *JrDHN1* 在整个干旱胁迫处理中叶绿素的质量分数均高于 WT。综上所述, *JrDHN* 基因过表达提高了叶绿体表面积与单层细胞表面积的比率及核桃叶肉细胞内叶绿素的积累。

2.4 核桃 *JrDHN* 基因过表达对抗氧化酶活性及 MDA 质量摩尔浓度的影响

由图 6A~C 显示: 在干旱胁迫条件下, 3 种抗氧化酶活性伴随着胁迫时间延长均呈现先上升后下降的趋势。0 d 时, WT 和 *JrDHN1* 的 SOD、POD、CAT 活性无显著性差异; 在 14 d 时酶活性达到最大

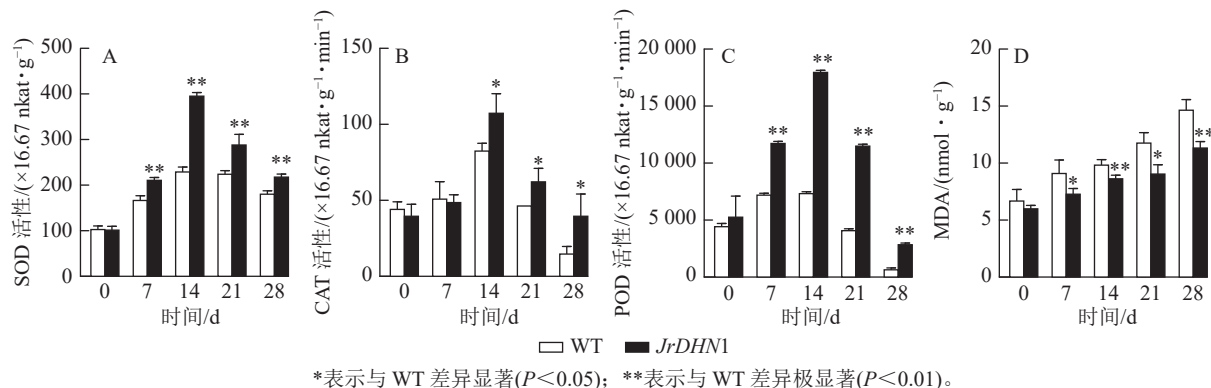


A. 叶绿体表型; B. 叶绿体和单层细胞面积比值; C. 叶绿素质量分数; WT1~3 为 3 株 WT 植株。*表示与 WT 差异显著($P<0.05$); **表示与 WT 差异极显著($P<0.01$)。

图 5 干旱处理后核桃苗叶绿体叶及绿素质量分数的变化

Figure 5 Changes of chlorophyll shape and content of walnut after drought treatment

值, 其中 *JrDHN1* 与 WT 的 SOD 及 POD 活性差异极显著 ($P<0.01$), CAT 活性差异显著 ($P<0.05$); *JrDHN1* 的抗氧化酶活性在干旱胁迫 7~28 d 均显著高于 WT ($P<0.05$)。由图 6D 显示: 随着干旱胁迫处理时间的增加, 各株系的 MDA 质量摩尔浓度逐渐上升。0 d 时, WT 和 *JrDHN1* 植株内的 MDA 质量摩尔浓度没有显著差异; 在 14 和 28 d 时 *JrDHN1* 的 MDA 质量摩尔浓度极显著低于 WT ($P<0.01$); 7 和 21 d 时, *JrDHN1* MDA 质量摩尔浓度均显著低于 WT。综上表明, 过表达 *JrDHN* 基因可使植株的抗氧化酶活性显著升高, 减少植物体内脯氨酸的积累, 从而提高核桃的抗干旱胁迫能力。



*表示与 WT 差异显著($P<0.05$); **表示与 WT 差异极显著($P<0.01$)。

图 6 干旱处理后核桃 *JrDHN1* 抗氧化酶活性及丙二醛质量摩尔浓度变化

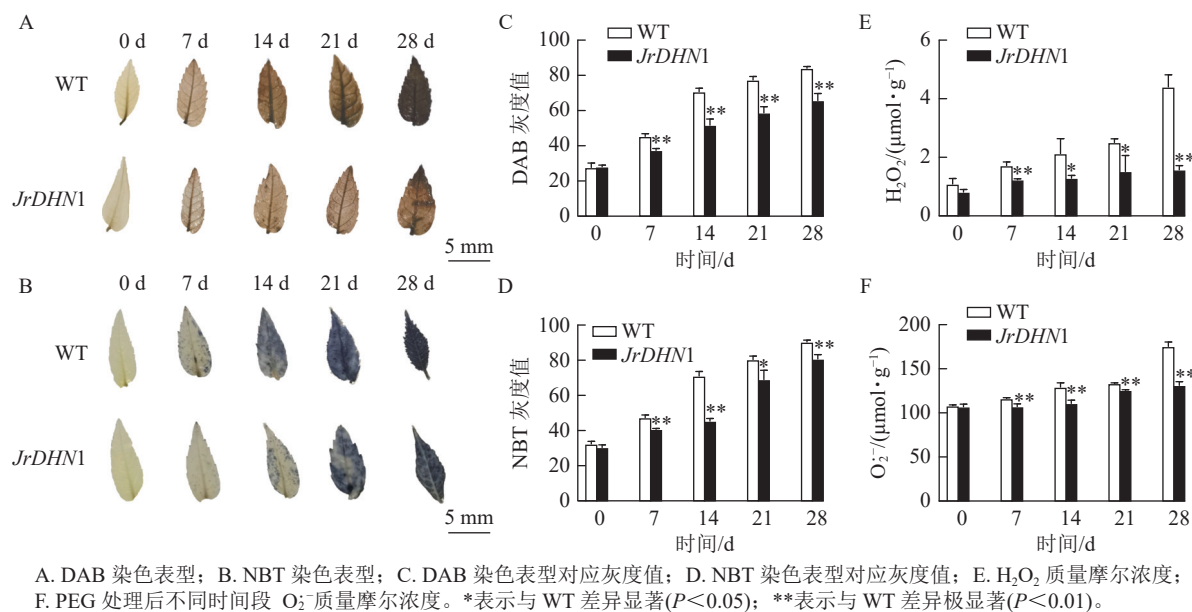
Figure 6 Changes of antioxidant enzyme activity and malondialdehyde content in walnut *JrDHN1* after drought treatment

2.5 核桃 *JrDHN* 基因过表达对 ROS 的影响

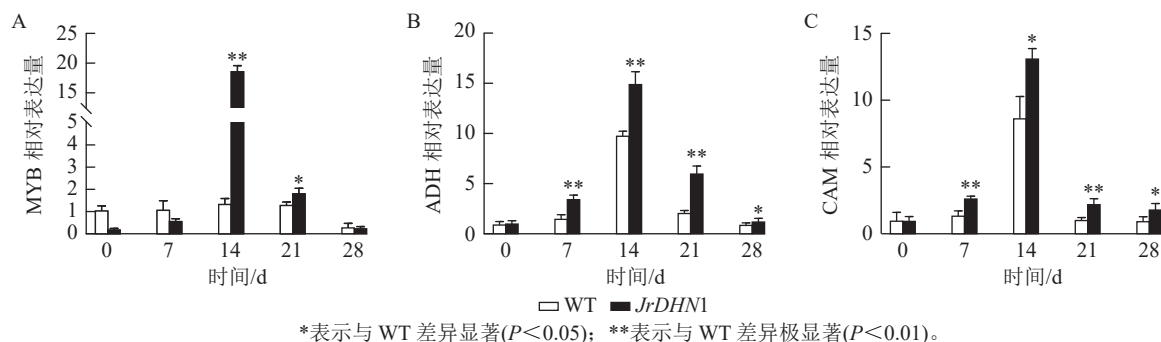
由图 7A 和图 7B 可见: 0 d 时, 核桃 WT 及 *JrDHN1* 的 NBT 染色后叶片颜色均为浅黄色, 无差异; 随着干旱胁迫时间的增加, DAB 染色表型为叶片的黄色逐渐加深, 在 28 d 时 WT 叶片完全为棕褐色, 而 *JrDHN1* 染色比 WT 浅; NBT 染色表型为叶片的蓝色逐渐加深, WT 叶片的颜色加深程度比 *JrDHN1* 突变体株系叶片的颜色深, 且至 28 d 被完全染为深蓝色, *JrDHN1* 仍有部分区域为浅蓝色或无色。通过量化的方式对颜色的灰度值进行测定, 灰度值越大代表颜色越深, 发现干旱处理 7~28 d, *JrDHN1* 灰度值均显著低于 WT, 与肉眼观察的结果相符 (图 7C 和图 7D)。进一步分析发现: 随着干旱胁迫时间的增加, WT 及 *JrDHN1* 中的 H_2O_2 和 $O_2^{\cdot-}$ 质量摩尔浓度也逐渐增多, 在第 28 天达到最大值。0 d 时, WT 和 *JrDHN1* 中的 H_2O_2 和 $O_2^{\cdot-}$ 质量摩尔浓度无显著差异; 28 d 时, WT 中的 H_2O_2 和 $O_2^{\cdot-}$ 质量摩尔浓度均显著低于 WT ($P<0.05$); 在 7 和 28 d 时, *JrDHN1* 中的 H_2O_2 质量摩尔浓度与 WT 差异极显著 ($P<0.01$), 在 14 和 21 d 时 H_2O_2 质量摩尔浓度则显著低于 WT ($P<0.05$), 而 7~28 d 时, *JrDHN1* 与 WT 的 $O_2^{\cdot-}$ 质量摩尔浓度均差异极显著 ($P<0.01$) (图 7E 和图 7F)。综上所述, 过表达 *JrDHN* 基因显著降低核桃植株中的 H_2O_2 和 $O_2^{\cdot-}$ 的积累, 从而提高其抗旱能力。

2.6 核桃 *JrDHN* 基因过表达对抗逆基因表达量的影响

荧光定量 qPCR 检测结果 (图 8) 显示: 各株系 *MYB*、*ADH*、*CAM* 的表达量均呈先上升后下降的趋

图7 干旱处理后核桃 *JrDHN1* ROS 变化Figure 7 ROS content changes of walnut *JrDHN1* after drought treatment

势，且各基因的表达量均在 14 d 时明显增高，这与抗旱表型出现的时间一致。14 d 时，*MYB* 的表达量最高，为 WT 的 18.8 倍，*ADH* 和 *CAM* 基因分别为 WT 的 15.0 和 13.2 倍。综合分析表明，过表达 *JrDHN* 基因可以提高 *MYB*、*ADH*、*CAM* 基因的表达量，提升脱落酸 (ABA) 信号转导通路对干旱胁迫的响应，从而增强植株抗旱性。

图8 干旱处理后 *JrDHN1* 相关抗逆基因表达量分析Figure 8 Analysis of *JrDHN1*-related stress resistance gene expression after drought treatment

3 讨论

脱水素 (dehydrins, DHNs) 为晚期胚胎丰富 (late embryogenesis abundant, LEA) 蛋白的一个分支，广泛存在于高等植物体内，并当植物处于干旱等胁迫环境时可以在细胞中迅速积累，引起植物的一系列变化，抵御外界胁迫环境^[21]。研究发现：脱水素可以通过提高叶绿素水平来提高干旱胁迫下的光合作用，从而保护植物细胞^[22]。本研究结果显示：干旱胁迫 0 d 时，*JrDHN* 过表达株系和 WT 叶绿素质量分数差异不显著；随着胁迫时间的增加，过表达株系叶绿素质量分数始终显著高于 WT，说明过表达 *JrDHN* 基因可以提高干旱胁迫过程中核桃叶片中的叶绿素水平，从而提高光合作用，增强植株抗旱性。将从早花白子莲 *Agapanthus praecox* 中提取到的脱水素基因 *ApY2SK2* 和 *ApSK3* 转入拟南芥，转基因拟南芥相比野生型在干旱胁迫下的光合能力显著提升^[23]，与本研究的结果相似。在铁皮石斛 *Dendrobium officinale* 中的研究也发现：高 *DHN* 表达量可以增加干旱胁迫条件下光合作用相关基因的表达量，从而提高植株光合作用水平来抵御干旱^[24]。

抗氧化酶系统是植物遭受环境胁迫时重要的防御体系。当植物遭受干旱胁迫时，ROS 的积累会触发

该防御系统, 从而保护植物减少胁迫环境带来的危害^[25]。用体积分数为 15% 的 PEG 6000 溶液模拟干旱胁迫处理 4 个不同的葡萄 *Vitis vinifera* 品种, 结果表明, 随着干旱时间的增加, 4 个不同葡萄品种的叶绿素水平均逐渐降低, MDA 含量上升, 4 个品种的 SOD、POD、CAT 以不同的变化幅度呈现先增长后降低的变化趋势^[26]。用体积分数 5% 的 PEGDKW 培养基模拟干旱胁迫环境, 随着干旱时间的延长, 与 WT 相比, 沉默 *JrGA20ox1* 基因表达能使核桃株系的抗氧化酶 SOD、POD、CAT 活性呈先升高后降低的趋势, 同时减少 MDA 和 ROS 的积累, 从而提高植株抗旱能力^[27]。本研究通过对 *JrDHN* 过表达株系生理指标测定及化学组织染色得出: 随着干旱时间的延长, WT 及 *JrDHN* 过表达株系的抗氧化酶活性呈先升高后降低的趋势, 这与前文的研究结果类似; *JrDHN* 过表达植株的抗氧化酶活性始终显著高于 WT, ROS 及 MDA 水平始终显著低于 WT。这表明过表达 *JrDHN* 可以提高核桃体内的抗氧化酶活性, 减少 ROS 及 MDA 的积累, 从而提高植株的抗旱能力。之前的研究也显示了类似的结果, 以体积分数 10% PEG 处理烟草时, 脱水素可以降低 ROS 在植物细胞中的积累, 减少 MDA 的产生, 同时增强抗氧化酶活性, 从而提升植株对干旱胁迫的耐受性^[28]。CHIAPPETTA 等^[29] 研究发现: 将野生油橄榄 *Olea europaea* 中提取到的 *OesDHN* 基因转入烟草后提高了烟草对干旱胁迫的耐受性。干旱胁迫下, 小麦中 *TabHLH49* 转录因子可提高 *WYZ2DHN* 基因的表达量, 从而提高小麦的耐受性^[30]。在拟南芥中过表达 *CdDHN 4-L* 和 *CdDHN4-S* 均可以导致两者清除活性氧的能力升高, 从而更好地抵御干旱胁迫^[31]。在甘蓝型油菜 *Brassica napus* 中的研究发现 *BnaMYB11*、*BnaMYB26*、*BnaMYB30* 和 *BnaMYB4* 基因在干旱处理后显著上调, 通过木质素合成, 从而响应干旱胁迫^[32]。褪黑素能通过调节抗氧化剂和氧化还原相关成分 ADH 的 mRNA 水平, 从而调节渗透保护, 增强植株耐旱性^[33]。*EcCaM* 基因的过表达使拟南芥能够耐受 PEG 诱导的干旱和盐胁迫^[34]。本研究结果也表明: 过表达 *JrDHN* 基因可以提高 *MYB*、*ADH*、*CAM* 基因的表达量, 从而增强植株抗旱性。

核桃作为营养价值较高的经济作物, 其种质资源的优化及品种的选育备受关注。在全球干旱的大背景下, 培育抗旱耐旱的核桃品种具有重要意义, 因此, 通过探究 *JrDHN* 过表达核桃植株对干旱的响应机制, 可为选育抗旱核桃品种提供理论价值和实践意义。

4 结论

本研究发现: 过表达 *JrDHN* 转基因核桃苗在 PEG 模拟干旱胁迫下的表型、光合能力和抗氧化能力均强于 WT, 过表达 *JrDHN* 基因在模拟干旱胁迫下可以有效提升抗氧化酶系统活力, 清除活性氧, 减少细胞受到的损伤, 从而提高植株的抗旱性。综上所述, 过表达 *JrDHN* 基因核桃的抗旱性要强于非转基因核桃。

5 参考文献

- [1] 孟佳, 方晓璞, 史宣明, 等. 我国核桃产业发展现状、问题与建议[J]. 中国油脂, 2023, 48(1): 84–86, 103.
MENG Jia, FANG Xiaopu, SHI Xuanming, et al. Situation, problems and suggestions on the development of walnut industry in China[J]. *China Oils and Fats*, 2023, 48(1): 84–86, 103.
- [2] 马庆国, 乐佳兴, 宋晓波, 等. 新中国果树科学研究 70 年: 核桃[J]. 果树学报, 2019, 36(10): 1360–1368.
MA Qingguo, LE Jiaxing, SONG Xiaobo, et al. Fruit scientific research in New China in the past 70 years: walnut[J]. *Journal of Fruit Science*, 2019, 36(10): 1360–1368.
- [3] 王磊, 曹亚龙, 孟海军, 等. 国内外核桃品种选育研究进展[J]. 果树学报, 2022, 39(12): 2406–2417.
WANG Lei, CAO Yalong, MENG Haijun, et al. Research progress in walnut variety breeding at home and abroad[J]. *Journal of Fruit Science*, 2022, 39(12): 2406–2417.
- [4] 胡梦玲, 彭小东, 阿丽亚·拜都热拉, 等. 城乡特色核桃防护林树种配置结构对空气颗粒物及温湿度的影响[J]. 南方农业学报, 2021, 52(5): 1310–1318.
HU Mengling, PENG Xiaodong, Aliya Baidourela, et al. Influence of special *Juglans regia* shelterbelts species configuration structure on air particulate, matter, temperature and humidity in urban and rural areas[J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2021, 52(5): 1310–1318.

- [5] 张翰生, 昌秦湘, 康建忠, 等. 核桃的营养价值及其开发利用研究进展[J]. 浙江农业学报, 2024, **36**(4): 905 – 919.
ZHANG Hansheng, CHANG Qinxiang, KANG Jianzhong. Research progress on nutritional value and utilization of walnut [J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2024, **36**(4): 905 – 919.
- [6] 何国庆, 俞春, 饶盈, 等. 山核桃果实成熟过程中矿质元素及脂肪酸组分变化[J]. 浙江农林大学学报, 2019, **36**(6): 1208 – 1216.
HE Guoqing, YU Chunlian, RAO Ying, *et al.* Dynamic changes in composition of mineral elements and fatty acids for hickory nuts (*Carya cathayensis*) during maturity[J]. *Journal of Zhejiang A&F University*, 2019, **36**(6): 1208 – 1216.
- [7] 怀婷婷, 卫伟, 刘春晓, 等. 核桃产业和贸易现状及发展建议[J]. 安徽农业科学, 2023, **51**(18): 203 – 208.
HUAI Tingting, WEI Wei, LIU Chunxiao, *et al.* Walnut industry and trade status and development suggestions[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2023, **51**(18): 203 – 208.
- [8] 李剑威, 晏舒蕾, 黄元城, 等. 薄壳山核桃幼苗对干旱胁迫的生理生化响应[J]. 核农学报, 2020, **34**(10): 2326 – 2334.
LI Jianwei, YAN Shulei, HUANG Yuancheng, *et al.* Physiological and biochemical responses of pecan seedlings to drought stress[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2020, **34**(10): 2326 – 2334.
- [9] 陈硕, 赵文武, 韩逸. 中国干旱半干旱区植被降水利用效率时空变化特征及影响因素分析[J]. 生态学报, 2023, **43**(24): 10295 – 10307.
CHEN Shuo, ZHAO Wenwu, HAN Yi. Spatio-temporal variation of vegetation precipitation use efficiency and influencing factors in arid and semi-arid areas of China[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2023, **43**(24): 10295 – 10307.
- [10] 陈兰兰, 王丽, 吴亚娟, 等. 植物响应干旱胁迫的分子和微生态机制 [J/OL]. 分子植物育种, 2023-04-07 [2024-05-07]. doi: 46.1068.S.20230406.1634.006.
CHEN Lanlan, WANG Li, WU Yajuan, *et al.* Molecular and microecological mechanisms of plant responses to drought stress [J/OL]. *Molecular Plant Breeding*, 2023-04-07 [2024-05-07]. doi: 46.1068.S.20230406.1634.006.
- [11] 张林生, 赵文明. LEA 蛋白与植物的抗旱性[J]. 植物生理学通讯, 2003(1): 61 – 66.
ZHANG Linsheng, ZHAO Wenming. LEA protein functions to tolerance drought of the plant[J]. *Plant Physiology Journal*, 2003(1): 61 – 66.
- [12] 刘慧春, 张加强, 马广莹, 等. 牡丹 *PsDHN1* 基因克隆及转基因拟南芥的耐涝性分析[J]. 浙江大学学报 (农业与生命科学版), 2021, **47**(3): 335 – 346.
LIU Huichun, ZHANG Jiaqiang, MA Guangying, *et al.* Cloning of *PsDHN1* gene of *Paeonia suffruticosa* and waterlogging tolerance analysis of transgenic *Arabidopsis* with *PsDHN1* gene[J]. *Journal of Zhejiang University (Agriculture and Life Sciences)*, 2021, **47**(3): 335 – 346.
- [13] 史学英, 田野, 李核, 等. 小麦 K₂ 型脱水蛋白 DHN14 响应非生物胁迫的功能分析 [J]. 西北农林科技大学学报 (自然科学版), 2019, **47**(5): 23 – 31, 41.
SHI Xueying, TIAN Ye, LI He, *et al.* Functional analysis of K₂-type wheat dehydrin DHN14 under abiotic stresses [J]. *Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition)*, 2019, **47**(5): 23 – 31, 41.
- [14] LIU Yang, LI Daxing, SONG Qiping, *et al.* The maize late embryogenesis abundant protein *ZmDHN13* positively regulates copper tolerance in transgenic yeast and tobacco[J]. *Crop Journal*, 2019, **7**(3): 403 – 410.
- [15] 张萌, 姜文婷, 王雪纯, 等. 日本落叶松谷胱甘肽过氧化物酶 (GPX) 酶学特性与抗逆性研究[J]. 北京林业大学学报, 2019, **7**(3): 403 – 410.
ZHANG Meng, JIANG Wenting, WANG Xuechun, *et al.* Studies on enzymatic properties and stress resistance of glutathione peroxidase (GPX) from *Larix kaempferi*[J]. *Journal of Beijing Forestry University*, 2019, **7**(3): 403 – 410.
- [16] 卓露, 林晓华, 薛山, 等. 植物耐干机制研究进展[J]. 华中农业大学学报, 2023, **42**(5): 28 – 34.
ZHUO Lu, LIN Xiaohua, XUE Shan, *et al.* Progress on studying mechanism of plant drought tolerance[J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2023, **42**(5): 28 – 34.
- [17] MAUREL C, TOURNAIRE-ROUX C, VERDOUCQ L, *et al.* Hormonal and environmental signaling pathways target membrane water transport[J]. *Plant Physiology*, 2021, **187**(4): 2056 – 2070.
- [18] FICHMAN Y, MITTLER R. Integration of electric, calcium, reactive oxygen species and hydraulic signals during rapid systemic signaling in plants[J]. *The Plant Journal*, 2021, **107**(1): 7 – 20.
- [19] RAZA A, SALEHI H, RAHMAN M A, *et al.* Plant hormones and neurotransmitter interactions mediate antioxidant defenses

- under induced oxidative stress in plants [J/OL]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, **9**(13): 872[2024-04-05]. doi: 10.3389/fpls.2022.961872.
- [20] ZHAO Xiaoping, LIU Hanyu, YONG Hui, *et al.* Effects of exogenous sucrose on root physiology and transcriptome of *Malus baccata* Borkh. under sub-low root-zone temperature [J/OL]. *Scientia Horticulturae*, 2024, **337**: 113474[2024-04-05]. doi: 10.1016/j.scienta.2024.113474.
- [21] RIYAZUDDIN R, NISHA N, SINGH K, *et al.* Involvement of dehydrin proteins in mitigating the negative effects of drought stress in plants [J]. *Plant Cell Reports*, 2022, **41**(3): 519 – 533.
- [22] YANG Zhou, SHENG Jiangyuan, LÜ Ke, *et al.* Y2SK2 and SK3 type dehydrins from *Agapanthus praecox* can improve plant stress tolerance and act as multifunctional protectants[J]. *Plant Science*, 2019, **284**: 143 – 160.
- [23] GUPTA K, JHA B, AGARWAL P K. A dehydration-responsive element binding (DREB) transcription factor from the succulent halophyte *Salicornia brachiata* enhances abiotic stress tolerance in transgenic tobacco[J]. *Marine Biotechnology*, 2014, **16**(6): 657 – 673.
- [24] HUANG Hui, JIAO Yixue, TONG Yang, *et al.* Comparative analysis of drought-responsive biochemical and transcriptomic mechanisms in two *Dendrobium officinale* genotypes [J/OL]. *Industrial Crops and Products*, 2023, **199**: 116766 [2024-04-05]. doi: 10.1016/j.indcrop.2023.116766.
- [25] 杨舒怡, 陈晓阳, 惠文凯, 等. 逆境胁迫下植物抗氧化酶系统响应研究进展[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2016, **45**(5): 481 – 489.
- YANG Shuyi, CHEN Xiaoyang, HUI Wenkai, *et al.* Progress in responses of antioxidant enzyme systems in plant to environmental stresses[J]. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition)*, 2016, **45**(5): 481 – 489.
- [26] 郭燕, 刘志华, 刘钊. PEG 模拟干旱胁迫下 4 种葡萄生理指标的变化及其抗旱性评价[J]. 分子植物育种, 2020, **18**(4): 1319 – 1325.
- WU Yan, LIU Zhihua, LIU Zhao. Changes of physiological indexes and drought resistance evaluation of 4 grapes variety under PEG simulated drought stress[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2020, **18**(4): 1319 – 1325.
- [27] 魏广利. 核桃赤霉素 2-ODDs 家族氧化酶基因的克隆与功能分析[D]. 杭州: 浙江农林大学, 2021.
- WEI Guangli. *Family Oxidase Gene in Walnut Gene Cloning and Functional Analysis of Gibberellin 2-ODDs* [D]. Hangzhou: Zhejiang A&F University, 2021.
- [28] ADUSE S, NKACHUKWU P, AUNG H, *et al.* Over-expression of a melon Y3SK2-Type LEA gene confers drought and salt tolerance in transgenic tobacco plants [J/OL]. *Plants*, 2020, **9**(12): 1749[2024-04-05]. doi: 10.3390/plants9121749.
- [29] CHIAPPETTA A, MUTO A, BRUNO L, *et al.* A dehydrin gene isolated from feral olive enhances drought tolerance in *Arabidopsis* transgenic plants [J/OL]. *Frontiers in Plant Science*, 2015, **6**: 392[2024-04-05]. doi: 10.3389/fpls.2015.00392.
- [30] LIU Hao, YANG Ying, LIU Danan, *et al.* Transcription factor TabHLH49 positively regulates dehydrin *WZY2* gene expression and enhances drought stress tolerance in wheat [J/OL]. *BMC Plant Biology*, 2020, **20**(1): 259[2024-04-05]. doi: 10.1186/s12870-020-02474-5.
- [31] ZHANG Di, LV Aimin, YANG Tianchen, *et al.* Protective functions of alternative splicing transcripts (CdDHN4-L and CdDHN4-S) of *CdDHN4* from bermudagrass under multiple abiotic stresses [J/OL]. *Gene*, 2020, **763**(suppl): 100033[2024-04-05]. doi: 10.1016/j.gene.2020.100033.
- [32] LUO Dingfan, MEI Desheng, WEI Wenliang, *et al.* Identification and phylogenetic analysis of the R2R3-MYB subfamily in *Brassica napus* [J/OL]. *Plants*, **12**(4): 886 [2024-04-05]. doi: 10.3390/plants12040886.
- [33] RIYAZUDDIN R, NISHA N, SINGH K, *et al.* Involvement of dehydrin proteins in mitigating the negative effects of drought stress in plants[J]. *Plant Cell Reports*, 2022, **41**(3): 519 – 533.
- [34] JAMRA G, AGARWAL A, SINGH N, *et al.* Ectopic expression of finger millet calmodulin confers drought and salinity tolerance in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant Cell Reports*, 2021, **40**(11): 2205 – 2223.