

核桃 Y_2SK_2 型脱水素基因 *JrDHN* 的克隆、表达和单核苷酸多态性分析

徐 丽, 陈 新, 魏海蓉, 张力思, 宗晓娟, 王甲威, 朱东姿, 刘庆忠*

(山东省果树研究所, 山东省果树生物技术重点实验室, 山东泰安 271000)

摘 要: 采用 RT-PCR 和 RACE 技术从‘香玲’核桃 (*Juglans regia* L. ‘Xiangling’) 叶片中克隆了 1 个脱水素基因 *JrDHN* (GenBank 登录号 KC503061.1), 其全长 1 056 bp, 具有 528 bp 的开放阅读框, 编码 175 个氨基酸组成的多肽, 具有 LEA 家族成员的特征多肽序列, 属于典型的 Y_2SK_2 型脱水素。以核桃 18S 基因为内参, 对‘香玲’核桃 *JrDHN* 在 4 °C 胁迫下的表达模式进行了初步的研究, 结果表明低温诱导下叶片中 *JrDHN* 的表达增加, 4 °C 处理 4 h 后达到最大值; 自然越冬条件下, 花芽中 *JrDHN* 表达量呈先上升后下降的趋势, 在 12 月份表达量最高, 推测 *JrDHN* 在核桃对低温胁迫响应中发挥重要功能。‘香玲’ *JrDHN* 在雌花中表达量高, 其次是叶片和树皮, 在花芽中最低。单核苷酸多态性分析 *JrDHN* 序列中有 30 个 SNPs 位点和 11 个 Indels; 单倍型分析显示 12 份核桃材料可分为 10 个单倍型, 单倍型多样性为 0.9697。

关键词: 核桃; 脱水素基因; 定量 RT-PCR; 单核苷酸多态性

中图分类号: S 664.1

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2014) 08-1573-10

Molecular Cloning, Expression and Single Nucleotide Polymorphisms Analysis of Typical Y_2SK_2 Dehydrin in *Juglans*

XU Li, CHEN Xin, WEI Hai-rong, ZHANG Li-si, ZONG Xiao-juan, WANG Jia-wei, ZHU Dong-zi, and LIU Qing-zhong*

(Shandong Province Key Laboratory of Fruit Tree Biotechnology, Shandong Institute of Pomology, Tai'an, Shandong 271000, China)

Abstract: Reverse transcription PCR (RT-PCR) and rapid amplification of cDNA ends (RACE) technologies were used to clone *JrDHN* (GenBank accession No. KC503061.1) from leaves of walnut (*Juglans regia* L. ‘Xiangling’). Cloned *JrDHN* gene was 1 056 bp in length, containing 528 bp ORF encoded 175 amino acids. Amino acid sequence analysis indicated that *JrDHN* possessed typical characters of LEA family. qRT-PCR analysis showed that the expression of *JrDHN* in Xiangling walnut was induced by low temperature and peaked at 4 hours after exposed to 4 °C low temperature. Under the condition of natural overwintering, *JrDHN* gene expression increased firstly, reached to a peak in December, followed

收稿日期: 2014-05-23; 修回日期: 2014-07-18

基金项目: 科技部科技基础条件平台项目 (2014-048); 农业部种质资源保护与利用项目 (2014NWB009); 山东省农业良种工程项目 (鲁科农字[2011]086); 中俄国际科技合作专项 (2012DFR30700)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: qzliu001@126.com)

by decrease. It was deduced that *JrDHN* may play important roles in tolerating to cold stress. The transcripts of *JrDHN* could be detected in female flower, bark, flower bud and leaf of Xiangling walnut, especially high expression in female flower. Additionally, after analyzing single nucleotide polymorphism of *JrDHN*, 30 SNPs and 11 Insertions/Deletions (Indels) were detected among 12 walnut accessions. Haplotype analysis showed that 12 walnut accessions were divided into ten haplotypes, and the haplotype diversity was 0.9697.

Key words: *Juglans*; dehydrin gene; qRT-PCR; single nucleotide polymorphism

脱水素 (Dehydrins, DHNs) 属于胚胎发育晚期丰富蛋白 (Late embryogenesis abundant proteins, LEA), 是一种亲水性蛋白, 属于 LEA 蛋白的第二家族 (Chen et al., 2012)。脱水素显著的特征是在 C 端或其附近含有至少一个富含赖氨酸的基序, 约 15 个氨基酸残基 (EKKGIMDKIKEKLP) 组成的 K 片段, 此片段在不同物种间极为保守。N 端含有保守基序 T/VDEYGNP 组成的 Y 片段, K 片段与 Y 片段之间有可被磷酸化的约 6 个丝氨酸串联成的 S 片段。所有的脱水素不一定含有 Y 和 S 片段, 但都含有 K 片段, 它是第 2 组 LEA 区别于其它组的特征 (Close, 1996; Allagulova et al., 2003)。目前在白杨 (Caruso et al., 2002)、大豆 (Momma et al., 2003)、拟南芥 (Rurek, 2010)、大麦 (Yang et al., 2011)、水稻 (Zhai et al., 2011)、番茄 (郭鹏 等, 2012) 和枇杷 (徐红霞 等, 2011) 等许多植物中均发现了脱水素的存在。

低温是限制植物生长和影响产量的主要非生物逆境之一, 脱水素在抵御低温等非生物胁迫过程中发挥着重要作用 (Close et al., 1997)。有研究表明过量表达脱水素基因可增强拟南芥的低温抗性, 提高抗寒力 (Puhakainen et al., 2004); Kosová 等 (2008) 报道低温锻炼后, 10 个大麦品种中 Dhn5 的积累量与其抵御冻害能力成正相关; 小麦脱水素 WCS120 的积累量与其获得冰冻抗性成正相关, 可以区分不同冬小麦品种的冰冻抗性强弱 (Houde et al., 1992; Vtmvs et al., 2010); 酒红杜鹃和云锦杜鹃杂交后代的叶片中脱水素基因的表达与其抗冻能力密切相关 (Lim et al., 1998)。

核桃 (*Juglans regia*) 在遭受冻害、寒害以及晚霜等灾害时, 常发生花芽枯死和枝条抽干, 影响树体的正常生长和结实, 经济损失严重。本研究中通过 RACE 技术克隆了与低温胁迫相关的核桃脱水素基因 cDNA 全长序列, 分析了该基因在低温胁迫下的表达模式和单核苷酸多态性, 为该基因进一步应用于核桃抗寒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寒核桃新品种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与处理

供试核桃材料为香玲 (*Juglans regia* L.)、阿克苏核桃 (*J. regia* L.)、温 185 (*J. regia* L.)、元林 (*J. regia* L.)、鸡心 (*J. hopeiensis* Hu.)、云新 14 (*J. sigillata* D. × *J. regia* L.)、奇异核桃 (*J. hindsii* × *J. regia* L.)、黑杂 1 (*J. major* × *J. regia* L.)、魁核桃 (*J. major* Heller)、北加州黑核桃 (*J. hindsii*)、黑核桃海兰 (*J. nigra* L.) 和小果黑核桃 (*J. microcarpa* Engelm), 种植于在国家果树种质泰安核桃板栗资源圃。

提取‘香玲’核桃树皮、叶片、花芽和雌花 RNA, 用于组织表达特异性分析。所有供试样品采集后立即置于液氮冷冻, 保存在 -80 °C 冰箱备用。

‘香玲’无性系组培苗分别在 4 °C 低温下处理 0、2、4、8 和 24 h, 然后采集叶片, 用于研究 DHN

基因响应低温的表达模式。

用于 RNA 提取的材料为‘香玲’。分别在 2012 年 11 月 15 日、12 月 25 日和 2013 年 1 月 26 日、3 月 6 日取花芽,用于分析不同冷适应时期 DHN 基因的表达。

1.2 核桃 DHN 基因克隆

采用北京天根 RNA plant plus Reagent 提取总 RNA,经 DNase I (TaKaRa, 大连)处理去除 RNA 中的 DNA。反转录参照反转录试剂盒 (Fermentas, MBI) 说明书进行,以 Oligo (dT)₁₈ 为引物合成 cDNA 第 1 链。

按照快捷型植物基因组 DNA 提取试剂盒 (Tiangen, 北京) 说明书提取嫩叶基因组 DNA。

根据 GenBank 中登录的脱水素蛋白保守区序列,设计简并引物 DHNJ5 和 DHNJ3 (表 1)。以反转录 cDNA 第 1 链为模板, DHNJ5 和 DHNJ3 为引物扩增核桃 DHN 基因中间保守区片段,扩增程序为 94 ℃ 5 min, 94 ℃ 30 s, 55 ℃ 40 s, 72 ℃ 1 min, 35 个循环; 72 ℃ 10 min。扩增产物回收、连接、转化和测序。根据正确的测序结果,设计 3'RACE 和 5'RACE 特异引物 GSP1 和 GSP2 (表 1),参照 SMARTTM RACE cDNA 扩增试剂盒 (Cat.No.634914) (Clontech, USA) 扩增 3'端和 5'端序列。将获得的两端序列和中间序列用 DNAMAN 软件 (V6.0.3.99) 进行拼接,获得核桃 DHN 的全长 cDNA。在拼接序列起始密码子上游和终止密码子下游设计特异性引物 qcDF 和 qcDR (表 1),扩增核桃 DHN 基因编码区序列。

将 PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测,回收目的条带,连接 pMD18-T 载体 (TaKaRa, 大连),转化 DH5 α 感受态细胞,菌液 PCR 鉴定重组质粒,挑选 3 个阳性克隆送上海生工生物工程服务有限公司测序,比较测序结果和拼接结果。

表 1 扩增引物序列
Table 1 PCR primers used for gene amplification

引物 Primer	引物序列 Primer sequences (5'-3')
DHNJ5	AC(C/T)GA(C/T)GA(A/G)TA(C/T)GG(A/C/T)AACC
DHNJ3	AGCTTCTCCTT(A/G)ATCTT(G/C)TCC
GSP1	GCACAAGGACGAACACTCGCACTC
GSP2	GAGTGCGAGTGTTCTGTCCTTGTGC
qcDF	TCATCTAAAACTAAAAGCTCAAG
qcDR	AACCTGCAAAATTATGAACAC
qDF	ATCCGCCATCCTCATACGAGC
qDR	CGGAGAAGGAGATTACCACAGG
18S-F	GGTCAATCTTCTCGTTCCCTT
18S-R	TCGCATTTCGCTACGTTCTT
SJrDHNf	ACATGGGGAGACGAGTAC
SJrDHNr	CAACTACAAAGTGAAATAAACTT

1.3 核桃 DHN 基因的时空表达分析

利用 qRT-PCR 分析‘香玲’核桃 DHN 基因在低温胁迫和不同组织中的表达模式。提取不同处理材料的总 RNA,反转录合成 cDNA。以稀释后的 cDNA 为模板,核桃 18S 基因为内参,利用 ABI7500 型荧光定量 PCR 仪 (ABI, USA),参照 qRT-PCR 试剂盒 (TaKaRa, 大连) 说明书进行 PCR 扩增。荧光定量 PCR 的引物序列为 qDF 和 qDR (表 1),18S 基因的引物序列为 18S-F 和 18S-R (表 1)。每个样品重复 3 次。

1.4 核桃 DHN 单核苷酸多态性分析

根据克隆的核桃 DHN 基因的核苷酸序列设计特异引物 SJrDHNF 和 SJrDHNr (表 1), 以 12 份核桃材料基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 将扩增产物纯化后与 pMD18-T 载体 (TaKaRa, 大连) 连接, 转化 DH5 α 感受态细胞后挑取阳性克隆进行序列测定。每份材料选取 5 个阳性克隆进行测序。

用 DNASTar SeqMan (V 7.1.0) 软件对来自同一材料不同克隆的测序结果进行组装, 得到一致序列。利用 DNASTar Megalign (V 7.1.0) 软件分别对来自不同材料的序列进行多序列联配, 用 DnaSP5 (V 5.10.01) 分析目标序列的单核苷酸多态性及单倍型。

2 结果与分析

2.1 核桃 *JrDHN* 克隆与序列分析

以低温处理的‘香玲’核桃叶片 RNA 反转录合成的 cDNA 为模板, 以简并引物 DHNJ5 和 DHNJ3 扩增获得约 450 bp 的中间片段, 测序结果表明中间片段为 459 bp (图 1)。

用特异引物 GSP1 和 GSP2 扩增, 分别获得大小约 350 bp 和 600 bp 的 3'端和 5'端片段, 测序结果表明 3'RACE 和 5'RACE cDNA 全长分别为 367 bp 和 618 bp (图 1)。

用 DNAMAN 软件拼接 3 段序列, 获得长为 961 bp 的 cDNA 序列。

以‘香玲’核桃基因组 DNA 为模板, 以 qcDF 和 qcDR 为引物进行 PCR 扩增, 得到长度约 850 bp 的片段 (图 1), DNAMAN 软件分析结果显示该基因包含 1 个内含子, 预测编码区与拼接结果 cDNA 阅读框一致。

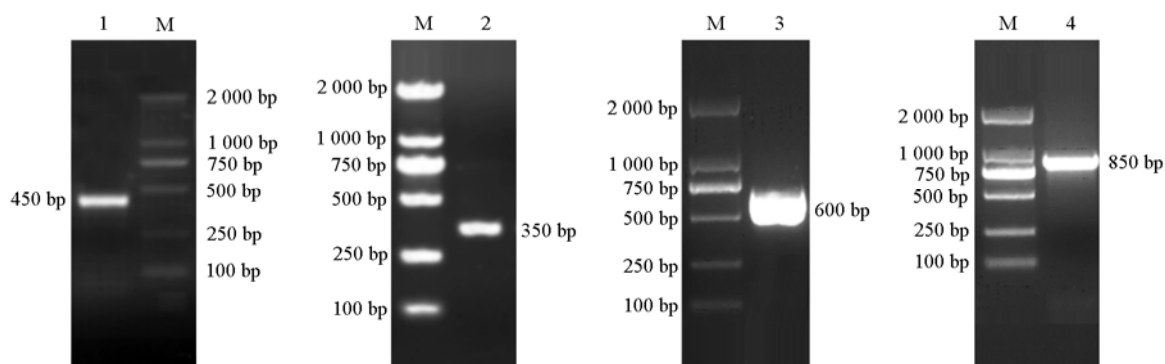


图 1 核桃 *JrDHN* 的 PCR 扩增

M: DL2000 marker; 1: 中间片段; 2: 3'RACE 片段; 3: 5'RACE 片段; 4: 全长 cDNA 片段。

Fig. 1 The PCR results of *JrDHN* of *Juglans regia*

M: DL2000 marker; 1: Middle segment; 2: 3'RACE fragment;
3: 5'RACE fragment; 4: Full-length cDNA.

分析结果表明 *JrDHN* 全长 1 056 bp, 利用 NCBI 中的 ORF Finder 分析发现 *JrDHN* 基因包含 221 bp 的 3'非编码区 (UTR), 208 bp 的 5'非编码区 (UTR), 99 bp 的内含子区和 528 bp 的开放阅读框, 编码 175 个氨基酸。

用 DNAMAN 软件进行氨基酸序列分析, 结果显示推导的 *JrDHN* 氨基酸序列具有 3 类保守特征

区域, 即 K、S 和 Y 片段 (图 2), 属于 LEA 蛋白的第二家族 (Close, 1997)。根据 Close (1996) 的分类方法, *JrDHN* 的速记形式为 Y_2SK_2 , 属于典型的脱水素类型。将此基因命名为 *JrDHN*, GenBank 登录号为 KC503061.1。

```

1  ATGGCTCAAATACTAGATAAGGATGGCAACCGAATTGAGCTCACCACGAACATGGCAAC
1  M A Q I L D K D G N R I Q L T D E H G N
61  CCGGTCCGATTAACTGATGAATATGGGAATCCCGTTCACTTAAAGGTGTGGCTGTCGAG
21  E V R L T D E Y G N E V Q L K G V A V E
121  CCCGAAACGCTAGCTGCAACAACGGAGAAGGAGATTACCACAGGTGGTGGTGGTGGT
41  P E T L A A T T E K E I T T G G G G G G
181  GGTGCTGCAGGTGAGCATGATGATCAGCAGGAGCAGGAGCAGAAGCAGCAGCATGAGGAG
61  G A A G E H D D Q Q E Q E Q K Q Q H E E
241  GTTCTCGCTCCAGTAGCTCCAGCTCTGGCTCGTATGAGGATGGCGGATCACAAGGTCAA
81  V S R S S S S S S S G S Y E D G G S Q G Q
301  GGTGGGGAGGTTGAGAGTGGGGAAGGTAGAAGAAGGAAGAAGGGTTTAAAGGAGAAA
101  G G E G E S G E G R R R K K K G L K E K
361  ATAAGGGAAAAGCTAACCAGTGGAAAGCACAAGGACGAACACTCGCACTCCAACACCACA
121  I R E K L T S G K H K D E H S H S N T T
421  GAGATTTCTAGTACAACCACAACCACTGGATCCGAACACCAGGAACATGAGAAGAAAAGT
141  E I S S T T T T T G S E H Q E H E K K S
481  ATGATGGAGAAGATCAAGGACAAGTTATCTGGGCATCATGTCAGTTAA
161  M M E K I K D K L S G H H V S *

```

图 2 核桃脱水素 *JrDHN* 基因的核酸序列及推导的氨基酸序列

双下划线表示起始密码子 ATG, * 表示终止密码子; 方框表示保守区段 Y 片段;

单下划线表示 S 片段; 阴影部分表示 K 片段。

Fig. 2 The nucleotide and deduced amino acids sequence of *JrDHN* gene in *J. regia*

Initiation codon is double underlined and stop codon is represented by asterisk; The conserved segment

Y are boxed; The S-segment is single underlined; The segment K are grey-shaded.

2.2 *JrDHN* 序列同源性和系统进化分析

将推导的 *JrDHN* 氨基酸序列经 BLAST 比对, 搜索与 *JrDHN* 同源性较高的植物氨基酸序列。*JrDHN* 蛋白与蓖麻 (*Ricinus communis*) LEA (XP_002512949.1)、葡萄 (*Vitis vinifera*) DHN4 (AEQ19906.1)、可可 (*Theobroma cacao*) DHN (EOX97937.1)、麻风树 (*Jatropha curcas*) DHN (ADT65200.1)、油菜 DHN (*Brassica napus*) AAQ74768.1、夏栎 (*Quercus robur*) DHN1 (AAU06814.1) 的一致性分别为 49%、45%、43%、49%、44% 和 53%。

从多重比对结果可看出不同脱水素蛋白氨基酸序列差异较大, 仅在脱水素特有 Y 片段、S 片段和 K 片段区域的氨基酸同源性较高 (图 3)。

利用 DNAMAN 软件对 *JrDHN* 与其他物种植物的脱水素蛋白进行系统进化分析, 可以看出 *JrDHN* 蛋白与壳斗科 (Fagaceae) 夏栎的脱水素蛋白亲缘关系最近, 因为在进化上同属壳斗目 (Fagales) 聚在一起, 同时毛榛、欧洲桦和山毛榉同属桦木科 (Betulaceae) 聚在一起, 油菜和拟南芥同属十字花科 (Cruciferae) 聚在一起, 大豆、苜蓿和三叶草同属豆科 (Leguminosae sp.) 聚在一起 (图 4)。

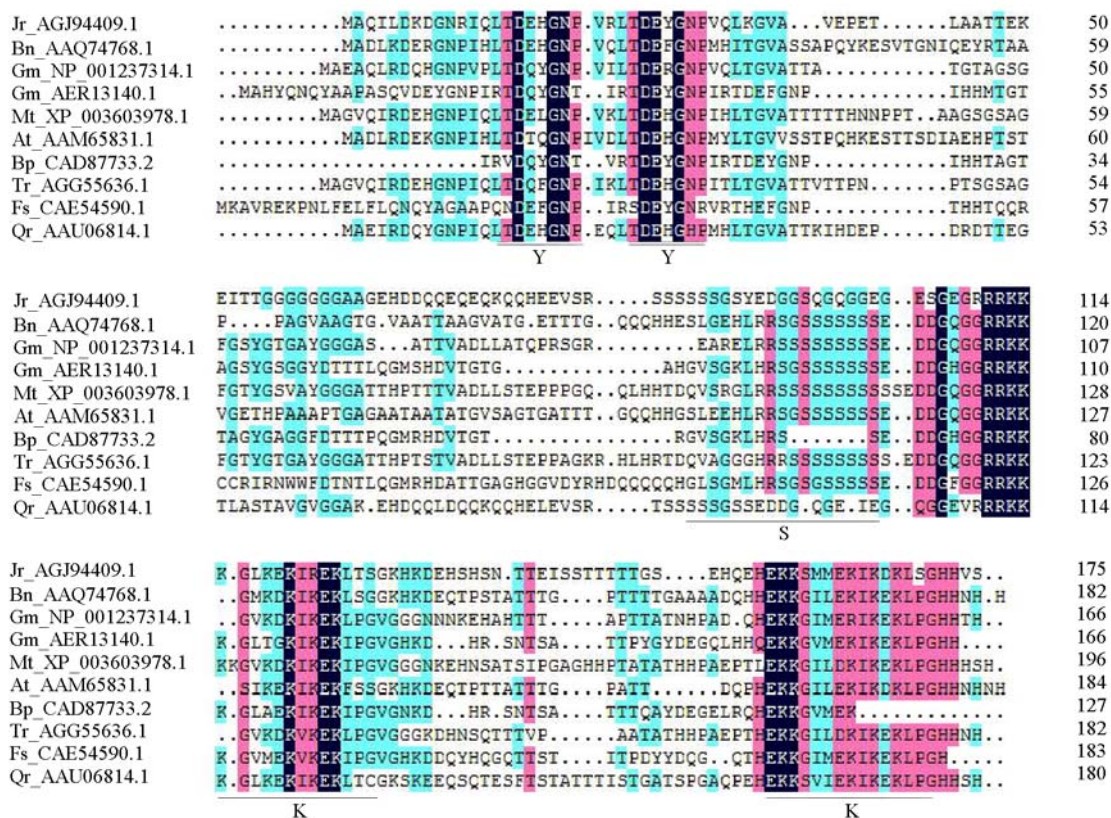


图 3 核桃 JrDHN 与其它物种 DHN 氨基酸序列的同源性分析

Jr: 核桃; Qr: 夏栎; Bn: 油菜; Fs: 山毛榉; Cm: 毛榛; Tr: 三叶草; Gm: 大豆; At: 拟南芥; Mt: 苜蓿; Bp: 欧洲桦。

Fig. 3 Alignment of JrDHN amino acid sequence with DHNs from other plant species

Jr: *Juglans regia*; Qr: *Quercus robur*; Bn: *Brassica napus*; Fs: *Fagus sylvatica*; Cm: *Corylus mandshurica*; Tr: *Trifolium repens*; Gm: *Glycine max*; At: *Arabidopsis thaliana*; Mt: *Medicago truncatula*; Bp: *Betula pubescens*.

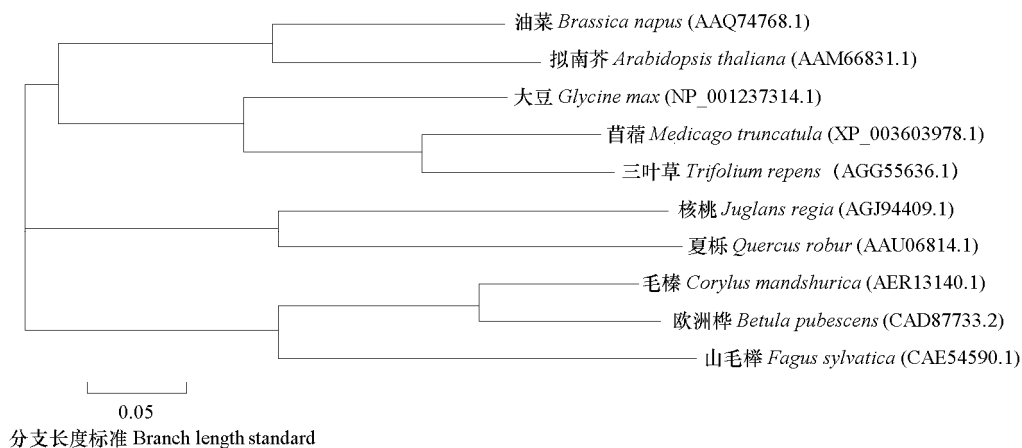


图 4 核桃 JrDHN 与已知其他植物脱水素蛋白系统进化分析

Fig. 4 Phylogenetic tree of JrDHN of *J. regia* and dehydrin from some other plants

2.3 JrDHN 的时空表达模式

通过对‘香玲’核桃不同组织器官进行 qRT-PCR 检测,发现 *JrDHN* 在核桃的树皮、叶片、雌

花和花芽中均有表达, 在雌花中的表达量最高, 其次是树皮和叶片, 在花芽中的表达量最低 (图 5), 具有组织表达特异性。

以核桃 18S 基因为内参, 利用 qRT-PCR 方法分析 ‘香玲’ 核桃叶片 *JrDHN* 在 4 °C 低温胁迫下的表达模式和花芽中 *JrDHN* 在自然越冬条件下的表达情况。结果 (图 6) 表明: 4 °C 低温处理 2 h 时 *JrDHN* 的表达量迅速升高, 4 h 时表达量达到最大值, 之后呈下降趋势, 但在整个胁迫过程中表达量均高于对照时期 (0 h), 说明 *JrDHN* 可能在低温胁迫中起作用。

自然越冬条件下 ‘香玲’ 核桃花芽中 *JrDHN* 表达呈现先上升后下降的趋势, 12 月份花芽中 *JrDHN* 表达量达到最大值, 次年 1 月份表达量开始下降, 3 月份表达量明显降低 (图 7), 进一步表明 *JrDHN* 可能在响应低温胁迫中起作用。

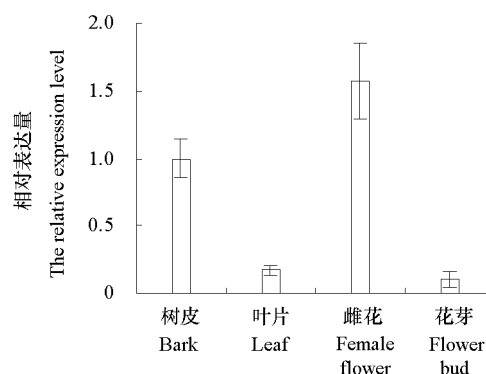


图 5 *JrDHN* 基因在 ‘香玲’ 核桃不同组织中的表达
Fig. 5 The expression of *JrDHN* gene in different tissues of *J. regia* ‘Xiangling’

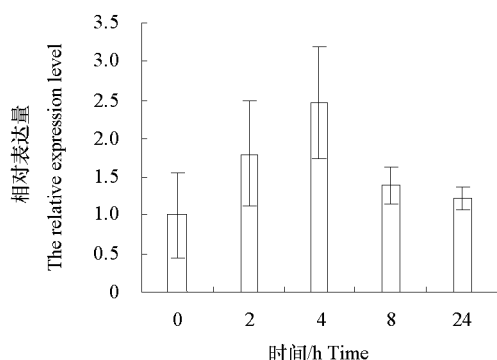


图 6 低温胁迫下核桃叶片中 *JrDHN* 的表达分析
Fig. 6 Expression of *JrDHN* gene in leaf of *J. regia* by cold treatment

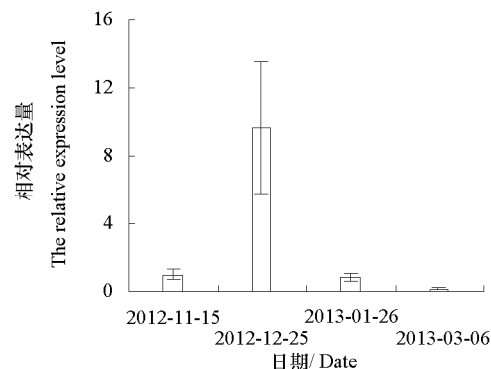


图 7 自然低温条件下核桃花芽中 *JrDHN* 的表达模式
Fig. 7 Expression of *JrDHN* gene in flower bud of *J. regia* under natural low temperature

2.4 *JrDHN* 的单核苷酸多态性 (SNPs) 分析

在分析 *JrDHN* 序列的基础上, 以 12 份核桃属植物为试材, 用 DnaSP5 软件对 *JrDHN* 进行单核苷酸多态性分析。在长度 1 056 bp 的核苷酸序列中检测到 30 个多态性位点 (SNPs), 平均每 35 bp 检测到一个多态性位点, 检测到 11 个插入缺失 (InDel), 发生频率分别为 30 SNP/1 056 bp 和 11 InDel/1 056 bp。其中有 16 个发生在编码区, 占总数的 39%, 25 个发生在非编码区, 占总数的 61%, 非编码区的单核苷酸多态性大于编码区。

在所检测出的 30 个多态性位点中, 有 16 个转换 (Transition) ($T \leftrightarrow C$, $A \leftrightarrow G$) 和 14 个颠换 (Transversion) ($A \leftrightarrow C$, $A \leftrightarrow T$, $C \leftrightarrow G$, $G \leftrightarrow T$), 转换与颠换的比率为 1.14:1, 说明碱基突变的主要类型是转换。

在发现的 11 个 InDel 中, 4 个来自编码区, 7 个来自非编码区, 非编码区 InDel 变异频率约为编码区的 1.75 倍。

利用 DNASTar 和 DnaSP5 软件对来自不同材料的序列进行多序列联配、聚类分析和单倍型 (haplotype) 分析。结果表明, *JrDHN* 在不同材料之间存在差异, 可分为 10 个单倍型, 单倍型的多样性为 0.9697。单倍型 Hap1 和 Hap4 各包含两份材料, 分别是阿克苏核桃, 温 185 和黑杂 1, 魁核桃; 单倍型 Hap2、Hap3、Hap5、Hap6、Hap7、Hap8、Hap9 和 Hap10 都只包含一份材料。12 个样本定义的 10 种单倍型在进化上分别聚为两类, 单倍型 Hap1、Hap5、Hap6、Hap8、Hap9 和 Hap10 聚为一类, 单倍型 Hap2、Hap3、Hap4 和 Hap7 聚为另一类 (图 8)。

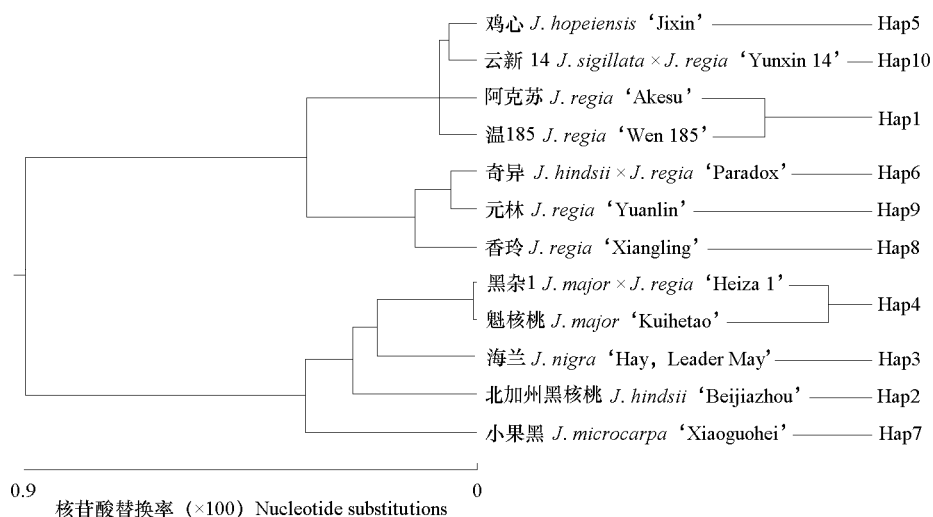


图 8 12 份核桃材料 *JrDHN* 基因的单倍型关系

Fig. 8 *JrDHN* haplotype relationship of 12 walnut accessions

3 讨论

根据 Y、S 和 K 片段保守特征区域的数量和排列顺序将脱水素分为 5 个亚类: Y_nSK_2 、 K_n 、 SK_n 、 K_nS 和 Y_2K_n , 其中 Y_nSK_2 型脱水素在自然界中最丰富, 是类碱性或者中性蛋白质 (Jensen et al., 1998)。本研究采用 RACE 技术首次从核桃中克隆了脱水素 *JrDHN* 基因, *JrDHN* 氨基酸序列 N 端含有 2 个 Y 片段、1 个 S 片段和 2 个 K 片段, 为典型的 Y_2SK_2 型脱水素 (Close et al., 1996)。与其他植物的脱水素蛋白的氨基酸序列同源性在 43% ~ 53% 之间。系统进化分析显示 *JrDHN* 与壳斗科 (Fagaceae) 夏栎的脱水素聚在一起, 这与进化上两者同属壳斗目 (Fagales) 是一致的。

qRT-PCR 分析表明, ‘香玲’核桃中 *JrDHN* 在 4 °C 低温胁迫下表达量均有所升高, 这暗示该脱水素在低温胁迫中发挥着重要作用。在越橘 (Muthalif & Rowland, 1994)、枇杷 (徐红霞 等, 2011) 和平榛 (陈新 等, 2013) 中的研究表明脱水素基因受低温胁迫诱导上调表达。‘香玲’核桃花芽中 *JrDHN* 基因在自然低温条件下, 12 月的表达量最高, 11 月和 1 月高于 3 月, 可能是由于气温的回升导致表达量下降, 表明 *JrDHN* 受低温诱导表达, 并且参与信号转导途径中的早期基因调控, 在受到外界胁迫时能快速大量表达。这与已报道阿月浑子 *pvDHN* 基因 (Yakubov et al., 2005)、苹果 *MdDHN* 基因 (Garcia-Bañuelos et al., 2009) 和桃树 *bpuDHN1* (Wisniewski et al., 2006) 在低温胁迫下的表达模式相似。

单核苷酸多态性 (Single nucleotide polymorphism, SNP) 是指在基因组水平上由单核苷酸变异所引起的一种序列多态性 (Brookes, 1999)。单核苷酸多态性具有数量大、分布广、稳定性强、易于分型等优点, 被称为第 3 代分子标记, 在物理作图、资源分类、进化遗传研究中也是很有效的分

子标记 (Brookes, 1999; Rafalski, 2002; Chagné et al., 2008; 张育堃 等, 2012)。已有研究结果表明, SNP 有助于解释不同群体或个体之间的表型差异 (Ingvarsson, 2005; Aulchenko et al., 2007), 而且分析 SNP 的差异还可以了解物种间的亲缘关系和进化生物学信息。本研究的结果表明 *JrDHN* 基因在核桃属中存在着丰富的 SNP 多态性, SNP 频率为 30/1 056 bp, 平均每 35 bp 有一个 SNP, 且非编码区 SNPs 位点多于编码区, 这与在大豆 (Zhu et al., 2003) 和玉米 (Ching et al., 2002) 等中的研究相似。

单倍型亲缘关系分析显示核桃属中 12 份材料可聚为两大类。Hap1、Hap5、Hap6 和 Hap8 ~ Hap10 聚为一类, 主要是核桃组和核桃楸组的成员, 其中奇异核桃是普通核桃和黑核桃的种间杂种, 鸡心是麻核桃的主要品种之一, 云新 14 是铁核桃和普通核桃的种间杂种。Hap2 ~ Hap4 和 Hap7 为另一类, 主要是黑核桃组的成员, 其中黑杂 1 是魁核桃和普通核桃的种间杂种。

References

- Allagulova C R, Gimalov F R, Shakirova F M, Vakhitov V A. 2003. The plant dehydrins: Structure and putative functions. *Biochemistry (Moscow)*, 68: 945 – 951.
- Aulchenko Y S, de Koning D J, Haley C. 2007. Genomewide rapid association using mixed model and regression: A fast and simple method for genomewide pedigree-based quantitative trait loci association analysis. *Genetics*, 177: 577 – 585.
- Brookes A J. 1999. The essence of SNPs. *Gene*, 234: 177 – 186.
- Caruso A, Morabito D, Delmotte F, Kahlem G, Carpin S. 2002. Dehydrin induction during drought and osmotic stress in *Populus*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40: 1033 – 1042.
- Chagné D, Gasic K, Crowhurst R N, Han Y, Bassett H C, Bowatte D R, Lawrence T J, Rikkerink E H A, Gardiner S E, Korban S S. 2008. Development of a set of SNP markers present in expressed genes of the apple. *Genomics*, 92 (5): 353 – 358.
- Chen K, Fessehaie A, Arora R. 2012. Dehydrin metabolism is altered during seed osmopriming and subsequent germination under chilling and desiccation in *Spinacia oleracea* L. cv. Bloomsdale: Possible role in stress tolerance. *Plant Science*, 183: 27 – 36.
- Chen Xin, Liang Li-song, Ma Qing-hua, Zhao Tian-tian, Liu Qing-zhong, Wang Gui-xi. 2013. Cloning and expression characteristics of a novel dehydrin gene from hazelnut (*Corylus heterophylla* Fisch.). *Acta Horticulturae Sinica*, 40 (1): 32 – 40. (in Chinese)
- 陈 新, 梁丽松, 马庆华, 赵天田, 刘庆忠, 王贵禧. 2013. 平榛脱水素基因的克隆与表达分析. *园艺学报*, 40 (1): 32 – 40.
- Ching A, Caldwell K S, Jung M, Dolan M, Smith O S, Tingey S, Morgante M, Rafalski A J. 2002. SNP frequency, haplotype structure and linkage disequilibrium in elite maize inbred lines. *BMC Genetics*, 3: 19.
- Close T J. 1996. Dehydrins: Emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Physiologia Plantarum*, 97 (4): 795 – 803.
- Close T J. 1997. Dehydrins: A commonality in the response of plants to dehydration and low temperatures. *Physiologia Plantarum*, 100 (2): 291 – 296.
- Garcia-Bañuelos M L, Gardea A A, Winzerling J J, Vazquez-Moreno L. 2009. Characterization of a midwinter-expressed dehydrin (DHN) gene from apple trees (*Malus domestica*). *Plant Molecular Biology Reporter*, 4: 476 – 487.
- Guo Peng, Zhang Shi-gang, Jin Hua, Zou Ji-xiang, Dong Yan, Jiang Guo-bin. 2012. Cloning and characterization of dehydrins gene *SIDHN2b* in tomato. *Acta Horticulturae Sinica*, 39 (10): 2015 – 2022. (in Chinese)
- 郭 鹏, 张士刚, 金 华, 邹吉祥, 董 燕, 姜国斌. 2012. 番茄脱水素基因 *SIDHN2b* 的克隆与表达分析. *园艺学报*, 39 (10): 2015 – 2022.
- Houde M, Dhindsa R S, Sarhan F. 1992. A molecular marker to select for freezing tolerance in Gramineae. *Molecular and General Genetics*, 234: 43 – 48.
- Ingvarsson P K. 2005. Nucleotide polymorphism and linkage disequilibrium within and among natural populations of European aspen (*Populus tremula* L., Salicaceae). *Genetics*, 169: 945 – 953.
- Jensen A B, Goday A, Figueras M, Jessop A C, Pages M. 1998. Phosphorylation mediates the nuclear targeting of the maize Rab17 protein. *The Plant Journal*, 13 (5): 691 – 697.

- Kosová K, Holková L, Prášil I T, Prášilová P, Bradáčová M, Vitámvás P, Čapková V. 2008. Expression of dehydrin 5 during the development of frost tolerance in barley (*Hordeum vulgare*). *Journal of Plant Physiology*, 165: 1142 – 1151.
- Lim C C, Krebs S L, Arora R. 1998. Freezing tolerance in *Rhododendron* and its association with dehydrin expression. *HortScience*, 33 (3): 453.
- Momma M, Kaneko S, Haraguchi K, Matsukura U. 2003. Peptide mapping and assessment of cryoprotective activity of 26/27-kDa dehydrin from soybean seeds. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 67: 1832 – 1835.
- Muthalif M M, Rowland L J. 1994. Identification of dehydrin-like proteins responsive to chilling in floral buds of blueberry (*Vaccinium*, section *Cyanococcus*). *Plant Physiology*, 104: 1439 – 1447.
- Puhakainen T, Hess M W, Mäkelä P, Svensson J, Heino P, Palva E T. 2004. Overexpression of multiple dehydrin genes enhances tolerance to freezing stress in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*, 54: 743 – 753.
- Rafalski J A. 2002. Novel genetic mapping tools in plants: SNPs and LD-based approaches. *Plant Science*, 162: 329 – 333.
- Rurek M. 2010. Diverse accumulation of several dehydrin-like proteins in cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*), *Arabidopsis thaliana* and yellow lupin (*Lupinus luteus*) mitochondria under cold and heat stress. *BMC Plant Biology*, 10: 181.
- Vitámvás P, Kosová K, Prášilová P, Prášil T I. 2010. Accumulation of WCS120 protein in wheat cultivars grown at 9 °C or 17 °C in relation to their winter survival. *Plant Breeding*, 129: 611 – 616.
- Wisniewski M E, Bassett C L, Renaut J, Farrell R Jr., Tworowski T, Artlip T S. 2006. Differential regulation of two dehydrin genes from peach (*Prunus persica*) by photoperiod, low temperature and water deficit. *Tree Physiology*, 26: 575 – 584.
- Xu Hong-xia, Chen Jun-wei, Yang Yong, Sun Jun-wei, Yan Cheng-qi. 2011. Isolation and expression analysis of *DHN* gene in loquat fruit under cold stress. *Acta Horticulturae Sinica*, 38 (6): 1071 – 1080. (in Chinese)
- 徐红霞, 陈俊伟, 杨 勇, 孙骏威, 严成其. 2011. 枇杷果实 *DHN* 基因克隆及其在低温胁迫下的表达分析. *园艺学报*, 38 (6): 1071 – 1080.
- Yakubov B, Barazani O, Shachack A, Rowland L J, Shoseyov O, Golan-Goldhirsh A. 2005. Cloning and expression of a dehydrin-like protein from *Pistacia vera* L. *Trees*, 19 (2): 224 – 230.
- Yang Z, Zhang T, Li G, Nevo E. 2011. Adaptive microclimatic evolution of the dehydrin 6 gene in wild barley at “Evolution Canyon”, Israel. *Genetica*, 139: 1429 – 1438.
- Zhai C, Lan J, Wang H, Li L, Cheng X, Liu G. 2011. Rice dehydrin K-segments have *in vitro* antibacterial activity. *Biochemistry (Moscow)*, 76: 645 – 650.
- Zhang Yu-yao, Li Jing-fu, Xie Li-bo, Zhang He, Kang Li-gong, Jiang Jing-bin, Xu Xiang-yang. 2012. Development of SNPs for leaf mould resistance gene *Cf-5* in tomato. *Journal of Northeast Agricultural University*, 43 (4): 99 – 104. (in Chinese)
- 张育垚, 李景富, 谢立波, 张 贺, 康立功, 姜景彬, 许向阳. 2012. 番茄 *Cf-5* 基因的 SNP 分子标记开发. *东北农业大学学报*, 43 (4): 99 – 104.
- Zhu Y L, Song Q J, Hyten D L, Van Tassell C P, Matukumalli L K, Grimm D R, Hyatt S M, Fickus E W, Young N D, Cregan P B. 2003. Single-nucleotide polymorphisms in soybean. *Genetics*, 163: 1123 – 1134.