

番茄 *SIWDR204* 基因正调控植物干旱胁迫

张琳, 李欢欢, 于淑坤, 黄曼, 苗敏 (合肥工业大学食品与生物工程学院, 安徽合肥 230009)

摘要 为了进一步研究 *SIWDR204* 的功能, 克隆了番茄的 *SIWDR204* 基因, 通过亚细胞定位为研究其功能提供线索, 并通过农杆菌介导法, 利用 RNAi 技术获得 *SIWDR204* 基因下调的转基因植株。干旱胁迫试验表明, 转基因番茄对干旱胁迫更加敏感, 说明 *SIWDR204* 基因正向调控植物对干旱的响应, 这一发现为分子育种提供了新的靶标基因, 并为阐明植物抗旱的分子机理奠定了基础。

关键词 *SIWDR204* 基因; WD40 家族蛋白; 转基因番茄; 抗旱性

中图分类号 S188 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2019)01-0096-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2019.01.030

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

*SIWDR204* Gene Positively Regulates Drought Stress in Tomato Plants

ZHANG Lin, LI Huan-huan, YU Shu-kun et al (School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei, Anhui 230009)

Abstract We cloned the *SIWDR204* from *Solanum lycopersicum* in order to further study the function of *SIWDR204*. To provide clues for the study of its function through subcellular localization. Further more we obtain the transgenic plants with down-regulated *SIWDR204* gene by RNAi technology through Agrobacterium-mediated method. Drought stress experiments illustrated that *SIWDR204* gene positively regulates the response of plants to drought. This discovery provided a new target gene for molecular breeding and lay a foundation for elucidating the molecular mechanism of plant drought resistance.

Key words *SIWDR204* gene; WD40 Family protein; Transgenic tomato; Drought resistance

植物由于固着生活的特点而不可避免地会受到环境不利因素的胁迫, 这些胁迫包括生物的和非生物的, 其中非生物的胁迫因素包括干旱、高温、低温、重金属离子等^[1]。干旱胁迫是植物胁迫中重要胁迫之一, 干旱对作物的生长发育造成了不可逆转的影响, 严重影响了作物的品质和产量^[2]。

WD40 家族蛋白在动植物中均有发现, 但其生物学功能有较大差别。WD40 蛋白一般具有一个保守的结构域 WD40-repeat, 一般含有 6~8 个 WD40-repeat, 每个 repeat 由 40~60 个保守的氨基酸构成, 其 N 端和 C 端分别有高度保守的二肽 GH (Gly-His) 和 WD (Trp-Asp)^[3]。番茄 WD40 (WD40-repeat domain) 基因家族编码 100 多个番茄 *SIWDR* (WD40-repeat domain family members in tomato) 蛋白^[3]。前人研究表明, WD40 家族蛋白作为 CUL4-DDB1 泛素连接酶复合体与底物直接结合而发挥作用^[4], 参与包括果实发育、胁迫应答、抵抗病害等许多重要生理过程^[5-6]。而 WD40 家族蛋白成员 *SIWDR204* 蛋白参与紫外胁迫应答和紫外修复, 是生物体中核苷酸切除修复通路的重要元件^[7]。为了进一步研究 *SIWDR204* 的功能, 笔者克隆了番茄的 *SIWDR204* 基因, 通过亚细胞定位为研究其功能提供线索, 并通过农杆菌介导法, 利用 RNAi 技术获得 *SIWDR204* 基因下调的转基因植株, 并对转基因植株进行干旱胁迫, 发现转基因番茄对干旱胁迫更加敏感, 表明 *SIWDR204* 基因正向调控植物对干旱的响应, 以期为阐明植物抗旱的分子机理奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂 番茄 (*Solanum lycopersicum*)、大肠杆菌

基金项目 安徽省自然科学基金面上项目 (1708085MC75); 国家自然科学基金青年基金项目 (31701059)。

作者简介 张琳 (1991—), 女, 广西灵山人, 硕士研究生, 研究方向: 生物化学与分子生物学。

收稿日期 2018-09-03

(*Escherichia coli*) DH5 α 菌株、农杆菌 (*Agrobacterium*) GV2260 菌株、质粒表达载体、反转录试剂盒、*pfu* DNA 聚合酶、T₄ 连接酶、限制性内切酶、质粒提取试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒、MS (Murashige and Skoog)、6-BA (6-Benzylaminopurine)、IAA (indole-3-acetic acid)、KT (Kinetin)、2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid)、ACE (Acetosyringone)、KANA (Kanamycin)、SB (Carbenicillin)。

1.2 番茄 *SIWDR204* 基因的克隆 根据 Sol Genomics Network 中 *SIWDR204* 基因 (Solyc09g031610.2.1) 序列信息, 设计 *SIWDR204*-F 和 *SIWDR204*-R 的特异性引物。

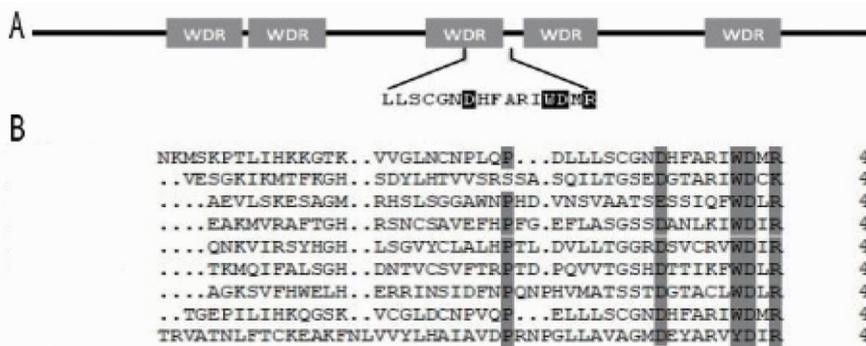
提取番茄野生型幼苗总 RNA, 反转录为 cDNA, 通过 DNA 聚合酶链式反应 PCR 扩增 *SIWDR204* 基因, PCR 条件如下: 预变性 95 °C 4 min; 变性温度 95 °C 2 min, 退火温度 58 °C 20 s, 延伸温度 72 °C 100 s, 72 °C 5 min, 30 个循环。

1.3 *SIWDR204* 的亚细胞定位 亚细胞定位是指某种蛋白或表达产物在细胞中的具体存在部位, 例如存在核内、胞质内或细胞膜上, GFP 是绿色荧光蛋白, 在扫描激光共聚焦显微镜下可以发出绿色荧光, 可以准确定位蛋白质在细胞中的位置^[3]。构建 *SIWDR204*-GFP 融合表达载体, 该表达载体可由 35S 强启动子启动。构建成功的表达载体转入农杆菌, 筛选阳性菌株。采用烟草基因瞬时表达体系表达番茄基因 *SIWDR204*。将经过乙酰丁香酮诱导的农杆菌转入烟草叶片中, *SIWDR204*-GFP 经过 36 h 表达, 该蛋白经过表达得到一定的积累。经处理后的烟草叶片, 利用激光共聚焦显微镜观察番茄 *SIWDR204* 表达蛋白的亚细胞定位。

1.4 番茄 *SIWDR204*-RNAi 转基因植株的获得与鉴定 用液氮冷激法将 *SIWDR204*-RNAi 重组质粒转入农杆菌中, 筛选获得阳性克隆菌株。利用组织培养的方法, 获得野生型植株的愈伤组织。采用经乙酰丁香酮诱导处理后的农杆菌侵

染番茄愈伤组织,利用组织培养的方法培养,经共培养、筛选分化、生根等步骤,培养至幼苗^[8]。经过炼苗后,移栽至土中培养,筛选获得阳性转基因植株。

1.5 干旱胁迫试验 为了探究番茄 *SIWDR204* 基因对于干旱胁迫的抵御能力,使用生长状况相同的番茄 *SIWDR204*-RNAi 转基因植株和野生型植株进行试验。将番茄转基因种子和野生型种子播种于土中,种子萌发暗处理 3 d,待种子露白,置于光下生长,光照 18 h、黑暗 6 h,温度 26 °C。待番茄生长至幼苗,将番茄幼苗移栽至花盆中培养。待花盆中土壤吸水饱和后,将转基因植株与野生型植株进行干旱胁迫处理,观察番茄植株叶片失水枯萎情况。



注:A. *SIWDR204* 在染色体上的位置以及该基因所编码蛋白质的部分序列;B. WD40 家族成员蛋白的氨基酸序列对比

Note: A. The position of the tomato *SIWDR204* gene on the chromosome and a partial sequence of the protein is encoded by the gene; B. The amino acid sequence of WD40 family member proteins

图 1 番茄 *SIWDR204* 基因在染色体上的位置以及该基因所编码的氨基酸序列

Fig. 1 The position of the tomato *SIWDR204* gene on the chromosome and the amino acid sequence encoded by the gene

2.2 *SIWDR204* 基因的克隆 提取番茄野生型幼苗总 RNA,反转录为 cDNA,以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,所得的 PCR 产物进行核酸琼脂糖凝胶电泳,番茄 *SIWDR204* 基因的长度为 1 608 bp,PCR 产物的电泳结果见图 2,电泳结果显示,所得条带大小位于 1 000 ~ 2 000 bp,与原基因大小 1 608 bp 位置一致,测序结果显示基因序列正确。

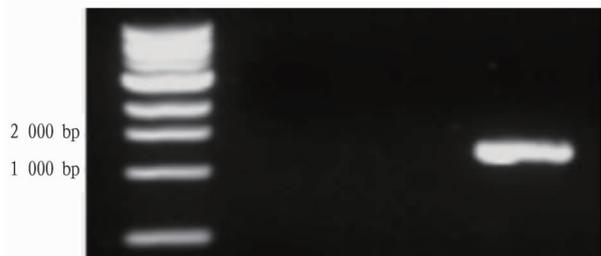


图 2 PCR 扩增 *SIWDR204* 基因电泳结果

Fig. 2 The electrophoresising result of *SIWDR204* gene

2.3 *SIWDR204* 的亚细胞定位 将带有 *SIWDR204*-GFP 融合表达载体的农杆菌注射烟草的下表皮细胞,36 h 后用激光共聚焦显微镜观察番茄 *SIWDR204* 表达蛋白的亚细胞定位。之前的研究显示番茄 WD40 家族 *SIWDR13*、*SIWDR25* 以及 *SIWDR28* 等基因的蛋白表达定位细胞核中^[5],推测番茄 *SIWDR204* 表达蛋白也定位细胞核中。亚细胞定位试验结果显示,GFP 蛋白表达定位在细胞核和细胞质中,故而在整个细胞中都呈现绿色,*SIWDR204* 表达蛋白主要定位于细胞

2 结果与分析

2.1 番茄 *SIWDR204* 基因分析 番茄 *SIWDR204* 基因所编码的蛋白质长度为 587 aa,该基因定位于番茄的第 9 号染色体上,由 10 个内含子和 11 个外显子构成,位于 9 号染色体的中部位置,番茄 *SIWDR204* 基因具有一个特殊 DWD 功能模块,DWD 模块拥有 125 个氨基酸的保守结构域,其所编码的蛋白质含有多个保守的 WD(Trp-Asp)、D(Asp)以及 R(Arg)重复氨基酸序列(图 1A)。番茄 *SIWDR204* 基因所编码的蛋白质与拟南芥 WD40 家族同源基因所编码的蛋白质具有较高的同源性,存在不同数量的重复保守氨基酸序列,如 WD(Trp-Asp)(图 1B)。

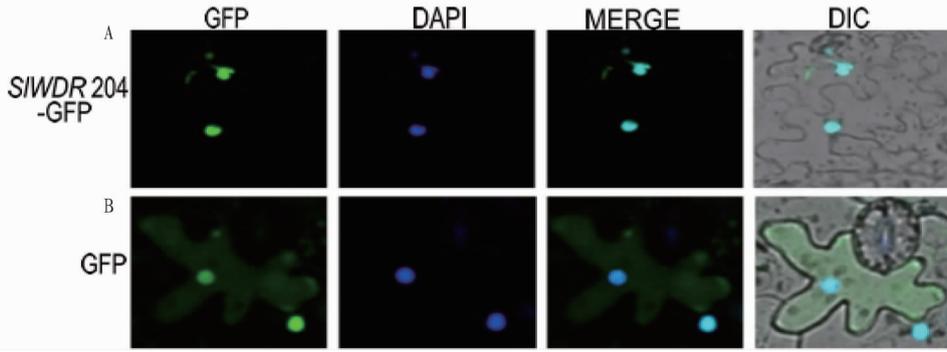
核(图 3)。

2.4 转基因番茄的鉴定 通过农杆菌介导转化和植物组织培养技术,获得 *SIWDR204*-RNAi 转基因番茄。收取部分转基因番茄叶片样本,提取番茄叶片中的基因组 DNA。植物表达载体 pBI121 含有 *NPTII* 基因,使用 *NPTII* 引物对番茄转基因植株进行阳性鉴定(图 4),获得 10 株番茄转基因阳性苗。

2.5 番茄 *SIWDR204* 转基因植株干旱胁迫后的植株形态 试验发现,干旱胁迫 8 d 时,*SIWDR204*-RNAi 转基因植株的部分叶片开始出现轻度失水,干旱胁迫 13 d 时,*SIWDR204*-RNAi 转基因植株的所有叶片都出现严重失水,叶片全部呈现枯萎状态;而野生型植株叶片在干旱胁迫 8 d 时,叶片呈平展状态,干旱胁迫 13 d 时,部分叶片呈失水枯萎状态(图 5)。该试验表明,*SIWDR204* 基因有助于提高番茄植株的抗旱能力。

3 结论与讨论

利用农杆菌侵染番茄愈伤组织获得 *SIWDR204* 基因下调的番茄转基因株系。通过观察发现 *SIWDR204* 番茄转基因株系长势比野生型茂盛,分支较野生型多,说明 *SIWDR204* 基因对番茄生长发育存在一定的影响。同时对转基因番茄进行干旱胁迫试验。通过干旱胁迫试验观察野生型与 *SIWDR204*-RNAi 转基因番茄叶片失水情况,发现野生型番茄的抗旱能力明显优于 *SIWDR204*-RNAi 转基因番茄,确定番茄 *SIWDR204* 基因对于干旱胁迫具有很好的抵御作用。亚细胞定位



注: A. *SIWDR204*-GFP 荧光分布, 其信号分布于细胞核中; B. GFP 荧光分布, 信号分布于细胞核和细胞质中

Note: The upper figure shows the fluorescence distribution of *SIWDR204*-GFP, and its signal is distributed in the nucleus; the lower picture shows the GFP fluorescence distribution, and the signal is distributed in the nucleus and cytoplasm

图3 *SIWDR204* 基因表达蛋白的亚细胞定位, 烟草叶片下表皮细胞荧光分布

Fig. 3 The subcellular localization of *SIWDR204* gene expression protein, and the fluorescence distribution of epidermal cells in tobacco leaves

结果显示, *SIWDR204* 与 *CUL4*、*DDB1* 定位相同^[3], 均定位于细胞核中, 说明 *SIWDR204* 可能与 *CUL4*、*DDB1* 发生相互作用, 共同行使功能。前期的研究结果也表明, *SIWDR204* 在 *CUL4* 泛素 E3 连接酶复合体中起到底物识别亚基的作用^[4], *SIWDR204* 蛋白与 *CUL4* 形成复合体之后, 具有相应的生物学活性, 参与植物生长发育的调控, 如修复 UV 损伤、果实发育和抵御病害等。也有研究表明 WD40 家族其他成员 (如 *SIWD6*^[9]、*SIWDR141*^[10]) 在抗旱或耐盐等方面有重要功能。

目前只对番茄 *SIWDR204* 基因的抗旱性进行研究, 在试验过程中亦发现转基因植株分支较多现象, 但未能进行深入

探究。下一步将探究转基因植株的多分支机理以及进一步研究 *SIWDR204* 基因抗旱的分子生物学机制。

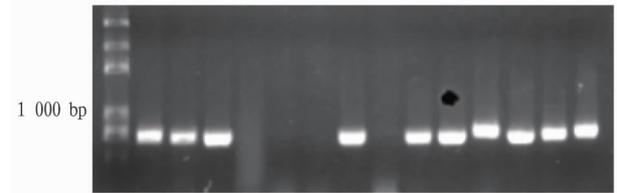
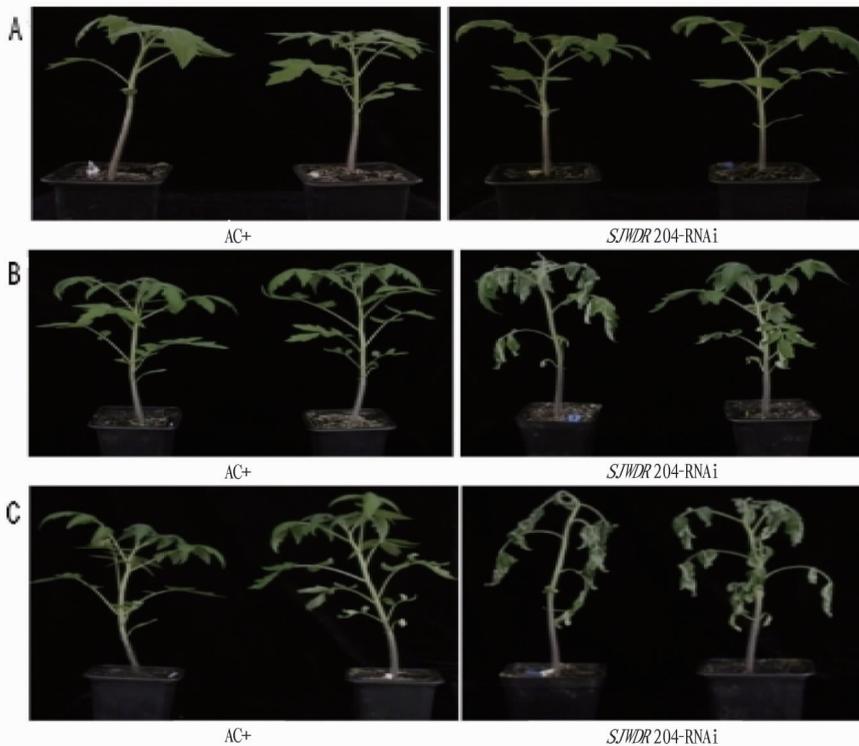


图4 *SIWDR204*-RNAi 转基因番茄阳性鉴定

Fig. 4 *SIWDR204*-RNAi transgenic tomato positive identification



注: A. 干旱胁迫 0 d; B. 干旱胁迫 8 d; C. 干旱胁迫 13 d

Note: A. Drought stress 0 days; B. Drought stress 8 days; C. Drought stress 13 days

图5 干旱胁迫下番茄 *SIWDR204*-RNAi 转基因植株与野生型植株叶片失水状况

Fig. 5 The dehydration status of tomato *SIWDR204*-RNAi transgenic plants and wild-type plants under drought stress

大,其主要访花者食蚜蝇或蜜蜂会在同一棵樟树上连续访花10朵以上,这样就会限制花粉的来源,造成同株异花授粉。此外,樟树的开花期恰值阴雨季节,温度较低,阴、雨等恶劣天气不仅影响昆虫访花频率,也影响花粉及柱头的生命力^[27]。气象因素还影响生境内的昆虫区系,进而影响樟树访花者的种类和数量^[28]。樟树的传粉昆虫种类单一,主要是食蚜蝇或蜜蜂,访问频率均较低,且食蚜蝇传粉效率低,而樟树的柱头可授期短(2 d),因此受天气的影响严重,最终影响到樟树的结实率,导致跟其开花量相比,樟树的自然结实率较低,为36.7%。

3.2 樟树繁育系统类型的判定 根据 Dafni^[19] 的标准和 Gruden^[24] 的标准可知,两指标的结果基本一致,樟树的繁育系统是兼性异交,自交亲和,这和人工授粉及访花观察的结果也是一致的。OCI 检测是从植物形态适应虫媒传粉出发,相对于 P/O 准确性更高^[29]。而人工控制授粉试验则排除了环境因素和授粉过程的差异,直接关注柱头和花粉识别对结实率的影响,为3种方法中最为有效的检测方式^[30]。从不同来源花粉授粉的结果看,辅助自花授粉处理的结实率明显低于辅助异株异花授粉处理,可见樟树存在一定的近交衰退,而自然授粉的平均结实率与异株异花授粉处理之间的统计分析结果差异显著,说明樟树自然条件下的有性繁殖系统受到花粉限制和缺少传粉昆虫的影响^[31-32]。该研究综合3种测定方法的结果,判定樟树为兼性异交,自交亲和,需要传粉者(该结果和 Shivaprasad 等^[33]对樟属 *C. sulphuratum* 的研究结果一致),且结实率受到传粉者不足的限制。后续试验将会对樟树不同授粉处理的种子萌发情况及萌发规律做进一步研究,从种子萌发层面判定樟树的近交衰退水平及繁育系统类型。

参考文献

- [1] 钟永达,胡晓建,余发新. 香樟的分子生物学研究进展[J]. 江西科学, 2015, 33(2): 184-187, 194.
- [2] 贾永娟. 塑料中溴代阻燃剂分析方法研究[D]. 北京:北京化工大学, 2011.
- [3] 龚期绳,龚伟. 樟树良种繁育及栽培利用研究进展[J]. 江西林业科技, 2014, 42(6): 20-21, 56.
- [4] 郑万钧. 中国树木志:第1卷[M]. 北京:中国林业出版社, 1983: 163-170.
- [5] 刘汉霞,张庆华,江桂斌,等. 多溴联苯醚及其环境问题[J]. 化学进展, 2005, 17(3): 554-562.
- [6] 钟永达,田晓娟,李彦强,等. 材用樟树研究进展[J]. 江西科学, 2017, 35(6): 859-863.

(上接第98页)

参考文献

- [1] 阮孟斌,彭明. 植物响应非生物胁迫相关基因的研究进展[J]. 热带生物学报, 2011, 2(4): 364-372.
- [2] 崔杰,孙西欢,马娟娟,等. 干旱胁迫及复水对作物生长和产量影响的研究[J]. 山西水利, 2011, 27(6): 31-32, 42.
- [3] 朱芸晔. 番茄 DWD 家族的生物信息学分析及生化特征[D]. 合肥:合肥工业大学, 2015.
- [4] BIEDERMANN S, HELLMANN H. WD40 and CUL4-based E3 ligases: Lubricating all aspects of life[J]. Trends in plant science, 2010, 16(1): 38-46.
- [5] ZHU Y Y, HUANG S X, MIAO M, et al. Genome-wide identification, sequence characterization, and protein-protein interaction properties of

- [7] 杨应龙. 香樟树的特征特性及栽培技术[J]. 现代农业科技, 2011(12): 213, 234.
- [8] 邱运亮. 大苗木樟树移植技术的研究[J]. 中国种业, 2004(12): 42-43.
- [9] 周新菊. 樟树良种繁育及栽培利用研究进展[J]. 广东林业科技, 2009, 25(1): 68-71.
- [10] 姚小华,任华东,王开良,等. 樟树苗期萌芽特性遗传变异初步研究[J]. 江西农业大学学报, 2001, 23(4): 538-543.
- [11] 姚小华,任华东,吴柯久,等. 樟树苗期遗传变异研究[J]. 江西农业大学学报(自然科学版), 1999, 21(3): 320-328.
- [12] 张国防,陈存及,邢建宏. 樟树干叶 DNA 提取方法的研究[J]. 江西农业大学学报, 2006, 28(1): 111-114.
- [13] 林达定. 芳香樟不同无性系主要生理性状分析与评价[D]. 福州:福建农林大学, 2011.
- [14] DOYLE J J, DICKSON E E. Preservation of plant samples for DNA restriction endonuclease analysis[J]. Taxon, 1987, 36(4): 715-722.
- [15] 张国防,陈存及,赵刚. 樟树叶油地理变异的研究[J]. 植物资源与环境学报, 2006, 15(1): 22-25.
- [16] 尤扬,刘宏,吴荣升,等. 低温胁迫对香樟幼树抗寒性的影响[J]. 广东农业科学, 2009(11): 23-25.
- [17] 王丁,姚健,薛建辉. 土壤干旱胁迫对樟树(*Cinnamomum camphora* (L.) Presl) 苗木水力结构特征的影响[J]. 生态学报, 2009, 29(5): 2725-2731.
- [18] 程许娜,王鹏霄,张静,等. 干旱胁迫对樟树幼苗叶片生理特性的影响[J]. 湖南农业科学, 2011(23): 117-120.
- [19] DAFNI A. Pollination ecology: A practical approach [M]. Oxford: Oxford University Press, 1992.
- [20] 刘淑娟,杨爱红,周华,等. 橙花瑞香的繁殖特性研究[J]. 广西植物, 2018, 38(5): 626-634.
- [21] 左丹丹,明军,刘春,等. 植物花粉生活力检测技术进展[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(16): 4742-4745.
- [22] 张超仪,耿兴敏. 六种杜鹃花属植物花粉活力测定方法的比较研究[J]. 植物科学学报, 2012, 30(1): 92-99.
- [23] 刘巧,易陈燃,郑硕理,等. 云南易危植物红马银花的传粉生物学研究[J]. 西北林业科学, 2017, 46(3): 96-102.
- [24] CRUDEN R W. Pollen-ovule ratios: A conservative indicator of breeding systems in flowering plants[J]. Evolution, 1977, 31(1): 32-46.
- [25] 凡辉. 樟树生殖生物学研究[D]. 福州:福建农林大学, 2014.
- [26] WEBB C J, LLOYD D G. The avoidance of interference between the presentation of pollen and stigmas in angiosperms. II. Herkogamy [J]. New Zealand journal of botany, 1986, 24(1): 163-178.
- [27] 钱一凡,黎云祥,陈兰英,等. 深山含笑传粉生物学研究[J]. 广西植物, 2015, 35(1): 36-41, 108.
- [28] 彭东辉,兰思仁,吴沙沙. 毛茛传粉生物学研究[J]. 热带亚热带植物学报, 2012, 20(6): 618-625.
- [29] 张建,杨发君,刘顺,等. 膜荚黄芪繁殖系统的研究[J]. 人参研究, 2009, 21(3): 17-20.
- [30] 吴佩纹,高素萍,张硕,等. 蓝花丹结实率低的传粉生物学和繁育系统初探[J]. 广西植物, 2016, 36(1): 107-113.
- [31] 黄双全,郭友好. 传粉生物学的研究进展[J]. 科学通报, 2000, 45(3): 225-237.
- [32] 戴国礼,秦晏,曹有龙,等. 黑果枸杞的花部结构及繁育系统特征[J]. 广西植物, 2013, 33(1): 126-132.
- [33] SHIVAPRASAD D, PRASANNAKUMAR C N, SOMASHEKAR R K. Reproductive biology of *Cinnamomum sulphuratum* Nees. from wet evergreen forest of Western Ghats in Karnataka [J]. Proceedings of the international academy of ecology and environmental sciences, 2015, 5(1): 7-15.

- [1] DDB1 (damaged DNA binding protein-1)-binding WD40-repeat family members in *Solanum lycopersicum* [J]. Planta, 2015, 241(6): 1337-1350.
- [2] WANG Y L, LI Q, XIE J, et al. Involvement of the single *Cul4* gene of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* in spermatogenesis [J]. Gene, 2014, 536(1): 9-17.
- [3] SCRIMA A, FISCHER E S, LINGARAJU G M, et al. Detecting UV-lesions in the genome: The modular CRL4 ubiquitin ligase does it best! [J]. FEBS Letters, 2011, 585(18): 2818-2825.
- [4] 熊桂红,刘小娟,杨靓,等. 水稻蛋白激酶 OsCIPK5 的亚细胞定位分析及 RNAi 转基因水稻的获得[J]. 福建农业学报, 2017, 32(4): 353-358.
- [5] 杨述章,高兰阳,孙晓春,等. 过量表达 *SlWD6* 基因增强番茄抗旱和耐盐功能[J]. 应用与环境生物学报, 2015, 21(3): 413-420.
- [6] 余佳,苗敏,高兰阳,等. 番茄 *SlWDR141* 基因的克隆及功能研究[J]. 中国科技论文, 2017, 12(6): 639-646.