

DOI: 10.11913/PSJ.2095-0837.2022.40524

杨霖, 尹康权, 杜芳. 川滇高山栎 *QaGDU3* 基因的克隆及遗传转化[J]. 植物科学学报, 2022, 40(4): 524-532

Yang L, Yin KQ, Du F. Cloning of *QaGDU3* gene from *Quercus aquifolioides* Rehd. et Wils. and its genetic transformation into *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. [J]. *Plant Science Journal*, 2022, 40(4): 524-532

川滇高山栎 *QaGDU3* 基因的克隆及遗传转化

杨霖¹, 尹康权^{2*}, 杜芳^{1*}

(1. 北京林业大学生态与自然保护学院, 北京 100083; 2. 北京林业大学草业与草原学院, 北京 100083)

摘要: 以川滇高山栎 (*Quercus aquifolioides* Rehd. et Wils.) 叶片为材料, 分别采用不依赖于连接反应的克隆法、农杆菌花序侵染、实时荧光定量 PCR、图像分析等方法克隆了 *QaGDU3* 基因, 获得 *QaGDU3* 转基因拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) 并分析转基因植物的表型变化, 利用生物信息学对 *QaGDU3* 蛋白与其他物种的 *GDU3* 蛋白序列间的差异和进化关系进行了分析。结果显示, *GDU3* 是种子植物特有的基因; *QaGDU3* 属于阴离子渗透酶 ArsB/NhaD 超家族成员, 可能具有氨基酸转运功能。*QaGDU3* 基因在拟南芥中过表达能够激活水杨酸 (SA) 途径中 *AtPR1*、*AtACD6*、*AtCBP60g* 和 *AtPAD4* 基因的表达, 且转基因拟南芥莲座大小随着 *QaGDU3* 基因表达量升高而变小。研究结果说明 *GDU3* 是种子植物所特有的氨基酸转运蛋白并参与植物生长发育的调控。

关键词: 川滇高山栎; 序列分析; 基因功能

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2022)04-0524-09

Cloning of *QaGDU3* gene from *Quercus aquifolioides* Rehd. et Wils. and its genetic transformation into *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.

Yang Lin¹, Yin Kang-Quan^{2*}, Du Fang^{1*}

(1. Beijing Forestry University, School of Ecology and Nature Conservation, Beijing 100083, China;

2. Beijing Forestry University, School of Grassland Science, Beijing 100083, China)

Abstract: We cloned the *QaGDU3* gene from *Quercus aquifolioides* Rehd. et Wils. and obtained transgenic *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. using ligation-independent cloning (LIC) and floral dipping transformation. We evaluated *QaGDU3* expression and analyzed phenotypic changes in transgenic plants using quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) and image analysis, respectively. We investigated the structure, sequence divergence, and evolutionary relationship of *QaGDU3* with related species. Structural analysis showed that *QaGDU3* is an acidic and unstable hydrophilic transmembrane protein. Phylogenetic analysis indicated that *GDU3* may only be present in seed plants. The qRT-PCR results showed that overexpression of the *QaGDU3* gene in transgenic plants activated the expression of the *AtPR1* (*PATHOGENESIS-RELATED GENE 1*), *AtACD6* (*ACCELERATED CELL DEATH 6*), *AtCBP60g* (*CAM-BINDING PROTEIN 60-LIKE g*), and *AtPAD4* (*PHYTOALEXIN*

收稿日期: 2022-02-06, 修回日期: 2022-03-02。

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项(2021ZY80); 内蒙古自治区种业科技创新重大示范工程项目第一课题; 国家自然科学基金(42071060, 31700314)。

This work was supported by grants from the Fundamental Research Funds for the Central Universities (2021ZY80), Science and Technology Innovation and Major Demonstration for Seed Industry Project of Inner Mongolia Autonomous Region and National Natural Science Foundation of China (42071060, 31700314)。

作者简介: 杨霖(1996-), 女, 硕士研究生, 研究方向为分子生态学(E-mail: yyyanglin777@bjfu.edu.cn)。

* 通讯作者(Authors for correspondence. E-mail: yinkq@bjfu.edu.cn; dufang325@bjfu.edu.cn)。

DEFICIENT 4) genes involved in the salicylic acid (SA) pathway. Furthermore, the rosette size of transgenic *A. thaliana* decreased with the increase in *QaGDU3* expression. These data suggest that *GDU3* may be a seed plant-specific amino acid transporter and that overexpression of *QaGDU3* can affect plant growth and development.

Key words: *Quercus aquifolioides*; Sequence analysis; Gene function

川滇高山栎 (*Quercus aquifolioides* Rehd. et Wils.) 为壳斗科栎属冬青栎组 (Section *Ilex*) 常绿乔木或灌木^[1,2], 广泛分布于我国西南地区横断山和喜马拉雅山的生物多样性热点地区, 分布海拔为 1900~4600 m, 为该地区的建群树种^[3-5]。近年来, 针对川滇高山栎的研究揭示了其对环境存在较强的局部适应性且不同谱系响应模式不同^[6,7], 但仍缺乏进一步对局部适应性背后基因功能的研究

我们基于川滇高山栎全基因组测序数据, 通过 PAML 软件^[8]的枝位点模型 (Branch-site model), 鉴定出川滇高山栎中谷氨酰胺转运蛋白基因 *QaGDU3* (*GLUTAMINE DUMPER 3*) 经历了正选择 (未发表数据), 结果显示该基因可能与植物的局部适应性相关。在模式植物拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) 中, *GDU* 蛋白参与水孔分泌氨基酸的过程, 为植物提供处理溶质, 改善营养获取和吸引其他生物的方式^[9,10]。水杨酸 (SA) 是一种重要的植物激素, 也是一种植物合成的抗病关键信号分子, 可激活病程相关基因的表达, 建立局部和系统获得性抗性, 从而对抗多种病原微生物的侵袭。Chen 等^[11]通过对甜菜曲顶卷叶病毒 (Beet severe curly top virus, BSCTV) 抗性突变体的遗传筛选, 发现 *AtGDU3* 基因能够参与 BSCTV 与宿主的相互作用, 其过量表达能够激活 SA 信号通路, 减弱 BSCTV 的 DNA 的复制, 使植物对 BSCTV 的抗性增强。可见 *GDU* 蛋白具有多功能性且与植物对环境的适应密切相关。因此, 在川滇高山栎中研究 *GDU* 基因的功能可开拓我们对这一建群树种生态适应机制的理解。

本研究采用分子克隆法从川滇高山栎基因组中分离出 *QaGDU3* 基因, 并进行生物信息学分析, 同时构建植物表达载体将其转化至拟南芥中。通过实时荧光定量方法分析不同转基因拟南芥中 *QaGDU3* 及水杨酸 (SA) 途径中的相关基因 *AtPR1* (*PATHOGENESIS-RELATED GENE 1*)^[12]、*AtACD6* (*ACCELERATED CELL DEATH 6*)^[13-15]、

AtCBP60g (*CAM-BINDING PROTEIN 60-LIKE g*)^[16] 和 *AtPAD4* (*PHYTOALEXIN DEFICIENT 4*)^[17] 的表达差异。进一步表型观察与分析发现转基因 *QaGDU3* 拟南芥 T2 代株系莲座大小随着 *QaGDU3* 基因表达量升高而变小。本研究结果旨在为后期探究川滇高山栎 *QaGDU3* 基因在植物生长过程中的分子调控机制及其作用机理研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

川滇高山栎叶片采自云南省大理白族自治州剑川县滇南镇水井村, 野生型 (Wild-type, WT) 拟南芥种子 (生态型为 Col-0) 由北京林业大学生态与自然保护学院分子生态实验室提供。

1.2 基因的克隆及表达载体的构建

1.2.1 目的片段扩增

参考川滇高山栎 CDS 序列, 设计 *QaGDU3* 基因扩增引物 Sca495 (表 1)。提取川滇高山栎干叶组织总 DNA, 进行 *QaGDU3* 基因的 PCR 扩增。PCR 反应体系参照 Premix Taq 说明书进行。反应条件为: 98℃ 变性 10 s, 54℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min; 共 30 次循环。

1.2.2 表达载体的构建和验证

以 *QaGDU3* 基因片段纯化产物为模板, 使用引物 Sca495-1 (表 1) 对目的片段添加不依赖于连接反应的克隆 (Ligation-Independent cloning, LIC) 接头。扩增的 PCR 反应条件同 1.2.1。

将回收后的产物按照 Zhang 等^[18]的方法与 pJG081 载体 (清华大学刘玉乐教授提供) 进行 LIC 克隆, 转化 DH5α 大肠杆菌感受态细胞, 转化后进行菌落 PCR 检测。

1.2.3 载体转化农杆菌 EHA105 及验证

将 pJG081-*QaGDU3* 质粒通过冻融法导入感受态根癌农杆菌 EHA105 中, 挑取单克隆以引物 Sca495-1 进行菌落 PCR 检测阳性转化菌株。

表 1 引物信息
Table 1 Primer information

引物名称 Primer	上游引物(5' - 3') Forward primer sequence	下游引物(5' - 3') Reverse primer sequence	片段长度 Fragment length / bp
Sca495	AAAGAAAGCAATGGCCGCAGC	GAGCCTGAGGTCTCATTGGCTTG	541
Sca495-1	CGACGACAAGACCGTGACCATGGC- CGCAGCAAGAGAGCC	GAGGAGAAGAGCCGTTTCATTGGCTT- GAGCCTCTCTCTCTC	519
UBQ5-RT	ACACCAAGCCGAAGAAGA	TCCACAGTTGCGTTAGG	128
Sca495-RT	AAGCCTAATGATTCGCATAA	AGAAGATGACCTACTTGACA	116
PR1-RT	GTAGGTGCTCTTGTCTTC	CTCTTAGTTGTTCTGCGTAG	153
ACD6-RT	TTGGTGAATGAGTAATGG	TGAAGAATTGAATCTCTGTAT	103
PCC1-RT	AATTGGTTATCCGACTAGAGA	ACAACCTATTATGGCTTCG	100
WAK1-RT	CCTTGTGGTCTATGAGTTC	GCGACTTCTATTGCTATCTT	115

1.3 QaGDU3 基因的生物信息学分析

使用 ExPASy ProtParam 和 ProtScale^[19] 软件推测蛋白质的基本理化性质并预测蛋白亲水性, TMHMM v2.0^[20] 软件进行蛋白质跨膜区的预测。采用 SignalP Server v4.1^[21] 软件预测蛋白质信号肽, Predict Protein^[22] 软件预测蛋白质的二级结构, Robetta^[23] 软件预测蛋白质三级结构, ProtComp v9.0 软件进行蛋白质亚细胞定位预测, MotifScan^[24] 软件进行蛋白质的功能位点预测。使用 NCBI conserved domains 在线网站 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 及 BlastP 程序 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行蛋白质结构域预测和蛋白序列比对, 通过 DNAMAN v9.0 软件进行多重序列比对, MEME v5.4.1^[25] 软件查找 Motif。

通过 Phytozome v13^[26] 在线网站 (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/blast-search>) 查找不同物种中 QaGDU3 的同源序列。选取种子植物中不同科且比对结果一致性较高的 24 个物种, 包括裸子植物: 西部红柏 (*Thuja plicata* Donn. ex D. Don.) 和云杉 (*Picea sitchensis* (Bong.) Carr.); 单子叶植物: 二穗短柄草 (*Brachypodium distachyon* (L.) Beauv.)、玉米 (*Zea mays* L.)、水稻 (*Oryza sativa* L.) 和高粱 (*Sorghum bicolor* (L.) Moench); 双子叶植物: 拟南芥、葡萄 (*Vitis vinifera* L.)、毛果杨 (*Populus trichocarpa* Torr. & Gray)、无油樟 (*Amborella trichopoda* Baill.)、蓝花蔺斗菜 (*Aquilegia coerulea* James)、番茄 (*Solanum lycopersicum* L.)、大豆 (*Glycine max* (L.) Merr.)、柠檬桉 (*Corymbia citriodora* (Hook.) K. D. Hill & L. A. S. Johnson)、菘蓝 (*Isatis tincto-*

ria L.)、陆地棉 (*Gossypium hirsutum* L.)、柑橘 (*Citrus clementina* hort. ex Tanaka)、豇豆 (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)、可可 (*Theobroma cacao* L.)、美国山核桃 (*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch)、美洲板栗 (*Castanea dentate* (Marsh.) Borkh.)、欧洲栓皮栎 (*Quercus suber* L.)、加州白栎 (*Quercus lobata* Née) 和有柄栎 (*Quercus robur* L.) 的 QaGDU3 的同源序列, 利用 MEGA7 v7.0.21^[27] 软件中的最大似然法 (Maximum likelihood, ML) 构建系统进化树, 参数设置为 Bootstrap method 和 500 bootstrap。

1.4 QaGDU3 基因遗传转化拟南芥的鉴定

1.4.1 拟南芥种植及花序轴浸染法遗传转化

将保存于 4°C 的野生型拟南芥 (WT) 种子播种于土: 蛭石: 珍珠岩为 3: 1: 1 的基质中, 待其抽薹开花后进行花序侵染。挑取活化的含 pJG081-QaGDU3 质粒的单克隆阳性农杆菌 EHA105 菌株至分别含有 50 μg/mL Kan 和 Rif 的新鲜农杆菌 YEB 液体培养基中培养并收集沉淀。沉淀使用转化液 (MS, 5% 蔗糖, 50 μL/L BREAK-THRU[®] S 233 (Evonik)) 重悬。将待转化的拟南芥植株剪去已经开过的花与长角果, 将其花蕾部分浸入含有重悬后的转化液中浸泡 30 s。水平置于 22°C 黑暗条件下培养 24 h 后将植株正立置于正常光照条件下继续培养, 待种子成熟后收集拟南芥种子。

1.4.2 转基因拟南芥植株的筛选和鉴定

将保存于 4°C 的 T0 代拟南芥种子取出后使用消毒液 (10% CLOROX 和 0.05% 吐温) 消毒 15 min, 无菌水洗 3~5 次后, 转移至含 25 mg/L 潮霉素的 1/2 MS 固体平板培养基上筛选, 得到转

基因植株(T1代), 将其单株移植到基质中, 在22℃、相对湿度80%的条件下培养。待1月龄时使用CTAB法提取叶片DNA, 以Sca495-1为引物(表1)进行PCR检测阳性植株。

1.5 qRT-PCR测定 *QaGDU3* 及水杨酸途径中相关基因的表达量

使用总RNA提取试剂盒提取阳性植株叶片的RNA。根据引物UBQ5-RT、Sca495-RT、PR1-RT、ACD6-RT、PCC1-RT和WAK1-RT(表1), 进行qRT-PCR分析。反应程序为: 95℃预变性2 min, 95℃变性15 s, 60℃退火30 s, 72℃延伸30 s; 共40次循环。实验设计3个重复, 以*At-UBQ5*为内参基因, 对*QaGDU3*基因及水杨酸途径中相关基因*AtPR1*、*AtACD6*、*AtCBP60g*和*AtPAD4*的表达量进行测定, 通过溶解曲线确定扩增产物的特异性。

1.6 转基因拟南芥植株莲座大小测定

按照*QaGDU3*基因表达量测定结果, 选择*QaGDU3*基因表达量高、中和低3种类型的植株进行莲座大小测定。待T1代转基因拟南芥种子成熟后, 收集种子并消毒, 在含25 mg/L潮霉素的1/2 MS的固体平板培养基上筛选。待其长至17 d时, 每个株系分别随机选取12株阳性植株进行拍照, 使用Image J v1.53软件^[28]中加载的RosetteTracker^[29]分别对每个植株的莲座直径进行测量, 并通过SPASS v22.0进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 *QaGDU3* 基因克隆及生物信息学分析

研究结果显示, 川滇高山栎DNA通过PCR扩增, 在500~700 bp有1条很明显的特异条带, PCR产物经Sanger测序证实该条带为*QaGDU3*基因目的片段。

2.1.1 蛋白质基本性质及结构预测

*QaGDU3*蛋白(GenBank号: ON843768)具有172个氨基酸(图1), 其分子量为18.58 kD, 理论等电点为4.79, 为具亲水性的不稳定酸性蛋白(图2: A)。 *QaGDU3*蛋白N末端并没有信号肽(图2: B)。 *QaGDU3*蛋白有1个跨膜螺旋域(图2: C), 表明其为跨膜蛋白。 *QaGDU3*蛋白可能存在于细胞质膜中。其具有

14个蛋白质-蛋白质作用位点, 二级结构由26.2%的 α -螺旋、2.3%的延伸链和71.5%的无规卷曲构成(图2: D)。

*QaGDU3*蛋白属于阴离子渗透酶ArsB/NhaD超家族成员。该蛋白具有3个天冬酰胺-连接糖基化位点(ASN-glycosylation site)、4个CK2-磷酸化位点(CK2-phospho site)、3个肉豆蔻基位点(Myristyl site)和8个PKC-磷酸化位点(PKC-phospho site)。

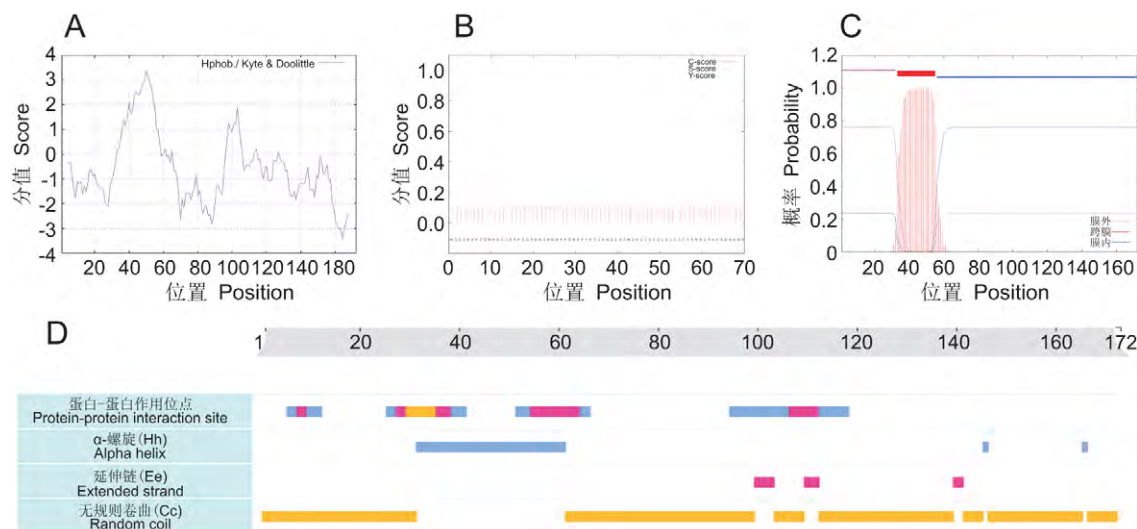
	10	20	30	40	50	60
1	ATGGCCGACAGCAAGAGAGCCATTCAACATGAATGAAACAGCAAGATCTCCAACAGGGAGC					
1	M A A A R E F F N M N E T A R S F T G S					
	70	80	90	100	110	120
61	ATGGCCACACACACACACTCACCATTGCCATTCTCTGTCGCATACCTGTTTGGTGGGCTG					
21	M G T Q Q H S P W H S F V P Y L F G G L					
	130	140	150	160	170	180
121	GCAGCCATGTGGTCTCATTTGCTTTGCTTCTCTGTCATGCTGCTCTACTGGAGA					
41	A A M L G L I A F A L L I L A C S Y W R					
	190	200	210	220	230	240
181	CTCTCTGGTTCCTTGACGGAGAAGGCAATTCAGAGAGACCTTGAGGCTGGCCAGAT					
61	L S G F L D G E G N S E R D L E A G Q D					
	250	260	270	280	290	300
241	GGTGGCCCAAGCCTAATGATTCGCATAAACACACCACAGTGTGGAAGAGAGTCTCTG					
81	G E A K P N D S H K Q P P V F E E K F L					
	310	320	330	340	350	360
301	GTGATTATGGCTGGTGGGCTAAGCCACGATATTGGCTACCCCATGTCAAGTAGGTCA					
101	V I M A G E A K P T Y L A T P M S S R S					
	370	380	390	400	410	420
361	TCTTCTTCGGTGATACTACTTGTAGCAGCTGTGGGAGCGAGAAGTGCACAGTCTGTG					
121	S S F G D T T C S S C G S E K S D K S V					
	430	440	450	460	470	480
421	GAAATGACTGAGACAGACAGCCCAAGCAGCAGATACCAAGTACACACAAAGTGCAC					
141	E M T E T E T A K Q A Q I P V P Q Q S D					
	490	500	510			
481	AACACCGAGCCGAGAGAGAGAGGCTCAAGCCAAATGA					
161	N N E S E R E R G S S Q *					

图1 川滇高山栎 *QaGDU3* 基因及其编码蛋白序列信息
Fig. 1 Sequence information of *QaGDU3* from *Quercus aquifolioides*

2.1.2 *QaGDU3* 蛋白同源性分析

*QaGDU3*氨基酸序列与拟南芥*AtGDU3*(AT5G57685.1)及近缘物种加州白栎*QIGDU3*(rna-XM_031080093.1)、欧洲栓皮栎*QsGDU3*(rna-XM_024054781.1)和有柄栎*QrGDU3*(Qrob_T0462130.2)的氨基酸序列平均一致度为86.2%。它们的氨基酸序列有2处保守的结构域, 且具有GDU家族特有的“VIMAG”结构域^[30], 其中4个栎属物种特有1处保守的Motif3(图3)。

研究发现, 它们的三级结构也基本相似, *QaGDU3*、*QIGDU3*、*QsGDU3*和*QrGDU3*均具有3个 α -螺旋, *AtGDU3*具有2个 α -螺旋。4个栎属物种的蛋白三级结构N末端均形成 α -螺旋, 而*AtGDU3*蛋白N末端未形成 α -螺旋(图4)。



A: QaGDU3 蛋白亲水性。B: QaGDU3 蛋白信号肽。C: QaGDU3 蛋白跨膜结构。D: QaGDU3 蛋白二级结构及蛋白作用位点。
 A: QaGDU3 hydrophobicity. B: QaGDU3 signal peptide. C: QaGDU3 transmembrane structure. D: QaGDU3 secondary structure and interaction site.

图 2 川滇高山栎 QaGDU3 蛋白基本性质及结构预测

Fig. 2 Basic properties and structure prediction of QaGDU3 from *Quercus aquifolioides*

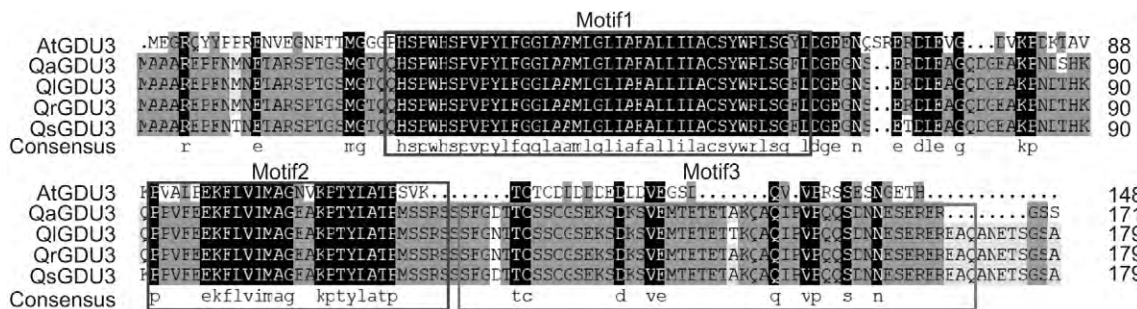
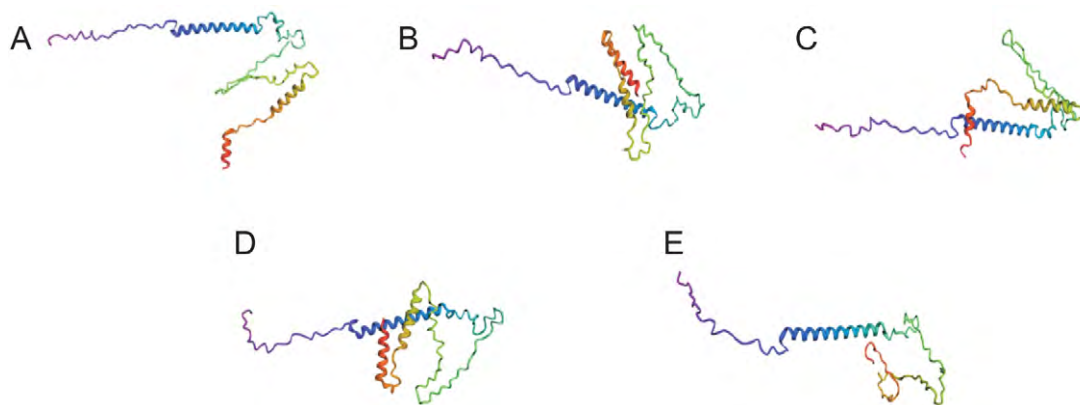


图 3 QaGDU3 与 QIGDU3、QrGDU3、QsGDU3 和 AtGDU3 蛋白的多序列比对
 Fig. 3 Multiple sequence alignment and motif prediction of QaGDU3, QIGDU3, QrGDU3, QsGDU3, and AtGDU3 proteins



红色到紫色递进的方向为蛋白质 N 端到 C 端。
 Rainbow coloring shows orientation of protein chain, with red as N terminus.

图 4 QaGDU3 (A) 与 QIGDU3 (B)、QrGDU3 (C)、QsGDU3 (D) 及 AtGDU3 (E) 蛋白三维结构
 Fig. 4 Comparison of tertiary structure predictions of QaGDU3 (A), QIGDU3 (B), QrGDU3 (C), QsGDU3 (D) and AtGDU3 proteins (E)

2. 1. 3 *QaGDU3* 蛋白系统进化树构建

系统发育分析结果表明, *GDU3* 最早出现在种子植物中。*QaGDU3* 与 *QsGDU3* 亲缘关系最近, 与云杉(*ABK21085.1*)的亲缘关系最远, 与其近缘物种 *QlGDU3*、*QsGDU3* 和 *QrGDU3* 聚在一支, 且进化时间较为一致(图 5)。

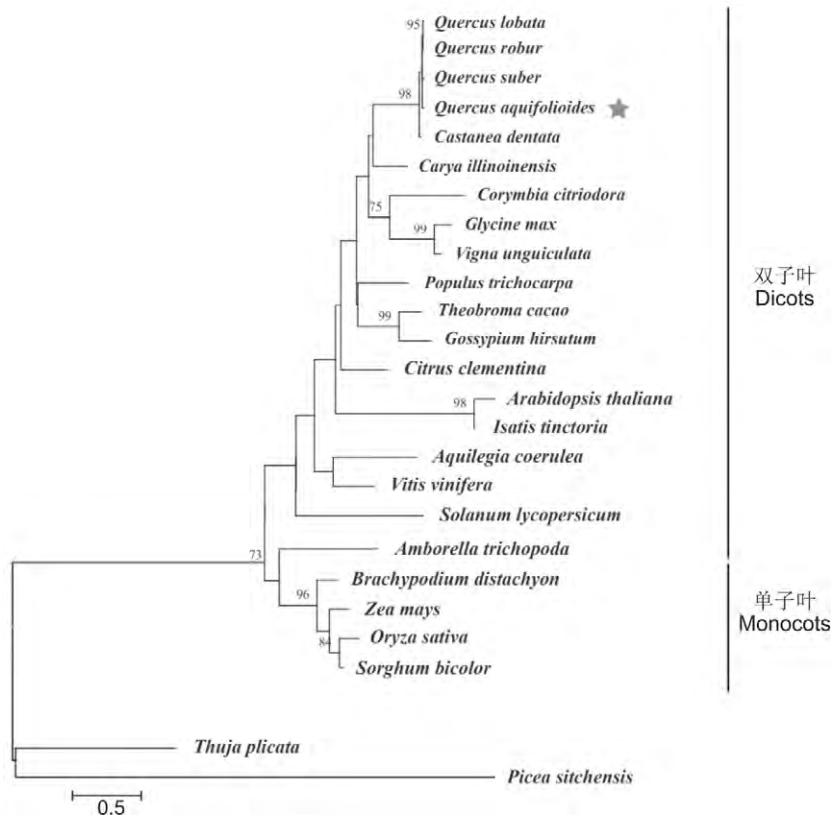
2. 2 *QaGDU3* 基因遗传转化拟南芥鉴定

本研究收获经花序侵染法遗传转化的拟南芥 T0

代株系种子后, 通过潮霉素进行抗性筛选, 总共获得 33 株 T1 代抗性幼苗, 阳性表达率达 0.375%。将 T1 代拟南芥抗性幼苗培养至 1 月龄时, 鉴定阳性植株。经检测, 33 株 T1 代拟南芥均含有目的基因。

2. 3 *QaGDU3* 基因表达量与莲座大小分析

转基因拟南芥 *QaGDU3* 基因表达水平定量分析结果表明, 3 号转基因拟南芥株系表达量最高, 2 号转基因拟南芥株系表达量最低(图 6)。



分支长度表示进化距离, 节点处的数字表示支持率。
Length of each branch represents evolutionary distance, and number at each node indicates bootstrap (BS) value.

图 5 *GDU3* 蛋白的系统进化树
Fig. 5 Phylogenetic tree of *GDU3* protein

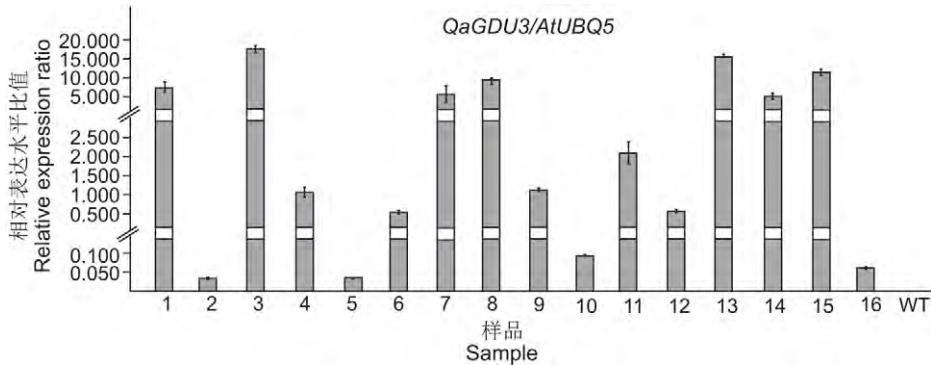


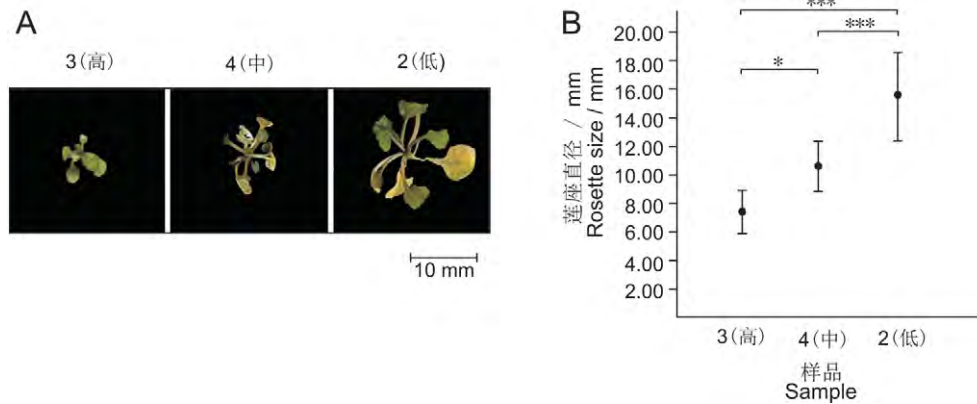
图 6 *QaGDU3* 与 *AtUBQ5* 基因的相对表达量
Fig. 6 Relative expression ratio of *QaGDU3* to *AtUBQ5* gene

观察并统计转基因拟南芥表达量高(3号株系)、中(4号株系)、低(2号株系)的株系莲座大小(图7: A), 结果发现, 2号转基因拟南芥株系莲座叶直径最大, 3号转基因拟南芥株系莲座叶直径最小, 且莲座叶直径随着 *QaGDU3* 基因表达量升高而变小(图7: B)。

2.4 水杨酸途径相关基因的表达量分析

转基因拟南芥 *QaGDU3* 表达量高(3号株系)、

中(4号株系)、低(2号株系) 3个株系中 *QaGDU3* 表达量最低的2号株系的 *AtPR1*、*AtACD6*、*AtCBP60g* 和 *AtPAD4* 的表达水平均与野生型拟南芥相当。随 *QaGDU3* 表达量升高, 转基因拟南芥中 *AtPR1*、*AtACD6*、*AtCBP60g* 和 *AtPAD4* 的表达水平均呈升高趋势。说明 *QaGDU3* 的过量表达会进一步激活水杨酸途径相关基因的表达(图8)。



* , $P < 0.05$; *** , $P < 0.001$.

图7 生长 17 d 的 T2 代转基因拟南芥幼苗 (A) 及其莲座直径统计 (B)

Fig. 7 T2 transgenic *Arabidopsis thaliana* seedlings grown on 1/2 MS medium with hygromycin for 17 d (A) and their rosette size statistics (B)

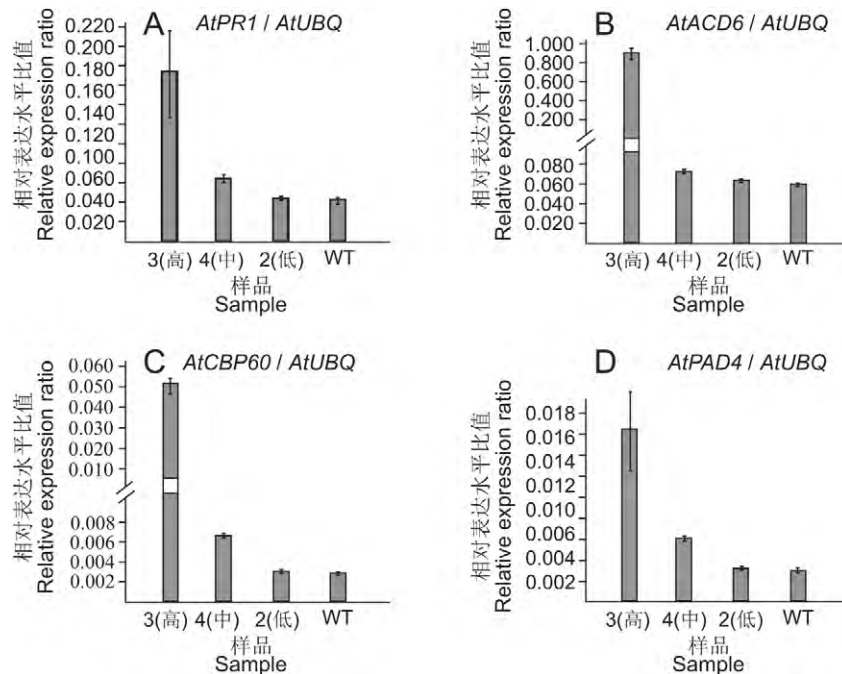


图8 *AtPR1* (A)、*AtACD6* (B)、*AtCBP60g* (C) 和 *AtPAD4* (D) 与 *AtUBQ5* 基因的相对表达量

Fig. 8 Relative expression ratios of *AtPR1* (A), *AtACD6* (B), *AtCBP60g* (C), and *AtPAD4* (D) to *AtUBQ5* gene

3 讨论

本研究从川滇高山栎中克隆获得 *QaGDU3* 基因, 通过结构域功能分析发现 *QaGDU3* 蛋白属于跨膜蛋白, 具有保守的“VIMAG”蛋白结构域, 可能附着在细胞膜两侧与位于膜上的蛋白质相互作用。*QaGDU3* 蛋白属于阴离子渗透酶 *ArsB/NhaD* 超家族成员, 可横跨生物膜转移钠、砷酸盐、铍酸盐、硫酸盐、有机阴离子和氨基酸; 既能独立作为膜转运蛋白, 也可作为 ATP 驱动的阴离子泵通道形成亚基发挥作用^[31]。*QaGDU3* 蛋白主要由 α -螺旋和无规卷曲构成, 与其近缘物种 *QIGDU3*、*QRGDU3*、*QSGDU3* 的蛋白序列有 3 个共有的 Motif, 表明 *GDU3* 蛋白序列在栎属植物中有较高的保守性。4 个栎属植物的 *GDU3* 蛋白与 *AtGDU3* 蛋白 N 端的 24 个氨基酸序列差异导致了栎属植物的蛋白三维结构 N 末端均形成 α -螺旋, 而 *AtGDU3* 蛋白 N 末端未形成 α -螺旋。不同物种 *GDU3* 蛋白的系统进化分析进一步表明, 4 个栎属植物的 *GDU3* 蛋白聚在一支, 且进化时间较为一致, 说明其具有共同的起源; 同时, *GDU3* 蛋白从种子植物中开始出现, 在单子叶中的分化时间早于双子叶, 与 Pratelli 等^[32] 研究结论一致。

本研究通过 qRT-PCR 分析验证了转基因植物 *QaGDU3* 基因的表达量, 同时结合转基因拟南芥莲座大小测量结果, 发现 *QaGDU3* 转基因拟南芥 T2 代株系莲座叶直径随着 *QaGDU3* 基因表达量升高而变小。在拟南芥中, 游离氨基酸含量随着 *AtGDU3* 基因过表达强度的增加而增加, 同时植株大小随着 *AtGDU3* 基因的 mRNA 积累而减小^[32], 预示着 *QaGDU3* 可能与 *AtGDU3* 具有相似的功能。

QaGDU3 转基因拟南芥中与 SA 途径相关基因的表达分析结果表明, *QaGDU3* 的超量表达同时激活了 3 个 SA 累积正调节基因 *AtACD6*、*AtCBP60g* 和 *AtPAD4* 的表达, 由此可见 *QaGDU3* 很可能是通过影响 SA 在植物体内的积累水平来调节水杨酸信号通路。因此, 我们推断在川滇高山栎中, *QaGDU3* 可能通过正向调控 SA 的水平来激活 SA 信号通路, 从而帮助植物有效地抵御病原物的侵害, 增强其对极端环境的适应性。

致谢: 感谢云南大学邓敏教授提供川滇高山栎种子; 清华大学刘玉乐教授提供 LIC 载体; 香港浸会大学的王益

平博士对本研究提供建议; 北京林业大学赵惠恩教授提供了部分实验仪器。

参考文献:

- [1] Denk T, Grimm GW, Manos PS, Deng M, Hipp AL. An updated infrageneric classification of the oaks: review of previous taxonomic schemes and synthesis of evolutionary patterns [M]//GilPelegrín E, Peguero-Pina JJ, Sancho-Knapik D, eds. Oaks Physiological Ecology. Exploring the Functional Diversity of Genus *Quercus* L.. Switzerland: Springer, 2018: 13–38.
- [2] 王国平, 徐阿生. 川滇高山栎研究综述[J]. 四川林业科技, 2008, 29(2): 23–29.
Wang GY, Xu AS. A review of researches on *Quercus aquifolioides*[J]. *Journal of Sichuan Forestry Science and Technology*, 2008, 29(2): 23–29.
- [3] Meng HH, Su T, Gao XY, Li J, Jiang XL, et al. Warm-cold colonization: response of oaks to uplift of the Himalaya-Hengduan Mountains[J]. *Mol Ecol*, 2017, 26(12): 3276–3294.
- [4] Feng L, Zheng QJ, Qian ZQ, Yang J, Zhang YP, et al. Genetic structure and evolutionary history of three alpine sclerophyllous oaks in east himalaya-hengduan mountains and adjacent regions[J]. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 1688.
- [5] Du FK, Hou M, Wang W, Mao K, Hampe A. Phylogeography of *Quercus aquifolioides* provides novel insights into the Neogene history of a major global hotspot of plant diversity in south-west China[J]. *J Biogeogr*, 2017, 44(2): 294–307.
- [6] Du FK, Wang T, Wang Y, Ueno S, Lafontaine G. Contrasted patterns of local adaptation to climate change across the range of an evergreen oak, *Quercus aquifolioides*[J]. *Evol Appl*, 2020, 13(9): 2377–2391.
- [7] Liu K, Qi M, Du FK. Population and landscape genetics provide insights into species conservation of two evergreen oaks in Qinghai-Tibet plateau and adjacent regions [J]. *Front Plant Sci*, 2022, 13: 858526.
- [8] Yang Z. PAML 4: phylogenetic analysis by maximum likelihood[J]. *Mol Biol Evol*, 2007, 24(8): 1586–1591.
- [9] Pilot G, Stransky H, Bushey DF, Pratelli R, Ludewig U, et al. Overexpression of *GLUTAMINE DUMPER1* leads to hypersecretion of glutamine from hydathodes of *Arabidopsis* leaves[J]. *Plant Cell*, 2004, 16(7): 1827–1840.
- [10] Pratelli R, Pilot G. Altered amino acid metabolism in glutamine dumper1 plants [J]. *Plant Signal Behav*, 2007, 2(3): 182–184.
- [11] Chen H, Zhang Z, Teng K, Lai J, Zhang Y, et al. Up-regulation of *LSB1/GDU3* affects geminivirus infection by activating the salicylic acid pathway[J]. *Plant J*, 2010, 6(21): 12–23.

- [12] He ZU, He D, Kohorn BD. Requirement for the induced expression of a cell wall associated receptor kinase for survival during the pathogen response [J]. *Plant J*, 1998, 14(1) : 55–63.
- [13] Dong X. The role of membrane-bound ankyrin-repeat protein ACD6 in programmed cell death and plant defense [J]. *Sci STKE*, 2004, 2004(221) : e6.
- [14] Lu H, Rate DN, Song JT, Greenberg JT. ACD6, a novel ankyrin protein, is a regulator and an effector of salicylic acid signaling in the *Arabidopsis* defense response [J]. *Plant Cell*, 2003, 15(10) : 2408–2420.
- [15] Lu H, Liu Y, Greenberg JT. Structure-function analysis of the plasma membrane-localized *Arabidopsis* defense component ACD6 [J]. *Plant J*, 2005, 44(5) : 798–809.
- [16] Huang W, Wu Z, Tian H, Li X, Zhang Y. *Arabidopsis* CALMODULIN-BINDING PROTEIN 60b plays dual roles in plant immunity [J]. *Plant Communications*, 2021, 2(6) : 100213.
- [17] Liu H, Li J, Xu Y, Hua J, Zou B. ISWI chromatin remodeling factors repress PAD4-mediated plant immune responses in *Arabidopsis* [J]. *Biochem Bioph Res Co*, 2021, 583: 63–70.
- [18] Zhang H, Liu Y. VIGS assays [J]. *Bio-protocol*, 2014, 4(5) : e1057.
- [19] Wilkins MR, Gasteiger E, Bairoch A, Sanchez JC, Williams KL, et al. Protein identification and analysis tools in the ExpASY server [J]. *Methods Mol Biol*, 1999, 112: 531–552.
- [20] Moller S, Croning MD, Apweiler R. Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions [J]. *Bioinformatics*, 2001, 17(7) : 646–653.
- [21] Nielsen H. Predicting secretory proteins with SignalP [J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1611: 59–73.
- [22] Bernhofer M, Dallago C, Karl T, Satagopam V, Heinzinger M, et al. PredictProtein—predicting protein structure and function for 29 years [J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(W1) : W535–W540.
- [23] Yang J, Anishchenko I, Park H, Peng Z, Ovchinnikov S, et al. Improved protein structure prediction using predicted interresidue orientations [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117(3) : 1496–1503.
- [24] Pagni M, Ioannidis V, Cerutti L, Zahn-Zabal M, Jongeneel CV, et al. MyHits: improvements to an interactive resource for analyzing protein sequences [J]. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35: W433–W437.
- [25] Bailey TL, Johnson J, Grant CE, Noble WS. The MEME suite [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(W1) : W39–W49.
- [26] Goodstein DM, Shu S, Howson R, Neupane R, Hayes RD, et al. Phytozome: a comparative platform for green plant genomics [J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40: D1178–D1186.
- [27] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets [J]. *Mol Biol Evol*, 2016, 33(7) : 1870–1874.
- [28] Abramoff MD, Magalhães PJ, Ram SJ. Image Processing with ImageJ [J]. *Biophotonics Int*, 2004, 11(7) : 36–43.
- [29] De Vylder J, Vandenbussche F, Hu Y, Philips W, van der Straeten D. Rosette tracker: an open source image analysis tool for automatic quantification of genotype effects [J]. *Plant Physiol*, 2012, 160(3) : 1149–1159.
- [30] Pratelli R, Pilot G. The plant-specific VIMAG domain of Glutamine Dumper1 is necessary for the function of the protein in *Arabidopsis* [J]. *FEBS Lett*, 2006, 580(30) : 6961–6966.
- [31] Kuroda M, Dey S, Sanders OI, Rosen BP. Alternate energy coupling of ArsB, the membrane subunit of the Ars anion-translocating ATPase [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(1) : 326–331.
- [32] Pratelli R, Voll LM, Horst RJ, Frommer WB, Pilot G. Stimulation of nonselective amino acid export by glutamine dumper proteins [J]. *Plant Physiol*, 2010, 152(2) : 762–773.

(责任编辑: 周媛)