

巨桉 *EgrCIN1* 响应非生物逆境的分析

李芳燕, 夏晓雪, 吴梦洁, 洪家都, 程龙军

(浙江农林大学 林业与生物技术学院, 浙江 杭州 311300)

摘要: 【目的】对巨桉 *Eucalyptus grandis* 中特有的低温响应基因 *EgrCIN1* (Eucgr.B02882) 序列及其表达特征进行分析, 并探索其在植物低温响应中发挥的功能, 以丰富桉树抗寒基因资源。【方法】利用生物信息学手段分析 *EgrCIN1* 基因、蛋白序列的特征和启动子上的顺式作用元件信息; 采用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 技术分析 *EgrCIN1* 在巨桉不同组织及 4 °C 不同时间、干旱、300 mmol·L⁻¹ 氯化钠 (NaCl)、100 μmol·L⁻¹ 脱落酸 (ABA) 和 100 μmol·L⁻¹ 茉莉酸甲酯 (MeJA) 处理下植株叶片中的表达特征; 通过 *EgrCIN1*::GFP 载体瞬时转化烟草 *Nicotiana tabacum* 进行亚细胞定位; 并构建 CaMV35S 启动子驱动的过表达载体异源转化拟南芥 *Arabidopsis thaliana*, 获得 3 个转基因纯合株系后, 对其进行 -6 °C 低温、0.5 μmol·L⁻¹ ABA 等逆境处理, 分析 *EgrCIN1* 在低温胁迫响应中发挥的功能。【结果】*EgrCIN1* 是巨桉中特有的基因, 不含内含子, 没有跨膜结构, 启动子含有多个与逆境响应相关的顺式作用元件。该基因在茎和叶片中都有表达, 而在根中不表达; 在叶片中其表达受低温处理强烈诱导; 同时, 干旱、高盐和 ABA 等非生物逆境因子也能诱导叶片中 *EgrCIN1* 的表达, 其编码蛋白被定位在叶绿体中。拟南芥中 *EgrCIN1* 过表达转基因株系对低温耐受性提高, 对外源 ABA 敏感程度增强。【结论】*EgrCIN1* 是在叶绿体表达, 并可能通过 ABA 依赖途径参与植物低温胁迫响应, 提高植物对低温的抗性。图 8 表 2 参 27

关键词: 巨桉; *EgrCIN1*; 低温响应; 叶绿体; 脱落酸

中图分类号: S722.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 2095-0756(2022)06-1194-09

Response of *Eucalyptus grandis* *EgrCIN1* to abiotic stress

LI Fangyan, XIA Xiaoxue, WU Mengjie, HONG Jiadu, CHENG Longjun

(College of Forestry and Biotechnology, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China)

Abstract: [Objective] The objective is to analyze the sequence and expression characteristics of *EgrCIN1* (Eucgr.B02882), a unique low temperature response gene in *Eucalyptus grandis*, and to explore its function in plant low temperature response, so as to enrich gene resources to cold resistance. [Method] Bioinformatics methods were used to analyze the characteristics of *EgrCIN1* gene, protein sequence and cis-acting elements on the promoter. The expression pattern of *EgrCIN1* in different tissues, at 4 °C in different time, under drought condition, under treatment of 300 mmol·L⁻¹ NaCl, 100 μmol·L⁻¹ ABA and 100 μmol·L⁻¹ MeJA were analyzed by RT-qPCR method. Subcellular localization of *EgrCIN1* was completed by transient transformation of *Nicotiana tabacum* with *EgrCIN1*::GFP vector. Besides, an overexpression vector driven by CaMV35S promoter was constructed and transformed into *Arabidopsis thaliana*. Three transgenic lines were obtained and treated with low temperature (-6 °C) and ABA (0.5 μmol·L⁻¹) to analyze the function of *EgrCIN1* in response to low temperature stress. [Result] *EgrCIN1* was a unique gene induced by low temperature in *E. grandis*. It did not contain introns and had no transmembrane structure. The promoter contained multiple cis acting elements related to stress response. The gene was mainly expressed in leaves and stems, but not in roots.

收稿日期: 2022-05-11; 修回日期: 2022-07-04

基金项目: 浙江省科技厅重大科技专项 (2021C02070-6)

作者简介: 李芳燕 (ORCID: 0000-0003-0037-1197), 从事林木抗逆育种研究。E-mail: 13598072239@163.com。通信

作者: 程龙军 (ORCID: 0000-0001-8994-8006), 副教授, 博士, 从事植物分子遗传学研究。E-mail:

ljcheng@zju.edu.cn

Moreover, its expression in leaves was strongly induced by low temperature treatment. Meanwhile, abiotic stress factors such as drought, high salt and ABA could also induce *EgrCIN1* expression in leaves. The encoded protein of *EgrCIN1* was localized in chloroplasts. In Arabidopsis, *EgrCIN1* overexpression transgenic lines were more tolerant to low temperature and more sensitive to exogenous ABA. [Conclusion] *EgrCIN1* is expressed in chloroplasts and may participate in plant cold stress response possibly through ABA-dependent pathway to improve plant cold resistance. [Ch, 8 fig. 2 tab. 27 ref.]

Key words: *Eucalyptus grandis*; *EgrCIN1*; cold response; chloroplast; ABA

低温是限制植物生长和发育的主要逆境因子。较低的温度会损伤植物细胞的膜结构, 抑制酶活性, 诱导活性氧产生, 破坏代谢平衡等, 引起植物生长受阻、早衰甚至死亡^[1]。世界上只有三分之一的陆地面积温度在冰点以上, 却有 42% 的陆地会经历 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下的低温, 因此低温也是限制植物地理分布的重要因素^[2]。为了应对低温胁迫, 植物在长期进化过程中逐渐形成了低温适应机制, 用来提高植物耐受低温逆境的能力, 降低低温胁迫伤害。在代谢层面上, 植物可以通过提高可溶性糖、游离脯氨酸等小分子渗透调节物, 以及抗氧化酶过氧化物酶 (POD)、超氧化物歧化酶 (SOD) 和过氧化氢酶 (CAT) 等的活性来增加对低温的耐受力^[3]。分子层面上, 低温下植物细胞膜的流动性降低, 膜蛋白的构象发生改变, 进而使膜刚性增加, 细胞膜的这些物理变化为膜上低温受体对低温的感受提供了基础。植物细胞的受体感受低温信号后, 通过提高细胞质中的钙离子 (Ca^{2+}) 水平, 并与 Ca^{2+} 结合蛋白结合, 作为二级信号激活抗寒相关转录因子, 调控耐寒相关基因, 实现低温胁迫响应^[4]。目前, 低温响应的分子调控途径中, ICE1-CBF-COR 途径被认为是植物响应耐寒胁迫的主要途径^[5]。低温通过 Ca^{2+} 信号引发蛋白激酶磷酸化脱落酸 (ABA) 信号调控途径中的蛋白激酶 OST1 (open stomata1, 气孔开放 1)/SnRK2.1 (SNF1-related protein kinase 2.1, SNF1 相关蛋白激酶 2.1), 磷酸化的 OST1 与 bHLH 类转录因子 ICE1 结合并将其磷酸化, 稳定 ICE1 的活性, 使其稳定结合在 CBF (C-repeat binding factor, C-重复结合因子) 基因上, 激活它们的表达。CBF 转录因子会进一步启动冷响应相关基因 CORs (cold responsive, 低温响应), 如编码渗透调节物质合成酶以及低温保护蛋白 COR、LT1 (low temperature 1, 低温 1) 和 CIN (cold-induced, 冷诱导) 基因等, 提高植物的低温适应性^[6-7]。除此之外, 植物激素^[8] 和 ROS (reactive oxygen species, 活性氧)^[9] 也参与了植物低温响应的调控。

植物细胞中, 低温的响应和调控主要发生在细胞质和细胞核中, 但叶绿体在低温响应中也发挥了重要作用。叶绿体不仅是低温响应二级信号分子 ROS 产生的主要场所^[10], 还参与水杨酸 (SA)^[11]、茉莉酸 (JA)^[12]、ABA^[13] 以及脯氨酸^[14] 等的生物合成。这些物质在植物低温响应中都产生了积极效应。因此, 参与叶绿体生物活性的相关基因在低温逆境响应中也发挥了重要的功能。近年来, 研究者发现叶绿体产生的 ROS 等信号分子可以通过逆行性信号传递途径进入细胞核来调控核基因的表达, 以实现植物对环境的适应^[15]。但叶绿体参与低温胁迫响应的具体分子机制大多不清楚。随着人们对植物逆境生物学研究重视程度的提高, 越来越多参与植物非生物逆境响应的基因被挖掘出来, 这些基因中有些响应特异逆境, 也有些能够响应多种逆境, 表明植物响应逆境的分子机制非常复杂的。尽管已经确定了相当数量逆境响应基因的功能, 但仍有很多功能未知的基因响应非生物逆境胁迫^[16]。

桉 *Eucalyptus* 树是世界上生长最快的木本植物之一, 作为重要的用材树种广受欢迎, 但大部分桉树对低温的耐受程度比较差。以桉树为材料研究它们的耐低温分子机制, 深入挖掘低温胁迫响应相关的基因资源, 对桉树的栽培和育种都有促进作用^[17]。*EgrCIN1* (cold induced 1) 是一个随低温处理时间延长表达不断增强的基因。亚细胞定位表明其表达的蛋白定位在巨桉 *Eucalyptus grandis* 叶绿体中。本研究通过对该基因及其编码蛋白序列特征的分析和在拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 中异源过表达后转基因株系对低温的响应等实验, 分析该基因响应低温胁迫的功能。

1 材料与方法

1.1 植物材料

巨桉为保存于浙江农林大学苗圃的 G5 扦插无性系材料。拟南芥野生型为哥伦比亚生态型, 生长于

浙江农林大学智能实验楼拟南芥生长室, 生长条件为 25 ℃ 16 h 光照/22 ℃ 8 h 黑暗, 相对湿度为 65%, 光照强度为 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 。

1.2 *EgrCIN1* 基因、编码蛋白序列及启动子顺式作用元件分析

根据 *EgrCIN1* 的编号 (Eucgr.B02882) 在 phytozome (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov>) 中获取其基因、蛋白序列。使用 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 分析 *EgrCIN1* 蛋白的相对分子量、理论等电点; 使用 PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/?disopred=1>) 在线预测其二级结构; 使用 TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 进行跨膜结构预测; 利用 Plant-mPLoc (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/>) 对 *EgrCIN1* 在细胞中的表达位置进行预测; 同时截取 *EgrCIN1* 基因起始密码子 ATG 上游 1 500 bp 的序列作为其启动子, 使用在线分析网站 Plant Care (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 分析 *EgrCIN1* 基因启动子上的顺式作用元件。

1.3 定量分析实验设置

1.3.1 4 ℃ 低温不同处理时间下的表达分析 取 6 个月苗龄的巨桉 G5 无性系幼苗, 于低温生长箱 (Snijder, 荷兰) 中进行 0.5、2.0、6.0、12.0、24.0、48.0 h 的 4 ℃ 低温处理。8 h 光照/16 h 黑暗, 相对湿度为 60%, 光照强度为 $150 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 。同时分别以正常温度 (白天 26 ℃, 晚上 22 ℃, 湿度、光照与处理相同) 条件下生长的 G5 无性系幼苗为对照 (ck)。3 株幼苗为 1 个处理组, 设置 3 次重复。处理结束后, 取叶片置于液氮速冻。

1.3.2 组织特异性分析 分别取 6 个月苗龄的巨桉 G5 无性系幼苗根、茎、嫩叶 (顶端新生叶片) 以及成熟叶片各 100 mg, 置于液氮速冻, 待测。

1.3.3 干旱、高盐、ABA、茉莉酸甲酯 (MeJA) 处理下的表达分析 选取长势一致、6 个月苗龄的巨桉 G5 无性系幼苗, 分别进行干旱、高盐、ABA、MeJA 等 4 种胁迫处理。干旱、高盐处理: 干旱组不浇水即可; 高盐处理组每次浇灌 $300 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠 (NaCl) 溶液 200 mL, 间隔 12 h 续浇 1 次; 对照组浇灌等量清水, 连续处理 1 周。ABA、MeJA 处理: 分别配制浓度为 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 ABA 和 MeJA 溶液, 均匀喷洒在幼苗叶片上, 对照组喷施等量清水, 12 h 处理 1 次, 共处理 24 h。每个处理 3 个植株, 重复 3 次。处理结束后选择相同叶位的成熟叶片取样。

1.3.4 RNA 提取 使用 TIANGEN 总 RNA 提取试剂盒 (DP432), 利用 PrimerScript TM RT reagent Kit (TaKaRa, 日本) 试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA。设计引物 (表 1), 以 *EgrACTIN* 为内参, 用 TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) 试剂盒 (TaKaRa, 日本) 进行 *EgrCIN1* 基因表达的实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 实验, 分析 *EgrCIN1* 在巨桉不同组织中及不同逆境处理后的表达情况。

1.4 *EgrCIN1* 蛋白亚细胞定位

以改造过的 pCAMbia1300-GFP 载体为骨架, 在 phytozome 上获得 *EgrCIN1* 的转录本序列, 去掉终

表 1 引物列表

Table 1 Primers		
用途	引物名称	引物序列(5'→3')
35S:: <i>EgrCIN1</i> 载体构建	35S:: <i>EgrCIN1</i> -F	cgggggtaccATGGCTTCTTCACCTTGCAAAA
	35S:: <i>EgrCIN1</i> -R	gctctagaTCATCGGACATGGGGAATTACA
35S:: <i>EgrCIN1</i> ::GFP载体构建	<i>EgrCIN1</i> ::GFP-F	gctctagaATGGCTTCTTCACCTTGCAAAA
	<i>EgrCIN1</i> ::GFP-R	cgggggtaccTCGGACATGGGGAATTACA
半定量PCR	<i>EgrCIN1</i> -F	AGCCTATGCTTGTACTIONACCA
	<i>EgrCIN1</i> -R	TTGCCGCCCTCGGCGCGGATGA
	<i>AtACTIN</i> -F	TAGGCCAAGACATCATGGTGTTCAT
	<i>AtACTIN</i> -R	GTTGTACGACCACTGGCGTACAAG
RT-qPCR	<i>EgrACTIN</i> -F	CCCGCTATGTATGTGCG
	<i>EgrACTIN</i> -R	AAGGTCAAGACGGAGGAT
	q <i>EgrCIN1</i> -F	ATGGCTTCTTCACCTTGCAAAA
	q <i>EgrCIN1</i> -R	TCATCGGACATGGGGAATTACA

说明: 引物前小写字母为酶切位点及保护碱基

止密码子后使用 Primer Premier 5 设计上下游引物并在引物 2 端分别添加 *Kpn* I 和 *Xba* I 酶切位点及保护碱基(表 1), 基因克隆后进行 *EgrCIN1::GFP* 融合载体构建。重组的阳性克隆提取质粒后, 利用电转法转入农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 中。瞬时转化烟草 *Nicotiana tabacum* 叶片, 共培养 2 d 后用激光共聚焦显微镜(ZEISS, LSM510, 德国)观察并拍照。GFP 荧光观察激发光波长设置为 488 nm, 吸收光波长为 500~525 nm; 观察叶绿素荧光时激发光波长设置为 552 nm, 吸收光波长则为 620~650 nm。

1.5 *EgrCIN1* 超表达载体构建及拟南芥异源转化

以含 35S 启动子的 pCambia1301 为载体骨架, 选取多克隆位点处的 *Xba* I 和 *Kpn* I 作为酶切位点, 设计 *EgrCIN1* 带酶切位点的全长基因引物(表 1), PCR 扩增, 鉴定后进行 35S::*EgrCIN1* 载体构建。电击转化农杆菌 GV3101, 蘸花法侵染拟南芥。种子收获后, 在含 $25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 潮霉素 B (Hygromycin B, 罗氏, 瑞士) 的 1/2 MS 培养基进行阳性株系筛选, 获得的阳性株系培养一段时间后, 提取叶片基因组 DNA, 利用 *EgrCIN1* 基因特异引物(表 1)进行分子鉴定。阳性株系继续繁殖、筛选, 直至获得 T3 代转基因纯合株系。

1.6 转基因拟南芥株系中 *EgrCIN1* 的表达

经筛选获得 3 个超表达 *EgrCIN1* 转基因纯合株系, 纯合株系植株种植 10 d 后, 提取叶片 RNA, 反转录为 cDNA, 设计引物(表 1), 以 *AtACTIN* 为内参, 进行半定量 PCR 实验。

1.7 *EgrCIN1* 拟南芥过表达转基因株系低温和 ABA 处理

野生型和 *EgrCIN1* 过表达株系种子经体积分数为 75% 乙醇消毒后, 播种在 1/2 MS 培养基上, 4°C 春化处理 2 d。低温处理: 培养基上培养 1 周后的野生型和转基因株系幼苗分别移栽至育苗盆中, 每盆中野生型和 1 个转基因株系各移栽 4 株。生长 2 周后, 在低温培养箱中 -6°C 处理 12 h 后移至正常生长条件下恢复 1 周, 观察表型并拍照。每个株系处理 3 盆, 重复 3 次。实验结束后统计野生型(COL)和各株系的存活率。ABA 处理: 野生型和 3 个过表达株系分别播于含 $0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA 的培养基上, 生长 10 d 后, 观察表型并拍照。

1.8 数据处理

定量结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ [18] 方法计算; 作图软件为 GraphPad Prism ver 6.01; 使用 SPSS 16.0 进行显著性检验, 分析方法选择单因素方差分析, 默认置信区间 95%。

2 结果与分析

2.1 *EgrCIN1* 基因的筛选及在 4°C 低温不同处理时间下的表达分析

课题组前期从巨桉 4°C 低温处理 2 h 的转录组中筛选到 1 个表达受到低温强烈诱导的基因, 将其命名为 *EgrCIN1* (cold induced 1)。Phytozome 数据库中该基因的序列号为 Eucgr.B02882。为进一步了解 *EgrCIN1* 对低温的响应, 利用 RT-qPCR 技术对 4°C 不同处理时间 (0.5、2.0、6.0、12.0、24.0、48.0 h) 的巨桉无性系幼苗进行 *EgrCIN1* 表达特性分析。结果表明(图 1): 除了处理 0.5 h 的植株中 *EgrCIN1* 基因的表达水平与未处理植株(对照)相比没有显著差异外, 随处理时间的延长, *EgrCIN1* 的表达水平逐渐升高, 处理 48.0 h 时, 其表达水平已经达到了对照的 48.6 倍。48.0 h 后, 叶片萎蔫严重, 明显受到低温生理伤害, 故未进一步取样分析。可见, *EgrCIN1* 表达明显受低温诱导, 且随处理时间的延长表达有增强的趋势。

2.2 *EgrCIN1* 基因、蛋白序列分析

根据巨桉数据库获取信息和相关分析可知: 该基因开放阅读框全长 579 bp, 不含内含子。编码含有 192 个氨基酸的蛋白, 等电点为 6.98, 相对分子

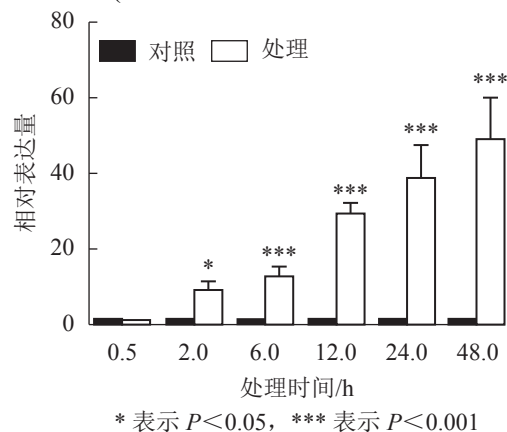


图 1 4°C 低温处理不同时间下 *EgrCIN1* 的定量表达

Figure 1 Relative expression of *EgrCIN1* gene under 4°C low temperature treatment for different time

量为 20.80 kDa。该基因编码的蛋白既没有旁系同源物,也没有直系同源物,是巨桉中特有且唯一的蛋白。

利用 PSIPRED 对 *EgrCIN1* 编码的蛋白的二级结构预测表明:该蛋白含有 2 个 β 转角和 7 个 α 螺旋,其余部分则为无规则卷曲(图 2A)。利用 TMHMM 对 *EgrCIN1* 蛋白序列跨膜结构的预测则表明:序列中所有氨基酸序列位点的跨膜概率均小于 0.02,没有明显跨膜区域(图 2B),说明其不是膜蛋白。亚细胞定位预测结果显示:*EgrCIN1* 编码的蛋白可能在叶绿体、线粒体、细胞质及细胞核中都能表达。

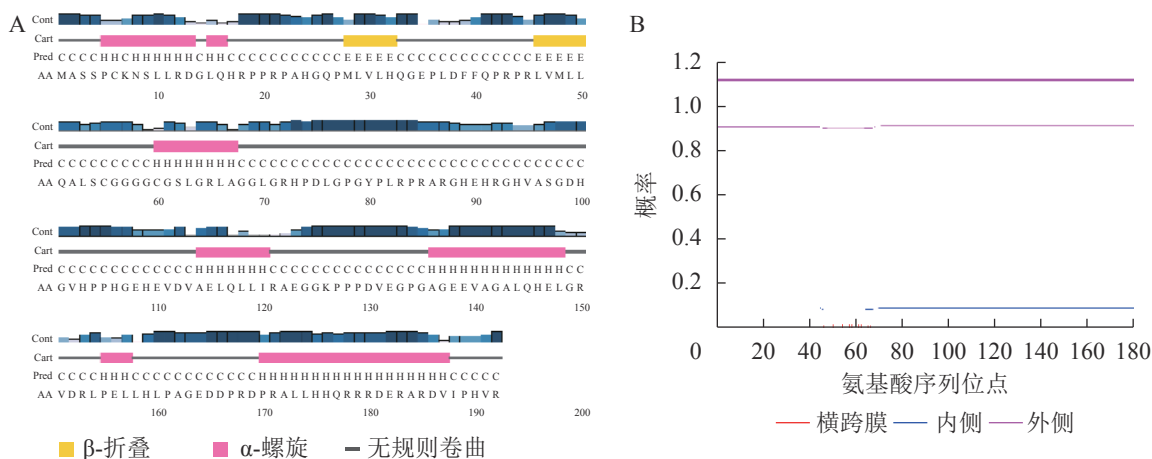


图 2 *EgrCIN1* 蛋白二级结构 (A) 和跨膜结构 (B) 预测

Figure 2 Prediction of *EgrCIN1* protein secondary structure (A) and transmembrane structure (B)

2.3 *EgrCIN1* 基因启动子顺式作用元件分析

对 *EgrCIN1* 的启动子上分布的顺式作用元件进行了分析,发现在 *EgrCIN1* 启动子上分布着多个与植物非生物逆境胁迫响应密切相关的顺式作用元件(表 2),其中脱落酸应答元件 (ABA response element, ABRE) 2 个,乙烯响应元件 (ethylene response element, ERE) 1 个,低温响应元件 (low temperature response element, LTR) 1 个,植物转录因子 MYB 识别序列 (MYB recognition site)、MYC 结合序列均为干旱和 ABA 响应元件,分别有 4 和 6 个。表明该基因的表达可能受到逆境胁迫的调控。

表 2 *EgrCIN1* 基因启动子上的顺式作用元件

Table 2 Cis-elements in the promoter of *EgrCIN1*

名称	位置	基序(5'→3')	数量	功能
ABRE	1 165-, 1 165+	GTGCAC	2	ABA响应元件
ERE	706+	ATTATAA	1	乙烯响应元件
LTR	420-	AAAGCC	1	低温响应元件
MYB	1 378+, 1 152-, 1 330+, 1 378+	TAACCA	4	干旱、ABA响应元件
MYC	104-, 935-, 630-, 622+, 1 015-, 668+	CATTGT	6	干旱、ABA响应元件
W-box	1 012-, 1 280-, 1 149-	TTGACC	3	真菌诱导反应元件

说明: +表示正义链, -表示反义链

2.4 *EgrCIN1* 组织特异性表达分析

通过 RT-qPCR 分析 *EgrCIN1* 在不同组织中的表达情况,结果表明: *EgrCIN1* 在嫩叶、成熟叶和茎中都有表达,且在茎中的表达量最高,而在根中却没有表达(图 3)。

2.5 *EgrCIN1* 蛋白亚细胞定位

由于 *EgrCIN1* 为巨桉特有的基因,尚无其功能信息的研究,本研究构建了 *EgrCIN1::GFP* 表达载体,针对其编码蛋白在细胞中发挥功能的位置进行了亚细胞定位分析。结果表明: *EgrCIN1* 蛋白与烟草叶片中的叶绿体具有共定位效应,表明 *EgrCIN1* 是在叶绿体中发挥作用的蛋白(图 4)。

2.6 拟南芥过表达转基因株系中 *EgrCIN1* 的表达

通过遗传转化后，从中筛选获得 3 个转基因株系：*EgrCIN1*-OE3、*EgrCIN1*-OE7 和 *EgrCIN1*-OE9。利用 RT-qPCR 技术对这 3 个株系中 *EgrCIN1* 的基因表达情况进行分析，结果表明：*EgrCIN1* 在 3 个株系中都有明显的表达 (图 5)。

2.7 低温处理下 *EgrCIN1* 过表达转基因株系的表型分析

对 3 个拟南芥过表达转基因株系进行 $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温处理 12 h，随后置于正常生长条件下生长 1 周。结果发现： $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温处理对转基因株系和野生型都会造成低温伤害，但转基因株系的恢复情况明显好于野生型 (图 6A)。统计不同株系的存活率发现，野生型存活率为 30.53%，而 *EgrCIN1*-OE3、*EgrCIN1*-OE7 和 *EgrCIN1*-OE9 等 3 个转基因株系分别达到了 77.77%、86.07% 和 88.83% (图 6B)，表明 *EgrCIN1* 的超表达在一定程度上可以提高植株的抗寒性。

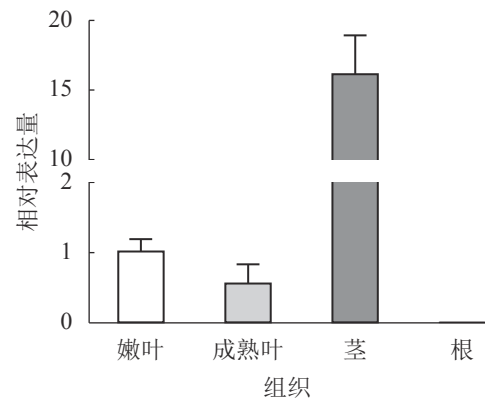


图 3 *EgrCIN1* 在巨桉不同组织中的定量表达
Figure 3 Quantitative expression of *EgrCIN1* in different tissues of *E. grandis*

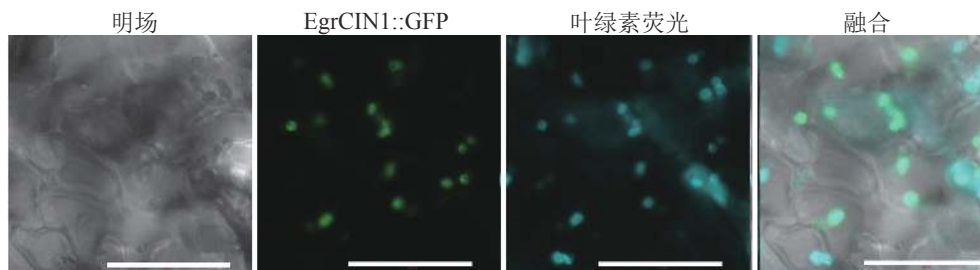


图 4 *EgrCIN1* 蛋白在烟草表皮细胞中的表达 (标尺为 50 μm)

Figure 4 Expression of *EgrCIN1* protein in tobacco epidermis cell (the bar is 50 μm)

2.8 ABA 处理下 *EgrCIN1* 过表达转基因株系的表型分析

植物低温响应分子调控途径有 ABA 依赖型和 ABA 非依赖型。针对 *EgrCIN1* 参与的抗寒性途径是否有 ABA 参与的这一问题，对转基因株系进行了 ABA 处理。结果表明：在 $0.5\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA 处理 10 d 后，3 个转基因株系受到的 ABA 抑制作用明显强于野生型 (图 7)，说明 ABA 也参与了 *EgrCIN1* 功能的发挥。

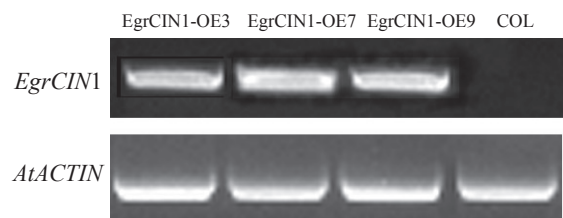


图 5 野生型和 *EgrCIN1* 过表达转基因株系中 *EgrCIN1* 的半定量 PCR

Figure 5 Semi-quantitative PCR of *EgrCIN1* in wild type and *EgrCIN1* overexpression transgenic lines



** 表示 $P < 0.01$

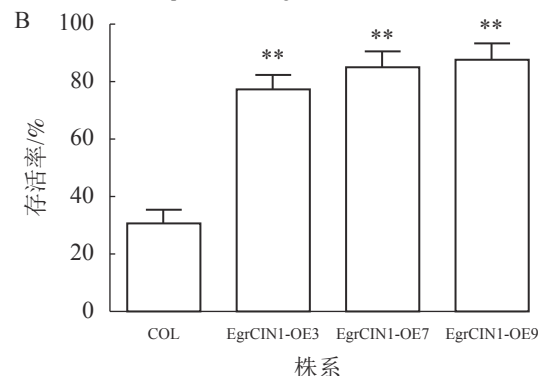


图 6 野生型和 *EgrCIN1* 转基因株系低温处理后的表型 (A) 和存活率 (B)

Figure 6 Phenotype (A) and survival (B) of wild-type and *EgrCIN1* transgenic lines after cold treatment

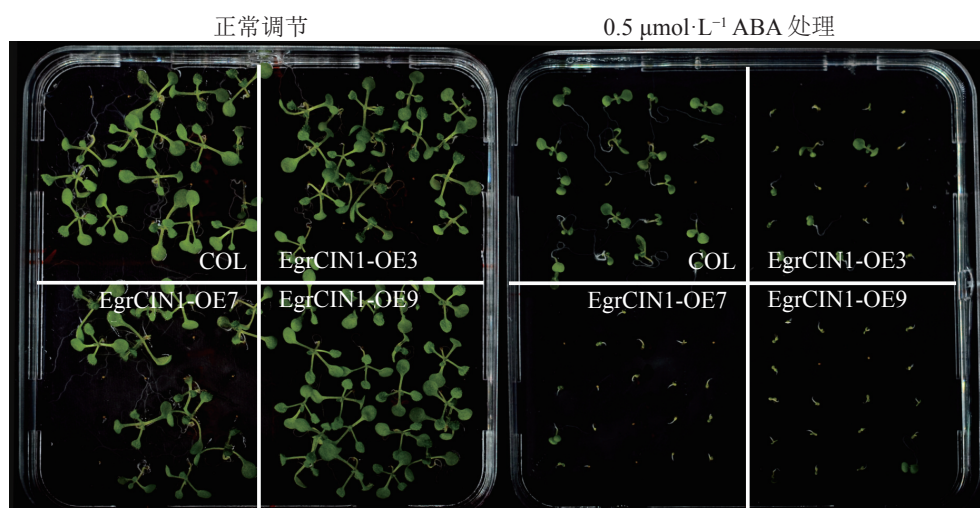


图7 野生型和 *EgrCIN1* 过表达株系 $0.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA 处理 10 d 后的表型
Figure 7 Phenotypes of wild-type and *EgrCIN1* overexpression lines treated with $0.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA after 10 days

2.9 干旱、高盐、ABA 和 MeJA 等其他非生物逆境处理下 *EgrCIN1* 的表达分析

由于不同非生物逆境因子之间往往存在相互作用, 为了进一步了解其他非生物逆境因子对 *EgrCIN1* 的影响, 分别分析了 *EgrCIN1* 在巨桉幼苗干旱、高盐、ABA 和 MeJA 处理下的表达情况。结果表明: 干旱和高盐处理都能诱导 *EgrCIN1* 的表达, 干旱处理下 *EgrCIN1* 的表达量是对照的 35.1 倍; $300 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 处理下 *EgrCIN1* 表达量则上调了 16.4 倍 (图 8A)。但 *EgrCIN1* 的拟南芥过表达转基因株系在干旱和高盐处理下与野生型相比没有显著的表型差异。此外, 外源喷施 ABA 也能促进 *EgrCIN1* 的表达, 而 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MeJA 处理下, 和对照相比 *EgrCIN1* 的表达并未发生显著变化 (图 8B)。

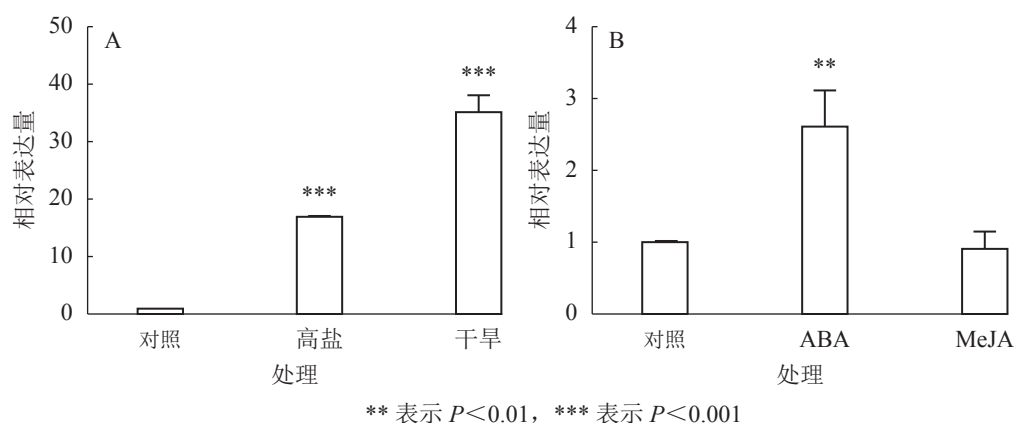


图8 巨桉幼苗高盐、干旱 (A) 和 ABA、MeJA (B) 处理下 *EgrCIN1* 的定量表达
Figure 8 Quantitative expression of *EgrCIN1* in *E. grandis* seedlings under high salt, drought (A) and ABA, MeJA (B) treatments

3 讨论

EgrCIN1 是巨桉中一个受低温诱导的未知功能的基因, 本研究表明: 它随着低温处理时间的延长, 表达水平不断提高, 显示其参与了巨桉的低温胁迫响应。基因、蛋白质序列的结构特征分析, 以及多序列比对和可能功能域的搜索结果都表明该基因是巨桉中一个特有的新基因。启动子上顺式作用元件的预测也表明其表达可能受低温相关因素和信号的影响。组织特异性表达分析则表明该基因主要在巨桉茎和叶中表达, 而根中没有表达。显示其可能主要在植株地上部分发挥作用。对于 *EgrCIN1* 功能的进一步研究有可能为揭示桉树低温适应性新机制提供基础。

叶绿体在植物低温响应过程中处于中心枢纽的位置, 一方面植物抵抗低温的能力取决于低温下的叶片光合活性。另一方面, 叶绿体中参与光合作用的光反应中心酶活性受到抑制, 进而引发 PS II 的光能溢出效应, 导致 ROS 积累, 产生控制核基因表达的逆行性信号, 调控低温响应基因表达, 提高植株适

应性^[19]。在一定程度上，叶绿体的抗低温程度与整体植株的抗寒性密切相关。因此，叶绿体冷诱导相关的基因受到了极大的关注和重视。很多冷诱导基因在叶绿体中表达，并参与植物的低温逆境响应。针叶福禄考 *Phlox subulata* 中 PsCor413im1 蛋白在叶绿体膜上表达，超表达 PsCor413im1 的拟南芥株系在低温和冷冻逆境下，存活率和种子发芽率都有较大程度的提高^[20]。拟南芥中的 NAC102 在叶绿体中作为抑制因子参与叶绿体基因的表达，并介导 ROS 对低温响应基因 ZAT6、ZAT10 和 ZAT12 等的调控^[21-22]；冷调控蛋白 COR15A 和 COR15B 在低温条件下也可以通过结构的改变稳定叶绿体的膜结构，实现拟南芥对低温的适应性^[23]。这些结果表明：叶绿体中表达的低温诱导基因有可能成为植物低温驯化的重要靶标。尽管利用生物信息学软件预测 *EgrCIN1* 编码蛋白在叶绿体、线粒体、细胞质以及细胞核中都可能存在，但亚细胞定位结果表明其可能仅在叶绿体中表达。因此被低温强烈诱导的 *EgrCIN1* 基因表达的蛋白也定位在叶绿体中，表明其在桉树中同样有可能是叶绿体中参与低温耐受性提高的重要候选基因。拟南芥中过表达 *EgrCIN1* 株系低温处理下的结果说明了该基因的确参与了植物的低温胁迫响应，能够提高植株对低温的耐受程度。另外，该基因在不同叶绿体中表达的强度有所差异，同时并非所有叶绿体中都有该基因的表达。这可能与瞬时表达过程中该基因在不同叶绿体中表达的强度不同有关，也可能是该基因在叶绿体不同发育阶段表达模式不同。

ABA 在植物低温响应中也发挥了重要作用^[24-25]，包含叶绿体在内的质体是 ABA 生物合成开始的场所^[13]。ABA 在叶绿体中与逆境胁迫相关基因表达的蛋白互作调控植物对逆境的适应性。如小立碗藓 *Physcomitrella patens* 中，ABA 介导了叶绿体蛋白 PpCOR413im 对植物低温逆境适应性的调控^[26]。拟南芥中过表达匍匐剪股颖 *Agrostis stolonifera* 叶绿体定位蛋白 AsHSP26.8a，可以通过调控 ABA 信号途径提高转基因植株对低温的抗性水平^[27]。*EgrCIN1* 的过表达株系对外源 ABA 表现出敏感性提高的表型，同时转基因植株对低温的抗性也得到了增强，这与 AsHSP26.8a 作用相似。暗示 ABA 合成或者信号途径可能也参与了 *EgrCIN1* 对低温逆境响应的调控。同时，在巨桉中，ABA 的处理也能在一定程度上诱导 *EgrCIN1* 的表达，表明 ABA 合成或者信号途径可能也参与了 *EgrCIN1* 功能发挥的调控。因此，*EgrCIN1* 一方面可能受到低温等非生物逆境信号诱导而参与 ABA 生物合成或者信号转导对逆境响应的调控；另一方面，ABA 也极可能直接影响 *EgrCIN1* 的表达，参与其功能的调控。另外，干旱、高盐也能强烈诱导 *EgrCIN1* 的表达，但实验过程中 *EgrCIN1* 拟南芥过表达转基因株系并未表现出明显的耐旱、耐盐表型，显示 *EgrCIN1* 在拟南芥和巨桉的非生物逆境响应中发挥的功能可能不同，同时也表明 *EgrCIN1* 在植物非生物逆境响应中发挥的功能比较复杂，需要进一步研究以揭示其在巨桉低温等非生物逆境响应中的功能。

本研究表明：*EgrCIN1* 是巨桉中特有的一个基因，受低温强烈诱导，在叶绿体中表达。其拟南芥过表达转基因株系提高了对低温的耐受性，同时对 ABA 的敏感程度也被增强。这表明 *EgrCIN1* 有可能是存在叶绿体中，通过与 ABA 互作，以 ABA 依赖形式的途径参与了植物对低温逆境的响应。但仍有很多问题需要进一步深入研究，如 *EgrCIN1* 是否与叶绿体的发育有关系，与 ABA 采用什么样的互动方式共同参与植物对低温逆境适应性的调控，在干旱、高盐等其他非生物逆境响应中的作用等。

4 参考文献

- [1] 任延靖, 郭怡婷, 赵孟良. 植物应答低温胁迫的研究进展[J]. *分子植物育种*, 2020, **18**(14): 4775 – 4781.
REN Yanjing, GUO Yiting, ZHAO Mengliang. Research progress of response to low temperature stress in plant [J]. *Mol Plant Breed*, 2020, **18**(14): 4775 – 4781.
- [2] RAMANKUTTY N, EVAN A T, MONFREDA C, et al. Farming the planet (1) Geographic distribution of global agricultural lands in the year 2000 [J]. *Glob Biogeochem Cycles*, 2008, **22**(1): 1 – 19.
- [3] RITONGA F N, CHEN S. Physiological and molecular mechanism involved in cold stress tolerance in plants [J]. *Plants*, 2020, **9**(5): 1 – 13.
- [4] 成京晋, 李浩, 早浩龙, 等. 植物响应低温胁迫的分子调控机制[J]. *分子植物育种*, 2021, **19**(9): 3104 – 3115.
CHENG Jingjin, LI Hao, ZAO Haolong, et al. Molecular regulation mechanism of plant response to cold stress [J]. *Mol Plant Breed*, 2021, **19**(9): 3104 – 3115.
- [5] PARK S, LEE C M, DOHERTY C J, et al. Regulation of the *Arabidopsis* CBF regulon by a complex low-temperature

- regulatory network [J]. *Plant J*, 2015, **82**(2): 193 – 207.
- [6] DING Yangling, HUI Li, ZHANG Xiaoyan, *et al.* OST1 kinase modulates freezing tolerance by enhancing ICE1 stability in *Arabidopsis* [J]. *Dev Cell*, 2015, **32**(3): 278 – 289.
- [7] MARUYAMA K, SAKUMA Y, KASUGA M, *et al.* Identification of cold-inducible downstream genes of the *Arabidopsis* DREB1A/CBF3 transcriptional factor using two microarray systems [J]. *Plant J*, 2004, **38**(6): 982 – 993.
- [8] EREMINA M, ROZHON W, POPPENBERGER B. Hormonal control of cold stress responses in plants [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2016, **73**(4): 797 – 810.
- [9] DREYER A, DIETZ K J. Reactive oxygen species and the redox-regulatory network in cold stress acclimation [J]. *Antioxidants*, 2018, **7**(11): 169 – 184.
- [10] ÖQUIST G, HUNER N P. Photosynthesis of overwintering evergreen plants [J]. *Ann Rev Plant Biol*, 2003, **54**(1): 329 – 355.
- [11] LEFEVERE H, BAUTERS L, GHEYSEN G. Salicylic acid biosynthesis in plants [J]. *Front Plant Sci*, 2020, **11**: 1 – 7.
- [12] WASTERNAK C, HAUSE B. The missing link in jasmonic acid biosynthesis [J]. *Nat Plants*, 2019, **5**(8): 776 – 777.
- [13] MILBORROW B. The pathway of biosynthesis of abscisic acid in vascular plants: a review of the present state of knowledge of ABA biosynthesis [J]. *J Exp Bot*, 2001, **52**(359): 1145 – 1164.
- [14] SZABADOS L, SAVOURE A. Proline: a multifunctional amino acid [J]. *Trends Plant Sci*, 2010, **15**(2): 89 – 97.
- [15] CHAN K X, PHUA S Y, CRISP P, *et al.* Learning the languages of the chloroplast: retrograde signaling and beyond [J]. *Ann Rev Plant Biol*, 2016, **67**(1): 25 – 53.
- [16] MANTRI N, PATADE V, PENNA S, *et al.* Abiotic stress responses in plants: present and future [M]//AHMAD P, PRASAD M. *Abiotic Stress Responses in Plants*. New York: Springer, 2012: 1 – 19.
- [17] OBERSCHELP G P J, GUARNASCHELLI A B, TESON N, *et al.* Cold acclimation and freezing tolerance in three *Eucalyptus* species: a metabolomic and proteomic approach [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2020, **154**: 316 – 327.
- [18] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR [J]. *Methods*, 2002, **25**(4): 402 – 408.
- [19] CROSATTI C, RIZZA F, BADECK F W, *et al.* Harden the chloroplast to protect the plant [J]. *Physiol Plant*, 2013, **147**(1): 55 – 63.
- [20] ZHOU Aimin, SUN Hongwei, FENG Suang, *et al.* A novel cold-regulated gene from *Phlox subulata*, *PsCor413im1*, enhances low temperature tolerance in *Arabidopsis* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, **495**(2): 1688 – 1694.
- [21] XIN K X, PAN T, GAO S, *et al.* A transcription factor regulates gene expression in chloroplasts [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, **22**(13): 6769 – 6779.
- [22] de CLERCQ I, van de VELDE J, LUO Xiaopeng, *et al.* Integrative inference of transcriptional networks in *Arabidopsis* yields novel ROS signalling regulators [J]. *Nat Plants*, 2021, **7**(4): 500 – 513.
- [23] THALHAMMER A, BRYANT G, SULPICE R, *et al.* Disordered cold regulated15 proteins protect chloroplast membranes during freezing through binding and folding, but do not stabilize chloroplast enzymes in vivo [J]. *Plant Physiol*, 2014, **166**(1): 190 – 201.
- [24] AGARWAL P, JHA B. Transcription factors in plants and ABA dependent and independent abiotic stress signalling [J]. *Biol Plant*, 2010, **54**(2): 201 – 212.
- [25] GUO Qianqian, LI Xia, NIU Li, *et al.* Transcription-associated metabolomic adjustments in maize occur during combined drought and cold stress [J]. *Plant Physiol*, 2021, **186**(1): 677 – 695.
- [26] RUIBALI C, CASTRO A, FLEITAS A L, *et al.* A chloroplast COR413 protein from *Physcomitrella patens* is required for growth regulation under high light and ABA responses [J/OL]. *Front Plant Sci*, 2020, **11**: 845 [2022-04-10]. doi: 10.3389/fpls.2020.00845.
- [27] SUN Xinbo, ZHU Junfei, LI Xin, *et al.* AsHSP26.8a, a creeping bentgrass small heat shock protein integrates different signaling pathways to modulate plant abiotic stress response [J]. *BMC Plant Biol*, 2020, **20**(1): 1 – 19.