

于海伟, 李铭杨, 张 军, 等. 大豆 *GmNCED1-2* 的非生物胁迫诱导表达及其转基因烟草鉴定[J]. 江苏农业学报, 2023, 39(4): 931-938.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2023.04.002

大豆 *GmNCED1-2* 的非生物胁迫诱导表达及其转基因烟草鉴定

于海伟¹, 李铭杨¹, 张 军², 李珊珊¹, 张梅娟¹, 马天意¹, 赵 艳¹, 兰红宇³, 翟 莹¹

(1. 齐齐哈尔大学生命科学与农林学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006; 2. 黑龙江省农业科学院畜牧兽医分院, 黑龙江 齐齐哈尔 161005; 3. 黑龙江省农业科学院齐齐哈尔分院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

摘要: 9-顺式-环氧类胡萝卜素双加氧酶(*NCED*)是脱落酸(ABA)合成途径中的关键酶。本研究从大豆中克隆 *GmNCED1-2*, 其开放阅读框全长1 818 bp, 编码 605 个氨基酸, 预测蛋白质相对分子质量 6.693×10^4 , 等电点 8.00。 *GmNCED1-2* 蛋白含有 1 个 RPE65 超家族结构域、2 个保守序列 MIAHPKxDP 和 HDFAITE 以及 4 个保守的组氨酸残基。 *GmNCED1-2* 蛋白的亚细胞定位预测结果显示其位于叶绿体中。蛋白质系统进化分析结果表明 *GmNCED1-2* 蛋白与 *CrNCED1* 蛋白和 *MhNCED3* 蛋白的亲缘关系较近。实时荧光定量 PCR 结果表明 *GmNCED1-2* 在叶中的表达量最高。脱落酸、干旱、高盐、高温和低温胁迫下 *GmNCED1-2* 的表达量均升高。顺式作用元件预测分析结果表明 *GmNCED1-2* 启动子含有 2 个 ABRE, 3 个 ARE, 1 个 TC-rich repeats 和 1 个 TGACG-motif 顺式作用元件。将 *GmNCED1-2* 构建植物表达载体并转化烟草, 获得 3 棵转基因烟草植株。烟草根长和生物量测定结果显示, *GmNCED1-2* 的过表达抑制了转基因烟草根的伸长及植株的生长。

关键词: 大豆; *NCED* 基因; 非生物胁迫; 转基因烟草; 脱落酸

中图分类号: S565.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2023)04-0931-08

Expression of soybean *GmNCED1-2* induced by abiotic stress and the identification of *GmNCED1-2* transgenic tobacco

YU Hai-wei¹, LI Ming-yang¹, ZHANG Jun², LI Shan-shan¹, ZHANG Mei-juan¹, MA Tian-yi¹, ZHAO Yan¹, LAN Hong-yu³, ZHAI Ying¹

(1. College of Life Science and Agro-Forestry, Qiqihar University, Qiqihar 161006, China; 2. Branch of Animal Husbandry and Veterinary of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Qiqihar 161005, China; 3. Qiqihar Branch of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Qiqihar 161006, China)

Abstract: The 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase (*NCED*) is the key rate-limiting enzyme in abscisic acid (ABA) synthesis pathway. *GmNCED1-2* was cloned from soybean in this research. The open reading frame (ORF) of *GmNCED1-2* was 1 818 bp in length, encoding 605 amino acids, with a predicted protein molecular weight of 6.693×10^4 and a theoretical

isoelectric point of 8.00. *GmNCED1-2* protein contained one RPE65 superfamily domain, two conserved sequences MIAHPKxDP and HDFAITE, and four conserved histidine residues. The subcellular localization of *GmNCED1-2* protein was predicted to be located in chloroplasts. Phylogenetic analysis showed that *GmNCED1-2* protein was closely related to *CrNCED1* protein and

收稿日期: 2022-08-12

基金项目: 黑龙江省省属高等学校基本科研业务费科研项目 (145109506); 国家自然科学基金项目 (32101694)

作者简介: 于海伟 (1979-), 女, 内蒙古赤峰人, 学士, 高级实验师, 主要从事大豆分子遗传育种研究。(E-mail) Yuhaiwei2020@163.com

通讯作者: 翟 莹, (E-mail) fairy39809079@126.com

MhNCED3 protein. The results of real-time quantitative PCR showed that the expression level of *GmNCED1-2* was the highest in leaves. The expression of *GmNCED1-2* increased under abscisic acid, drought, salt, heat and cold stresses. *Cis*-element prediction showed that the promoter region of *GmNCED1-2* contained two ABRE, three ARE, one TC-rich repeats and one TGACG-motif. *GmNCED1-2* was constructed into plant expression vector and transformed into tobacco. Three transgenic tobacco plants were obtained. The root length and biomass of wild type tobacco and *GmNCED1-2* transgenic tobacco were measured. The results showed that the overexpression of *GmNCED1-2* inhibited the root elongation and plant growth of transgenic tobacco.

Key words: soybean; *NCED* gene; abiotic stress; transgenic tobacco; abscisic acid

脱落酸 (Abscisic acid, ABA) 是以异戊二烯为基本单位的萜烯化合物。作为植物的重要激素,ABA 不仅具有促进种子休眠、影响根系结构、调节气孔关闭、促使叶片衰老脱落等多种生理作用^[1],还参与逆境条件下植物的适应过程^[2]。在 ABA 合成路径中,9-顺式-环氧类胡萝卜素双加氧酶 (*NCED*) 是一种关键的限速酶^[3],该酶由 *NCED* 基因编码。因此,*NCED* 基因的表达量直接影响植物体内 ABA 的含量。

第 1 个 *NCED* 基因是从玉米中克隆而来^[4]。随着研究的不断深入,人们发现 *NCED* 基因在植物中常以多基因家族的形式出现。拟南芥 *NCED* 基因家族包括 9 个成员,其中 5 个成员 (*AtNCED2*、*AtNCED3*、*AtNCED5*、*AtNCED6*、*AtNCED9*) 的编码产物具有 *NCED* 酶活性,参与 ABA 的合成^[5]。*AtNCED3* 与拟南芥的抗旱性相关,过表达 *AtNCED3* 的转基因植株抗旱性得到提高^[6-7]。*AtNCED6* 和 *AtNCED9* 与种子萌发过程中的 ABA 合成相关^[5]。此外,*AtNCED9* 还参与高温胁迫下 ABA 的合成和种子萌发的抑制^[8]。*AtNCED5* 与 *AtNCED3* 共同参与水分胁迫下的 ABA 合成,*AtNCED5* 与 *AtNCED6* 和 *AtNCED9* 则共同调控种子的休眠^[9]。*NCED* 基因在植物基因工程中的应用也在逐渐开展。在拟南芥中异位表达甘蓝型油菜 *BnNCED3* 促进了拟南芥种子休眠,使开花期提前,植株的抗逆性也得到提高^[10]。番茄 *LeNCED1* 能够使转基因白三叶植株的 ABA 含量显著提高,蒸腾速率显著下降,从而使长期水分利用效率提高^[11]。水稻 *OsNCED4* 在拟南芥中的异源表达改变了转基因植株大小和叶片形状,延缓了种子萌发并导致萌发后的植株生长对糖超敏感,增强了对干旱胁迫的耐受性^[12]。过表达野海棠 *MhNCED3* 的转基因拟南芥对渗透和镉胁迫的耐受性增强^[13]。*AtNCED3* 的过表达则能够提高温室和大田条件下转基因大豆的抗旱性^[14]。

作为一种重要的油料作物,人们对大豆的功能基因研究始终热度不减。前人已从大豆中鉴定出一个能够应答非生物胁迫和外源 ABA 的 *NCED* 基因 (*GmNCED1*),其过表达可以提高转基因植株的抗盐性和抗旱性^[15-16]。本研究对大豆中的另一个 *NCED* 基因 *GmNCED1-2* 进行克隆及功能初探,为其后续功能研究及应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验所用大豆品种北豆 9 号、烟草品种 NC89、菌种大肠杆菌 DH5 α 和根癌农杆菌 EHA105 由本实验室保存和提供。

1.2 试验方法

1.2.1 大豆幼苗非生物胁迫处理 使用 Hoagland 营养液,参照李铭杨等的方法水培大豆幼苗^[17]。播种 14 d 后,幼苗的第一片三出复叶已经完全展开,此时进行非生物胁迫处理。将幼苗移至含有 200 $\mu\text{mol/L}$ ABA 的 Hoagland 营养液中处理培养。干旱、高盐、高温和低温处理均参照李铭杨等的方法^[17]。在 ABA、干旱、高盐、高温和低温处理不同时间点 (0 h、1 h、2 h、5 h、10 h 和 24 h) 取幼苗的三出复叶 0.1 g,同时取未经处理的幼苗叶片、根和茎各 0.1 g,所有取样均重复 3 次,于液氮中保存备用。

1.2.2 实时荧光定量 PCR (qPCR) 使用 TaKaRa 公司 RNAiso Plus 试剂提取大豆叶片 mRNA 并反转录成第一链 cDNA (cDNA 反转录试剂盒购自 Innovagene 公司)。以第一链 cDNA 为模板,通过 qPCR 检测 *GmNCED1-2* 的表达量。20.0 μl qPCR 反应体系包括 cDNA 2.0 μl 、上下游引物各 0.8 μl 、 $2\times\text{TaQ SYBR Green qPCR Premix}$ (购自 Innovagene 公司) 10.0 μl 、ddH₂O 补至 20.0 μl 。根据 NCBI 数据库中 *GmNCED1-2* 的 mRNA 序列设计 qPCR 引物,上游引物 5'-ACGTCGTCCAGAAGCCTTAC-3',下游引物 5'-

ATCGTGCATCATGGTGGGTT-3'。内参基因为 *Gm β -Tubulin*, 上游引物 5'-GGAAGGCTTTCTTGCATTGTA-3', 下游引物 5'-AGTGGCATCCTGCTACTGC-3'^[18]。在 BIO-RAD CFX96 Real-Time PCR 仪上设置参数如下: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 5 s, 58 °C 30 s, 共循环 40 次。所有样品重复 3 次计算基因表达量。使用 SPSS 软件对数据进行差异显著性分析。

1.2.3 基因克隆及生物信息学分析 根据 *GmNCED1-2* 的开放阅读框 (Open reading frame, ORF) 序列设计 PCR 扩增引物, 上游引物 5'-GGAATTCATATGATGGCATCATCAGCAGCAGC-3', 下划线代表 *Nde* I 酶切位点; 下游引物 5'-GGAATTCCTCAAGCTTGTTCCTCAAAATCATT-3', 下划线代表 *Eco* R I 酶切位点。以大豆 cDNA 为模板, PCR 扩增 *GmNCED1-2* 完整 ORF 序列, PCR 退火温度设为 60 °C。PCR 扩增产物回收后与 pMD18-T 克隆载体 (购自 TaKaRa 公司) 连接, 转化 DH5 α 感受态细胞, 提取质粒通过双酶切验证。菌液寄送生工生物工程有限公司进行测序。*GmNCED1-2* 蛋白相对分子质量及等电点的预测使用在线网址 https://web.expasy.org/compute_pi/。*GmNCED1-2* 蛋白的保守结构域预测使用在线网址 http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set_mode.cgi?NORMAL=1。*GmNCED1-2* 蛋白亚细胞定位预测分析使用在线网址 <https://www.genscript.com/wolf-psort.html?src=leftbar>。使用 MEGA 软件构建 NCED 蛋白的系统进化树。*GmNCED1-2* 启动子序列的获取使用在线数据库 <http://www.plantgdb.org/GmGDB/>。启动子顺式作用元件的预测分析使用在线网址 <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>。

1.2.4 植物表达载体构建及烟草遗传转化 使用 DNA Ligation Kit (购自 TaKaRa 公司) 将 *GmNCED1-2* 与植物表达载体 pRI101 (购自 TaKaRa 公司) 连接, 所用限制性内切酶为 *Nde* I 和 *Eco* R I。重组载体质粒经双酶切验证后, 热激转化根癌农杆菌 EHA105 感受态细胞。烟草的遗传转化采用农杆菌侵染烟草叶盘法^[19]。在 MS 培养基中添加 50 mg/L 卡那霉素筛选 T₀ 代和 T₁ 代转基因烟草。使用基因组 DNA 提取试剂盒 (购自 TaKaRa 公司) 提取烟草叶片基因组 DNA, 通过 PCR 检测 *GmNCED1-2* 是否整合进入烟草基因组中。通过 qPCR 检测 *GmNCED1-2* 在 T₀ 代转基因烟草中的表达量, 检测

方法参照方法 1.2.2, 退火温度改为 56 °C, 内参基因换为烟草 *Nt α -Tubulin* 基因, 上游引物 5'-ATGAGAGAGTGCATATCGAT-3', 下游引物 5'-TTCAGTGAAGAAGGTGTTGAA-3'^[18]。通过 SPSS 软件分析数据差异显著性。

1.2.5 转基因烟草根长及生物量测定 对 MS 培养基上生长 18 d 的野生型 (Wild type, WT) 烟草和 T₁ 代转基因烟草的根长和生物量进行测量。通过 SPSS 软件分析数据差异显著性。

2 结果与分析

2.1 *GmNCED1-2* 的克隆及序列分析

从 NCBI 数据库中获取一个大豆 *NCED* 基因 *GmNCED1*, GenBank 登录号 XM014768319, 其功能尚未被鉴定。通过 PCR 从大豆叶片 cDNA 中克隆获得基因的完整 ORF 序列, 测序结果显示所获得的序列与 GenBank 中公布的序列相符。由于大豆中已经鉴定出 1 个 *GmNCED1* 基因^[15-16], 故将本研究中克隆的基因命名为 *GmNCED1-2*。*GmNCED1-2* 位于大豆基因组 15 号染色体上。*GmNCED1-2* 的核苷酸序列及其编码的蛋白质氨基酸序列如图 1 所示, *GmNCED1-2* 基因 ORF 全长 1 818 bp, 编码 605 个氨基酸, 预测蛋白质相对分子质量 6.693×10^4 , 理论等电点 8.00。*GmNCED1-2* 蛋白含有 1 个 RPE65 超家族结构域 (氨基酸序列第 134 位至 597 位), 还含有 2 个保守序列 MIAHPK \times DP 和 HDFAITE 及 4 个保守的组氨酸残基, 这些均属于 NCED 蛋白家族特征。*GmNCED1-2* 蛋白的亚细胞定位预测结果显示其位于叶绿体中。

2.2 NCED 蛋白系统进化分析

将功能已经得到鉴定的 13 个植物 NCED 蛋白与 *GmNCED1-2* 蛋白构建系统进化树。进化分析结果 (图 2) 表明, *GmNCED1-2* 蛋白与柑橘 *CrNCED1* 蛋白和野海棠 *MhNCED3* 蛋白的亲缘关系较近, 与大豆中的另一个 *GmNCED1* 蛋白亲缘关系较远。

2.3 *GmNCED1-2* 表达模式分析

通过 qPCR 对 *GmNCED1-2* 在根、茎、叶中的表达量进行检测。如图 3 所示, *GmNCED1-2* 在叶中的表达量最高, 是根中表达量的 28.5 倍; 在茎中的表达量约是根中表达量的 4.4 倍。通过 qPCR 对 *GmNCED1-2* 在 ABA、干旱、高盐、高温和低温处理 24 h 内叶片中的表达动态进行检测。如图 3 所示,

胁迫处理后, *GmNCED1-2* 的表达量均存在升高趋势。ABA 处理后, *GmNCED1-2* 的表达量在 1 h 和 24 h 出现 2 次峰值; 干旱处理后 *GmNCED1-2* 的表达量

升高最明显, 在 24 h 的表达量是未处理对照(0 h) 的 455.8 倍; 高盐、高温和低温处理后, *GmNCED1-2* 表达量峰值分别出现在 10 h、5 h 和 24 h。

```

1  ATGGCATCATCAGCAGCAGCAACAACAACAACAACTTGGATCAAAACCACACTCCCTTCTCCTCTACAACCTTAAAGAAAAGGTTT
1  M A S S A A A T T T T N T W I K T T L P S P P T T L K K R F
91  CCTTGCAATTCCAATTCCAATTCCAACCTCAACGCCATCACATGTTCTTCAAACTCCACTTCCCCAAAAAGTACCAACCACTCC
31  P C N S N S N S N S N A I T C S L Q T L H F P K K Y Q P T S
181  ACAACCACAACCACAACAACAACCACTCCAGCAAGAGAAACCAACAGTAATCGCTTCTCCCTCCGAAACAAAACACCCATTACCT
61  T T T T T T T T T P A R E T K P V I A S P S E T K H P L P
271  CAAAGTTGGAATTTCTCCAGAAAGCAGCGCTTACGCTTAGACATGGTCGAACTGCCTTAGTCTCCACGAAACGCAACACCCACTC
91  Q S W N F L Q K A A A S A L D M V E T A L V S H E R K H P L
361  CCAAAACCGCGACCCACGTGTCCAAATCGTGGCAACTTCGCCCCGTGCCGAGCACCAGCGCAGCACTCCCTTCCGGTGGCCGGA
121  P K T A D P R V Q I A G N F A P V P E H P A Q H S L P V A G
451  AAAATCCCCAAATGCATTGAGGGCGTCTACGTCCGCAACGGCGCAACCCGCTCTACGAGCCGCTCGCTGGGACCACTTCTTCGACGGA
151  K I P K C I E G V Y V R N G A N P L Y E P V A G H H F F D G
541  GACGGCATGGTCCACGCGTCAAATTCCTCTGGCGCGCCAGCTACGCTGCGCTTACCGAAACCGAGCGCTAGCCCAAGAAAAA
181  D G M V H A V K F H S G A A S Y A C R F T E T Q R L A Q E K
631  ACCCTCGGGCGGCAGTGTTCCTCAAGCCATCGCGAGCTCCACGGCACTCCGGCATCGCGCGCTCTCTCTTCTACGCGCGCTCC
211  T L G R P V F P K A I G E L H G H S G I A R L L L F Y A R S
721  CTCTTCGGCTCGTTGATGGGTCCCACGGCATGGGCGTCGCAACGCGCGCTGGTCTACTTCAACAACCCTCTCGCCATGTCCGAA
241  L F G L V D G S H G M G V A N A G L V Y F N N H L L A M S E
811  GACGACTTACCCTACCATCTCCGACTCACCCCAACGGCGACTTAACACCGTCGGCGTTACAACCTTAAACGGCAATTGAAATCCACA
271  D D L P Y H L R L T P N G D L T T V G R Y N F N G Q L K S T
901  ATGATCGTCAACCCAAAGTCGACCCGTCACCAACGACCTCCACGCGCTCTCTACGACGTCGTCCAGAAGCCTTACCTCAAACTACTT
301  M I A H P K V D P V T N D L H A L S Y D V V Q K P Y L K Y F
991  CGCTTCTCCCCGAACGGCGTCAAATCCCCGACGTCGAAATCCCTTTGAAAGAACCACCATGATGCAGGATTTCGCAATAACAGAAAA
331  R F S P N G V K S P D V E I P L K E P T M M H D F A I T E N
1 081  TTCGTGTCATCCCGACCAAGTGGTTTCAAACCTTCCGAAATGATCTCCGGTGGCTCCCCGTTGTATACGATAAGAATAAGGTT
361  F V V I P D Q Q V V F K L S E M I S G G S P V V Y D K N K V
1 171  TCGAGATTGGGATTCTGAACAAGAATGCTAAAGACCCCAATGGGATGAAATGGATCGATGCTCCTGAATGTTTCTGCTTCCATCTCTGG
391  S R F G I L N K N A K D P N G M K W I D A P E C F C F H L W
1 261  AACGCTGGGAGGAACCCGAAACGACGAGATTGTTGTGATCGGTTCTGATGACCCCGCAGACTCCATTTCAACGAATGCGATGAG
421  N A W E E P E N D E I V V I G S C M T P A D S I F N E C D E
1 351  AGTTTGAAGAGCGTCTTGTCTGAGAAAAGGCTGAATTTGAAGACCGGAAAGTCTACAAGAAAACCCATTATCTCCGAATCCCAACAGGTC
451  S L K S V L S E K R L N L K T G K S T R K P I I S E S Q Q V
1 441  AACTTGAAGCCGGCATGGTCAACAGAAACAAGCTCGGACGAAAGACCCAGTTTGGCTACTTAGCACTTGGCAGCATGGCCTAAGGTT
481  N L E A G M V N R N K L G R K T Q F A Y L A L A E P W P K V
1 531  TCAGGTTTCGTAAGTTGATTGTTTCAGTGGGAAAGTGAACAAGTACATGATGTTGGGAGAGAGGTTCCGTTGGGAGCCTCTGTTTCTT
511  S G F A K V D L F S G E V N K Y M Y G E E R F G G E P L F L
1 621  CCAATGGTGTGACGGTGATGAAGATGATGGCTATATCTCGCATTGTCATGATGAGAAGGAATGGAATCGGAGCTGCAGATTGTG
541  P N G V D G D E D D G Y I L A F V H D E K E W K S E L Q I V
1 711  AATGCCAAACTTTGAAGCTTGAGGCTTCGTTAAGCTTCCTTCTAGAGTTCTTATGGGTTTCACGGCACTTTTATTCATTCAAATGAT
571  N A K T L K L E A S V K L P S R V P Y G F H G T F I H S N D
1 801  TTGAGGAAACAAGCTTGA
601  L R K Q A *

```

下划线表示保守的 4 个组氨酸残基; 阴影部分表示保守序列 MIAHPKxDP 和 HDFAITE; * 表示终止密码子。

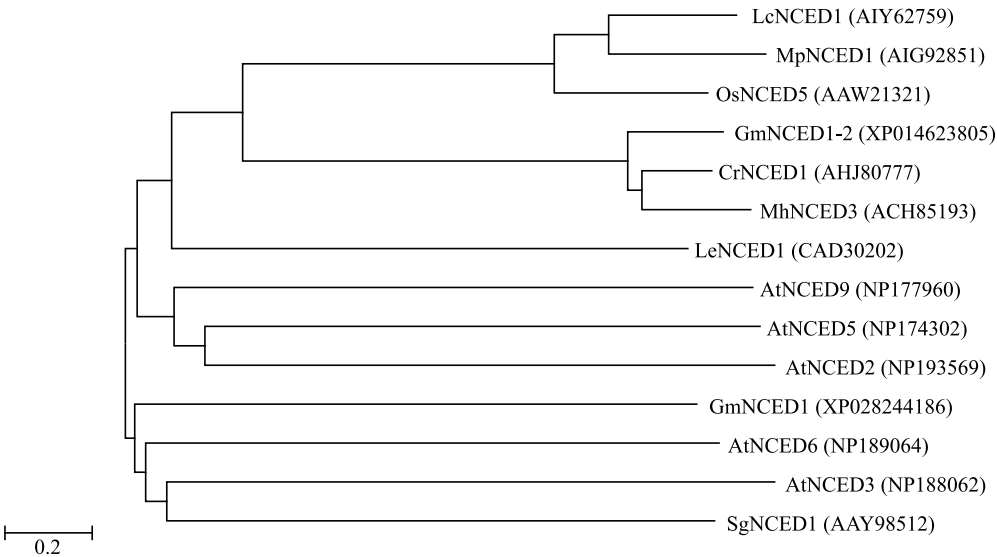
图 1 *GmNCED1-2* 的核苷酸序列及其编码的氨基酸序列

Fig.1 Nucleotide and amino acid sequences of *GmNCED1-2*

2.4 *GmNCED1-2* 启动子顺式作用元件预测分析

对 *GmNCED1-2* 基因起始密码子上游 2 000 bp 的启动子区域进行预测分析, 发现其含有 4 种逆境及激素响应相关顺式作用元件(表 1), 包括 2 个脱落酸响应元件(ABRE), 3 个厌氧诱

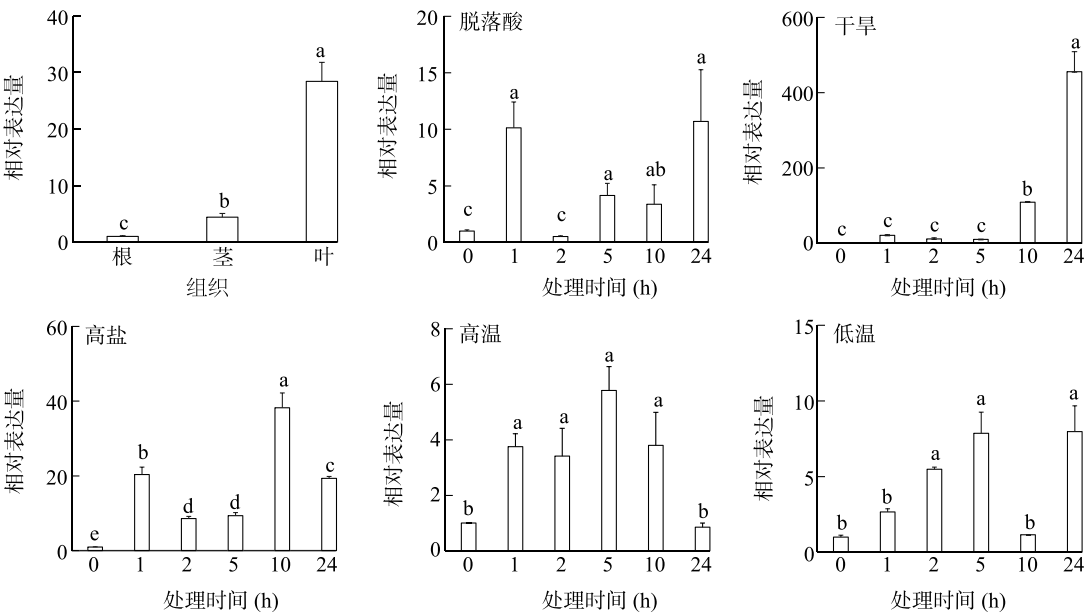
导元件(ARE), 1 个防御和胁迫响应元件(TC-rich repeats)和 1 个茉莉酸甲酯响应元件(TGACG-motif)。这些顺式作用元件的存在, 与 *GmNCED1-2* 能够应答 ABA 和非生物胁迫的结果相符合。



括号里列出的是蛋白质 GenBank 登录号。

图2 植物 NCED 蛋白系统进化树

Fig.2 Phylogenetic tree of plant NCED proteins



图柱上不同小写字母表示不同组织间或不同处理时间间差异显著 ($P < 0.05$)。

图3 *GmNCED1-2* 的表达分析

Fig.3 Expression analysis of *GmNCED1-2*

表1 *GmNCED1-2* 启动子顺式作用元件预测

Table 1 Prediction of *cis*-elements in *GmNCED1-2* promoter

顺式作用元件	预测功能	序列	数目
ABRE	脱落酸响应元件	ACGTG	2
ARE	厌氧诱导元件	AAACCA	3
TC-rich repeats	防御和胁迫响应元件	ATTCTCTAAC	1
TGACG-motif	茉莉酸甲酯响应元件	TGACG	1

2.5 *GmNCED1-2* 转基因烟草遗传转化及鉴定

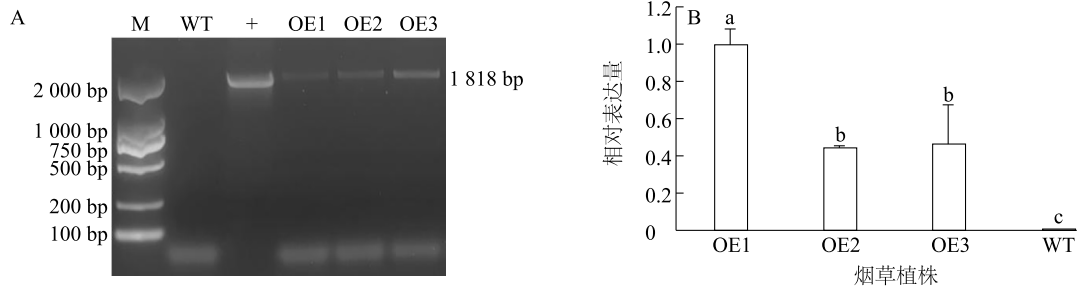
烟草叶片基因组 DNA PCR 检测结果(图 4A)显示,共获得 3 棵 *GmNCED1-2* 转基因烟草植株,分别命名为 OE1、OE2 和 OE3。*GmNCED1-2* 在转基因烟草植株中的表达量为 OE1>OE3>OE2(图 4B)。

2.6 T₁代 *GmNCED1-2* 转基因烟草根长和生物量分析

对生长 18 d 的野生型(WT)烟草和 *GmNCED1-*

2 转基因烟草的根长和生物量进行测定。根长测定结果(图 5)显示,WT 烟草的根长显著长于转基因烟草。生物量测定结果(图 5)显示,WT 烟草的生

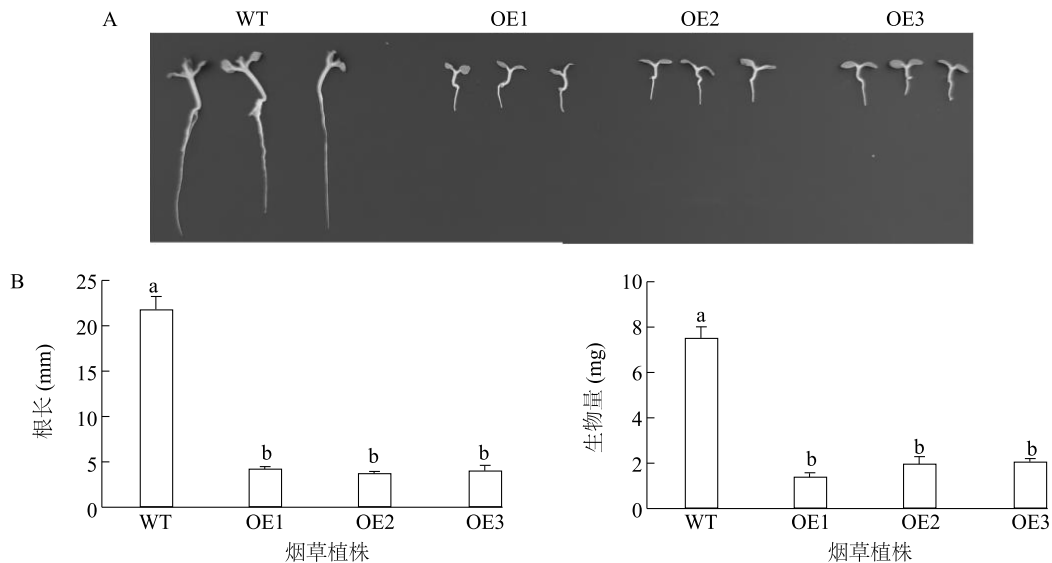
物量显著高于转基因烟草。以上结果表明 *GmNCED1-2* 的过表达抑制了转基因烟草根的伸长及植株的生长。



A:烟草基因组 DNA PCR 检测;B:*GmNCED1-2* 在转基因烟草植株中的表达量;M:Marker(基因大小标记);WT:野生型烟草植株;+:pRI101-*GmNCED1-2* 阳性质粒;OE1~OE3; T_0 代转基因烟草植株。图柱上不同小写字母表示不同烟草植株间 *GmNCED1-2* 相对表达量差异显著($P < 0.05$)。

图 4 *GmNCED1-2* 转基因烟草鉴定

Fig.4 Identification of *GmNCED1-2* transgenic tobacco



WT:野生型烟草;OE1~OE3; T_1 代转基因烟草植株。图柱上不同小写字母表示不同烟草植株间差异显著($P < 0.05$)。

图 5 WT 烟草和 *GmNCED1-2* 转基因烟草根长和生物量

Fig.5 Root length and biomass of WT tobacco and *GmNCED1-2* transgenic tobacco

3 讨论

ABA 在植物生长发育及应对逆境胁迫过程中的生物合成受 *NCED* 基因表达水平的调控,这一点已经得到了广泛的证实。因此,对 *NCED* 基因进行遗传操作可以提高植物体内 ABA 水平,调控植物生长发育并增强其胁迫耐受性^[20-21]。尽管从大豆中已经鉴定出一个具有非生物胁迫抗性的 *GmNCED1*^[15-16],但由于 *NCED* 基因为多基因家族基

因,且各基因之间存在一定的分工^[5-9],因此有必要对大豆中其他 *NCED* 基因的功能进行探索。本研究克隆的 *GmNCED1-2* 所编码的蛋白质含有一个类胡萝卜素裂解酶均有的 RPE65 结构域,还含有 4 个保守的组氨酸残基,这些残基负责与铁辅因子相结合^[22-24]。以往研究表明,*NCED* 蛋白大多定位于叶绿体中^[25-26],因为它们的作用底物位于质体中^[23]。本试验也预测 *GmNCED1-2* 蛋白定位在叶绿体中。*GmNCED1-2* 蛋白与 *GmNCED1* 蛋白和

MhNCED3 蛋白的亲缘关系较近,它们可能在功能上存在相似性。*MhNCED3* 可以被干旱、低温、盐和镉胁迫诱导表达,其过表达提高了转基因植株对渗透和镉胁迫的耐受性^[13]。*CrNCED1* 可以被干旱、低温胁迫和 ABA 诱导表达^[27],这些也为后续 *GmNCED1-2* 的功能鉴定提供了参考。

GmNCED1-2 在叶中的表达量最高,在根中的表达量最低,这一结果与 *CrNCED1* 的组织定量结果一致,意味它们具有组织特异性表达的特点^[27]。以往研究结果也表明,*NCED* 基因可以在不同组织中表达并调节 ABA 的生物合成,包括根、茎和叶,但在根部的表达量往往最低^[28]。因此后续选择大豆幼苗叶片作为试验材料,分析 *GmNCED1-2* 对非生物胁迫的应答情况。*GmNCED1-2* 在不同的胁迫处理下表现出不同的表达模式,这表明存在不同的转录调控机制控制着 *GmNCED1-2* 的转录。*GmNCED1-2* 对干旱胁迫的应答最为明显,其次是高盐胁迫,但在高温或低温胁迫下其表达量的变化不超过 10 倍。不同 *NCED* 基因对不同非生物胁迫的应答也不尽相同,例如 *VuNCED1* 的表达能够被干旱和高盐胁迫诱导,但对 ABA 和高温或低温胁迫无响应^[29]; *TaNCED3* 能够被 ABA 诱导表达,但对高盐和低温胁迫无响应^[30];而 *FvNCED3* 的表达则被 ABA、干旱和高盐胁迫诱导,但在高温和低温胁迫下表达量却下降^[31]。

ABRE 是响应 ABA 的主要顺式作用元件,常位于胁迫诱导基因的启动子中^[26]。*GmNCED2-1* 启动子中含有 2 个 ABRE,qPCR 结果也证实 ABA 可以诱导 *GmNCED2-1* 的表达。而 TGACG-motif 则是响应茉莉酸的顺式作用元件,茉莉酸信号也参与植物的抗逆机制调控^[32]。此外,*GmNCED2-1* 启动子中还含有 3 个缺氧诱导元件和 1 个防御和胁迫响应元件,这些元件的存在表明 *GmNCED1-2* 可能受复杂调控机制的调控,是其能够响应多种逆境胁迫的重要原因。

研究结果表明,用 ABA 处理拟南芥幼苗,可以抑制主根伸长,浓度过高时会导致幼苗子叶无法张开,不能长出真叶^[33]。*NCED* 基因通过控制 ABA 的合成可以调控种子萌发和根系生长等植物生长发育过程。*GmNCED1-2* 在烟草中的过表达抑制了转基因烟草根的伸长和植株的生长,这应该与 *GmNCED1-2* 过表达后导致烟草中 ABA 含量升高相

关。在其他 *NCED* 过表达的转基因植物中也存在类似现象。例如,*BnNCED3* 转化拟南芥后促进了拟南芥种子休眠,抑制侧根生长,并使转基因拟南芥提前开花^[10]。*CrNCED1* 转基因烟草的根生长速度慢于野生型,但在含 ABA 的培养基上,转基因烟草的根生长速度则快于野生型,表明 ABA 对转基因烟草根的生长抑制作用较小^[27]。另有文献报道,干扰 *NtNCED3-2* 的表达会抑制烟草初生根的发育,出现发育迟缓和叶片腺毛数量减少的现象^[34]。综上,大豆 *GmNCED1-2* 作为 *NCED* 基因家族成员能够响应非生物胁迫,其过表达抑制了转基因烟草根的伸长和植株的生长。

参考文献:

- [1] HIRAYAMA T, SHINOZAKI K. Perception and transduction of abscisic acid signals; keys to the function of the versatile plant hormone ABA[J]. Trends in Plant Science, 2007, 12(8): 343-351.
- [2] HUANG Y, JIAO Y, XIE N, et al. *OsNCED5*, a 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene, regulates salt and water stress tolerance and leaf senescence in rice[J]. Plant Science, 2019, 287: 110188.
- [3] SAHOO K K, TRIPATHI A K, PAREEK A, et al. An improved protocol for efficient transformation and regeneration of diverse indica rice cultivars[J]. Plant Methods, 2011, 7(1): 49.
- [4] NAMBAR E, MARION-POLL A. Abscisic acid biosynthesis and metabolism[J]. Annual Review of Plant Biology, 2005, 56(1): 165-185.
- [5] LEFEBVRE V, NORTH H, FREY A, et al. Functional analysis of Arabidopsis *NCED6* and *NCED9* genes indicates that ABA synthesized in the endosperm is involved in the induction of seed dormancy[J]. The Plant Journal, 2006, 45(3): 309-319.
- [6] TAN B C, JOSEPHY L M, DENG W T, et al. Molecular characterization of the Arabidopsis 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene family[J]. The Plant Journal, 2003, 35(1): 44-56.
- [7] LUCHI S, KOBAYASHI M, TAJI T, et al. Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in Arabidopsis[J]. The Plant Journal, 2010, 27(4): 325-333.
- [8] TOH S, IMAMURA A, WATANABE A, et al. High temperature-induced abscisic acid biosynthesis and its role in the inhibition of gibberellin action in Arabidopsis seeds[J]. Plant Physiology, 2008, 146(3): 1368-1385.
- [9] FREY A, EFFROY D, LEFEBVRE V, et al. Epoxycarotenoid cleavage by NCED5 fine-tunes ABA accumulation and affects seed dormancy and drought tolerance with other NCED family members[J]. The Plant Journal, 2012, 70(3): 501-512.
- [10] XU P P, CAI W M. Functional characterization of the *BnNCED3* gene in *Brassica napus*[J]. Plant Science, 2017, 256: 16-24.

- [11] 王昌耀, 闫尔俊, 常凯, 等. 转 *LeNCED1* 基因对白三叶 ABA 含量及水分利用效率的影响[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2020, 35(6): 1029-1033.
- [12] HWANG S G, LEE C Y, TSENG C S. Heterologous expression of rice 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase 4 (*OsNCED4*) in *Arabidopsis* confers sugar oversensitivity and drought tolerance[J]. Botanical Studies, 2018, 59(1): 2.
- [13] ZHANG W, YANG H, YOU S, et al. Cloning, characterization and functional analysis of the role *MhNCED3*, a gene encoding 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase in *Malus hupehensis* Rehd., plays in plant tolerance to osmotic and Cd²⁺ stresses[J]. Plant and Soil, 2014, 381(1/2): 143-160.
- [14] MOLINARI M D C, FUGANTI-PAGLIARINI R, MARIN S R R, et al. Overexpression of *AtNCED3* gene improved drought tolerance in soybean in greenhouse and field conditions[J]. Genetics and Molecular Biology, 2020, 43(3): e20190292.
- [15] 张洁. 大豆 *GmNCED1* 基因的功能鉴定及其表达调控研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2014.
- [16] 李琼琼, 张洁, 邓宇, 等. 大豆 *GmNCED1* 基因的克隆及表达模式分析[J]. 中国油料作物学报, 2014, 36(4): 455-460.
- [17] 李铭杨, 邱爽, 何佳琦, 等. 大豆 *GmGolS1* 的克隆及转基因烟草耐高温性鉴定[J]. 植物遗传资源学报, 2022, 23(2): 575-582.
- [18] QIU S, ZHANG J, HE J Q, et al. Overexpression of *GmGolS2-1*, a soybean galactinol synthase gene, enhances transgenic tobacco drought tolerance[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2020, 143(3): 507-516.
- [19] HOEKEMA A, HIRSCH P R, HOOYKAAS P J J, et al. A binary plant vector strategy based on separation of *vir*- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid[J]. Nature, 1983, 303(5913): 179-180.
- [20] SUN L, SUN Y, ZHANG M, et al. Suppression of 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase, which encodes a key enzyme in abscisic acid biosynthesis, alters fruit texture in transgenic tomato[J]. Plant Physiology, 2012, 158(1): 283-298.
- [21] RODRIGO M J, ALQUEZAR B, ZACARIAS L. Cloning and characterization of two 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase genes, differentially regulated during fruit maturation and under stress conditions, from orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck)[J]. Journal of Experimental Botany, 2006, 57(3): 633-643.
- [22] 殷书欣, 计俊杰, 肖情, 等. 干旱诱导基因 *GmNF-YA7* 克隆及植物表达载体构建[J]. 大豆科学, 2022, 41(1): 43-48.
- [23] SCHWARTZ S H, TAN B C, GAGE D A, et al. Specific oxidative cleavage of carotenoids by VP14 of maize[J]. Science, 1997, 276(5320): 1872-1874.
- [24] TIAN X, JI J, WANG G, et al. Cloning and expression analysis of 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase gene 1 involved in fruit maturation and abiotic stress response in *Lycium chinense*[J]. Journal of Plant Growth Regulation, 2015, 34(3): 465-474.
- [25] 王赞, 陈丹, 岳川, 等. 茶树 *CsNCED2* 基因的克隆和表达分析[J]. 西北植物学报, 2018, 38(6): 994-1002.
- [26] JIA Y, LIU J, BAI Z, et al. Cloning and functional characterization of the *SmNCED3* in *Salvia Miltiorrhiza* [J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2018, 40(7): 133.
- [27] XIAN L, SUN P, HU S, et al. Molecular cloning and characterization of *CrNCED1*, a gene encoding 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase in *Citrus reshni*, with functions in tolerance to multiple abiotic stresses[J]. Planta, 2014, 239(1): 61-77.
- [28] THOMPSON A J, MULHOLLAND B J, JACKSON A C, et al. Regulation and manipulation of ABA biosynthesis in roots[J]. Plant, Cell & Environment, 2007, 30(1): 67-78.
- [29] LUCHI S, KOBAYASHI M, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K, et al. A stress-inducible gene for 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase involved in abscisic acid biosynthesis under water stress in drought-tolerant cowpea[J]. Plant Physiology, 2000, 123(2): 553-562.
- [30] 席海秀. 小麦 *TaNCED3* 基因克隆及功能分析[D]. 大连: 辽宁师范大学, 2015.
- [31] LI T, SUN J, LI C, et al. Cloning and expression analysis of the *FvNCED3* gene and its promoter from ash (*Fraxinus velutina*)[J]. Journal of Forestry Research, 2019, 30(2): 471-482.
- [32] 任爱琴, 易津, 高洪文, 等. 柠条锦鸡儿 *CkNCED1* 基因启动子的克隆及表达分析[J]. 草业学报, 2013, 22(2): 165-170.
- [33] 袁冰剑, 张森磊, 曹萌萌, 等. 脱落酸通过影响生长素合成及分布抑制拟南芥主根伸长[J]. 中国生态农业学报, 2014, 22(11): 1341-1347.
- [34] YANG Y X, ZHOU Q Q, XU J Y, et al. RNA interference of *NtNCED3* reduces drought tolerance and impairs plant growth through feedback regulation of isoprenoids in *Nicotiana tabacum*[J]. Environmental and Experimental Botany, 2018, 155: 332-344.

(责任编辑: 成纾寒)