

紫花苜蓿 F-box 蛋白基因 *MsFTL* 的克隆及功能分析

陈秀秀, 张 彤, 余倩文, 周 薇, 安逸民, 杜秉昊, 郭长虹

(黑龙江省分子细胞遗传与遗传育种重点实验室 / 哈尔滨师范大学生命科学与技术学院, 哈尔滨 150000)

摘要: FTL (F-box Triple LRR protein) 是 F-box 蛋白家族的成员, 具有 F-box 保守结构域, 在植物抵御逆境胁迫过程中起重要作用。本研究参考低温胁迫下紫花苜蓿转录组数据设计引物, 通过 RT-PCR 克隆获得紫花苜蓿 *MsFTL* 基因, 该基因的全长 1422 bp, 编码 473 个氨基酸。该蛋白含有 1 个 F-box 结构域及 3 个 LRR 重复。系统进化分析表明, *MsFTL* 与蒺藜苜蓿 XP_003626345.1 F-box/FBD/LRR-repeat protein 亲缘关系最近。两者蛋白序列比对发现共有 11 个差异位点。在低温、盐、干旱以及外源 ABA 处理下, *MsFTL* 基因受到诱导, 表达量上调。构建植物过表达载体 pCBM-*MsFTL*, 通过农杆菌介导法转化烟草。对经过抗性筛选、PCR 和 Real-time PCR 验证的转基因植株进行低温抗性鉴定。在 -4 °C 低温胁迫下, 野生型烟草叶片出现了明显的萎蔫失水现象, 而转基因烟草萎蔫程度相对较轻。生理检测结果表明, 4 °C 处理 24 h 之后, 转基因烟草的可溶性蛋白含量、可溶性糖含量、SOD 活性, CAT 活性高于野生型, MDA 含量低于野生型。本研究表明, *MsFTL* 基因在提高植物对低温胁迫的抗性方面具有重要的作用。

关键词: 紫花苜蓿; *MsFTL* 基因; 低温; 基因克隆; 功能分析

Cloning and Functional Analysis of F-box Protein Gene *MsFTL* in Alfalfa (*Medicago sativa* L.)

CHEN Xiu-xiu, ZHANG Tong, YU Qian-wen, ZHOU Wei, AN Yi-min,
DU Bing-hao, GUO Chang-hong

(Key Laboratory of Molecular Cytogenetics and Genetic Breeding of Heilongjiang Province/
College of Life Science and Technology, Harbin Normal University, Harbin 150000)

Abstract: FTL (F-box Triple LRR) protein belongs to the family of F-box proteins that play an important role in tolerance to low temperature. In this study, an *MsFTL* gene was isolated by candidate gene approach from alfalfa, and this gene was differently expressed in leaf under cold stress. The full-length cDNA of *MsFTL* gene was 1422 bp, which putatively encoded for 473 amino acids. By bioinformatic analysis, the *MsFTL* protein was found to carry an F-box domain and three LRR repeats in C-terminus. *MsFTL* showed homology closely to XP_003626345.1, a member of F-box/FBD/LRR-repeat protein in *Medicago truncatula*, with 11 differential sites between the two proteins. The expression of *MsFTL* was induced by low temperature, salt, drought stress and ABA treatments. We generated the transformation construct and transformed the *MsFTL* into tobacco. Under -4 °C, wild-type tobacco leaves showed remarkable wilting, while the transgenic plants presented slightly stressed

收稿日期: 2018-09-29 修回日期: 2018-10-28 网络出版日期: 2018-11-23

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20181123.0910.001.html>

第一作者研究方向为植物基因工程, E-mail: 18846916536@163.com

通信作者: 郭长虹, 研究方向为植物基因工程, E-mail: kaku3008@126.com

基金项目: 国家自然科学基金 (31770575, 31470571); 国家高技术研究发展计划项目 (2013AA102607); 黑龙江省重大攻关目 (GA18B104); 国家转基因生物新品种培育重大专项 (2016ZX08004-002)

Foundation project: National Natural Science Foundation of China (31770575, 31470571), Supported by National High Technology Research and Development Program of China (2013AA102607), Major Research Project in Heilongjiang Province (GA18B104), National Major Projects of Transgenic Organisms Breeding New Varieties (2016ZX08004-002)

phenotype. Transgenic plants accumulated higher content of soluble protein and soluble sugar than that of wild-type. The activity of SOD and CAT in transgenic plants was higher than those of wild type under low temperature (4 °C) for 24 h. Moreover, the MDA content in transgenic plants was lower than that of wild type. Thus, these results suggested that overexpressing *MsFTL* might significantly improve tobacco plant tolerance to low temperature stress.

Key words: alfalfa; *MsFTL* gene; low temperature; gene clone; functional analysis

非生物胁迫是影响植物生长发育的关键因素。当植物面对非生物胁迫时会通过自身的调节系统来适应环境,而 F-box 蛋白参与的泛素蛋白酶水解系统是植物维持正常生命活动的调节体系之一^[1]。在植物中,SCF 类的 E3 泛素连接酶是研究最为深入的连接酶,SCF 复合体包括 Skp1、Cullin/CDC53、Rbx1 和 F-box 4 个亚基:F-box 蛋白作为靶蛋白的受体决定了底物识别的特异性^[2]。F-box 蛋白的 N 端有 40~60 个氨基酸残基组成 F-box 蛋白保守结构域,C 端是与蛋白-蛋白互作的结构域,如亮氨酸拉链(LRR)、WD40、TRR、Kelch 等,这些结构域参与泛素化的底物异性^[3]。

F-box 蛋白在植物体内发挥重要作用,包括器官发育、花器官特性、衰老、稳态、信号传导以及对生物和非生物胁迫的响应^[4]。拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)基因组编码 700 多个 F-box 蛋白,有几个 F-box 蛋白参与干旱胁迫应答。霍冬英等^[5]从谷子 *F-box* 基因家族中鉴定出 19 个在干旱胁迫下表达量上调的 *F-box* 基因,其中 *SiF-box18* 基因对干旱胁迫响应最为明显。Jain 等^[6]在水稻中鉴定出 23 个 F-box 蛋白在盐胁迫下差异性表达。水稻的 F-box 蛋白 OsMsr9 参与植物的盐胁迫应答,在转基因拟南芥中 OsMsr9 通过调节可溶性糖和丙二醛(MDA)等细胞相容性物质来增强耐盐性^[7]。Xu 等^[8]指出盐胁迫下,水稻 OsMsr9 表达量显著提高。Min 等^[9]从小麦穗中分离出一个 F-box 蛋白基因,发现 *Triticum aestivum* cyclin F-box 蛋白结构域(*TaCFBD*)基因在冷胁迫下表现出升高的表达水平。Chen 等^[10]发现黄瓜 *CsTIR/AFB* 基因含有 F-box 结构域,异位表达可以提高拟南芥的耐盐性。Chen 等^[11]指出辣椒(*Capsicum annuum* L.)CaF-box 参与植物激素应答和非生物胁迫响应。以上研究表明,F-box 蛋白在干旱、盐等胁迫下,起到非常重要的作用。

紫花苜蓿(*Medicago sativa* L.)是多年生豆科牧草,因其具有产量高、蛋白质含量丰富、适口性好等优良特点,被誉为“牧草之王”^[12]。中国是紫花

苜蓿的重要生产国之一,然而,低温等极端的环境条件影响紫花苜蓿生长和品质,而且严重限制其生存和分布,因此开展紫花苜蓿抗低温基因的研究,对通过基因工程手段提高紫花苜蓿抗低温能力具有重要的意义。肇东苜蓿具有抗低温、高产等优质特点,黑龙江属于寒冷地区,肇东苜蓿作为紫花苜蓿的地方性品种,越冬率在 90% 以上^[13]。本课题组在紫花苜蓿低温胁迫转录组测序工作中,发现 *MsFTL* 基因明显上调表达。前人主要在一些植物的干旱、盐和少数低温胁迫中对 F-box 家族基因有报道,关于紫花苜蓿 *MsFTL* 基因的抗低温功能目前还不明确。本研究以抗低温能力较强的紫花苜蓿品种肇东苜蓿作为材料,克隆 *MsFTL* 基因,并运用 real-time PCR 方法研究在低温、盐、干旱以及外源 ABA 处理下, *MsFTL* 在紫花苜蓿中的表达特性。构建 *MsFTL* 植物表达载体,转化烟草,并在低温胁迫条件下对转基因烟草进行相关表型和生理指标分析。运用分子生物学手段验证 *MsFTL* 响应低温胁迫过程中所起的作用,为通过转基因技术改善植物抗低温能力奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

从肇东苜蓿(*Medicago sativa* L. cv. Zhaodong)克隆得到 *MsFTL* 基因。用于转化的植物材料为烟草(*Nicotiana tabacum* L. cv. SR-1)。Gelmini Purification Kit 胶回收试剂盒、RNAiso plus 试剂盒、质粒提取试剂盒均来自 TIANGEN 公司;反转录试剂盒、THUNDERBIRD SYBR[®] qPCR Mix 试剂盒来自 TOYOBO 公司;克隆载体 pMD18-T 试剂盒、胶回收试剂盒来自 TAKARA 公司;表达载体 pCBM、大肠杆菌 TOP10 为实验室保存;克隆载体抗生素为氨苄青霉素(Amp, Ampicillin)来自 Amresco 公司;表达载体抗生素为卡那霉素(Km, Kanamycin)来自 Sigma 公司;紫花苜蓿 *MsFTL* 基因在 4 种处理下表达模式所使用试剂:氯化钠来自上海西陇化工公司、甘露醇和脱落酸以及 6 苄基腺嘌呤(6-BA)

和萘乙酸 (NAA) 来自纳川生物技术工作室; MS 培养基所需试剂和生理指标测定所需试剂均来自上海西陇化工公司, 部分试剂如硝酸铵、硝酸钾、硫酸镁、三氯甲烷、磷酸二氢钾等。

1.2 试验方法

1.2.1 *MsFTL* 基因的克隆 紫花苜蓿总 RNA 提取参照 RNAiso plus 试剂盒的说明书进行。以提取的 RNA 作为模板, 反转录成 cDNA, 根据肇东苜蓿低温胁迫的转录组测序中得到的 *MsFTL* 基因的核苷酸序列, 分析获得该基因的 CDS 序列, 设计引

物 *MsFTL*-F 和 *MsFTL*-R (表 1)。将上一步获得的 cDNA 进行稀释, 利用 ExTaq DNA polymerase (5 U/ μ L) 进行 PCR 扩增。反应体系包含模板 DNA (50 ng/ μ L) 5 μ L、10 $\times$ PCR Buffer 5 μ L、dNTP Mix 4 μ L、ExTaq DNA polymerase 0.25 μ L、正、反向引物 (10 μ mol/L) 各 2 μ L, 用 ddH₂O 补足至 50 μ L。反应条件为 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s、50 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 90 s、30 个循环。用 1% 琼脂糖凝胶分离 PCR 产物, 将目的片段胶回收后与 pMD18-T 克隆载体连接, 送至上海生工公司测序。

表 1 本研究中所用到的引物
Table 1 Primers used in this study

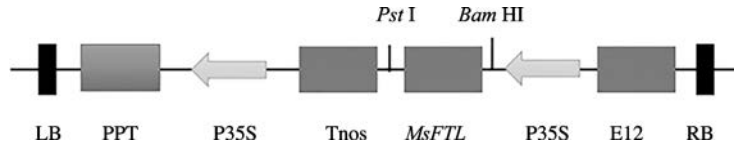
引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'-3')	用途 Use
MsFTL-F	TGGGTTAGGTTAGGATTA	ORF 的扩增
MsFTL-R	TTTCTAGCCTTCTTACAGT	
MsFTLq-F	TCGCATTAGTGAGTTGTCTGA	实时荧光定量 PCR
MsFTLq-R	TGACTTGTTTATCCTGCGTAT	
GAPDH-S	GTGGTGCCAAGAAGGTTGTTAT	实时荧光定量 PCR
GAPDH-A	CTGGGAATGATGTTGAAGGAAG	
MsFTL-F	CGCAGGATAAACAAGTCA	转基因烟草的鉴定
MsFTL-R	ATACCAAATCGCAGCATA	

1.2.2 生物信息学分析 利用软件 ContigExpress^[14] 对重复测序结果进行拼接, 通过在线 ORF Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 找到 *MsFTL* 基因的开放读码框。将预测的 *MsFTL* 氨基酸序列 利 用 NCBI protein BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行 比 对, 同 蒺 藜 苜 蓿 XP_003626345.1 F-box/FBD/LRR-repeat protein 的 结 构 域 比 较, 利 用 软 件 Clustal X^[15] 找 出 其 所 相 对 应 的 结 构 域 中 氨 基 酸 的 差 异 位 点。从 NCBI 获 取 地 三 叶 (*Trifolium subterraneum*)、鹰 嘴 豆 (*Cicer arietinum*)、月 季 (*Rosa chinensis*) 等 其 他 物 种 F-box 蛋 白 家 族 的 氨 基 酸 序 列, 用 MEGA 5.0^[16] 软 件 中 NJ (Neighbor-Joining) 法 构 建 系 统 发 育 进 化 树。

1.2.3 总 RNA 提取及实时荧光定量 PCR 分析 将紫花苜蓿种子种植于蛭石中, 室温 (25 $^{\circ}$ C, 16 h 光照) 培养, 每 3 d 浇一次 Hoagland 营养液。选取 4 周龄长势一致的紫花苜蓿植株于 4 $^{\circ}$ C、200 mmol/L NaCl、150 mmol/L 甘露醇和 30 μ mol/L ABA 处理 0 h、1 h、3 h、6 h、12 h、24 h 并取材。提取相应材料总 RNA, 用于 qRT-PCR。设计 *MsFTL* 荧光定量表 达 引 物 (表 1)。以 紫 花 苜 蓿 *GAPDH* 为 qRT-PCR

内 参 基 因 (表 1)。根 据 THUNDERBIRD SYBR[®] qPCR Mix 试 剂 盒 使 用 说 明 书 配 置 反 应 液, 反 应 体 系 为 1/10 cDNA first-strand 2.0 μ L、2 $\times$ SYBR Premix ExTaq 10 μ L、50 $\times$ ROX Reference Dye 0.4 μ L、正、反向引物各 0.8 μ L、用 ddH₂O 补 至 20 μ L。用 实 时 荧 光 定 量 PCR 仪 进 行 PCR 扩 增, 反 应 条 件 为 95 $^{\circ}$ C 15 s; 55 $^{\circ}$ C 30 s; 72 $^{\circ}$ C 30 s; 40 个 循 环。其 中 最 后 一 步 为 扩 增 产 物 的 溶 解 曲 线 分 析, 以 确 定 引 物 的 特 异 性。进 行 qRT-PCR 反 应 时, 每 个 样 品 设 置 3 次 技 术 重 复。qRT-PCR 结 果 采 用 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 法 计 算 基 因 表 达 量。

1.2.4 *MsFTL* 基因植物表达载体构建和转基因烟草的获得 利用 *Pst* I 和 *Bam* HI 双酶切, 将克隆载体的 *MsFTL* 基因连接到 pCBM 载体上, 从而构建出 pCBM-*MsFTL* 重组载体 (图 1)。将构建的重组载体转化农杆菌 EHA105 菌株, 获得阳性菌株后, 采用叶盘法侵染烟草^[17]。将烟草叶片放入含有 6-BA 和 NAA 的 MS 培养基中暗培养 3 d。将叶片移至含有草丁膦的筛选培养基, 培养 20 d 左右长出不定芽, 移至 MS 培养基。提取已生根抗性植株 DNA, 通过 PCR 检测, 从而获得转基因株系。

图 1 pCBM-*MsFTL* 表达载体构建示意图Fig.1 Construction of pCBM-*MsFTL*

1.2.5 转基因烟草低温处理及生理指标测定 将长势一致的野生型烟草和转基因烟草的组培苗, 移入蛭石和培养土 (1:1) 中, 室温 (25 °C, 16 h 光照) 培养 1 个月左右, 每 3 d 浇一次 Hoagland 营养液, 4 °C 冷驯化 4 h, 之后降到 -4 °C 处理 1.5 h, 每个株系设置 3 个重复, 在低温胁迫过程中, 观察其表型。并参照 Zhao 等^[18]的方法测定相对电导率, 取低温处理后的野生型烟草和转基因烟草植株相同位置的叶片, 每片叶子用直径约 0.5 cm 的打孔器进行打孔, 每 10 片烟草叶圆片放于 20 mL 去离子水中, 通过真空泵抽真空 15 min, 静置 20 min 后, 利用电导仪测得 S1。再煮沸 20 min, 凉置室温, 测得 S2, $S1/S2 \times 100\%$ 即为电导率。将培养 1 个月左右的野生型烟草和转基因烟草 4 °C 处理 24 h, 取其叶片, 参照 Dhindsa 等^[19]的方法测可溶性蛋白、可溶性糖和丙二醛 (MDA), 参照 Shi 等^[20]的方法测超氧化物歧化酶 (SOD), 参照 Aebi^[21]的方法测过氧化氢酶 (CAT)。每个试验至少 3 次重复。

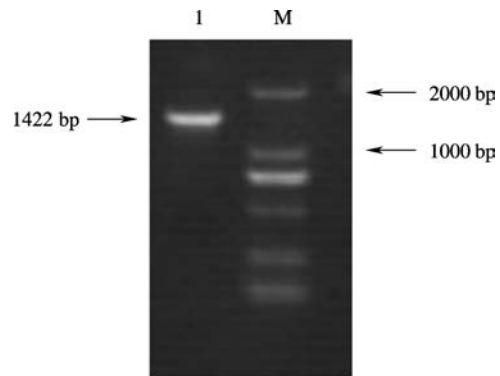
1.2.6 数据分析 用 SPSS 16.0 统计软件对不同非生物胁迫下 *MsFTL* 基因的表达模式、*MsFTL* 基因相对表达量测定, 低温胁迫下生理指标数据进行显著性分析, 所有数据以平均值 $\pm$ 标准误差 (mean $\pm$ SEM) 表示, 两组间差异采用 *t* 检验分析, 星号表示差异显著 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)。两组以上采用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 进行检验分析。不同小写字母表示差异显著, $P < 0.05$ 则被

认为差异具有统计学意义。

2 结果与分析

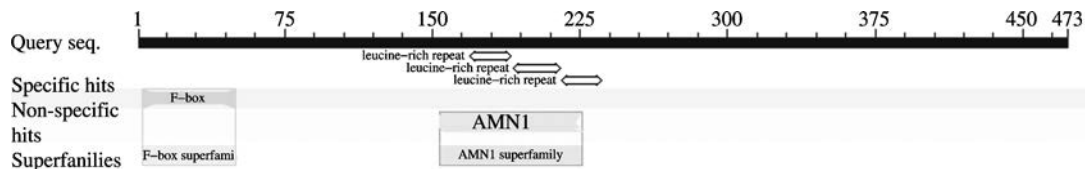
2.1 紫花苜蓿 *MsFTL* 基因克隆及蛋白结构域分析

以紫花苜蓿 RNA 反转录成的 cDNA 为模板, 克隆得到一条约 1400 bp 的条带 (图 2), 对得到的条带进行回收测序分析, 得到该基因开放阅读框全长 1422 bp, 编码 473 个氨基酸。对获得的 *MsFTL* 蛋白进行分析 (图 3), 结果显示, *MsFTL* 蛋白的 N 端为一个 F-box 基序, 从 N 端的第 3 个氨基酸残基开始, 到 N 端的第 50 个氨基酸残基结束, C 端为 3 个 LRR 重复排列组成的保守结构域, 因此 *MsFTL* 属于 F-box 蛋白家族成员。



1: PCR 产物; M: DNA 分子量 DL2000

1: PCR products, M: DNA marker DL2000

图 2 *FTL* 基因的 PCR 扩增Fig.2 The PCR fragment of *FTL* gene

MsFTL 蛋白包含 1 个 F-box 结构域以及 C 端包含 3 个 LRR 重复

MsFTL protein contained a F-box domain and three LRR repeats C-terminus

图 3 *MsFTL* 蛋白结构域Fig.3 Predicted functional domains of *MsFTL*

2.2 *MsFTL* 氨基酸序列同源性分析

将紫花苜蓿 *MsFTL* 蛋白序列与蒺藜苜蓿、鹰嘴豆、地三叶和月季等 10 种相似度较高的

F-box 蛋白序列进行比对, 采用 MEGA 5.0 软件构建系统进化树 (图 4), 发现 *MsFTL* 与蒺藜苜蓿 XP_003626345.1 亲缘关系最近, 其次是鹰嘴豆、红

车轴草和地三叶。进一步将 *MsFTL* 蛋白序列与蒺藜苜蓿 XP_003626345.1 蛋白序列相比,发现蛋白序列相似性为 96%,两者差异位点共有 11 个,其中 F-box 结构

域内的差异位点有 2 个,其他位置有 9 个,结构域内在第 19 个氨基酸处出现了 1 个甲硫氨酸的替换,在第 54 个氨基酸处出现了 1 个丝氨酸的替换(图 5)。

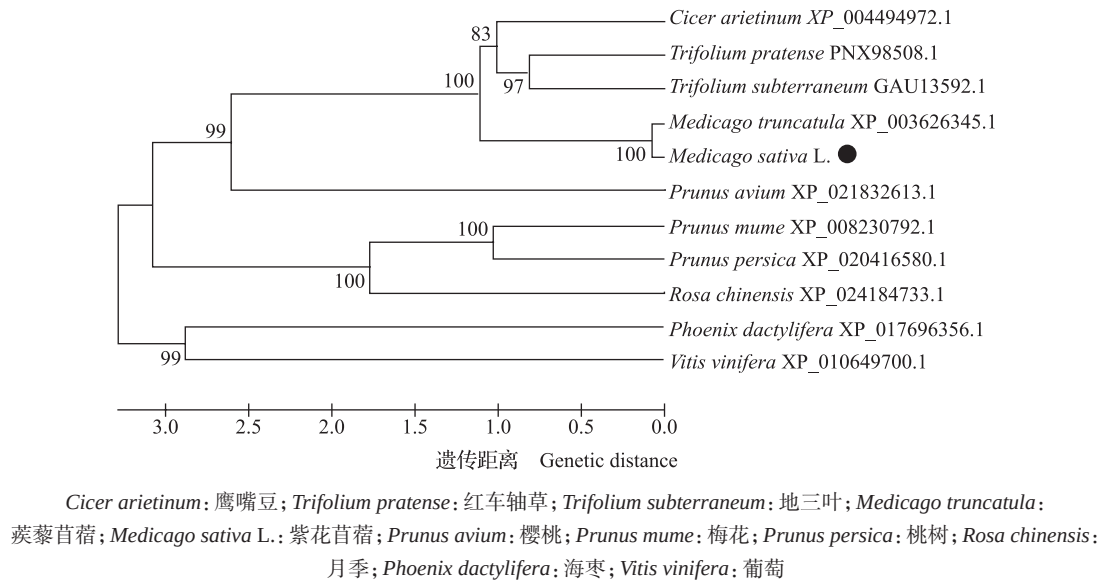
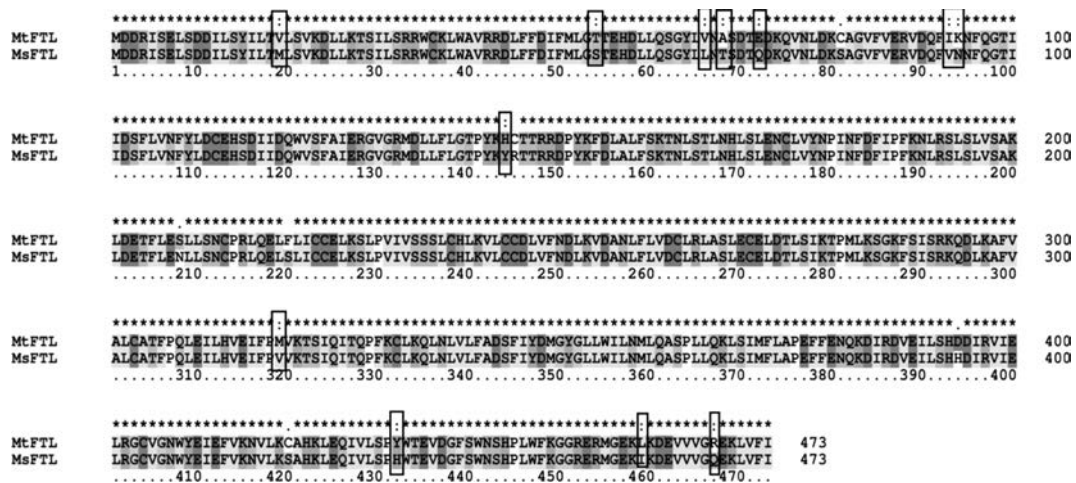


图 4 多物种间 F-box 蛋白的进化树

Fig.4 Phylogenetic tree of F-box proteins among multiple species



MtFTL: Amino acid sequence of FTL of *Medicago truncatula*, MsFTL: Amino acid sequence of FTL of *Medicago sativa* L., The black box represents the different amino acids

图 5 *MsFTL* 和蒺藜苜蓿 XP_003626345.1 蛋白序列的比对

Fig.5 Sequence alignment between *MsFTL* and XP_003626345.1

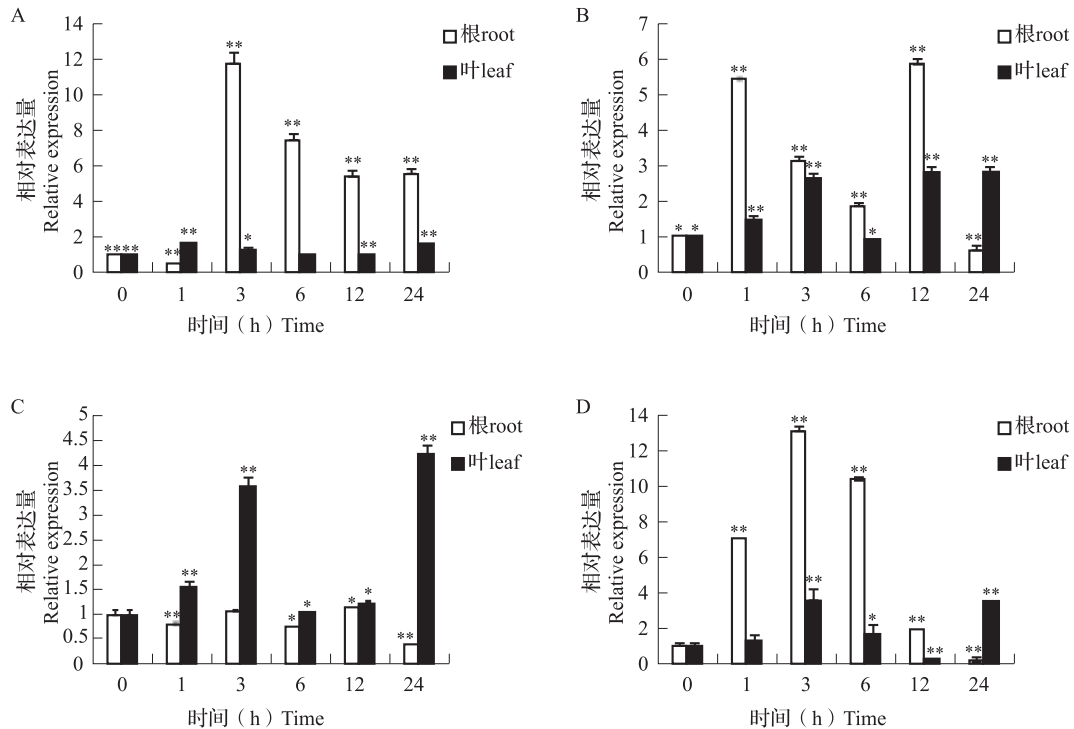
2.3 紫花苜蓿 *MsFTL* 基因的表达模式

在低温、盐、干旱以及外源 ABA 处理下, *MsFTL* 的表达量均有变化。在低温处理下, *MsFTL* 在根中表达明显高于叶中表达, 3 h 时根中表达量达到峰值, 峰值约为对照的 12 倍, 随后下降; 而在叶中表达较为平缓(图 6A)。NaCl 处理下, 处理 1 h 时 *MsFTL* 在根中表达显著提高, 随后下降,

12 h 时达到峰值, 呈波浪式表达; 叶也呈波浪式表达, 同样 12 h 时表达量最高(图 6B)。干旱处理下, *MsFTL* 在根和叶的表达差异比较明显, 在根中的表达呈现波浪式表达; 而在叶中表达 3 h 时表达量为对照的 3.5 倍, 随后下降, 24 h 时达到峰值, 峰值约为对照的 4 倍, 说明 *MsFTL* 受渗透胁迫诱导表达(图 6C)。外源 ABA 处理下, 在 3 h 前 *MsFTL* 根

中表达持续上升, 3 h 时达到峰值, 峰值约为对照的 12 倍, 随后逐渐降低, 24 h 表达量最低; *MsFTL* 叶的表达模式呈现波浪式, 3 h 时达到最大, 随后在 12 h

时下降, 在 24 h 时又达到最高, 这表明 *MsFTL* 可能在 ABA 信号通路中起作用(图 6D)。



A: 低温处理 (4 °C), B: 盐处理 (200 mmol/L NaCl); C: 干旱处理 (150 mmol/L Mannitol); D: ABA 处理 (30 μmol/L ABA);

*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; 误差线为每组的标准误差 ($n=3$), 下同

A: Cold treatment (4 °C), B: Salt treatment (200 mmol/L NaCl), C: Drought treatment (150 mmol/L Mannitol),

D: ABA treatment (30 μmol/L ABA),

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, Error bars represent the standard error of sample mean ($n=3$), the same as below

图 6 不同非生物胁迫下 *MsFTL* 基因的表达模式分析

Fig. 6 The expression analysis of *MsFTL* gene in different abiotic stress

2.4 转基因烟草的获得以及抗寒性分析

利用农杆菌介导转化烟草。获得 56 株草丁膦筛选抗性植株, 经 PCR 鉴定 28 株为阳性植株 (图 7A)。通过 Real-time PCR 分析 *MsFTL* 在转基因植株中的表达。结果表明, *MsFTL* 在所有转基因株系均有表达, 其中 L8、L23 和 L35 3 个株系表达量相对较高, 选取这 3 个株系用做下一步低温胁迫表型及生理指标分析 (图 7B)。将长势一致的转基因烟草和野生型烟草 4 °C 冷驯化 4 h 后降到 -4 °C 处理 1.5 h, 观察表型 (图 8A)。结果表明, 低温胁迫后, 野生型烟草出现了严重的萎蔫失水现象, 转基因烟草则程度较轻, 说明低温胁迫下, 转基因烟草比野生型烟草对低温胁迫更具有耐受性。对低温胁迫下转基因烟草和野生型烟草的叶圆片进行相对电导率的测定, 每个株系有 3 个重复植株 (图 8B)。结果表明, 25 °C 时, 转基因烟草和野生型烟草的相对电导率值相似, 差异不显著; 而低温处理后转基因烟草

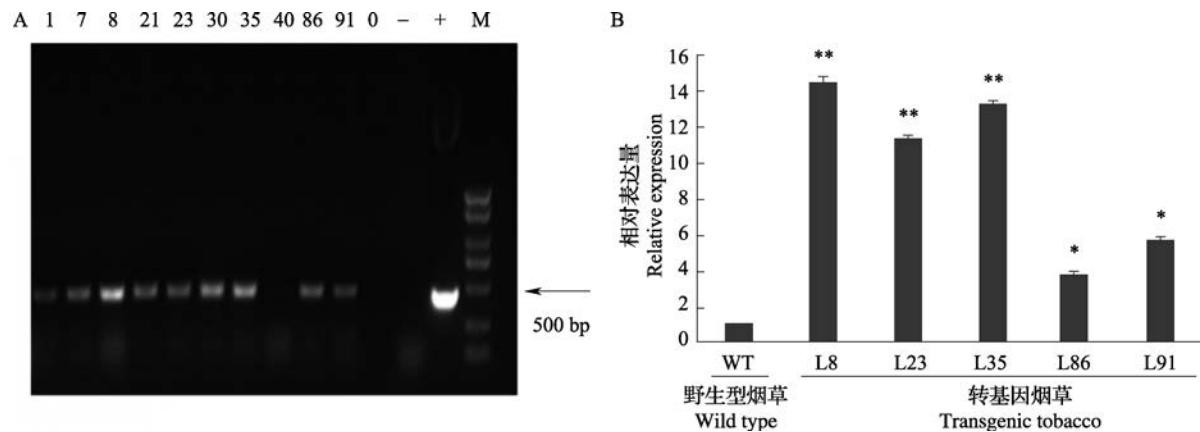
的相对电导率明显低于野生型烟草, 表明在低温胁迫下, 转基因烟草能减少植物膜受损程度。

2.5 低温胁迫下转基因烟草的生理指标分析

将转基因烟草和野生型烟草经 4 °C 处理 24 h, 取叶片测定其生理指标 (图 9)。结果表明, 转基因烟草的可溶性蛋白和可溶性糖含量高于野生型株系, 说明转基因能增加植物可溶性蛋白和可溶性糖的积累 (图 9A、B)。转基因植株的 SOD、CAT 的活性高于野生型植株。说明在低温胁迫条件下, 转基因株系抗氧化能力高于野生型植株 (图 9C、D)。25 °C 时, 转基因烟草和野生型烟草的 MDA 含量差异不显著, 低温处理后, 转基因烟草 MDA 含量低于野生型烟草且差异显著 ($P < 0.05$) (图 9E)。

3 讨论

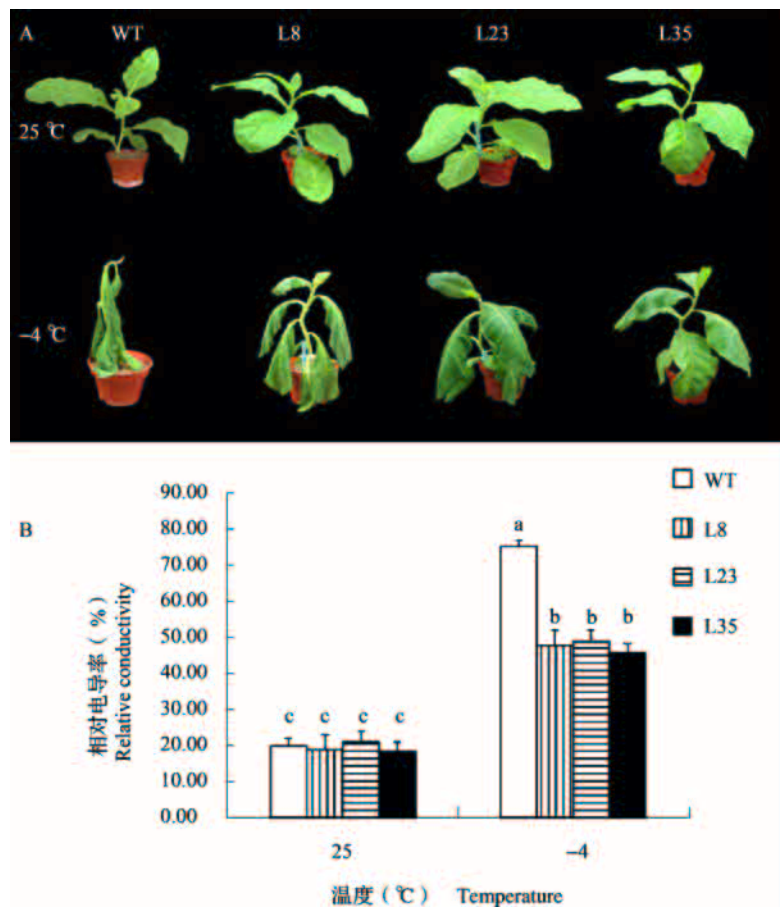
F-box 蛋白家族在真核生物中广泛存在, 家族成员数量庞大。Bai 等^[22]首次发现周期蛋白 Cyclin



A: 部分转基因烟草 PCR 鉴定; 1、7、8、21、23、30、35、40、86、91: 转基因烟草; 0: 对照; -: 阴性对照; +: 阳性对照; M: Marker DL2000; B: 相对表达量
A: PCR detection of transgenic tobacco, 1, 7, 8, 21, 23, 30, 35, 40, 86, 91: Transgenic tobacco, 0: control, -: Negative control, +: Positive control, M: Marker DL2000 B: Relative expression identification of transgenic tobacco

图 7 部分转基因烟草 PCR 鉴定和相对表达量测定

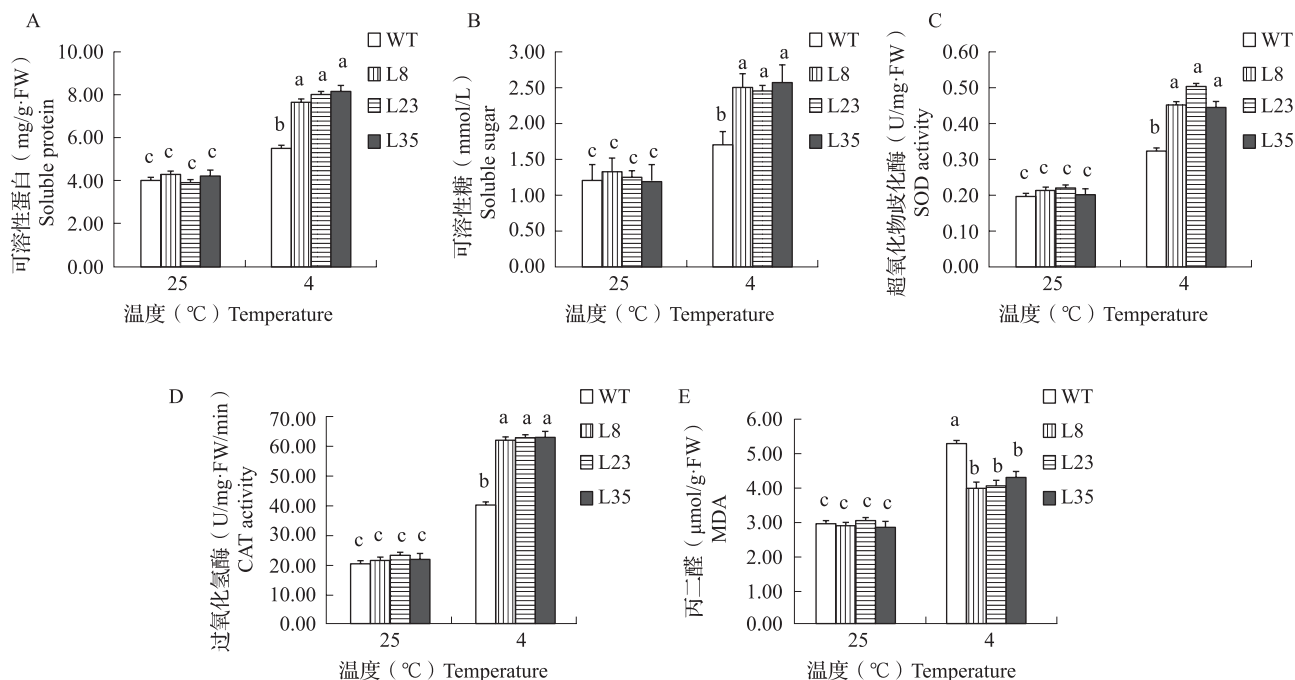
Fig.7 PCR detection and relative expression identification of transgenic tobacco



A: -4 °C 处理下转基因烟草和野生型烟草的表型观察; B: -4 °C 处理下转基因烟草和野生型烟草的相对电导率测定;
WT: 野生型烟草; L8、L23、L35: 转基因烟草。不同小写字母代表差异显著 ($P<0.05$); 误差线为每组的标准误差 ($n=3$), 下同
A: Phenotypic on transgenic tobacco and wild type tobacco under -4 °C, B: Relative conductivity on transgenic tobacco under -4 °C,
WT: Wild type, L8, L23, L35: Transgenic tobacco. The different letter indicates that the difference was significant ($P<0.05$),
Error bars represent the standard error of sample mean ($n=3$), The same as below

图 8 转基因烟草的低温胁迫表型和相对电导率的测定

Fig.8 Phenotype on transgenic tobacco and relative conductivity of transgenic gene tobacco under low temperature stress



A: 可溶性蛋白含量的变化; B: 可溶性糖含量的变化; C: 超氧化物歧化酶活性的变化; D: 过氧化氢酶活性的变化; E: 丙二醛含量的变化;

WT: 野生型烟草; L8, L23, L35: 转基因烟草

A: Change of soluble protein content, B: Change of soluble sugar content, C: Change of superoxide dismutase (SOD) activity, D: Change of Catalase (CAT) activity, E: Change of malondialdehyde (MDA) content, WT: Wild-type, L8, L23, L35: Transgenic tobacco plants

图9 低温胁迫下野生型烟草和转基因烟草的生理指标

Fig.9 Physiological indicators of wild-type tobacco and transgenic tobacco under low temperature stress

F 含有 F-box 结构域。目前已分别在酵母、果蝇、线虫和人类中报道了 *F-box* 基因^[23]。于兰芳等^[24]研究发现,葡萄 *VvF-box5* 的过表达可以提高转基因拟南芥的耐旱性。在植物中,水稻、大豆和玉米分别含有 678 个、509 个和 359 个 *F-box* 基因^[6,25-26]。*F-box* 蛋白参与多种细胞生理过程,包括细胞周期转换,转录调控和信号转导等^[8]。研究表明,许多 *F-box* 基因参与了各种非生物和生物胁迫应答。Li 等^[27]发现,含有 F-box 结构域的 *AtPP2-B11* 基因,其表达受干旱胁迫诱导,过表达 *AtPP2-B11* 使拟南芥对干旱更敏感,表明 *AtPP2-B11* 作为拟南芥的负调节因子在干旱胁迫中起着重要作用。Zhao 等^[28]发现小麦中 F-box 基因 *TaFBA1*,过表达可以提高烟草对盐的耐受性。An 等^[29]发现 MAX2 是一种多功能的 F-box 蛋白,过表达 *MdMAX2* 能够提高植株的耐盐和耐旱性。本研究通过对低温胁迫的肇东苜蓿转录组测序分析发现, *MsFTL* 基因表达上调,暗示 *MsFTL* 基因可能在紫花苜蓿抵抗低温胁迫过程中发挥重要作用。克隆获得的 *MsFTL* 基因, *MsFTL* 蛋白具有 F-box 蛋白结构域,该基因受低温、盐、干旱以及外源 ABA 处理下上调表达。

渗透胁迫物质通过多种途径在植物渗透耐受

性中发挥作用,如保护酶不被变性、稳定膜、大分子或蛋白质的结构等。Hou 等^[30]研究发现,在低温胁迫下,转 *VvBAP1* 基因拟南芥的可溶性蛋白和可溶性糖的含量高于野生型,提高了拟南芥对低温的耐受性。Gu 等^[31]研究发现低温胁迫下拟南芥突变体 *AtDUF1517* 的可溶性蛋白和可溶性糖的含量低于对照组,降低了对低温的耐受性。为了研究 *MsFTL* 基因在抵抗低温胁迫方面的功能,将该基因转化到了烟草中。在低温胁迫后,转基因烟草表现出较强的抗性表型。同时,转基因烟草的可溶性蛋白和可溶性糖都高于对照烟草。推测可能是转基因烟草产生更多的可溶性蛋白和可溶性糖来抵御低温胁迫。研究表明低温胁迫下,植物中会产生氧自由基,即活性氧。活性氧不仅对植物细胞器和细胞膜有损伤,还会对核酸和蛋白质等大分子物质有伤害^[32]。植物保护酶系统可以作为抗寒性指标,包括 SOD、CAT 等,间接反应植物的耐寒性^[33]。Zhu 等^[34]研究表明,在低温胁迫下,转 *CsSPMS* 基因烟草的 SOD 和 CAT 的活性高于野生型,并对低温具有较强的耐受性。本研究发现,低温胁迫下,转基因烟草的 SOD、CAT 活性高于野生型,推测有可能是过表达 *MsFTL* 使烟草产生更多的 SOD 和 CAT 来

抵御低温。MDA 是一种脂质过氧化产物,研究表明膜脂的氧化反应导致 MDA 在植物中积累,发现 MDA 被广泛用作植物对低温胁迫反应的氧化性脂质损伤的可靠标记物^[35-36]。Nelofer 等^[37]研究发现,在低温胁迫下,金盏花处理组的 MDA 高于对照组。本研究的结果显示,低温胁迫下,转基因植株 MDA 含量低于野生型,说明过表达 *MsFTL* 加强了膜的稳定性,进而增强植物的低温抗性。

本研究通过低温、盐、干旱以及外源 ABA 处理, *MsFTL* 基因表达水平以及在低温胁迫下的表型和生理实验对 *MsFTL* 基因的功能进行了探究。*MsFTL* 可能通过参与小分子有机物的积累、活性氧代谢等代谢通路的调控提升植物对低温胁迫的抗性。而 *MsFTL* 在其他胁迫以及植物发育方面是否同样重要仍有待进一步研究。

参考文献

- [1] 许克恒,张云彤,张莹,王彬,王法微,李海燕. 植物 F-box 基因家族的研究进展. 生物技术通报, 2018, 32(1): 26-32
Xu K H, Zhang Y T, Zhang Y, Wang B, Wang F W, Li H Y. Research progress of plant F-box gene family. Biotechnol Bulletin, 2018, 32(1): 26-32
- [2] Koo A J, Thireault C, Zemelis S, Poudel A N, Zhang T, Kitaoka N F, Brandizzi M H, Howe G A. Endoplasmic reticulum-associated inactivation of the hormone jasmonoyl-L-isoleucine by multiple members of the cytochrome P45094 family in *Arabidopsis*. Journal of Biological Chemistry, 2014, 289(43): 29728-29738
- [3] Jin J, Cardozo T, Lovering R C, Elledge S J, Pagano M, Harper J W. Systematic analysis and nomenclature of mammalian F-box proteins. Genes & Development, 2004, 18(21): 2573-2580
- [4] Jana J R, Vignesh D, Parameswari P, Sangeeth P D, Su R C, So Y Y, Seongmin H, Sang H O, Man H O, Yong P L. *F-Box* genes in *Brassica rapa*: genome-wide identification, structural characterization, expressional validation, and comparative analysis. Plant Molecular Biology Reporter, 2018, 36(3): 500-517
- [5] 霍冬英,郑炜君,李盼松,徐兆师,周永斌,陈明,马有志,闵东红,张小红. 谷子 F-Box 家族基因的鉴定,分类及干旱响应. 作物学报, 2014, 40(9): 1585-1594
Huo D Y, Zheng W J, Li P S, Xu Z S, Zhou Y B, Chen M, Ma Y Z, Min D H, Zhang X H. Millet F-Box family gene identification, classification and drought response. Acta Agronomica Sinica, 2014, 40(9): 1585-1594
- [6] Jain M, Ni A, Arora R, Agarwal P, Ray S, Harna P S, Kapoor S, Tyagi A K, Hurana J P K. F-Box proteins in rice. Genome-wide analysis, classification, temporal and spatial gene expression during panicle and seed development, and regulation by light and abiotic stress. Plant Physiology, 2007, 143(4): 1467-1483
- [7] Tyler L, Thomas S G, Hu J, Dill A, Alonso J M, Ecker J R, Sun T. DELLA proteins and gibberellin-regulated seed germination and floral development in *Arabidopsis*. Plant Physiology, 2004, 135(38): 1008-1019
- [8] Xu G Y, Cui Y C, Wang M L. OsMs9, a novel putative rice F-box containing protein, confers enhanced salt tolerance in transgenic rice and *Arabidopsis*. Molecular Breeding, 2014, 34(21): 1055-1064
- [9] Min J H, Dae Y K, Si Y K, Dong S K, Jin B K, Yong W S. Wheat F-box protein recruits proteins and regulates their abundance during wheat spike development. Molecular Biology Reports, 2012, 42(18): 132-143
- [10] Chen Z H, Li M T, Yuan Y. Ectopic expression of cucumber (*Cucumis sativus* L.) *CsTIR/AFB* genes enhance salt tolerance in transgenic *Arabidopsis*. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2017, 131(1): 107-118
- [11] Chen R, Guo W, Yin Y, Gong Z H. A novel F-Box protein CaF-Box is involved in responses to plant hormones and abiotic stress in Pepper (*Capsicum annuum* L.). International Journal of Molecular Sciences, 2014, 15(2): 2413-2430
- [12] 曹宏,章会玲,盖琼辉,陈红,赵满来. 22 个紫花苜蓿品种的引种试验和生产性能综合评价. 草业学报, 2011, 20(6): 219-229
Cao H, Zhang H L, Gai Q H, Chen H, Zhao M L. Comprehensive evaluation of introduction and performance of 22 alfalfa varieties. Journal of Grassland Science, 2011, 20(6): 219-229
- [13] 隋勇,刘长恩. 肇东市苜蓿产业化发展的现状与对策. 中国乳业, 2012, 21(5): 11-12
Sui Y, Liu C E. Current situation and countermeasures of Alfalfa industrialization in Zhaodong city. China Dairy Industry, 2012, 21(5): 11-12
- [14] Lu G Q, Moriyama E N. Vector NTI, a balanced all-in-one sequence analysis suite. Briefings in Bioinformatics, 2004, 5(4): 378-388
- [15] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research, 1997, 25(24): 4876-4882
- [16] Tamura K, Peterson D, Peterson N. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28(10): 2731-2739
- [17] Hoekema A, Hirsch P R, Hooykaas P J. A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. Nature, 1983, 303(5913): 179-180
- [18] Zhao L N, Liu F X, Xu W Y, Di C, Zhou S X, Xue Y B, Yu J J, Su Z. Increased expression of *OsSPX1* enhances cold/subfreezing tolerance in tobacco and *Arabidopsis thaliana*. Plant Biotechnology Journal, 2009, 7(7): 550-561
- [19] Dhindsa R S, Matowe W. Drought tolerance in two mosses: correlated with enzymatic defence against lipid peroxidation. Journal of Experimental Botany, 1981, 32(1): 79-91
- [20] Shi J, Fu X Z, Peng T, Huang X S, Fan Q J, Liu J H. Spermine pretreatment confers dehydration tolerance of citrus in vitro plants via modulation of antioxidative capacity and stomatal response. Tree Physiology, 2010, 30(7): 914-922
- [21] Aebi H. Catalase in vitro. Methods in Enzymology, 1984, 105(105): 121-126

- [22] Bai C, Sen P, Hofmann K, Ma L, Goebel M, Harper J W, Elledge S J. SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box. *Cell*, 1996, 86 (2): 263-274
- [23] Edward T K, Michele P. The F-box protein family. *Genome Biology*, 2000, 1 (5): 1-7
- [24] 于兰芳,周硕,张双喜,纪玉洁,刘永伟. 葡萄 F-box 基因 *VvF-box5* 的基因结构与表达分析. *植物遗传资源学报*, 2018, 19 (2): 361-369
Yu L F, Zhou S, Zhang S X, Ji Y J, Liu Y W. Analysis of gene structure and expression of f-box gene *VvF-box5* in grape. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2018, 19 (2): 361-369
- [25] Cui H R, Zhang Z R, Lv W. Genome-wide characterization and analysis of F-box protein-encoding genes in the *Malus domestica* genome. *Molecular Genetics and Genomics*, 2015, 290 (4): 1435-1446
- [26] Jia F, Wu B, Li H. Genome-wide identification and characterisation of F-box family in maize. *Molecular Genetics and Genomics*, 2013, 288 (11): 559-577
- [27] Li Y, Jia F, Yu Y. The SCF E3 ligase AtPP2-B11 plays a negative role in response to drought stress in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2014, 32 (5): 943-956
- [28] Zhao Z X, Zhang G Q, Zhou S M. The improvement of salt tolerance in transgenic tobacco by overexpression of wheat F-box gene *TaFBA1*. *Plant Science*, 2017 (259): 71-85
- [29] An J P, Li R, Qu F J. Apple F-Box protein MdMAX2 regulates plant photomorphogenesis and stress response. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7 (1235): 1685-1699
- [30] Hou L X, Zhang G K, Zhao F G. VvBAP1 is involved in cold tolerance in *Vitis vinifera* L. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9 (6): 102-123
- [31] Gu L J, Cheng H M. Isolation, molecular cloning and characterization of a cold-responsive gene, *AmDUF1517*, from *Ammopiptanthus mongolicus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2014, 117 (2): 201-211
- [32] Mccord J M, Fridovich I. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry*, 1969, 224 (22): 6049-6055
- [33] Shalata A, Neumann P M. Exogenous ascorbic acid (vitamin C) increases resistance to salt stress and reduces lipid peroxidation. *Journal of Experimental Botany*, 2001, 52 (364): 2207-2211
- [34] Zhu X, Li Q, Hu J, Wang M, Li X. Molecular cloning and characterization of spermine synthesis gene associated with cold tolerance in Tea plant (*Camellia sinensis*). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2015, 177 (5): 1055-1068
- [35] Steponkus P L. Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation. *Annual Review of Plant Biology*, 2003, 35 (1): 543-584
- [36] Sagarika M, Sanjeev K, Bedabrata S. Crosstalk between salt, drought, and cold stress in plants: Toward genetic engineering for stress tolerance. *Abiotic Stress Resports Plant*, 2016, 23 (5): 57-88
- [37] Nelofer J, Umer M, Khurshid I, Riffat J. Cold stress modulates osmolytes and antioxidant system in *Calendula officinalis*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2018, 40 (4): 73-86