

番茄糖基转移酶基因 *SIUDP* 提高拟南芥镉胁迫耐性的作用研究

张美玉, 马玉芳, 罗宇芳, 耿鑫鑫, 郭静, 张欣欣, 陈超, 金晓霞

(哈尔滨师范大学生命科学与技术学院/黑龙江省道地野生药材种质资源研究中心, 哈尔滨 150025)

摘要: 镉(Cd)胁迫严重限制植物生长,因此鉴定与植物镉胁迫耐受性相关的基因尤为重要。课题组前期通过转录组数据筛选获得番茄UDP-糖基转移酶基因(*SIUDP*)响应植株镉胁迫反应。本研究克隆*SIUDP*基因编码区全长序列,该基因在叶片和果实中表达量较高,受镉胁迫诱导上调表达。酵母耐镉性分析表明,转入*SIUDP*基因提高了酵母镉胁迫的耐受性。进一步获得*SIUDP*过表达拟南芥株系,CdCl₂胁迫下(40、60、80 μmol/L),与野生型相比,过表达拟南芥株系的子叶失绿程度下降;发芽率、根长和种子存活率提高,而丙二醛含量下降,可溶性糖含量、超氧化物歧化酶活性、过氧化物酶活性增加,且金属离子转运蛋白基因*ZIP1*、*IRT1*、*CSD1*和*COPT2*的表达水平显著高于野生型。结果表明,*SIUDP*过表达株系通过调节抗氧化酶系统,提高植株清除活性氧能力,降低膜脂过氧化程度,提高金属离子转运等方面提高植株耐镉性。本研究为糖基转移酶基因在植物耐受镉胁迫中的作用研究提供一定的理论依据,并为园艺植物抗性分子育种提供了候选基因。

关键词: 番茄;镉;糖基转移酶基因;抗氧化酶系统;金属转运基因

Study on the Effect of Tomato Glycosyltransferase Gene *SIUDP* in Improving Cadmium Stress Tolerance in *Arabidopsis thaliana* L.

ZHANG Meiyu, MA Yufang, LUO Yufang, GENG Xinxin, GUO Jing,
ZHANG Xinxin, CHEN Chao, JIN Xiaoxia

(College of Life Science and Technology, Harbin Normal University/Heilongjiang Research Center of Genuine Wild Medicinal Materials Germplasm Resources, Harbin 150025)

Abstract: Cadmium (Cd) stress severely restricts plant growth, so it is particularly important to identify genes associated with plant cadmium stress tolerance. The UDP-glycosyltransferase gene (*SIUDP*) of tomato was screened by transcriptome data in response to cadmium stress in preliminary tests. In this research, the full-length sequence of the coding region of *SIUDP* gene was cloned, the expression of the gene were higher in leaves and fruits than other tissues, and the expression of the gene was up-regulated by cadmium stress. Cadmium tolerance analysis of yeast showed that the transfer of *SIUDP* gene improved the tolerance of cadmium stress in yeast. *SIUDP*-overexpressed *Arabidopsis thaliana* lines were obtained further, and the degree of cotyledonous greening of *Arabidopsis* overexpressing lines decreased under CdCl₂ stress (40, 60, and 80 μM/L) compared with wild-type lines. The germination rate, root length and seed survival rate increased, while the malondialdehyde content decreased, meanwhile the soluble sugar content, superoxide dismutase activity and peroxidase activity increased, the expression levels of metal ion transporter genes *ZIP1*, *IRT1*, *CSD1* and *COPT2* were significantly higher than those of wild type. These results showed that the *SIUDP* overexpression line

收稿日期: 2023-10-23 网络出版日期: 2024-01-30

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20231023002>

第一作者研究方向为植物生理与分子生物学, Email: 769905367@qq.com

通信作者: 金晓霞, 研究方向为植物生理与分子生物学, Email: xiaoxia6195@126.com

基金项目: 黑龙江省自然科学基金(LH2021C052)

Foundation project: Natural Science Foundation of Heilongjiang Province (LH2021C052)

improved the cadmium tolerance of plants by regulating the antioxidant enzyme system, improving the ability of plants to scavenge reactive oxygen species, reducing the degree of membrane lipid peroxidation, and improving metal ion transport. This study provides a theoretical basis for the study of the role of glycosyltransferase genes in plant tolerance to cadmium stress, and provides candidate genes for molecular breeding of horticultural plant resistance.

Key words: tomato; cadmium; glycosyltransferase genes; antioxidant enzyme system; metal transport gene

重金属如镉(Cd)造成的土壤污染正在全球范围内受到广泛关注,因为重金属不能被降解并在土壤中持续存在^[1]。此外,这些重金属易被植物吸收,并通过食物链进入人体,影响人体健康^[2-3]。目前,植物已经进化出多种途径来承受重金属胁迫,其中活性氧清除系统和金属离子转运途径在植物抵抗重金属引起的胁迫中起着重要作用^[4-7]。糖基转移酶广泛分布在植物中,在生物胁迫和非生物胁迫中起重要作用^[8]。尿苷二磷酸(UDP, uridine diphosphate)-糖基转移酶(UGTs, glycosyltransferases)是植物中最大的GTs超家族之一。这些酶有助于植物适应非生物胁迫^[9]。例如,新型糖基转移酶 UGT2 在调节水稻耐盐性方面起着重要作用,在盐胁迫处理的水培条件下,过表达 UGT2 的幼苗比野生型生长更好,而突变株系则遭受更严重的生长抑制^[10]。水稻基因 *GmUGT73F4* 能够与金属硫蛋白 4(MT4, metallothionein 4)相互作用,响应盐、干旱、冷胁迫以及脱落酸诱导,这可能是通过上调胁迫相关基因和清除活性氧来实现的,同时, *GmUGT73F4* 在增强植物种子活力和对非生物胁迫的耐受性方面发挥着重要作用^[11]。牵牛基因 *PhUGT51* 可以被盐胁迫快速诱导,其过量表达导致耐盐性显著增加^[12]。此前,从冬凌草中扩增出 UDP-糖基转移酶基因 *IrUGT86A1*, 在氯化钠、茉莉酸甲酯和脱落酸作用下可以调节 *IrUGT86A1* 基因在冬凌草中的表达^[13]。UDP-糖基转移酶在调节植物衰老和应对非生物胁迫方面发挥着关键作用^[14], 例如,糖基转移酶基因 *UGT76B1* 可能在调节植物衰老中具有重要且特定的作用^[15]。拟南芥 *AtUGT74E2* 基因的过表达可以促进拟南芥种子萌发^[16], 拟南芥 *UGT76C2* 基因表达使植物能够应对缺水并参与干旱胁迫^[17]。同样,茶树 UDP-葡萄糖基转移酶基因 *UGT91Q2* 表达受到冷胁迫的强烈诱导,并且特异性催化橙花叔醇的糖基化,茶树吸收空气中的橙花叔醇并将其转化为葡萄糖苷,从而增强茶树的冷胁迫耐受^[18]。在吡啶-3-丁酸的作用下拟南芥糖基转移酶基因 *UGT74E2* 被证明参与水分胁迫响应的调节^[19]。

番茄(*Lycopersicon esculentum* Mill.)是世界上最重要的园艺作物之一,其产量和需求量非常大,作为设施栽培的重要园艺蔬菜,其受到镉胁迫的污染影响也很严重^[20],因此研究番茄的镉(Cd)抗性机制非常重要。尽管已有一些对植物糖基转移酶的功能研究报道(如拟南芥、水稻、玉米和小麦),但研究糖基转移酶在番茄镉耐受性中作用的报告较少。本研究通过前期转录组数据筛选获得番茄糖基转移酶基因 *SIUDP*, 其响应番茄植株的镉胁迫应答。在克隆 *SIUDP* 基因 CDS 全长序列的基础上,进一步分析该基因组织表达特征和镉胁迫诱导表达特性,利用酵母转化系统和拟南芥遗传转化系统,分析 *SIUDP* 基因在调控酵母和拟南芥植株镉胁迫抗性方面的作用,为糖基转移酶基因在植物抵抗镉胁迫中的作用研究提供一定的理论依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

本研究试验材料是本实验室保存的番茄商品种红罗成和哥伦比亚野生型拟南芥。将红罗成种子置于 1:1 的泥炭土和蛭石混合物中,播种于营养钵(6.5 cm×6.5 cm)中,一钵一株,将营养钵置于温室,培养条件为温度 22~26℃,光照 16 h,避光 8 h,且相对湿度保持在 60%~70%。酿酒酵母感受态 INVSC1 菌株由上海唯地生物和中宜生物公司提供。根癌农杆菌 GV3101 和植物表达载体 pGM-T 质粒为本实验室保存。

1.2 *SIUDP* 基因的克隆与生物信息学分析

采用 4 叶期番茄植株叶片进行基因克隆,利用 PCR 技术扩增基因 CDS 全长。半定量 PCR 反应体系 12.5 μL:模板 cDNA 1 μL,上下游引物各 1 μL, Mix 酶 6.25 μL, ddH₂O 3.25 μL。半定量 PCR 反应条件:在 95℃ 预变性 2 min;96℃ 变性 30 s,55℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,共 35 次循环;72℃ 终延伸 5 min。引物设计见表 1。将番茄 *SIUDP* 基因 CDS 连接到克隆载体 pGM-T 中形成 pGM-T-*SIUDP* 重组质粒,测序后分析序列信息。使用 NCBI 网站

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)进行序列比对,分别与马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)、辣椒(*Capsicum annuum* L.)、烟草(*Nicotiana benthamiana* L.)、橄榄(*Olea europaea* var. *sylvestris*)、梔子花(*Gardenia*

jasminoides J.Ellis)、咖啡(*Coffea arabica* L.)、柳树(*Salix babylonica* L.)、梨树(*Pyrus spp*)和越橘(*Vaccinium darrowii*)进行比较,并利用MEGA5.0软件构建系统发育进化树。

表1 引物序列汇总

Table 1 Summary of primer sequences

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence	用途 Use
<i>SIUDP-F</i>	AATGGAGGGAGTGAC	过表达载体构建
<i>SIUDP-R</i>	AAAGTGTTCCAGGTC	
<i>SIUDP-D-F</i>	<u>GGGGTACCAAGTTGCTGTGGTTATGGTG</u> (<i>Kpn</i> I)	
<i>SIUDP-D-R</i>	<u>AACTGCAGAAAGGGGTGCCAGTAGG</u> (<i>Pst</i> I)	
<i>SIUDP-MF</i>	<u>GGGGTACC</u> ATGGCATCAACAACAAACCATGTAAAT(<i>Kpn</i> I)	构建酵母重组质粒
<i>SIUDP-MR</i>	<u>GCTCTAGACT</u> ATCTAGTGATGTGGCAACAAAAGAT(<i>Xba</i> I)	
<i>SLActin11-qF</i>	AAGATCCCATTCTGTCCTCCAT	内参引物
<i>SLActin11-qR</i>	CAAGAGCCTCAAGGAGAGTTGG	
<i>AtActin7-qF</i>	TCGTTTCGCTTTCCTTAG	
<i>AtActin7-qR</i>	CTCACCATTCAGTTCC	
<i>SIUDP-qF</i>	GAGCAACAGTAATGGAGGGAGTGAC	实时定量PCR分析
<i>SIUDP-qR</i>	TTCTCCGTAAAGTGTTCAGGTC	
<i>ZIP1-qF</i>	AGACACCATAAAGCCACTCA	
<i>ZIP1-qR</i>	TTTCTGTAGCTAAACCAC	
<i>IRT1-qF</i>	TGGGTCTTGGCGGTGTATC	
<i>IRT1-qR</i>	CCGAATGGTGTGTACC GC	
<i>COPT2-qF</i>	CCTTTCGTATTTGGTGATGCT	
<i>COPT2-qR</i>	AAACACCTGCGTTAAAGGAC	
<i>CSD1-qF</i>	TCCATGCAGACCCTGATGAC	
<i>CSD1-qR</i>	CCTGGAGACCAATGATGCC	
<i>GSH1-qF</i>	TTTGAGCAGTATGTTGACTACGCAC	
<i>GSH1-qR</i>	GCAGTTCACCAGGGAGACAGG	

下划线表示限制性内切酶识别位点

The underlined line indicates the restriction enzyme recognition site

1.3 *SIUDP*基因的qRT-PCR表达特性分析

取4月龄番茄植株的主茎、侧茎、叶、根、花和果实,研究*SIUDP*在以上组织中的表达量;分别选用0、20、40、60、80和100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 CdCl_2 胁迫番茄植株12 h,取胁迫后番茄植株根和叶,研究不同浓度镉胁迫下*SIUDP*表达的变化;选用50 $\mu\text{mol/L}$

镉胁迫番茄植株,分别取胁迫后0、1、2、3、4和5 d植株的根和叶,测定*SIUDP*基因表达量,研究镉胁迫下不同时间点*SIUDP*表达的变化。

1.4 RNA分离和实时荧光定量PCR

使用FOREGENE测定法^[21]从番茄叶和根中分离总RNA,并使用ReverTra AceTM qPCR RT试剂

盒合成 cDNA。采用 qRT-PCR 方法研究基因表达量变化,反应体系为 9.5 μL ddH₂O、1 μL *SIUDP*-qR (10 $\mu\text{mol/L}$)、1 μL *SIUDP*-qF (10 $\mu\text{mol/L}$)、12.5 μL 10 \times PCR Buffer Mix、1 μL cDNA,共 25 μL 。PCR 反应程序为 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 10 s,56 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 1.5 min,35 个循环,72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min,以 *SlActin11* 为对照。引物序列如表 1 所示,委托上海生工工程有限公司合成。基因相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算^[22],使用 SPSS 20.0 软件对数据进行统计学分析。

1.5 转 *SIUDP* 基因酵母的镉胁迫抗性分析

将番茄 *SIUDP* 基因 CDS 区克隆回收片段与 pYES2 质粒连接,构建重组质粒 pYES2-*SIUDP*,并将重组质粒转化至酿酒酵母 INVSC1 菌株,方法见说明书。提取重组质粒 INVSC1-pYES2-*SIUDP*,送往上海生工工程有限公司,测序筛选出阳性克隆。采用浓度为 0、20、40、60、80 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 CdCl₂ 分别处理含重组质粒的酵母菌株 INVSC1-pYES2-*SIUDP*(以下简称为 pYES2-*SIUDP*)和含有空载体的对照菌株 INVSC1-pYES2(以下简称为 pYES2),振荡培养 20~24 h,收集菌液,将菌液依次稀释 10、100、1000、10000、100000 倍,取 2 μL 稀释菌液接种于固体培养基,30 $^{\circ}\text{C}$ 倒置培养 2~3 d,观察菌落生长情况。取 10 μL 菌液接种于 10 mL 液体选择培养基中,置于 30 $^{\circ}\text{C}$ 下振荡培养 36 h,测定菌液 OD₆₀₀ 值。每个试验设置 3 次重复,所得数据用 SPSS 软件进行分析。

1.6 过表达 *SIUDP* 基因载体的构建和转基因拟南芥的鉴定

利用花序侵染法^[23],将含有 pGM-*SIUDP* 重组质粒的根癌农杆菌 GV3101 侵染野生型拟南芥而获得转基因拟南芥植株。在含有抗生素的(50 mg/L 卡那&利福平)MS 固体培养基上筛选阳性植株,并进行半定量 PCR 和 qRT-PCR 鉴定,获得两个转基因株系 *SIUDP*-OE1 和 *SIUDP*-OE2。取拟南芥野生型(WT, wild type)和转基因株系 *SIUDP*-OE1、*SIUDP*-OE2 叶片各 0.1 g,提取 RNA,逆转录获得 cDNA。PCR 反应体系:9.5 μL ddH₂O、1 μL *SIUDP*-qR (10 $\mu\text{mol/L}$)、1 μL *SIUDP*-qF (10 $\mu\text{mol/L}$)、12.5 μL 10 \times PCR Buffer Mix、1 μL cDNA,共 25 μL 。PCR 反应程序为 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 10 s,59 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 1.5 min,35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min,以 *SlActin11* 为对照,对转基因型进行检测。将转基因拟南芥种子春化 3 d,培养室培养 4 d 后,置于含有不同浓度 CdCl₂(0、40、60 和 80 $\mu\text{mol/L}$)的 MS 培养基中竖直培养 7 d,每隔 24 h 统计一次,

共 7 次,随后统计转基因拟南芥植株发芽率、子叶失绿和根长。发芽率=发芽的种子数/种子总数 \times 100%,子叶失绿=叶片变黄数量/叶片总数量 \times 100%,根长使用游标卡尺进行测量。将转基因拟南芥植株和野生型移入草炭土中培育,室温 24 $^{\circ}\text{C}$,光照 16 h/8 h,培养 15 d 后对植株表型进行观察,查看存活植株个数。

1.7 转基因植株生理响应指标的测量

将 1.6 鉴定获得的拟南芥转 *SIUDP* 基因阳性材料和野生型同时种植生长至 35 d,用 60 $\mu\text{mol/L}$ CdCl₂ 处理拟南芥,选取拟南芥叶片,测定其超氧化物歧化酶(SOD, superoxide dismutase)活性^[24]和过氧化物酶(POD, peroxidase)活性^[25],丙二醛(MDA, malondialdehyde)含量^[26]和可溶性糖含量^[27]等生理响应指标。

1.8 活性氧清除系统和金属转运相关基因的定量表达分析

取生长 28 d 的转基因拟南芥 *SIUDP*-OE1、*SIUDP*-OE2 两个阳性株系和野生型拟南芥用 CdCl₂ (60 $\mu\text{mol/L}$)处理,以双蒸水处理作为对照,在 0 h、3 h 和 6 h 时剪取叶片 0.1 g(设置 3 次生物学重复),采用 qRT-PCR 方法,反应体系和程序如 1.4,以 *AtActin7* 基因为内参,对重金属胁迫下转基因拟南芥的活性氧清除系统基因(*CSD1*、*GSH1*)和金属离子转运基因(*ZIP1*、*IRT1*、*COPT2*)进行定量表达分析,引物见表 1。

2 结果与分析

2.1 番茄 *SIUDP* 基因的克隆和生物信息学分析

SIUDP 基因序列长度为 1486 bp(图 1A),该基因编码的蛋白质序列与马铃薯蛋白质序列关系最密切,其次是烟草和辣椒(图 1B)。此外,*SIUDP* 蛋白序列与多种植物的序列相似,例如马铃薯,胡椒,烟草等,表明该蛋白序列具有高度保守性(图 1C)。

2.2 镉胁迫下番茄 *SIUDP* 基因表达模式分析

SIUDP 基因在番茄不同组织中的表达分析结果表明,50 $\mu\text{mol/L}$ CdCl₂ 胁迫番茄植株 12 h 时,*SIUDP* 基因在主茎、叶片、根部、侧茎、花和果实中均有表达,特别是在叶片和果实中的表达高于其他组织,*SIUDP* 基因在叶片中的表达量是主茎的 8.4 倍;*SIUDP* 基因在果实中的表达量是主茎的 5.8 倍;*SIUDP* 基因在根和侧茎的表达量约是主茎的 3 倍(图 2A)。此外,相同镉浓度不同处理时间基因的表达分析表明,在番茄植株的根系中,与对照 0 d 相

比,镉胁迫4 d后 *SIUDP* 基因表达量增加,在镉胁迫5 d后是对照0 d的6.2倍(图2B)。镉胁迫2 d后, *SIUDP* 基因在番茄叶片中的表达量比对照0 d高17.5倍(最大值为22.1倍)(图2C)。不同浓度镉胁迫处理试验表明,用不同浓度(20、40、60、80和100 $\mu\text{mol/L}$)的 CdCl_2 胁迫番茄植株12 h,60 $\mu\text{mol/L}$

CdCl_2 胁迫后, *SIUDP* 基因在番茄根中的表达量比对照0 $\mu\text{mol/L}$ 高7倍(最大值为7.6)(图2D),40 $\mu\text{mol/L}$ CdCl_2 胁迫后, *SIUDP* 基因在番茄叶片中的表达量比对照高11.2倍(最大值为11.2)(图2E)。这些结果表明,镉胁迫上调了 *SIUDP* 基因在叶片和根系中的表达。

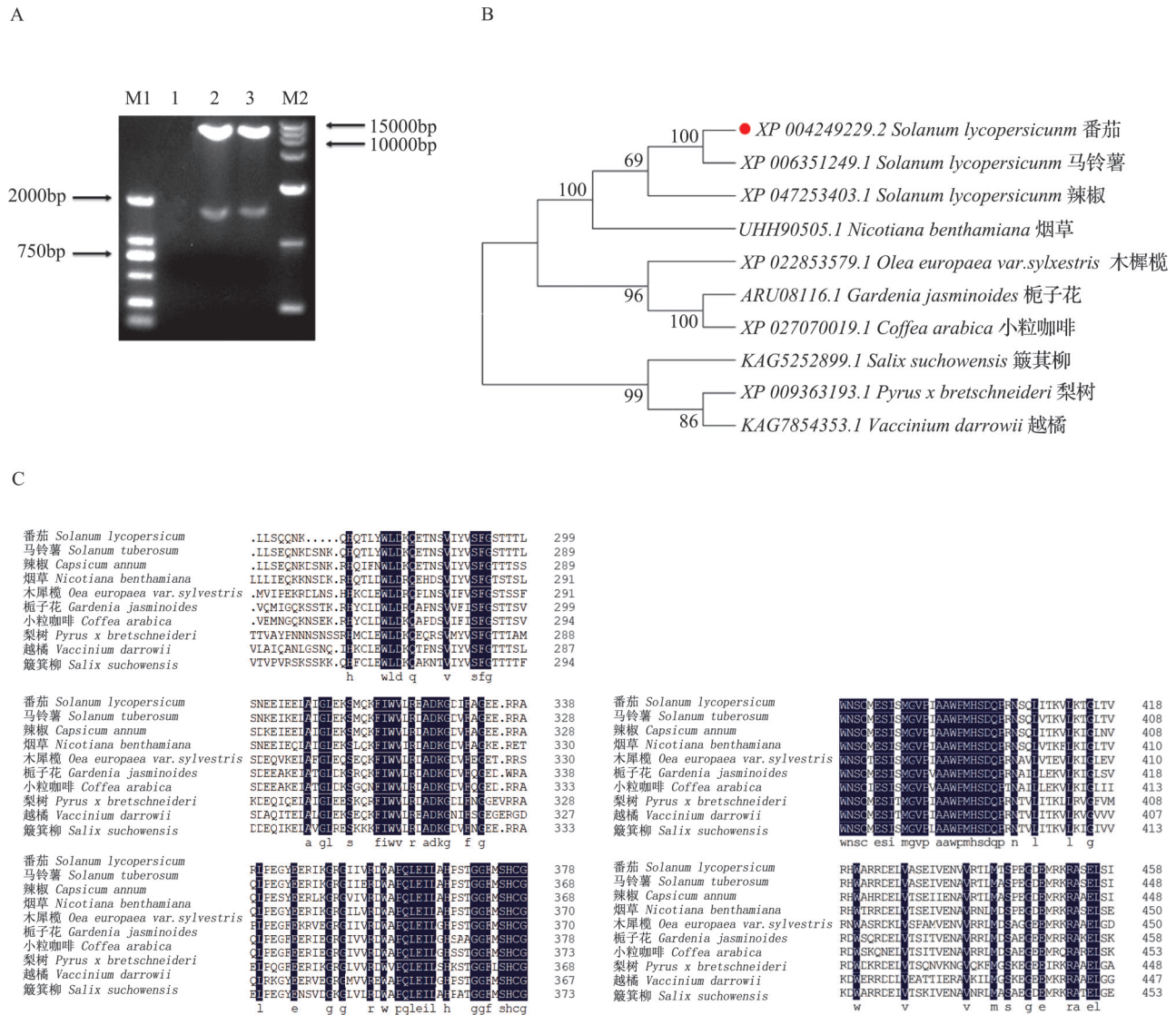
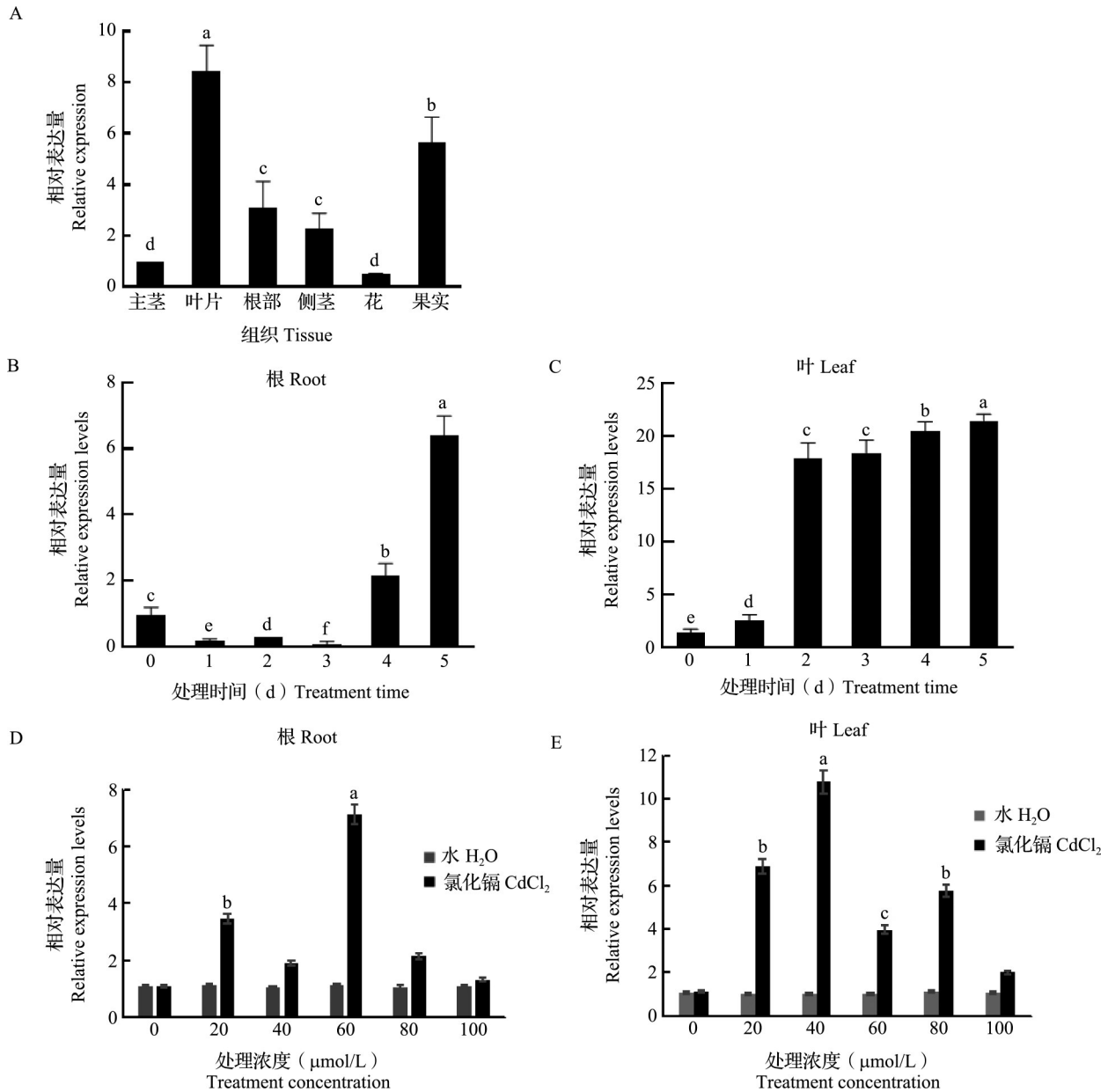


Fig.1 Double digestion identification of recombinant plasmid and bioinformatics analysis of SIUDP protein



A: *SIUDP* 基因在番茄不同组织中的表达模式; B、C: 不同时间镉处理下 *SIUDP* 基因在番茄根和叶片中的表达; D、E: 不同镉浓度处理下 *SIUDP* 基因在番茄根和叶片中的表达; 数值是具有标准误差线的 3 个重复的平均值, 不同的字母在 $P < 0.05$ 时表示显著差异
A: Expression patterns of *SIUDP* gene in different tissues of tomato; B, C: *SIUDP* gene expression in tomato root and leaf under different time cadmium treatment; D, E: Expression of *SIUDP* gene in tomato roots and leaves under different cadmium concentrations; The value is the average of three replicates with a standard error line, with different letters indicating significant differences at $P < 0.05$

图 2 重金属镉胁迫下番茄幼苗 *SIUDP* 基因表达模式分析

Fig. 2 Analysis of *SIUDP* gene expression patterns in tomato seedlings under heavy metal Cd stress

2.3 镉胁迫下重组酵母菌株的耐镉性分析

20 $\mu\text{mol/L}$ 镉胁迫时 pYES2 和 pYES2-*SIUDP* 没有明显差别, 100 $\mu\text{mol/L}$ CdCl₂ 处理时含有 pYES2-*SIUDP* 质粒的酵母菌株比 80 $\mu\text{mol/L}$ CdCl₂ 处理时含有 pYES2-*SIUDP* 质粒的酵母菌株长势弱, 100 $\mu\text{mol/L}$ CdCl₂ 处理时对照在稀释 1000 倍下菌落未发现生长, 而 pYES2-*SIUDP* 菌落仍可以生长

(图 3)。挑取 pYES2-*SIUDP* 和 pYES2 单菌落摇菌, 进行 OD₆₀₀ 值测定, 对酵母在镉胁迫下进行定量分析。随着 Cd 胁迫浓度的增加, 酵母 OD₆₀₀ 的值不断降低, 但 pYES2-*SIUDP* 一直高于 pYES2, 且高浓度时达到差异显著性(图 4)。结果显示随着镉胁迫的处理浓度逐渐升高, *SIUDP* 基因显著提高了酵母对镉胁迫的抗性。

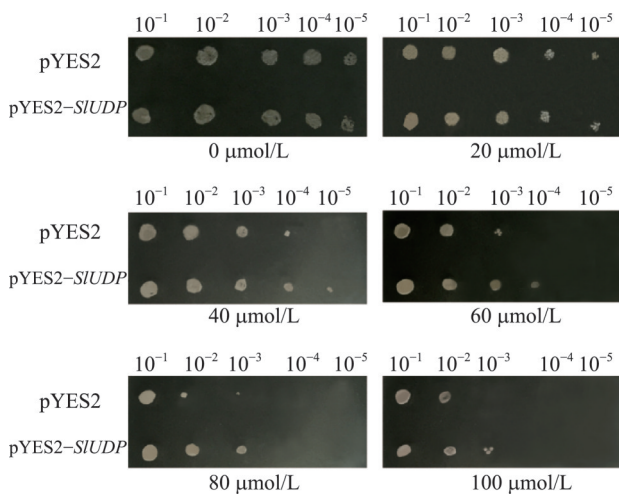
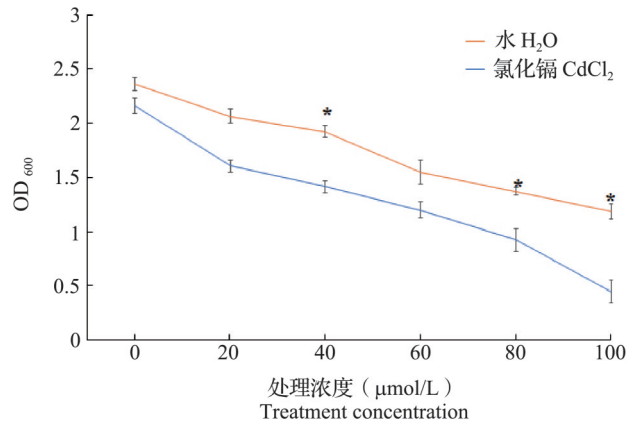


图3 转 *SIUDP* 基因酵母在不同浓度镉胁迫处理后的表型分析

Fig.3 Phenotype analysis of yeast with *SIUDP* gene under different stress

2.4 过表达转基因拟南芥种子萌发耐镉性鉴定

荧光定量 PCR 分析表明, *SIUDP* 基因在 *SIUDP-OE1* 和 *SIUDP-OE2* 中的表达水平分别是野生型植株的 80 倍和 64 倍(图 5A)。在第 3 天时比较 *SIUDP* 过表达拟南芥株系与野生型拟南芥的发芽率, 40 μmol/L CdCl₂ 处理条件下, *SIUDP* 过表达



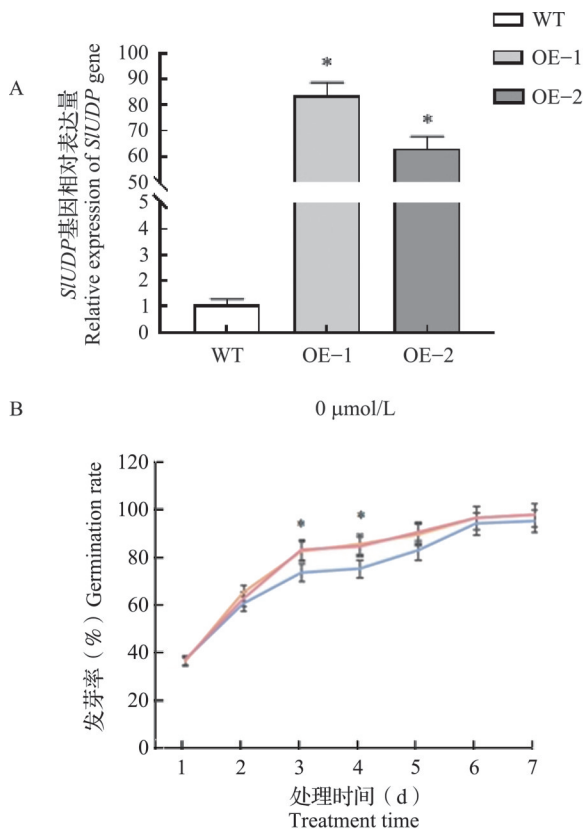
*表示处理组和对照组之间3次重复的平均值在 $P < 0.05$ 水平上差异显著; 下同

* indicates that the mean of the three replicates between the treatment group and the control group was significantly different at the $P < 0.05$ level; The same as below

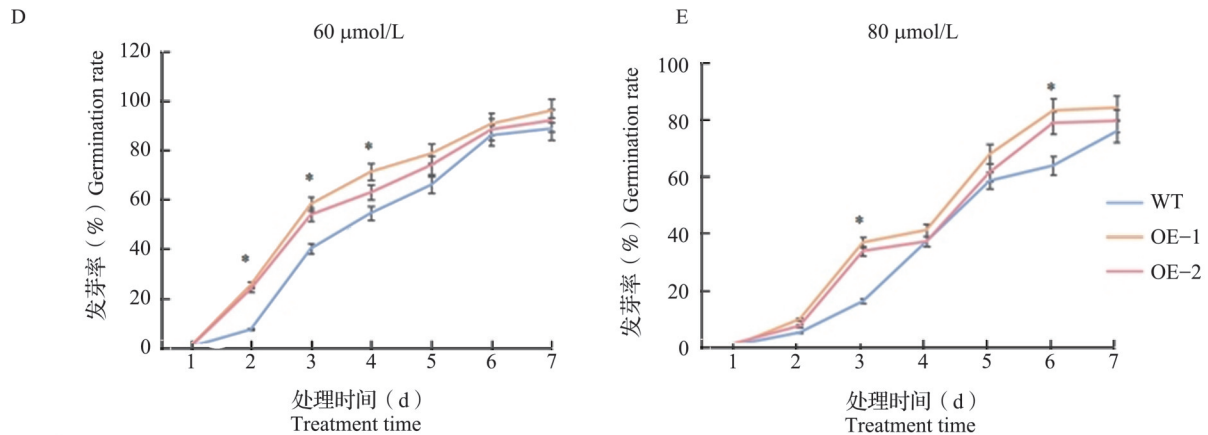
图4 转 *SIUDP* 基因酵母在镉胁迫处理后的存活率分析

Fig.4 Survival rate of *SIUDP* transgenic yeast under Cd stress

拟南芥平均发芽率是野生型的 1.2 倍(图 5C); 60 μmol/L CdCl₂ 胁迫下, 过表达拟南芥植株平均发芽率是野生型的 1.58 倍(图 5D); 而 80 μmol/L CdCl₂ 胁迫下是野生型的 1.9 倍(图 5E)。这些结果表明, *SIUDP* 基因可能减弱镉胁迫对种子发芽率的抑制作用。



(图 5)



A: qRT-PCR validation test; B-E: Germination test under different concentrations of CdCl₂ stress (0, 40, 60, 80 μmol/L), OE-1: *SIUDP*-OE1, OE-2: *SIUDP*-OE2, WT: Wild type; The same as below

图5 转基因拟南芥的鉴定及发芽率分析

Fig 5 Identification and germination rate analysis of transgenic *Arabidopsis thaliana*

2.5 *SIUDP* 基因的过表达提高拟南芥植株对镉胁迫的耐受性

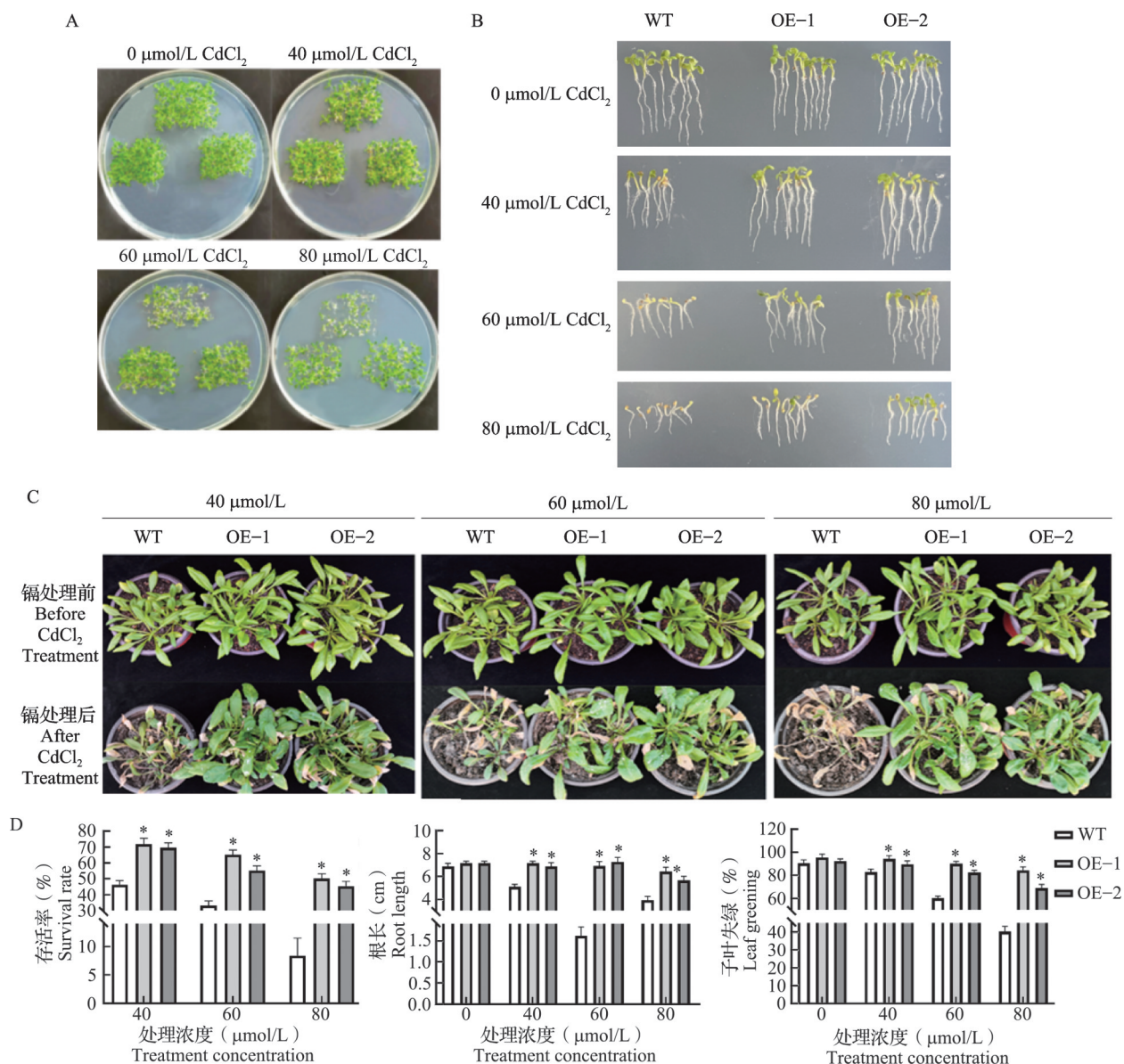
野生型种子(本实验室保存哥伦比亚野生型拟南芥种子)和 *SIUDP*-OE 拟南芥种子在不同浓度镉胁迫下生长 7 d 时,未进行胁迫处理的种子生长无显著差异(图 6A)。然而,暴露于 40 μmol/L CdCl₂ 时,与野生型植株相比, *SIUDP* 过表达拟南芥植株失绿更缓慢。在 60 μmol/L CdCl₂ 胁迫时, *SIUDP* 过表达植株的平均失绿程度(87%)高于野生型拟南芥植株(58%)。在 80 μmol/L CdCl₂ 胁迫时, *SIUDP* 过表达植株的平均失绿程度(70%)高于野生型拟南芥植株(40%)(图 6C)。 *SIUDP* 过表达拟南芥植株在 60 μmol/L 和 80 μmol/L CdCl₂ 胁迫时的平均根长分别为 7.2 cm 和 6.0 cm,野生型植株的根长分别为 4.0 cm 和 2.0 cm,说明在高镉胁迫下, *SIUDP* 过表达拟南芥植株对镉毒害的耐受性增强(图 6B)。为了解野生型和 *SIUDP* 过表达拟南芥植株在镉胁迫下的存活情况,将这些植株在不同的镉浓度下生长 15 d。野生型植株在 80 μmol/L CdCl₂ 条件下的存活率低于 10%, 40 μmol/L 和 60 μmol/L CdCl₂ 的存活率低于 50%。另一方面, *SIUDP* 过表达拟南芥植株在 80 μmol/L CdCl₂ 条件下存活率接近 50%, 40 μmol/L 和 60 μmol/L CdCl₂ 条件下的存活率高于 50%,说明 *SIUDP* 过表达拟南芥植株受镉胁迫危害的影响较小(图 6D)。以上结果表明, *SIUDP* 基因的过表达提高了拟南芥植株对镉胁迫的耐受性。

2.6 *SIUDP* 过表达拟南芥植株生理指标的测定

在正常生长条件下,野生型和 *SIUDP* 过表达拟南芥植株的丙二醛和可溶性糖含量以及超氧化物歧化酶和过氧化物酶活性无显著差异。然而, 60 μmol/L CdCl₂ 胁迫处理时,与野生型植株相比, *SIUDP* 过表达拟南芥植株的丙二醛含量降低而可溶性糖含量有所增加,丙二醛含量下降约 1.4 倍、可溶性糖含量增加至约 1.8 倍,超氧化物歧化酶和过氧化物酶活性也显著增加,超氧化物歧化酶活性、过氧化物酶活性分别增加至约 1.25 倍、2 倍(图 7)。结果表明, *SIUDP* 的过表达导致抗氧化酶系统的变化,提高植株清除活性氧的能力,降低膜质氧化的程度,赋予植物更好的耐镉性。

2.7 转基因拟南芥金属离子转运蛋白基因表达分析

在镉胁迫下, *SIUDP* 过表达拟南芥植株金属离子转运蛋白基因 *ZIP1*、*IRT1*、*CSD1* 和 *COPT2* 的表达水平显著高于野生型植株。在镉胁迫 3 h 时,这些基因的表达量显著升高,金属离子转运相关基因(*ZIP1*、*IRT1*、*COPT2* 和 *CSD1*)在过表达植株中的表达量分别约为野生型植株的 3.1 倍、1.5 倍、1.6 倍、2.1 倍。结果表明, *SIUDP* 过表达株系中 *ZIP1*、*IRT1*、*COPT2* 和 *CSD1* 基因在增强植物镉胁迫中起到一定作用, *SIUDP* 基因可能通过调节金属离子的转运来缓解金属离子对植物造成的损伤。 *GSH1* 基因在 *SIUDP*-OE1 处理 3 h 和 6 h 时的表达量都低于野生型拟南芥,初步推测 *SIUDP* 基因提高镉胁迫的过程与谷胱甘肽途径相关性不大(图 8)。



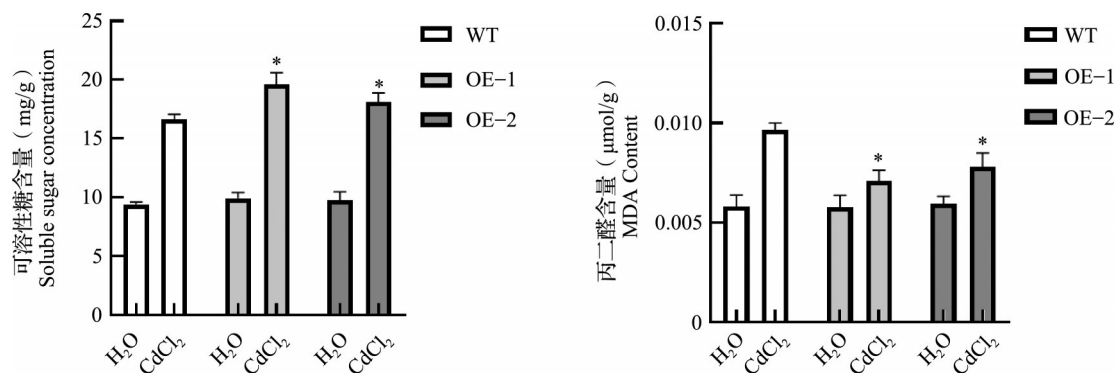
A~C: 不同浓度 CdCl_2 胁迫后拟南芥表型; A 图上方为 WT, 左下侧为 OE-1, 右下侧为 OE-2;

D: 不同浓度 CdCl_2 胁迫后拟南芥的存活率、子叶失绿、根长的统计数据

A-C: *Arabidopsis* phenotype after CdCl_2 stress at different concentrations; The top of Figure A is WT, the left side is OE-1, and the right side is OE-2; D: Statistical data of survival rate, greenness of cotyledon, and root length of *Arabidopsis* mustard after CdCl_2 stress at different concentrations

图 6 不同浓度 CdCl_2 胁迫后拟南芥的子叶失绿、根长及表型分析

Fig. 6 Leaf greening, root length and phenotypic analysis of *Arabidopsis* mustard under different concentrations of CdCl_2 stress



(图 7)

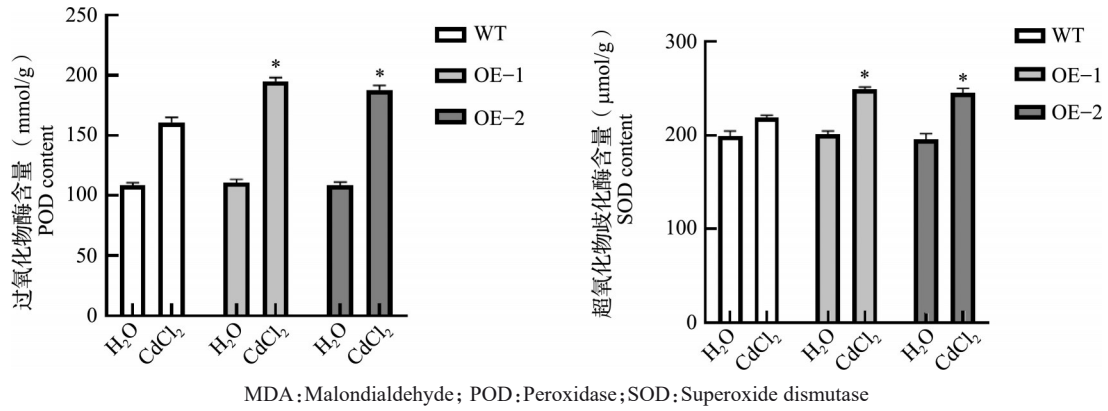


图7 镉胁迫拟南芥丙二醛、可溶性糖、超氧化物歧化酶和过氧化物酶含量的测定

Fig.7 Determination of MDA, soluble sugar, SOD and POD contents in *Arabidopsis thaliana* under CdCl₂ stress

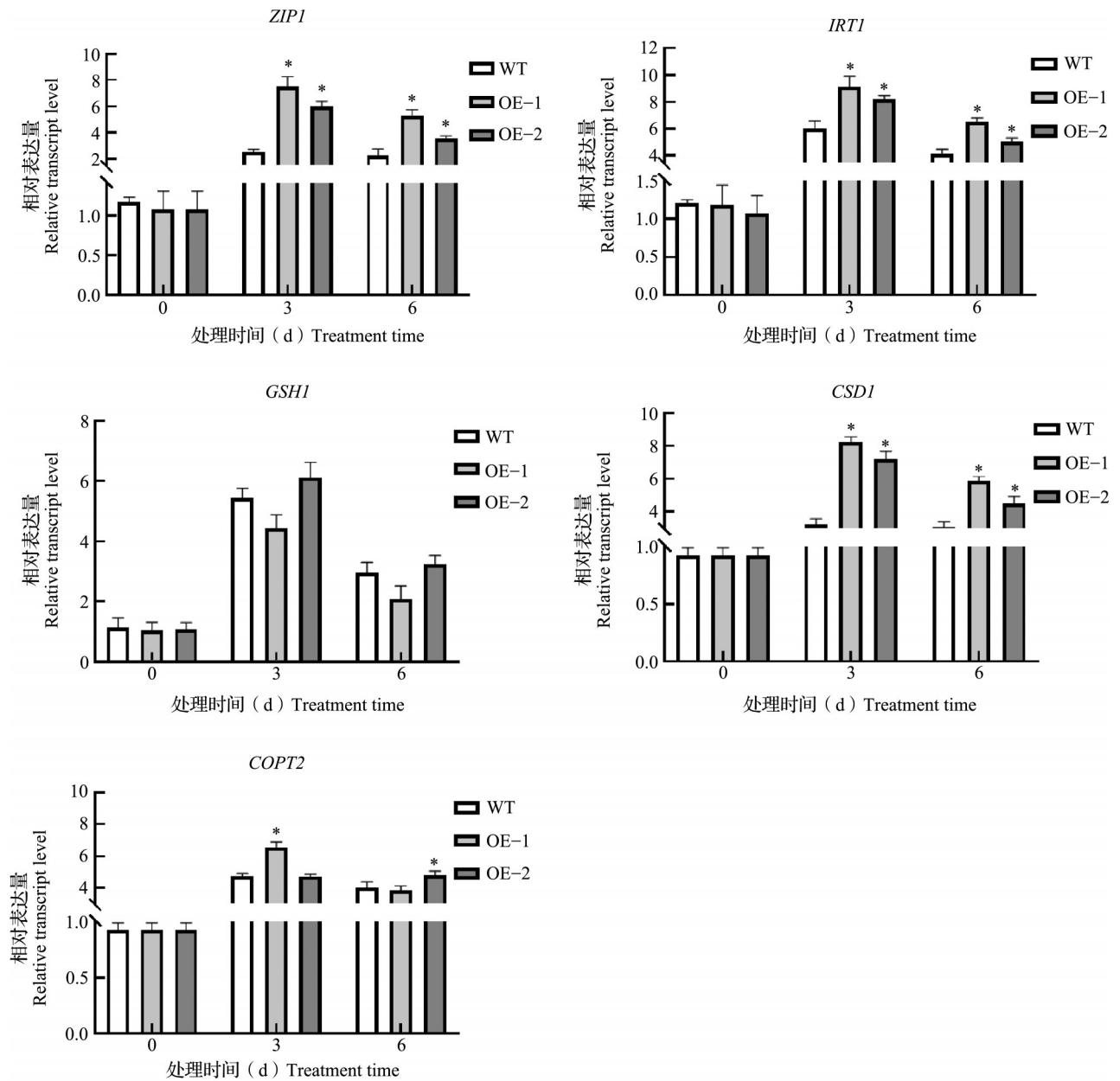


图8 镉胁迫处理下 *SIUDP*-OE1、*SIUDP*-OE2 中 *ZIP1*、*IRT1*、*COPT2*、*GSH1* 和 *CSD1* 基因的表达

Fig. 8 Expressions of *ZIP1*, *IRT1*, *COPT2*, *GSH1* and *CSD1* genes in *SIUDP*-OE1 and *SIUDP*-OE2 treated by CdCl₂

3 讨论

本研究对番茄糖基转移酶基因 *SIUDP* 进行克隆、生物信息学分析和基因表达特性分析,并且进行了酵母和拟南芥转基因功能验证,研究其调控植株镉胁迫的生物学功能。结果表明,番茄 *SIUDP* 基因序列与马铃薯序列同源,这与之前的研究结果一致^[28]。此外,番茄 *SIUDP* 基因在茄子、水稻、辣椒等物种中具有同源物。植物中的糖基转移酶(GTs, Glycosyl Transferases)已被研究与多种非生物胁迫有关,例如高温,干旱和高盐等,干旱等胁迫通常与糖基转移酶对脱落酸稳态的调节有关^[29], *UGT71B6* 可以应对干旱胁迫,然而,尚未报道 *SIUDP* 对植株镉胁迫耐性的相关作用^[30]。研究表明,当植物暴露于镉胁迫时, *SIUDP* 基因的表达会周期性地发生变化,表明 *SIUDP* 基因表达对植物的影响具有时间依赖性,但是原因尚不清楚。当植物受到生理和生化胁迫时,糖基转移酶作为渗透压调节剂,可以通过合成蛋白质来保护植物免受伤害^[31-32]。研究发现,控制离子转运蛋白的表达和活性直接影响植物的生长^[33-35]。Liu 等^[36]发现 *UGT71C5* 的低表达导致种子萌发延迟,而 *UGT71C5* 的过表达加速种子萌发。此外, *UGT71C5* 突变导致拟南芥脱落酸水平升高,而 *UGT71C5* 的过表达导致脱落酸水平降低,表明 *UGT71C5* 通过调节脱落酸水平影响种子萌发。此前,使用酵母系统证明 *ZmDHN15* 基因的过表达可以有效提高冷胁迫的耐受性^[37]。同样,含有小麦 *TaNCL2-A* 基因的酵母生长速率更高, *TaNCL2-A* 可以减轻酵母中镉毒性^[38]。Ni 等^[39]也发现 *ILCDT1* 赋予酵母和拟南芥对镉胁迫的耐受性。在 40 $\mu\text{mol/L}$ CdCl_2 处理条件下,第3天 *SIUDP* 过表达拟南芥发芽率是野生型植株的 1.2 倍左右。在 60 $\mu\text{mol/L}$ CdCl_2 胁迫下,过表达拟南芥植株发芽率是野生型植株的 1.58 倍左右,而 80 $\mu\text{mol/L}$ CdCl_2 胁迫下发芽率比野生型植株高约 1.9 倍。结果表明, *SIUDP* 基因参与植物对镉胁迫的响应。与野生型相比,在镉胁迫下, *SIUDP* 过表达拟南芥的生长没有显著抑制,表明这可能与缓解了种子发芽有关,需要进一步的研究来更详细地了解其机制。随着镉浓度的增加,种子的发芽率受到抑制,但 *SIUDP* 过表达拟南芥对镉的耐受性高于野生型植株。在 80 $\mu\text{mol/L}$ CdCl_2 处理下,野生型植株大部分枯萎或死亡,成活率低于 10%。然而, *SIUDP* 过表达拟南芥的存活率接近 50%。

丙二醛通常用于反映植物中膜脂过氧化的程

度。在本项研究中,在高镉浓度下,发现 *SIUDP* 的过表达拟南芥植株丙二醛含量比野生型植株降低约 1.4 倍,说明在过表达株系中镉胁迫造成的氧化损伤显著低于野生型拟南芥。此外,过表达拟南芥植株可溶性糖含量和超氧化物歧化酶、过氧化物酶活性显著增加,再次表明这些植株对胁迫造成的氧化损伤耐受性增强。在 60 $\mu\text{mol/L}$ CdCl_2 处理下,过表达 *SIUDP* 拟南芥植株的可溶性糖含量增加至约 1.8 倍。这些结果表明, *SIUDP* 基因通过调控拟南芥可溶性糖含量来响应胁迫,提高植物对镉胁迫的耐受性。Chen 等^[40]表明 *CmWRKY15-1* 通过增加保护酶体系的活性,可提高菊花对白锈病的抗性。Sun 等^[41]表明耐旱基因 *ZmMYB48* 过表达可增强玉米光合性能,诱导抗氧化酶活性和脯氨酸含量增加,降低丙二醛含量。本研究表明在 60 $\mu\text{mol/L}$ CdCl_2 处理下, *SIUDP* 的过表达拟南芥植株的过氧化物酶和超氧化物歧化酶活性显著高于野生型植株,表明 *SIUDP* 基因可以提高抗氧化酶的活性,减轻镉的毒性作用。此前, Meng 等^[42]发现 ZIP 家族蛋白包括 *ZIP1* 和 *IRT1*, *ZIP1* 和 *IRT1* 都可以转运镉, *IRT1* 可以介导镉摄取效率低的过程。这些结果表明这些蛋白质对镉应激的作用。本研究 *ZIP1* 和 *IRT1* 基因在表达 *SIUDP* 的植株中的表达水平显著高于野生型植株,表明这些蛋白质对镉应激的作用与上述结果一致。

4 结论

本研究克隆了番茄的 *SIUDP* 基因,并研究了该基因在番茄植株不同组织中的表达。结果表明当番茄植株暴露于镉胁迫时,该基因在不同组织中的表达显著增加。利用酵母表达系统验证了 *SIUDP* 基因介导镉胁迫耐性的功能。此外,镉胁迫下在 *SIUDP* 过表达转基因拟南芥植株中,种子发芽率高于野生型植株。 *SIUDP* 过表达植株导致胁迫下丙二醛水平降低,可溶性糖水平升高,超氧化物歧化酶和过氧化物酶活性升高。结果表明,番茄 *SIUDP* 基因超量表达可以提高拟南芥植株的镉胁迫耐受性,抗氧化酶系统和金属离子转运蛋白可能参与其中。

参考文献

- [1] Wang H T, Cao Q J, Zhao Q, Arfan M, Liu W. Mechanisms used by DNA MMR system to cope with Cadmium-induced DNA damage in plants. *Chemosphere*, 2020, 24(6): 125-614
- [2] Bharti R. Effect of heavy metals: An overview. *Materials*

- Today: Proceedings, 2022, 51(6): 880-885
- [3] Nowicka B. Heavy metal-induced stress in eukaryotic algae—mechanisms of heavy metal toxicity and tolerance with particular emphasis on oxidative stress in exposed cells and the role of antioxidant response. *Environmental Science and Pollution Research*, 2022, 29(12): 16860-16911
- [4] Noor I, Sohail H, Sun J X, Nawaz M A, Guo H L, Li G H, Hasanuzzaman M, Liu J W. Heavy metal and metalloids toxicity in horticultural plants: Tolerance mechanism and remediation strategies. *Chemosphere*, 2022, 1(3): 188-196
- [5] 王雪阳, 易鹏辉, 汪春香, 陈小虎, 刘爱玉, 周仲华, 屠小菊. 重金属复合污染对植物的影响研究进展. *现代农业科技*, 2023, 1(23): 47-51
Wang X Y, Yi P H, Wang C X, Chen X H, Liu A Y, Zhou Z H, Tu X J. Research progress on effects of heavy metal combined pollution on plants. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2023, 1(23): 47-51
- [6] Magray J A, Sharma D P, Deva M A, Ahmad Thoker S. Phenolics: Accumulation and role in plants grown under heavy metal stress. *Plant Phenolics in Abiotic Stress Management*, 2023, 2(1): 321-351
- [7] 杨婉莹, 孙莎莎, 巩彪, 李晓彤, 刘越, 史庆华. 超表达 *SISAMS1* 对番茄镉胁迫的缓解效应及抗氧化系统的影响. *核农学报*, 2020, 34(3): 487-496
Yang W Y, Sun S S, Gong B, Li X T, Liu Y, Shi Q H. Effects of *SISAMS1* overexpression on cadmium stress and antioxidant system in tomato. *Journal of Nuclear Agriculture*, 2020, 34(3): 487-496
- [8] Rehman H M, Khan U M, Nawaz S, Saleem F, Ahmed N, Rana I A, Atif R M, Shaheen N, Seo H. Genome wide analysis of Family-1 UDP glycosyltransferases in *Populus trichocarpa* specifies abiotic stress responsive glycosylation mechanisms. *Genes*, 2022, 13(9): 16-40
- [9] Li J. Identification and expression characteristics of udp-glycosyltransferase genes in pear and their correlation with arbutin accumulation. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2022, 69(5): 70-82
- [10] Wang T, Li X K, Liu X, Yang X Q, Li Y J, Hou B K. Rice glycosyltransferase gene *UGT2* functions in salt stress tolerance under the regulation of bZIP23 transcription factor. *Plant Cell Reports*, 2022, 1(5): 1-12
- [11] Hu H, Qian P, Ye M. *GmUGT73F4* plays important roles in enhancing seed vitality and tolerance to abiotic stresses in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2022, 150(2): 313-328
- [12] Dong L L, Tang Z, Yang T, Hao F L, Deng X Y. Genome-wide analysis of *UGT* genes in petunia and identification of *PhUGT51* involved in the regulation of salt resistance. *Plants*, 2022, 11(18): 24-34
- [13] Lian C. Molecular cloning and functional analysis of *IrUGT86A1-like* gene in medicinal plant *isodon rubescens* (Hemsl.) Hara. *Life*, 2022, 12(9): 13-34
- [14] Martínez M, Bernal P, Almela C, Vélez D, Agustín P G, Serrano R, Aviñó J N. An engineered plant that accumulates higher levels of heavy metals than *Thlaspi caerulescens*, with yields of 100 times more biomass in mine soils. *Chemosphere*, 2006, 64(3): 478-485
- [15] Saint P V, Zhang W, Kanawati B, Geist B, Kessler T F, Kopplin P S, Schäffner A R. The *Arabidopsis* glycosyltransferase *UGT76B1* conjugates isoleucic acid and modulates plant defense and senescence. *The Plant Cell*, 2011, 23(11): 4124-4145
- [16] Wang T, Li P, Mu T, Zheng C C, Jin S H, Chen T T, Hou B K, Li Y J. Overexpression of *UGT74E2*, an *Arabidopsis* IBA glycosyltransferase, enhances seed germination and modulates stress tolerance via ABA signaling in rice. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(19): 22-39
- [17] Li Y, Wang B, Dong R, Hou B. *AtUGT76C2*, an *Arabidopsis* cytokinin glycosyltransferase is involved in drought stress adaptation. *Plant Science*, 2015, 236(2): 157-167
- [18] Zhao M, Zhang N, Gao T, Jin J Y, Jing T T, Wang J M, Wu Y, Wan X C, Schwab W, Song C K. Sesquiterpene glucosylation mediated by glycosyltransferase *UGT91Q2* is involved in the modulation of cold stress tolerance in tea plants. *New Phytologist*, 2020, 226(2): 362-372
- [19] Tognetti V B, Van A O, Morreel K, Vandenbroucke K, Cotte B V, Clercq I D, Chiwocha S, Fenske R, Prinsen E, Boerjan W, Genty B, Stubbs K A, Inzé D, Breusegem F V. Perturbation of indole-3-butyric acid homeostasis by the UDP-glycosyltransferase *UGT74E2* modulates *Arabidopsis* architecture and water stress tolerance. *The Plant Cell*, 2010, 22(8): 2660-2679
- [20] 杨佳敏, 万家悦, 丁艳菲. 镉污染地区番茄品种的筛选及其抗氧化能力. *生物工程学报*, 2021, 37(1): 242-252
Yang J M, Wan J Y, Ding Y F. Screening and antioxidant capacity of tomato varieties in cadmium-contaminated areas. *Journal of Bioengineering*, 2021, 37(1): 242-252
- [21] 李倩, 张建坤, 曾宪东, 王琴, 王振华, 徐文兴. 凤果花叶病毒的 RT-PCR 和核酸斑点杂交检测研究. *植物病理学报*, 2023, 53(6): 1262-1265
Li Q, Zhang J K, Zeng X D, Wang Q, Wang Z H, Xu W X. Studies on the detection of pepion mosaic virus using RT-PCR and dot blot methods. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2023, 53(6): 1262-1265
- [22] 庾蕾, 刘建平, 庄志雄, 杨淋清, 张仁利, 叶小明, 程锦泉. 实时 RT-PCR 基因表达相对定量 REST 软件分析与 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法比较. *热带医学杂志*, 2007, 7(10): 956-958
Yu L, Liu J P, Zhuang Z X, Yang L Q, Zhang R L, Ye X M, Cheng J Q. Real-time RT-PCR gene expression relative quantitative REST software analysis compared with $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Journal of Tropical Medicine*, 2007, 7(10): 956-958
- [23] Decroocq V, Sicard O, Alamillo J M. Multiple resistance traits control *Plum pox virus* infection in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2006, 19(5): 541-549

- [24] Zhou J Y, Prognon P. Raw material enzymatic activity determination: A specific case for validation and comparison of analytical methods—the example of superoxide dismutase (SOD). *Journal of Pharmaceutical and BiomEdical Analysis*, 2006, 40(5): 1143-1148
- [25] Vetter J L, Steinberg M P, Nelson A I. Enzyme assay, quantitative determination of peroxidase in sweet corn. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1958, 6(1): 39-41
- [26] Peever T L, Higgins V J. Suppression of the activity of non-specific elicitor from *Cladosporium fulvum* by intercellular fluids from tomato leaves. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 1989, 34(6): 471-482
- [27] Barnett A J, Tawab G A. A rapid method for the determination of lactose in milk and cheese. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1957, 8(7): 437-441
- [28] 耿鑫鑫, 于丽杰, 陈超, 金晓霞. 番茄 *SIUDP* 基因的克隆及其在镉、干旱和盐胁迫中的响应分析. *华北农学报*, 2021, 36(2): 46-53
Geng X X, Yu L J, Chen C, Jin X X. Cloning of tomato *SIUDP* gene and its response to cadmium, drought and salt stress. *Journal of North China Agronomy*, 2021, 36(2): 46-53
- [29] Sano N. ABA metabolism and homeostasis in seed dormancy and germination. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(10): 5069-5072
- [30] David M P, Stephen J A, Fabián E V, Priest D M, Ambrose S J, Vaistij F E, Elias L S, Higgins G S, Andrew R S, Suzanne R A, Bowles D J. Use of the glucosyltransferase *UGT71B6* to disturb abscisic acid homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 2006, 46(3): 492-502
- [31] 刘美子, 王丹丹, 秦超, 王小强, 沈月全. 植物糖基转移酶的结构与机理及糖基化工程的研究进展. *中国科学: 生命科学*, 2019, 49(9): 1133-1142
Liu M Z, Wang D D, Qin C, Wang X Q, Shen Y Q. Research progress on structure and mechanism of plant glycosyltransferase and glycosylation engineering. *Science in China: Life Sciences*, 2019, 49(9): 1133-1142
- [32] Dong T. Contribution of ABA UDP-glucosyltransferases in coordination of ABA biosynthesis and catabolism for ABA homeostasis. *Plant Signaling & Behavior*, 2014, 9(7): 28-88
- [33] Spiral J, Ouazzani S, Vial N H. Reciprocal grafting reveals differential metabolic responses between robust clones with contrasting tolerances to drought. *Agricultural Research*, 2022, 5(2): 1-11
- [34] Zhang Z, Li J, Liu H. Roles of ubiquitination-mediated protein degradation in plant responses to abiotic stresses. *Environmental Experimental Botany*, 2015, 114(3): 92-103
- [35] Ajayi O O. Systems identification and characterization of β -glucuronosyltransferase genes involved in arabinogalactan-protein biosynthesis in plant genomes. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 1-14
- [36] Liu Z, Yan J P, Li D K, Luo Q, Yan Q J, Liu Z, Ye L M, Wang J M, Li X F, Yang Y. UDP-glucosyltransferase *71C5*, a major glucosyltransferase, mediates abscisic acid homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 2015, 167(4): 1659-1670
- [37] Chen N, Fan X, Wang C, Jiao P, Jiang Z Z, Ma Y Y, Guan S Y, Liu S Y. Overexpression of *ZmDHN15* enhances cold tolerance in yeast and *Arabidopsis*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(1): 470-480
- [38] Tyagi S, Sharma Y, Sharma A, Pandey A, Kashmir Singh K, Upadhyay S K. Expression of *TaNCL2-A* ameliorates cadmium toxicity by increasing calcium and enzymatic antioxidants activities in *Arabidopsis*. *Chemosphere*, 2023, 3(39): 138-636
- [39] Ni L, Wang Z, Liu L. The *IINF-YC6* transcription factor of *Iris lactea* var. *chinensis* (Fisch.) activates the *ILCDTI* gene and enhances tolerance to cadmium stress in *Arabidopsis thaliana*. *Industrial Crops and Products*, 2023, 19(7): 116-558
- [40] Chen Q, Kuang A, Wu H, Liu D, Zhang X, Mao H Y. Physiological response of *CmWRKY15-1* to chrysanthemum white rust based on TRV-VIGS. *Frontiers in Plant Science*, 2023, 14(1): 140-596
- [41] Sun S, Yao X, Liu X. Brassinolide can improve drought tolerance of maize seedlings under drought stress: By inducing the photosynthetic performance, antioxidant capacity and *ZmMYB* gene expression of maize seedlings. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 2022, 22(2): 2092-2104
- [42] Meng Y, Huang J, Jing H, Wu Q, Shen R F, Zhu X F. Exogenous abscisic acid alleviates Cd toxicity in *Arabidopsis thaliana* by inhibiting Cd uptake, translocation and accumulation, and promoting Cd chelation and efflux. *Plant Science*, 2022, 3(25): 111-464