# 芒果翻译起始因子 MieIF1A-a 基因的克隆与功能分析

李丽淑<sup>1,2</sup>,罗 聪<sup>1</sup>,安振宇<sup>3</sup>,刘召亮<sup>1</sup>,董 龙<sup>3</sup>,何新华<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>广西大学农学院/亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室,南宁 530004;<sup>2</sup>广西农业科学院经济作物研究所, 南宁 530007;<sup>3</sup>广西农业科学院园艺作物研究所,南宁 530007)

摘要:翻译起始因子 eIF1A 是蛋白合成重要的调控因子之一,在植物响应非生物胁迫过程中发挥重要的调控作用。本研究通过克隆获得了1个 eIF1A 基因 MieIF1A-a (GenBank 登录号: KP271044),对其进行了信息学分析,并通过表达模式和拟 南芥转化来研究其功能,研究结果发现, MieIF1A-a 基因的 cDNA 全长为 604 bp,包含1个 435 bp 开放阅读框(ORF),编码 144个氨基酸,分子量为 16.45 kD;与葡萄中 VveIF1A 基因相似性最高;在成熟果实中表达量显著高于其他组织,在盐和干旱 胁迫条件下均能诱导该基因在芒果叶片中的上调表达;在盐和干旱胁迫下,与野生型相比,转基因植株的结荚数量多,以及转 基因植株生长良好,受影响较小;且在干旱胁迫下,芒果的相对含水量、叶绿素和脯氨酸含量较高,超氧化物歧化酶(SOD),过 氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)酶活性较强,丙二醛(MDA)含量相对较低。综上,本研究初步阐明了 MieIF1A-a 基因参与芒果果实发育和逆境胁迫调控作用,为后续深入芒果抗逆研究工作奠定了研究基础。

关键词:芒果; MielF1A-a; 基因克隆; 表达分析; 功能分析

# Cloning and Function Analysis of Translation Initiation Factor *MieIF1A-a* Gene in Mango

LI Li-shu<sup>1, 2</sup>, LUO Cong<sup>1</sup>, AN Zhen-yu<sup>3</sup>, LIU Zhao-liang<sup>1</sup>, DONG Long<sup>3</sup>, HE Xin-hua<sup>1</sup> (<sup>1</sup>College of Agriculture, Guangxi University/State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-Bioresources, Nanning 530004; <sup>2</sup>Cash Crops Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007; <sup>3</sup>Horticultural Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007)

Abstract: Eukaryotic translation initiation factors 1A (eIF1A) function as important regulatory factors in protein synthesis and play crucial roles in the response to abiotic stresses in plants. In this study, we cloned the translation initiation factor *MieIF1A-a* (GenBank accession number: KP271044) in mango. Bioinformatic analysis was carried out on the *MieIF1A-a*, and its function was studied through the expression pattern analysis and *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. genetic transformation. Sequences analysis showed that the full length of the *MieIF1A-a* cDNA was 604 bp with an open reading frame of 435 bp, encoding 144 amino acids, and the molecular weight was 16.45 kD. *MieIF1A-a* had the highest similarity with *VveIF1A* of grapevine, had significantly higher expression level in mature fruit than in other tissues. It was up-regulated under salt and drought stresses, causing transgenic plants to produce more pods, to grow better and to be less adversely affected than wild-type plants. Compared with wild-type plants, the relative water content, chlorophyll and proline contents were higher, SOD, POD and CAT activities were stronger, and MDA content was relatively lower in

URL: http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20190813002

Foundation projects: National Natural Science Foundation of China (31660561), Science and Technology Major Projects of Guangxi (GXKJ-AA17204097-3, GXKJ-AA17204026-2), The Key Research and Development Project of Guangxi (GXKJ-AB17292010),

Innovation Team of Guangxi Mango Industry Project, Modern Agricultural Industry Technology System (nycytxgxcxtd-06-02)

收稿日期: 2019-08-13 修回日期: 2019-10-16 网络出版日期: 2019-11-01

第一作者研究方向为芒果生物技术育种, E-mail: shukitty@126.com; 罗聪为共同第一作者

通信作者:何新华,研究方向为果树遗传育种与种质资源研究, E-mail: honest66222@163.com

**基金项目:**国家自然科学基金项目(31660561);广西创新驱动发展专项资金资助项目(GXKJ-AA17204097-3,GXKJ-AA17204026-2);广西 重点研发计划项目(GXKJ-AB17292010);国家现代农业产业技术体系广西芒果创新团队栽培岗位项目(nycytxgxcxtd-06-02)

transgenic plants under drought stress. In summary, this study revealed that the *MieIF1A-a* gene was involved in the regulation of fruit development and responded to stresses, which laid a foundation for further research on stress resistance of mango.

Key words: Mangifera indica L.; MieIF1A-a; gene cloning; expression analysis; function analysis

蛋白质合成是包括植物在内的所有生物体最动态、最普遍、最基本的过程<sup>[1-2]</sup>,通常可将整个翻译过程分为三步,即起始、延伸和终止,其中翻译起始作为蛋白合成过程中的重要阶段<sup>[3]</sup>,迄今为止,已发现了6个翻译起始因子(*eIFs*)家族,分别为*eIF1、eIF2、eIF3、eIF4、eIF5*和*eIF6*,它们在蛋白翻译起始中担任不同角色<sup>[4-5]</sup>,除此之外,翻译起始因子还在植物非生物胁迫中发挥重要作用<sup>[6]</sup>。

eIF1A 是蛋白合成的重要调控因子之一,在肽 链合成起始过程中起着重要作用,即在 eIF1A 等 起始因子的参与下,刺激 eIF2/GTP/Met-tRNAiMet 与40S核糖体亚基结合组成43S三元复合体,促 进mRNA的结合,防止40S核糖体亚基的过早缔 合到 60S 核糖体亚基上,它还稳定了 eIF5B 与小核 糖体亚基的结合<sup>[7-10]</sup>。前人研究表明, eIF1 家族 翻译起始因子不仅与合成蛋白质密切相关[11-12], 而且与植物的各种非生物胁迫(如高温、盐害、干 旱、氧化、营养等)具有响应反应[13-16],如:甜菜中 的 eIF1A(BveIF1A)因子在植物和酵母中的盐胁迫 中起重要作用,将 BveIF1A 在真核酵母中超量表达 后,明显增强了酵母对钠盐和锂盐的抗性,同时发现 BveIF1A 在拟南芥中的过量表达,提高了拟南芥抗 NaCl 的能力<sup>[17]</sup>; 柽柳 eIF1A(TheIF1A)通过调节相 关酶活性和清除体内活性氧危害,从而提高植物对 盐和渗透压的耐受能力,降低了胁迫条件下的细胞 受损伤程度<sup>[18]</sup>;将 eIF-1 基因转入水稻中,发现该 基因保持叶片中的光合作用,降低叶片中的 Na<sup>+</sup> 和 Cl<sup>-</sup>离子浓度,并通过调控液泡H<sup>+</sup>-ATPase的水平, 明显增强了转基因水稻的耐盐性<sup>[14]</sup>;对羊草 elF1、 eIF1A、eIF1B3个 eIF1 家族基因进行克隆及相关分 子生物学分析,证实了 eIF1 基因家族可作为逆境胁 迫机制研究依据<sup>[16]</sup>;并且 eIFI 基因增强了水稻盐 害诱导,使ABA和甘露醇处理上调,表明 eIFI 基因 与作物胁迫响应相关<sup>[12-13]</sup>;同时也发现转化 LceIF1 基因增强了羊草的耐盐能力<sup>[15]</sup>;因此, eIF1 家族在 植物抗逆基因工程中具有重要的应用价值。

芒果(Mangifera indica L.)素有"热带水果之 王"的美称,是世界上热带和亚热带的主要经济水 果之一,芒果在生长发育过程中会遇到各种各样的 非生物或生物胁迫,其中受非生物胁迫(包括低温、 高温、干旱、盐碱、重金属等)时,严重制约芒果的 品质和产量,造成芒果大量减产或者无收<sup>[19]</sup>。当 芒果叶片中积累有毒离子时会引起营养失衡,减少 主要营养物质的吸收,使叶片受到损害,从而抑制 植株和果实的生长发育,最终影响到芒果的经济效 益<sup>[19]</sup>;随着干旱胁迫程度加剧,叶片相对含水量和 叶片水势明显下降,细胞膜质系统由于体内超氧离 子含量和 MDA 含量增加引起细胞膜过氧化而遭到 破坏,说明芒果体内抗氧化酶的活性受干旱影响较 大<sup>[20-21]</sup>,严重干旱会使芒果树水分供应不足,生长 受阻<sup>[22]</sup>;低温天气会严重影响芒果幼苗的生长发 育,嫩叶嫩梢干枯,树干上部受害明显,新叶卷曲枯 萎并落叶,花序受害后发育异常且花穗干枯,授粉率 降低,坐果率下降,果实易脱落<sup>[23-24]</sup>;同时对芒果的 花期(抽穗率)、花粉形成、花粉育性、花粉管伸长、 授粉、种子和果实形成等影响较大[25-27]。关于芒果 非生物胁迫相关基因的研究,已有利用 qTR-PCR 分析了9个基因(TDF4、TDF7、TDF23、TDF45、 TDF49、TDF50、TDF57、TDF91和TDF9)的表达 模式,研究发现9个基因与逆境胁迫存在直接或 间接应答关系<sup>[28]</sup>:同时,研究发现芒果 MiRab5 和 MiASR 两个基因也与低温、高温、干旱、盐碱、重金 属等逆境胁迫有响应反应<sup>[29-30]</sup>;但关于芒果 elF1A 的相关研究尚未见报道。本研究是在前期研究的 基础上,对 eIF1A 进行基因全长克隆、生物信息学分 析、基因表达模式及其转基因功能研究,初步揭示芒 果 MielF1A-a 基因在逆境胁迫应答过程中的机制。

# 1 材料与方法

#### 1.1 试验材料

样品采自广西大学农学院教学科研基地的果树标本园的四季蜜芒,砧木为土芒,不同组织及各发育时期的果实均取自10株12年树龄的树体,不同组织样品包括老叶、嫩叶、老茎(已木质化)、嫩茎(未木质化)、花、果实;果实发育时期为从开花后20d的果实开始,每隔10d取1次样,直到成熟,共8次,取不同植株的样品混合备用。逆境处理用穴盆栽培的1年树龄四季蜜芒嫁接苗,种植于无纺布

种植带中。设 300 mmol/L NaCl 和 30% PEG-6000 处理,处理5株,重复3次,处理后0h、12h、24h、 36 h、48 h、72 h、96 h 采集叶片,取样 3 次重复。选 择长势一致的1年龄四季蜜芒嫁接苗,以清水为对 照。取样后液氮中速冻后,保存于-80℃冰箱,用 于 qRT-PCR 或其他试验分析。

# 1.2 RNA 的提取和 cDNA 的合成

取上述存放于-80 ℃冰箱中的样品,按多糖多 酚植物 RNA 快速提取试剂盒说明书(北京华越洋 公司)分别提取芒果总 RNA,用1% 琼脂糖凝胶电 泳和分光光度计检测 RNA 的完整性。取完整性良 好的总RNA 经RNase-Free DNase 处理,以去除含 有的基因组 DNA,使用 M-MLV 反转录酶与逆转录 引物 APU1 进行逆转录合成 cDNA, 按照 TaKaRa 公司产品说明书操作。

# 1.3 MieIF1A-a 基因的克隆和序列分析

课题组前期对四季蜜芒不同逆境胁迫处理样 品进行基因差异显示研究,获得芒果 MieIF1A-a 同 源基因的全长序列。为了验证序列的可靠性,利用 Pimer 5.0 设计 *MieIF1A-a* 基因特异引物(表1), 克隆基因全长序列。PCR反应总体积为25 µL, 其中 buffer 2.5 μL, cDNA 1 μL, 上下游引物各为 1 μL, dNTP 0.5 μL, Dream Taq 聚 合 酶 0.16 μL, ddH<sub>2</sub>O 18.84 μL。PCR 扩增参数为:95 ℃ 预变性 5 min; 95 ℃变性 50 s; 57 ℃退火 50 s; 72 ℃延伸 40 s; 共 36 个循环; 72 ℃延伸 10 min。1.8% 琼脂糖

表1 引物序列与用途

Table	1 Sec	juence	of	primers	and	app	olic	atioı	Ĺ

凝胶电泳检测 PCR 产物,目的片段连接 pMD18-T 载体后转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞,筛选阳 性菌落,再进行 PCR 验证,把带有目的基因重组 质粒送上海宝生物工程有限公司测序,以备下步 试验。

采用在线 NCBI(https://www.ncbi.nlm.nih.gov) 的 BLAST 和 DNAMAN 5.2.2 软 件 对 MielF1A-a 及 其编码氨基酸序列比对分析:其他物种的氨基酸序 列来源于 NCBI 数据库,采用 MEGA 5.0 软件的 NJ (neighbor-joining)法对基因编码蛋白进行系统进化 树分析,经过 1000 次 Bootstrap 校验。

## 1.4 MieIF1A-a 基因的 gRT-PCR 分析

利用实时荧光定量 PCR 技术分析 MieIF1A-a 在不同组织、不同发育阶段果实以及逆境胁迫下 的幼苗叶片 MielF1A-a 的表达情况,以已公布的 *MiGAPDH* 为内参<sup>[31]</sup>(表1), 逆转录 cDNA 为模 板,用 SYBR Green I Master kit(Takara)试剂盒, *MielF1A-a* 荧光定量引物 qMielF1A-a(表1),在 Light Cycler® 480 上对目的基因的表达水平进行 检测。PCR反应体系为20 µL,包括10 µL SYBR Premix ExTaq (0.25 µmol/µL), 上、下游引物各 0.8 µL (10 µmol/L), 2 µL cDNA(50 ng/µL), 6.4 µL 去离子 水。PCR 程序如下: 95 ℃ 30 s, 95 ℃ 5 s, 60 ℃ 20 s, 60 ℃收集荧光信号,45个循环,95 ℃ 0 s,65 ℃ 15 s,42 ℃冷却。使用 2-ΔΔCT 方法<sup>[32]</sup>计算基因相 对定量,每个样品重复3次。

Table 1 Sequence of pr	milers and application	
引物名称	引物序列	用途
Primer ID	Primer sequence $(5' - 3')$	Application
AUP1	GGCCACGCGTCGACTAGTAC(T) <sub>18</sub>	逆转录引物 Reverse transcriptase
MieIF1A-a-F	ATGCCGAAGAAAAAGGGTAAGG	扩增 ORF 序列 Amplification of ORF sequence
MieIF1A-a-R	GATCTTATCAATATCTTCATCTTC	扩增 ORF 序列 Amplification of ORF sequence
MieIF1A-a-Xba I	CACGGGGGACTCTAGAATGCCGAAGAAAAAG	载体构建 Vector construction
MieIF1A-a-BamH I	GACCACCCGGGGATCCGATCTTATCAATATC	载体构建 Vector construction
M13F	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC	pMD-18T 通用引物 pMD-18T universal primer
M13R	AGCGGATAACAATTTCACACAGGA	pMD-18T 通用引物 pMD-18T universal primer
35S-F	GCACAATCCCACTATCCTTCG	菌液 PCR Bacterium specific PCR
JGUS-R	GATCCAGACTGAATGCCCACAG	菌液 PCR Bacterium specific PCR
MiGAPDH-F	CTAGTGGTCCAAGTCTCCAAGAAAA	内参引物 Real time PCR
MiGAPDH-R	CAAGGGGCTCATCACAAACA	内参引物 Real time PCR
qMieIF1A-a-F	TCAAGGAAGATGGGCAAGAG	实时定量 Real time PCR
qMieIF1A-a-R	ACGGATGTGGCAAAGACG	实时定量 Real time PCR

# 1.5 超量表达载体构建

根据获得的 MielF1A-a 基因 cDNA 序列,结合 双元表达载体 pBI121 上的限制性酶切位点,设计带 有 Xba I 和 Bam H I 双酶切位点的引物(表1),重 新构建带有酶切位点的目的基因片段,然后经测序和 目的片段相符合的 PCR 产物与经 Xba I 和 Bam H I 双酶切的 pBI121-GUS 载体构建表达载体,酶切产物 用 In-fusion HD Enzyme 连接酶,于 PCR 仪上 50 ℃ 连接 15 min,转化大肠杆菌 DH5α 感受细胞,过夜培 养后挑取单克隆菌落,筛选阳性菌株送上海生工生 物科技有限公司测序。对于验证导入序列正确的阳 性菌液,提取其质粒,转入农杆菌 EHA105 感受态 细胞。

# 1.6 拟南芥转化、筛选和鉴定

利用花序浸染法转入拟南芥,对获得的转基因 T<sub>0</sub>代种子经低温春化、消毒后播种于具有 50 mg/L 卡那霉素抗性的 1/2 MS 平板上进行初步筛选,对于 长势良好的植株移栽到基质中,当幼苗长至 5~6 片 叶后,提取转基因植株的 DNA 进行分子鉴定<sup>[33]</sup>, 并结合 GUS 染色法<sup>[34]</sup>同时对每株进行染色检测验 证, DNA 分子检测具有目标条带以及 GUS 染色出 呈蓝色反应的植株表明转化成功,单株收获阳性 T<sub>1</sub> 代转基因植株,继续对转基因拟南芥进行筛选培养, 直到获得 T<sub>4</sub>代纯合转基因植株。

 1.7 转基因植株逆境胁迫下植株形态及生理指标 分析

1.7.1 结荚期耐盐性分析 利用泥炭:蛭石(3:1)的栽培基质种植转基因和野生型拟南芥T<sub>3</sub>代苗,待植株长到结荚前期时,用 300 mmol/L 的 NaCl 处理,每处理1盆6株,重复3次,处理10d 后观察植株生长及结荚情况。

1.7.2 干旱胁迫下植株表型和生理指标分析 将在 1/2 MS培养基上生长21d的3个转基因拟南芥株 系T<sub>3</sub>代和野生型拟南芥幼苗分别移栽至泥炭:蛭 石(3:1)的栽培基质上,待植株莲座叶长到8~15 片真叶时,对其进行自然干旱处理(处理期间不浇 水),每盆5株,重复3次,处理时间15d,并于处理 的0d、7d、15d进行植株生长情况调查以及叶片的 生理生化指标分析,对照为正常淋水,利用浸泡法 测定相对含水量;丙酮乙醇法测定叶绿素含量;超 氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、脯氨酸 (Pro)、过氧化氢酶(CAT)和丙二醛(MDA)测定 按照江苏科铭生物技术试剂盒说明书操作。

#### 1.8 数据分析

试验数据采用 SPSS 17.0 软件进行方差分析, Duncan's 检验进行多重比较,并采用 Excel 2007 软 件进行数据统计分析与作图,试验结果为 3 次重复 的平均值。

# 2 结果与分析

### 2.1 芒果 MieIF1A-a 的基因克隆及其结构特征

在前期 cDNA-SCoT 研究中,获得了 MielF1A-a 基因的序列,本研究对基因差异显示获得的 MielF1A-a基因进行克隆验证和生物信息学分析。 分析显示, MielF1A-a基因的 cDNA 全长为 604 bp, 开放阅读框(ORF)长度为 435 bp(GenBank 登录 号: KP271044),编码 144 个氨基酸(图1);蛋白分 子量为 16.45 kD,理论等电点 pI 为 4.87;利用 NCBI 的 BLAST 在线工具对 MielF1A-a基因的蛋白序 列进行比对发现, MielF1A-a与葡萄(99%)、番茄 (98%)和巨桉(98%)等植物同源性较高(图2);系 统进化树分析结果显示 MielF1A-a与葡萄、巨桉和 番茄亲源关系最近(图3)。

1	ATGCCGAAGAAAAAGGGTAAGGGAGGAAAGAACAGGAAGAGGGGGAAAAAATGAAGCAGAT																			
1	M	Р	K	K	K	G	K	G	G	K	N	R	K	R	G	K	N	E	A	D
61	GATGAGAAGCGTGAGCTTTTGTTCAAGGAAGATGGGCAAGAGTATGCCCAAGTTCTTCGC																			
21	D	E	K	R	E	L	L	F	K	E	D	G	Q	E	Y	A	Q	V	L	R
121	ATGCTTGGTAATGGGCGGTGTGAAGCTATGTGCATTGATGGCACCAAACGTCTTTGCCAC																			
41	M	L	G	N	G	R	С	Ε	A	M	С	I	D	G	Т	K	R	L	С	Н
181	ATC	CGT	GGG	AAG	ATG	CAC	AAG	AAG	GTT	TGG	ATT	GCA	GCT	GG1	GAT	AT/	AT1	CT	GT	rggg
61	I	R	G	K	M	Н	K	K	V	W	I	А	A	G	D	I	I	L	V	G
241	СТС	CGT	GAC	TAT	CAA	GAT	GAC	AAG	GCC	GAT	GTC	ATC	сто	'AA/	TAC	CATO	GOCT	<b>IGA</b>	ſGAO	GCA
81	L	R	D	Y	Q	D	D	K	A	D	V	I	L	K	Y	M	Р	D	E	Α
301	AGGCTTCTGAAGGCATATGGTGAGCTTCCAGAGAACACTCGTCTCAATGAGGGTATTGCT																			
101	R	L	L	K	A	Y	G	E	L	Р	E	N	T	R	L	N	E	G	I	Α
361	GGTGGTCTGGATGAGGAGGATGAAGGGGCTGGTGATGATTACATTGAGTTTGAAGATGAA																			
121	G	G	L	D	Е	Е	D	Е	G	A	G	D	D	Y	I	E	F	Е	D	Е
421	GAT	TAT	GAT	AAG	ATC	TAA	1													
141	D	I	D	K	I	*														

图 1 芒果 MieIF1A-a 基因的 CDS 序列长度 Fig. 1 CDS length analysis of MieIF1A-a gene from mango



Mi: 芒果; At: 拟南芥; Br: 芜菁; Eg: 巨桉; Gm: 大豆; Os: 水稻; Pt: 欧洲大叶杨; Rc: 蓖麻; Sl: 番茄; Vv: 葡萄。下同

Mi: Mangifera indica L., At: Arabidopsis thaliana (L.) Heynh., Br: Brassica rapa L., Eg: Eucalyptus grandis W. Hill, Gm: Glycine max
(L.) Merr., Os: Oryza sativa L., Pt: Populus trichocarpa Torr. & A. Gray, Rc: Ricinus communis L., SI: Solanum lycopersicum L., Vv: Vitis vinifera L., the same as below

图 2 芒果 MieIF1A-a 与其他植物 eIF1A 氨基酸序列比对 Fig. 2 Alignment of amino acid of MieIF1A-a from mango and eIF1A from other plants



图 3 芒果 MieIF1A-a 与其他植物 eIF1A 的进化树分析



# 2.2 芒果 MieIF1A-a 时空表达模式与非生物胁迫 表达响应分析

为了确定 MielF1A-a 基因在芒果不同组织与果 实发育阶段、非生物胁迫下的基因表达情况,我们进 行了 qRT-PCR 分析,结果显示 MielF1A-a 在不同组 织中均有表达,特别在成熟果实中表达量最高(图 4A);在果实不同发育阶段, MielF1A-a 随着果实的 生长发育,在果实的幼果期、中期和成熟期表达水平 呈现先上升后下降,然后又上升趋势,最后在果实 成熟时,表达量达到最高值,为 62.4,是幼果时期表 达量的 60 倍(图 4B)。盐胁迫明显诱导 MielF1A-a 基因的表达,其表达高峰出现在处理后的 36 h,表达 量为 2.4,为未处理 0 h(1.0)的 2.4 倍,且与各处理 时期的表达量之间差异显著。30% PEG 胁迫处理 同样诱导 MielF1A-a 基因的表达,其表达高峰出现 在处理后的 48 h,表达量为 2.2,为未处理 0 h(1.0) 的 2.2 倍,与各处理时期的表达量之间差异达显著 水平(图 4C)。以上表达模式说明 MielF1A-a 与芒 果果实的发育和逆境胁迫调控相关。



图 4 *MieIF1A-a* 在不同组织(A)、不同果实发育阶段(B)、NaCl 和 PEG 处理下的表达(C) Fig.4 Expression analysis of mango *MieIF1A-a* in various tissues(A) and at different development stages of the fruit(B), with the treatments of NaCl and PEG(C)

# 2.3 拟南芥转基因植株鉴定与株系不同组织的 GUS 染色

利用含 50 mg/L Kan 抗性 1/2 MS 平板上筛选、 PCR 扩增检测和 GUS 染色 3 种方法进行转化植株 的鉴定, Kan 筛选阳性转基因植株叶色深绿色, 未转 基因小苗叶片颜色呈偏黄色(或黄白色), PCR 检测 转基因植株在 435 bp 处有清晰条带, GUS 检测阳 性植株染色呈深蓝色的, 检测得到阳性 MielF1A-a 转化植株 73 株。选用 3 个转基因株系(Ta8、Ta50、 Ta84)和野生型拟南芥(WT)进行不同组织 GUS 染色检测实验,由图 5 可知,3 个转基因 Ta8、Ta50 和 Ta84 株系的根、茎、叶、花序、花苞、柱头和果荚等 组织及幼苗全株均被染成蓝色到深蓝色,而未转基 因野生型拟南芥(WT)的各组织均未染色成蓝色, 而是脱色呈白色,染色结果说明了该基因在转基因 拟南芥植株的各器官中均有表现。



A:叶;B:茎、花萼、花苞、花序;C:果荚;D:根;WT:野生型拟南芥; Ta8、Ta50、Ta84 代表 *MieIF1A-a* 的 3 个株系
A:Leaf, B: Stem, calyx, buds and inflorescence. C: Fruit pods,
D: Roots, WT: wild-type *A. thaliana*(L.) Heynh.. Ta8, Ta50 and Ta84 represent the three *MieIF1A-a* transgenic lines
图 5 转基因植株不同组织的 GUS 染色检测
Fig. 5 The results of GUS staining in different tissues of transgenetic plants

### 2.4 盐胁迫对转基因拟南芥结荚期的影响

对 T,代转基因拟南芥植株的耐盐能力进行检测。由图 6 可知,拟南芥转基因 T,代株系的植株生 长良好,绿叶数量较野生型多,叶片枯死数量较少, 茎秆较粗壮,结荚数量多、角果长且肥大,说明转基 因植株受盐害影响不大;而野生型拟南芥植株生长 严重受阻,叶片呈枯死状较多,部分植株底部叶片全 部死亡,茎秆细小,种子结荚数量较少,角果形状细 小且较短。说明在拟南芥结荚期转基因后代植株比 野生型的耐盐能力更强。



### 2.5 干旱胁迫对拟南芥苗期植株生长表型的影响

对T<sub>3</sub>代转基因拟南芥植株的耐旱能力进行检测。由图7可知,对照与各处理的植株,生长状态 没有明显差异;干旱胁迫7d后,各处理材料的植 株生长受抑制差异明显,野生型拟南芥植株生长受 阻严重,叶片变黄、萎蔫、干枯、脱落,下部叶片尤为 明显,生长缓慢,Ta50和Ta84的植株生长受影响较 小,比WT植株更健壮、叶片大、叶色稍绿,数量较 多;干旱胁迫15d后,野生型拟南芥植株生长叶片 萎蔫,干枯、脱落、生长严重受阻,植株已停止生长; 在3个转基因株系中,Ta50植株生长受影响较小, 植株生长相对正常,叶片稍绿,数量较多,Ta84植 株生长受到一定影响,叶片萎蔫、变黄、干枯、角质 层较厚,而Ta8随着处理时间延长,植株受影响变 小,试验结果证实了转基因植株比野生型的耐旱能 力高。



0 d: 处理前; 7 d: 处理 7 d; 15 d: 处理 15 d 0 d: the growth before treatment, 7 d: the growth after 7 days of treatment, 15 d: the growth after 15 days of treatment

图 7 干旱胁迫下转基因与野生型拟南芥植株生长的差异 Fig.7 Differences in growth between wild-type and

#### transgenic Arabidopsis Heynh. plants under drought stress

# 2.6 干旱胁迫对拟南芥苗期叶片生理生化指标的 影响

对干旱胁迫的转基因拟南芥植株叶片进行生理 生化指标检测,结果如图 8 可知,相对含水量与叶绿 素含量均随着处理时间的延长呈下降趋势,在 0 d 时,野生型和 3 个转基因株系的相对含水量、叶绿素 间差异不明显,处理 7 d 后,Ta8、Ta50 的相对含水 量、叶绿素与野生型间差异显著,处理 15 d 后,所有 处理的相对含水量和叶绿素均下降到最低值,Ta8、 Ta50和Ta84的相对含水量分别为65.1%、71.8% 和70.6%,叶绿素含量分别为3.58、4.14、3.01,3个 株系的相对含水量、叶绿素含量均与野生型之间差 异显著。随着干旱胁迫时间的延长,转基因株系的 Pro含量、SOD、POD、CAT活性均呈先下降后稍微 上升的变化趋势,但野生型的CAT、SOD活性则呈 相反的变化趋势。在处理的各个时期,3个转基因 株系的Pro含量、SOD、POD和CAT活性均比WT 的高;处理7d后,3个转基因株系的4种酶活性 降到最低值,三者的SOD、POD活性与WT之间差 异显著;处理15d后,3个转基因株系的4种酶活 性稍微上升,其中Ta50的4种酶活性最强,Ta8和 Ta84的POD、CAT活性与WT间差异达显著水平。 各处理材料的MDA含量随盐害处理时间延长均呈 现上升趋势,WT的MDA含量比3个转基因株系 的含量高,15d时,WT的MDA含量为34.2,研究 结果说明了转基因株系的抗逆能力得到增强。



The lowercase letters on the histogram show that a significant difference between different lines under the same stress time (P < 0.05)

图 8 干旱处理叶片生理指标检测

Fig.8 The results of physiological indicators of leaves under drought stress

# 3 讨论

真核翻译起始因子除了参与真核翻译起始过程 之外,近年来发现翻译起始 elF 6 个家族还参与植 物抗逆相关调控,如 eIF5A 家族与植物逆境调控相 关研究较多<sup>[35-37]</sup>, elF1(elF1A)在酵母、人类和动物 上研究较多,在植物上仅发现在水稻、甜菜、羊草和 刚毛柽柳等进行相关克隆与抗逆性调控研究[14-15], 过表达TheIF1A、BveIF1A、LceIF1、LceIF1A、LceIF1B和 OselF1A 基因明显增强植物对盐胁迫、渗透胁迫、锂 等非生物胁迫的耐受性[12-16,38],同时发现在逆境 胁迫下, eIF1A 基因在许多植物的组织器官中均可 以诱导表达,是植物抗逆性的相关基因<sup>[18,39]</sup>。本 研究从芒果中分离克隆 elF1A 基因并对其进行了 序列分析,结果表明芒果 eIF1A 基因全长为 604 bp,包括1个编码144氨基酸的完整开放阅读框 (435 bp),基因命名为 MielF1A-a,系统进化树分析 表明 MielF1A-a 与葡萄同源性最高。

目前已从水稻、甜菜、羊草和刚毛柽柳等作物 中克隆了一些 *eIF1A* 基因,研究报道了 *eIFs* 家族 响应植物非生物胁迫(如低温、盐害、干旱、重金属 等)<sup>[18,4041]</sup>。为研究探讨 *eIF1A* 在芒果中表达模式 及功能,本研究利用 qRT-PCR 对芒果的不同组织、 果实发育阶段和逆境胁迫下进行相关表达分析,结 果显示,*MieIF1A-a* 在芒果的不同组织均有表达,但 存在表达特异性,尤其在果实成熟期表达最高,说明 其参与了芒果器官发育形成过程;在逆境胁迫下, *MieIF1A-a* 的响应程度各不相同,对盐胁迫响应最 高,处理后 36 h 的表达水平为处理前 0 h 的 2.4 倍, 其次为 PEG 胁迫,处理后 48 h 表达水平为处理前 0 h 的 2.2 倍;研究结果说明了 *MieIF1A-a* 为芒果逆 境胁迫应答相关基因,可为深入研究其基因功能以 及在芒果中抗逆调控机理提供科学借鉴。

前人研究报道 eIF1A 基因与植物的非生物胁 迫应答紧密相关<sup>[16]</sup>,例如,转化 BVeIF1A 基因增强 了转基因拟南芥的耐盐性<sup>[17]</sup>,而 TheIF1A 转录受 盐和干旱胁迫的强烈诱导,同时 TheIF1A 在柽柳耐 受盐害与干旱危害中起到重要角色,在盐和干旱处 理下,过量表达 TheIF1A 提高烟草中抗氧化酶活 性(可溶性蛋白质量、相对电导率、SOD 活性),减 少 ROS 积累,从而减轻 ROS 对柽柳的危害<sup>[18,4243]</sup>; 过表达 TheIF1A 可能通过提高保护酶活性来调节 体内活性氧清除能力进而改善植株活性氧积累,提 高抗氧化能力<sup>[44]</sup>;在 CaCl<sub>2</sub> 胁迫下, eIF1A 基因通

过增强 CaCl, 胁迫蛋白质合成能力, 提高 POD 和 SOD 活性,降低膜质过氧化程度,提高转基因烟草 的抗重金属能力<sup>[45]</sup>;盐胁迫处理下,转基因山新杨 所受盐害较小,且株高生长均高于对照株系,为1.26 倍<sup>[46]</sup>;本研究结果中,在盐胁迫下,转基因植株比野 生型植株生长良好,受盐害影响不大;而在干旱胁 迫下,在各个处理时间,相比野生型,转基因植株生 长较健壮,各性状受影响较小,说明转 MielF1A-a 基 因可能增强了拟南芥植株的耐盐性和耐旱性;同时 发现转基因的相对含水量、叶绿素和脯氨酸均比野 生型的含量相对较高,以及 SOD、POD 和 CAT 活性 也较野生型的强些,而 MDA 含量相对较小,说明转 MielF1A-a 基因有可能增加了转基因植株的抗氧化 酶活性,极大增强了植株在逆境处理条件下的抗逆 能力。综上,本研究初步阐明了 MielF1A-a 基因参 与芒果果实发育和逆境胁迫调控作用,为后续深入 芒果抗逆研究工作奠定了研究基础。

#### 参考文献

- Sonenberg N, Hinnebusch A G. Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. Cell, 2009, 136(4): 731-745
- Steitz T A. A structural understanding of the dynamic ribosome machine. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2008, 9 (3): 242-253
- [3] Grewal R, Comer J M, Mehta R. The elongation, termination, and recycling phases of translation in eukaryotes. Cold Spring Harbor Perspectives Biology, 2012, 4 (7): a013706
- Pyronnet S, Sonenberg N. Cell-cycle-dependent translational control. Current Opinion in Genetics & Development, 2001, 11 (1): 13-18
- [5] Dong Z, Zhang J T. Initiation factor *eIF3* and regulation of mRNA translation, cell growth, and cancer. Critical Reviews Oncology/Hematology, 2006, 59 (3): 169-180
- [6] Dutt S, Parkash J, Mehra R, Sharma N, Singh B, Raigond P, Joshi A, Chopra S, Singh B P. Translation initiation in plants: roles and implications beyond protein synthesis. Biologia Plantarum, 2015, 59 (3): 401-412
- Battiste J L, Pestova T V, Hellen C U T, Wagner G. The *eIF1A* solution structure reveals a large RNA-binding surface important for scanning function. Molecular Cell, 2000, 5(1): 109-119
- Passmore L A, Schmeing T M, Maag D, Applefield D J, Acker M G, Algire M A, Lorsch J R, Ramakrishnan V. The eukaryotic translation initiation factors *eIF1* and *eIF1A* induce an open conformation of the 40S ribosome. Molecular Cell, 2007, 26 (1): 41-50
- Yu Y P, Marintchev A, Kolupaeva V G, Unbehaun A, Veryasova T, Lai S C, Hong P, Wagner G, Hellen C U T, Pestova T V. Position of eukaryotic translation initiation factor *eIF1A* on the 40S ribosomal subunit mapped by directed

hydroxyl radical probing. Nucleic Acids Research, 2009, 37 (15): 5167-5182

- [10] Grunwald M, Lazzaretti D, Bono F. Structural basis for the nuclear export activity of Importin13. The Embo Journal, 2013, 32 (6): 899-913
- [11] Chaudhuri J, Si K, Maitra U. Function of eukaryotic translation initiation factor 1A (*eIF1A*) (formerly called *eIF-4C*) in initiation of protein synthesis. The Journal of Biological Chemistry, 1997, 272 (12): 7883-7891
- [12] Latha R, Salekdeh G H, Bennett J, Swaminathan M S. Molecular analysis of a stress-induced cDNA encoding the translation initiation factor, *eIF1*, from the salt-tolerant wild relative of rice, *Porteresia coarctata*. Functional Plant Biology, 2004, 31: 1035-1042
- [13] Rangan L, Rout A, Sudarshan M, Gregorio G. Molecular cloning, expression and mapping of the translational initiation factor *eIF1* gene in *Oryza sativa*. Functional Plant Biology, 2009, 36 (5): 442-452
- [14] Diédhiou C J, Popova O V, Dietz K J, Golldack D. The SUIhomologous translation initiation factor *eIF-1* is involved in regulation of ion homeostasis in rice. Plant Biology, 2008, 10
   (3): 298-309
- [15] Sun Y L, Hong S K. Sensitivity of translation initiation factor *eIF1* as a molecular target of salt toxicity to sodic-alkaline stress in the halophytic grass *Leymus chinensis*. Biochemical Genetics, 2013, 51 (1-2): 101-118
- [16] Sun Y L, Gong H S, Jin C W, Hong S K. Molecular cloning and identification of eukaryotic translation initiation factor 1 family genes (*eIF1*, *eIF1A* and *eIF1B*) in *Leymus chinensis* (Trin.). Biotechnology & Biotechnological Equipment, 2015, 29(4): 609-616
- [17] Rausell A, Kanhonou R, Yenush L, Serrano R, Ros R. The translation initiation factor *eIF1A* is an important determinant in the tolerance to NaCl stress in yeast and plants. The Plant Journal, 2003, 34(3): 257-267
- [18] Yang G Y, Yu L L, Wang Y C, Wang C, Gao C Q. The translation initiation factor 1a (*TheIF1A*) from *Tamarix hispida* is regulated by a dof transcription factor and increased abiotic stress tolerance. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 1-15
- [19] Rao N K S, Shivashankara K S, Laxman R H. Abiotic stress physiology of horticultural crops. India: Springer Nature, 2016: 169-181
- [20] 陈由强,叶冰莹,黄庆煌. 马尾松银松素合酶基因表达的 RNA 原位杂交研究.西安:第九届全国植物结构与生殖生物 学学术研讨会论文摘要集,2010 Chen Y Q, Ye B Y, Huang Q H. RNA in situ hybridization of *Pinus massoniana* silver pine synthase gene expression. Xi' an, China: Abstracts of the Ninth National Symposium on Plant Structure and Reproductive Biology, 2010
- Helaly M N, El-Hoseiny H, El-Sheery I, Rastogi A, Kalaji M. Regulation and physiological role of silicon in alleviating drought stress of mango. Plant Physiology and Biochemistry, 2017, 118: 31-44
- [22] 何麒峰,戴雨菡,黄伟圣.田东县芒果种植的气候条件分析. 气象研究与应用,2018,39(2):68-71
   He Q F, Dai Y H, Huang W S. Analysis of climate conditions for mango planting in Tiandong County. Meteorological

Research and Application, 2018, 39 (2): 68-71

- [23] 莫蕤,韦芳,苏春芹.广西右江河谷 2008 年芒果低温寒害调查分析.气象研究与应用,2009,30(1):52-54
   Mo F, Wei F, Su C Q. Investigation and analysis on cold damage of mango in Youjiang Valley of Guangxi in 2008. Meteorological Research and Application, 2009, 30(1):52-54
- [24] 何堂熹,何新华,罗聪.广西百色芒果低产原因分析与改造技术.农业研究与应用,2018,3(31):49-53
  He T X, He X H, Luo C. Cause analysis and improvement technology of low yield of Baise mango in Guangxi. Agricultural Research and Application, 2018,3(31):49-53
- [25] 黄镜浩, 王松标, 武红霞. 低温对芒果授粉生物学的影响. 西南大学学报:自然科学版, 2008, 30(12): 106-110
   Huang J H, Wang S B, We H X. Effects of low temperature on pollination biology of mango. Journal of Southwest University: Natural Science Edition, 2008, 30(12): 106-110
- [26] 李勇.芒果落花落果的原因及防治技术.云南农业科技, 2012(3):43-44

Li Y. Causes and control techniques of mango flowering and fruit dropping. Yunnan Agricultural Science and Technology, 2012 (3): 43-44

- [27] 李朝琴, 濮蝶天.影响华坪县芒果生长的农业气象灾害及防御对策.云南农业科技, 2018(5): 52-55
   Li C Q, Pu D T. Agrometeorological disasters affecting mango growth in Huaping County and preventive measures. Yunnan Agricultural Science and Technology, 2018(5): 52-55
- [28] Luo C, Dong L, He X H, Yu H X, Ou S J, Fang Z B. Molecular cloning and characterisation of a cDNA encoding an abscisic acid-, stress-, and ripening-induced (ASR) protein in mango (*Mangifera indica* L.). Journal of Pomology and Horticultural Science, 2014, 89 (3): 352-358
- [29] Luo C, He X, Hu Y, Yu H X, Ou S J, Fang Z B. Oligo-dT anchored cDNA-SCoT: a novel differential display method for analyzing differential gene expression in response to several stress treatments in mango (*Mangifera indica* L.). Gene, 2014, 548 (2): 182-189
- [30] Liu Z L, Luo C, Dong L, Toan C V, Wei P X, He X H. Molecular characterization and expression analysis of a GTPbinding protein (*MiRab5*) in *Mangifera indica*. Gene, 2014, 540(1): 86-91
- [31] 罗聪,何新华,胡颖,谭超,欧世金. 杧果 MGAPDH 同源基因 的克隆及其表达分析.果树学报,2011,28(6):1019-1024 Luo C, He X H, Hu Y, Tan C, Ou S J. Molecular cloning and expression analysis of a MGAPDH homologous gene from mango. Journal of Fruit Science, 2011,28(6):1019-1024
- [32] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔCT</sup> method. Methods, 2001, 25: 402-408
- [33] 余海霞,罗聪,徐趁,何新华.一种简单高效提取高质量转基 因拟南芥和烟草 DNA 的方法.分子植物育种,2016,14(6): 1436-1440
  Yu H X, Luo C, Xu C, He X H. A simple and efficient method for high quality DNA extraction from transgenic *Arabidopsis* and tobacco. Molecular Plant Breeding, 2016, 14(6): 1436-1440
- [ 34 ] Sieburth L E, Meyerowitz E M. Molecular dissection of the AGAMOUS control region shows that cis elements for spatial

regulation are located intragenically. The Plant Cell, 1997, 9 (3): 355-365

- [35] Davis W, Schultz R M. Molecular cloning and expression of the mouse translation initiation factor *eIF-1A*. Nucleic Acids Research, 1998, 26 (20): 4739-4747
- [36] Wei C, Kainuma M, Hershey J. Characterization of yeast translation initiation factor 1A and cloning of its essential gene. Journal of Biological Chemistry, 1995, 270 (39): 88-94
- [37] Buchan J R, Yoon J H, Parker R. Stress-specific composition, assembly and kinetics of stress granules in *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Cell Science, 2011, 124 (2): 228-239
- [38] Huang J, Wang J, Qiu S P, Zhang H H. Isolation and characterization of two cDNAs encoding translation initiation factor 1A from Rice (*Oryza sativa* L.). DNA Sequence, 2004, 15(1): 39-43
- [39] Shi J, Liu M Q, Shi J N, Zheng G S, Wang Y P, Wang J Y, Chen Y Z, Lu C F, Yin W L. Reference gene selection for qPCR in *Ammopiptanthus mongolicus* under abiotic stresses and expression analysis of seven ROS-scavenging enzyme genes. Plant Cell Reports, 2012, 31 (7): 1245-1254
- [40] Wang L Q, Xu C X, Wang C, Wang Y C. Characterization of a eukaryotic translation initiation factor 5A homolog from *Tamarix androssowii* involved in plant abiotic stress tolerance. BMC Plant Biology, 2012, 12 (1): 118
- [41] Xu J Y, Zhang B L, Jiang C H, Ming F. *RcelF5A*, encoding an eukaryotic translation initiation factor 5A in *Rosa chinensis*, can enhance thermotolerance, oxidative and osmotic stress resistance of *Arabidopsis thaliana*. Plant Molecular Biology, 2011, 75 (1-2): 167-178
- [42] 李艳霞,姜静,于影,王玉成,刘桂丰,姜莹,王有菊.转柽柳

eIF1A 基因烟草的耐盐性分析 . 生物技术通讯, 2006, 17(3): 328-331

Li Y X, Jiang J, Yu Y, Wang Y C, Liu G F, Jiang Y, Wang Y J. Salt tolerance analysis of transgenic tobacco with eIF1A from *Tamarix* sp.. Letters in Biotechnology, 2006, 17 (3): 328-331

- [43] 高彩球,李艳霞,刘桂丰,王玉成,李孝国.翻译起始因子 (*eIF1A*)基因的获得及抗旱性分析.东北林业大学学报, 2007,35(8):6-9
  Gao C Q, Li Y X, Liu G F, Wang Y C, Li X G. Cloning and drought resistance of *eIF1A* gene from *Tamarix androssowii*. Journal of Northeast Forestry University, 2007, 35(8):6-9
- [44] 赵玉琳,杨桂燕,于丽丽,郭宇聪,赵震,高彩球.甲基紫精胁 迫下转 TheIF1A 基因烟草的活性氧代谢.植物研究,2016, 36(1):129-133
  Zhao Y L, Yang G Y, Yu L L, Guo Y C, Zhao Z, Gao C Q. Reactive oxygen metabolism of the TheIF1A transgenic tobacco under methyl viologen stress. Bulletin of Botanical Research, 2016,36(1):129-133
- [45] 姚启超,高彩球,姜静,王玉成,刘桂丰. 柽柳 *eIF1A* 基因耐 重金属 CdCl<sub>2</sub> 胁迫能力分析.东北林业大学学报,2010,38 (2):4-5

Yao Q C, Gao C Q, Jiang J, Wang Y C, Liu G F. Tolerance of *eIF1A* gene from *Tamarix androssowii* under CdCl<sub>2</sub> stress. Journal of Northeast Forestry University, 2010, 38 (2): 4-5

[46] 李健,王有菊,姜静,刘桂丰,王雷,杨连和.山新杨转 elF1A 基因及耐盐性分析.东北林业大学学报,2010,38(1):12-14 Li J, Wang Y J, Jiang J, Liu G F, Wang L, Yang L H. Expression of elF1A gene in transgenic Populus davidiana × P. bolleana and its salt tolerance. Journal of Northeast Forestry University, 2010, 38(1): 12-14