文章编号:1000-7601(2020)04-0235-10

doi:10.7606/j.issn.1000-7601.2020.04.30

# 马铃薯气孔密度表皮模式因子 StSTOMAGEN 的克隆和功能分析

王艳丽<sup>1</sup>,谢 天<sup>1</sup>,张春丽<sup>1</sup>,李娟娟<sup>1</sup>,刘溢健<sup>2</sup>,李红兵<sup>2</sup>, 殷俐娜<sup>2</sup>,王仕稳<sup>2</sup>,邓西平<sup>1,2</sup>,可庆波<sup>2</sup>

(1.西北农林科技大学生命科学学院,陕西 杨凌 712100; 2.西北农林科技大学水土保持研究所,陕西 杨凌 712100)

摘 要:为了研究马铃薯 EPFL9/StSTOMAGEN 基因在气孔发育过程中的功能,从马铃薯品种大西洋中克隆得到 气孔密度表皮模式因子 StSTOMAGEN,将其通过农杆菌介导的遗传转化方法,在拟南芥中异位表达,对该基因的表达 特性及功能进行分析。结果显示:StSTOMAGEN 主要定位于细胞间隙和细胞核,并且它在顶端未展开叶中表达最多, 表达量在1d中呈现周期性变化,长日照条件下(16 h/8 h,光/暗),在授时因子为20 h 时表达量最高;聚乙二醇 (PEG)模拟干旱胁迫处理4h后其表达量达到最高,而脱落酸(ABA)和 NaCl 胁迫处理后,其表达水平呈现出持续降 低的趋势。功能鉴定表明,过表达 StSTOMAGEN 基因的拟南芥(ST)相对于野生型(WT)气孔密度增大63%~83%, 光合速率增大36%~42%。此外,ST 植株离体叶片的水分散失速率增大24%~55%,离体叶片 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量也显著升 高,约为野生型的50%~100%。干旱胁迫下,ST 株系的光合速率,F<sub>e</sub>/F<sub>m</sub>和瞬时水分利用效率都显著低于野生型,其 中光合速率降低55%~66%,F<sub>e</sub>/F<sub>m</sub> 降低22%~50%,瞬时水分利用效率降低11%~12%。综上结果可知,表皮模式因 子 StSTOMAGEN 通过正调控气孔密度而降低植物的抗旱性,该结果为后期通过基因编辑技术降低 StSTOMAGEN 基 因的表达,培育抗旱节水型马铃薯新品种奠定理论基础。

关键词:气孔密度;StSTOMAGEN;抗旱性;马铃薯

中图分类号:S532 文献标志码:A

# Cloning and functional analysis of potato stomatal density epidermal patterning factor *StSTOMAGEN*

WANG Yanli<sup>1</sup>, XIE Tian<sup>1</sup>, ZHANG Chunli<sup>1</sup>, LI Juanjuan<sup>1</sup>, LIU Yijian<sup>1</sup>,

LI Hongbing<sup>2</sup>, YIN Li'na<sup>2</sup>, WANG Shiwen<sup>2</sup>, DENG Xiping<sup>1,2</sup>, KE Qingbo<sup>2</sup>

(1. College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100;

2. Institute of Soil and Water Conservation, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100)

**Abstract**: Secretion of small molecules in the epidermal patterning factor-like family (EPFL) play an important role in stomatal development. To study the function of potato *EPFL9/StSTOMAGEN* gene during stomatal development, we cloned and functionally characterized the stomatal density regulator *StSTOMAGEN* from potato (Atlantic) and transformed it into *Arabidopsis* by Agrobacterium-mediated genetic transformation. We found *StSTOMAGEN* was mainly inter cellular space and cell nucleus localized and had the highest expression level in the apical unexpanded leaves. Interestingly, *StSTOMAGEN* transcript was rhythmically expressed with a peak around Zeitgeber time (ZT) 20 under long-day (16 h/8 h, light/dark) conditions. Expression of *StSTOMAGEN* was markedly downregulated in response to abscisic acid (ABA) and sodium chloride (NaCl) treatments; however, upon the application of polyethylene glycol (PEG), the expression of *StSTOMAGEN* peaked at 4 h and then decreased gradually.

收稿日期:2020-04-29 修回日期:2020-05-10

邓西平(1959-),男,陕西西安人,研究员,主要从事植物水分生理研究。E-mail:dengxiping@ms.iswc.ac.cn

基金项目:中国科学院"黄土高原土壤侵蚀与旱地农业国家重点实验室"开放基金(A314021402-2013);中国科学院"西部青年学者"B类项目(XAB2017B02)

作者简介:王艳丽(1995-),女,河南三门峡人,硕士研究生,研究方向为植物逆境生理与分子育种。E-mail:nwafu\_wyl@163.com

通信作者:可庆波(1986-),男,河南新乡人,助理研究员,主要从事植物逆境生理与分子育种研究。E-mail:qbke@nwafu.edu.en

Functional identification showed that the stomatal density of the *StSTOMAGEN* overexpression (ST) lines was significantly increased by  $63\% \sim 83\%$ , and led to elevated photosynthetic rateby  $36\% \sim 42\%$ . Moreover, ST lines showed more water loss ( $24\% \sim 55\%$ ) and hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) accumulation ( $50\% \sim 100\%$ ) in detached leaves compared with wild-type (WT) plants. Under drought stress, ST lines maintained lower photosynthetic rates ( $55\% \sim 66\%$ ), photosystem II efficiency ( $22\% \sim 50\%$ ), and instantaneous water use efficiency ( $111\% \sim 12\%$ ) than WT plants did. Taken together, the results showed that the epidermal patterning factor *StSTOMAGEN* reduced drought tolerance of plants by positively regulating stomatal density. This result laid a theoretical foundation for reducing the expression of *StSTOMAGEN* gene and cultivating drought-resistant and water-saving potato strains by gene editing technology in the later period.

Keywords: stomatal density; StSTOMAGEN; drought tolerance; potato

随着全球气候变化和生态环境的恶化,植物经 常会遭受到高温、高盐、干旱等各种各样的非生物 胁迫<sup>[1]</sup>,而干旱胁迫会影响植物的生长发育、地理 分布以及农作物的产量<sup>[2]</sup>。因此,提高农作物的抗 旱性,保证干旱胁迫下农作物的产量对保障全球粮 食安全具有重要意义。

气孔是高等植物茎叶等器官表皮上由1对保卫 细胞特化而成的小孔结构,在植物蒸腾作用、呼吸 作用和光合作用中发挥重要作用<sup>[3]</sup>。植物通过气 孔吸收 CO<sub>2</sub>进行光合作用,从而促进自身生长;同 时,植物通过气孔的蒸腾作用推动物质运输<sup>[4]</sup>。植 物完成自身生长需要在最大化光合作用效率的同 时最小化水分流失<sup>[5]</sup>,所以气孔调控对于植物生存 是至关重要的。

随着陆地植物的进化,气孔的形成方式也经历 了一系列的演化[4],但是大量研究表明植物气孔发 育都经历不对称分裂、细胞命运转化、胞间信号转 导等一系列复杂的发育调控事件[6],其分布几乎都 遵循"单细胞间隔法则(One cell spacing)<sup>[7]</sup>"。转录 因子、信号肽以及促分裂原活化蛋白激酶信号等在 气孔发育过程中发挥重要作用[6]。目前已发现的 在气孔发育过程中发挥作用的细胞间信号转导因 子都是属于类表皮模式因子家族 (EPIDERMAL PAT-TERNING FACTOR-LIKE family, EPFL)的小 分子分泌多肽,这些多肽通常具有 N 末端的分泌信 号序列和 C 末端的相对保守的 6 个或 8 个半胱氨酸 残基,前者在蛋白成熟过程中被剪切掉,后者可能 参与形成分子内二硫键<sup>[4]</sup>。拟南芥的 EPFL 家族包 含11个成员<sup>[9]</sup>, EPF1和 EPF2是以负调控因子的 作用来调节特定时期的气孔发育。EPF1 是最早发 现的 EPFL 家族成员, 该基因在晚期的拟分生细 胞、保卫母细胞和早期的保卫细胞中表达,EPF2 的 氨基酸序列与 EPF1 有很高的同源性,其作用时间 早于 EPF1. 在早期的气孔谱系细胞中表达<sup>[10]</sup>。

EPF1 和 EPF2 都依赖类受体膜蛋白 TOO MANY MOUTHS(TMM)和ER家族(ERECTA family, ERf) 类受体激酶发挥功能<sup>[11]</sup>。而 STOMAGEN 是 EPFL 家族中目前已知唯一的正调控因子,其蛋白质包括 N末端分泌信号序列,前肽结构域和成熟肽结构 域<sup>[4]</sup>。过表达 STOMAGEN 基因可以产生簇状气孔 群, 而利用 RNAi 敲除 STOMAGEN 则使得植株几乎 不形成气孔,这些均表明 STOMAGEN 能够促进气孔 发育<sup>[12]</sup>。与 EPF1 和 EPF2 类似, STOMAGEN 发挥 作用需要 TMM 存在。这表明 STOMAGEN 可能是通 过与 EPF1 和 EPF2 竞争性地结合 TMM 从而促进气 孔的形成<sup>[4]</sup>。前人研究表明,细胞中 STOMAGEN 的 表达水平与气孔密度呈正相关,在拟南芥中过表达 STOMAGEN 可以显著增加气孔密度,同时植株的光 合作用得到明显改善<sup>[12]</sup>,但是 STOMAGEN 基因在 植物逆境胁迫响应中的作用尚不清楚。

本研究克隆了马铃薯气孔密度表皮模式因子 StSTOMAGEN 基因,分析了该基因的表达模式,并通 过农杆菌介导的遗传转化获得了过量表达 StS-TOMAGEN 基因的拟南芥株系。通过分析转基因拟 南芥的气孔密度和抗旱性,初步揭示 StSTOMAGEN 在气孔运动及植物干旱胁迫响应中的作用,以期为 通过基因编辑技术改变马铃薯气孔密度调节因子 StSTOMAGEN 基因的表达水平,培育抗旱节水型马 铃薯新品种奠定基础。

# 1 材料与方法

#### 1.1 试验材料

植物材料有拟南芥[哥伦比亚生态型(Col-0)] 和马铃薯(大西洋品种)。将拟南芥种子在超净台 中用 75%的酒精、1%次氯酸钠溶液消毒后,用灭菌 水冲洗 3 次,4℃低温处理 3 d。随后播种在 MS [1/ 2MS+3%蔗糖+0.5%琼脂(pH 5.6~5.8)]培养基,放 于光照培养箱中(光周期为 14 h/10 h,光/暗、相对湿 将继代培养15 d 长势一致的马铃薯组培苗转移至花盆(7 cm×7 cm×6.5 cm)中,生长温度为25℃,相对湿度为60%,光周期为16 h/8 h(光/暗), 光照强度为120 μmol・m<sup>-2</sup>・s<sup>-1</sup>。驯化1周,将马 铃薯苗转移至温室中培养45 d。将马铃薯植株的茎 尖、茎、叶、根和块茎进行取样,迅速放于液氮冷冻 用于 RNA 的提取。对于不同胁迫处理,将继代培养 18 d 的马铃薯组培苗移至霍格兰营养液中培养,3 周后对植株进行逆境处理。包括:5%的聚乙二醇 (PEG6000)溶液、100 mM NaCl 溶液、50 μm 脱落酸 (ABA)溶液,分别在处理0、1、4、8、12、16、20 h 和24 h 后从顶部取第二片完全展开叶并立即置于液氮中冷 冻,用于胁迫条件下基因表达模式研究。

#### 1.2 研究方法

1.2.1 RNA 的提取及荧光定量 PCR 采用 Trizol (Invitrogen)提取马铃薯不同组织的总 RNA,用 DNase 进行纯化处理。然后取 2  $\mu$ g 纯化后的总 RNA,用 TaKaRa 公司的反转录试剂盒 PrimScript<sup>TM</sup> II 1st Strand cDNA Synthesis Kit,按照说明书进行反 转录反应。得到 cDNA 后进行实时定量 PCR,实时 定量 PCR 采用 QuantiTect SYBR Green PCR 试剂盒 (TaKaRa, Dalian, China),用 LightCycler 480 II 系统 (Roche, Basel, Switzerland)进行相关基因表达量分 析。qRT-PCR 所用的反应体系:2× UltraSYBR Mixture 10  $\mu$ L,上游引物(10 mmol·L<sup>-1</sup>)1  $\mu$ L,下游引 物(10  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>)1  $\mu$ L,cDNA 1  $\mu$ L,ddH<sub>2</sub>O 7  $\mu$ L, 共 20  $\mu$ L。最后采用 2<sup>-ΔΔCT</sup>法进行定量数据分析,每 一处理进行 3 次生物学重复。引物序列见表 1。

表1 研究所用引物序列

| able 1 Primers used in this study | fable 1 | Primers | used | in | this | study |
|-----------------------------------|---------|---------|------|----|------|-------|
|-----------------------------------|---------|---------|------|----|------|-------|

| 引物名称 Primer name    | 引物序列(5'3') Primer sequence(5'3') | 引物的用途 Purpose of primers        |
|---------------------|----------------------------------|---------------------------------|
| StSTOMAGEN-F        | ACTAGTATGACGAGAGGTGAGGAAG        | 扩增目的基因 Amplify the target gene  |
| StSTOMAGEN-R        | GGATCCAGTTGATTCATTGATCAAG        | 扩增目的基因 Amplify the target gene  |
| StSTOMAGEN-RT-F     | TCAGGGTTCGATGCACTACT             | 定量 qRT-PCR Quantitative qRT-PCR |
| StSTOMAGEN-RT-R     | CAACTGGAACTTGCTCTGCTC            | 定量 qRT-PCR Quantitative qRT-PCR |
| Stef1α-RT-F         | CTGGTACAAGGGACCAACCC             | 内参基因引物 Reference gene primer    |
| Stef1a-RT-R         | ACACCAGTCTCAACACGACC             | 内参基因引物 Reference gene primer    |
| $\beta$ -actin-RT-F | CTTGCACCAAGCAGCATGAA             | 内参基因引物 Reference gene primer    |
| $\beta$ -actin-RT-R | GCCTCATCATACTCGGCCTT             | 内参基因引物 Reference gene primer    |

1.2.2 *StSTOMAGEN* 基因的克隆和表达载体的构 建 以 1.2.1 中获得的马铃薯的 cDNA 为模板,按照 KOD Plus-Neo(Toyobo, Osaka, Japan)试剂盒的说 明书进行 PCR 扩增,得到目的基因 *StSTOMAGEN*, 引物见表 1。PCR 反应程序为:95℃ 预变性 3 min, 95℃ 变性 10 s,55℃ 退火 30 s,72℃延伸 30 s,35 个 循环。利用 SpeI 和 BamH I 对克隆序列和表达载体 pCAMBIA1305 进行 双酶 切,利用 DNA 连接酶 (TaKaRa,大连)连接获得重组质粒,并将其转化至 农杆菌(Agrobacterium)EHA105。

1.2.3 系统进化分析 以 StSTOMAGEN 基因推导的氨基酸序列为目标序列在 NCBI BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)网站上进行 BlastP 分析,获得各物种同源基因的蛋白序列,并用 MEGA 6.0 软件对 StSTOMAGENA 蛋白序列与荠菜 (Capsella rubella, XM\_023779504.1)、亚麻荠(Camelina sativa, XR\_757444.2)、琴叶拟南芥(Arabidopsis lyrate, XM\_002863154.2)、拟南芥(Arabidopsis thaliana, NM\_117366.4)、山嵛菜(Eutremasalsugineum,

XM\_006414920.2)、白菜(Brassica rapa, XM\_ 009109421.3)、石榴(Punicagranatum, XM\_ 022160362.1)、大豆(Glycine max, NM\_001255343.2)、 木薯(Manihot esculenta, XM\_021776765.1)、橡胶树 (Heveabrasiliensis, XM\_021821217.1)、猩红猴面花 (Erythrantheguttatus, XM\_012979755.1)、番茄(Solanum lycopersicum, XM\_004245347.4)、辣椒 (Capsicum annuum, XM\_016723913.1)、胡萝卜 (Daucuscarota, XM\_017397194.1)和烟草(Nicotiana tabacum, XM\_016654878.1)的蛋白序列进行比对, 并使用最大似然法生成系统进化树,分析 StSTOMA-GEN 的进化关系。

1.2.4 *StSTOMAGEN* 的 亚 细 胞 定 位 将 含 有 pCaMV35S-StSTOMAGEN-GFP 表达载体的农杆菌 和含 P19 沉默抑制基因表达载体的农杆菌用注射 缓冲液(10 mM MES,10 mM MgCl<sub>2</sub>和 100  $\mu$ M aceto-syringone)稀释到 OD<sub>600</sub> = 1,然后按照 1 : 1 将 二 者 混合后,注射到 4 周龄的烟草叶片中,每株注射 3 片 叶片,每片叶片 4 个注射点,室温暗处培养 3 d 后,

通过生物激光共聚焦显微镜(Leica TCs SP2,488 nm,633 nm)观察绿色荧光蛋白(GFP)信号,根据荧光的位置确定蛋白的亚细胞定位。

1.2.5 转基因拟南芥的获得 将 pCaMV35S-StS-TOMAGEN-GFP 表达载体转化至农杆菌 GV3101 后,利用浸花法<sup>[13]</sup>将该重组载体对拟南芥 Col-0进 行遗传转化,获得转基因植株(称为 ST),收获浸染 后的 T0 代种子,消毒后再播种于含有 25 μg·mL<sup>-1</sup> 潮霉素的 1/2 MS 固体培养基上,种子萌发后,根部 正常延伸且叶片保持绿色的即可初步认定为筛选 的 T1 代转基因阳性苗,移栽至土壤中进一步生长, 收获 T2 代种子。在 1/2 MS 筛选培养基(含 25 μg ·mL<sup>-1</sup>潮霉素)继续筛选,可获得纯合株。最后分 别进行 DNA 水平(基因组 DNA 的 PCR)和 RNA 水 平(qRT-PCR)鉴定,确定 T-DNA 成功插入拟南芥 基因组并且 StSTOMAGFEN 基因在拟南芥中得到 表达。

1.2.6 气孔密度的观察 分别取生长 30 d 的 ST 和 WT 拟南芥幼苗同一叶位、长势健康的叶片,根据 Sugano 等<sup>[12]</sup>的方法,首先用固定液(无水乙醇:乙酸=9:1)对叶片固定 7 h 以上,然后用脱色液(水 合氯醛溶液:水:甘油=8:2:1)进行脱色,最后 用 1 μg · mL<sup>-1</sup>番红染色,在奥林巴斯 BX51 电子显 微镜(Olympus America Inc., Melville, NY, USA)下 观察气孔数目。每片莲座叶上表皮选取 4~6 个视 野进行拍照,统计气孔数目,计算气孔密度(个 · mm<sup>-2</sup>),每组重复 3 次。

1.2.7 转基因拟南芥的光合指标测定 待 ST 和 WT 拟南芥生长 6 周后,选取同一叶位的叶片用 Li-COR 6800(Li-COR, Lincoln, NE, USA)便携式光 合作用测定系统,在 9:00—12:00 进行测定。通 过开放式气路,设定温度为 25℃,CO<sub>2</sub>浓度为 719.6 mg・m<sup>-3</sup>,空气相对湿度为 50%,光强梯度为 1 000、 800、600,400、300、250、200、150、100、50 µmol・m<sup>-2</sup> ·s<sup>-1</sup>和 0 µmol・m<sup>-2</sup> ·s<sup>-1</sup>PAR,间隔 2~3 min 的条 件下测定叶片在每一光强下的净光合速率(Pn)、气 孔导度( $g_s$ )和蒸腾速率(Tr)。同时使用 FluorPen FP 100(PSI, Drasov, Czech Republic)测定  $F_v/F_m$ , 即 PS II 最大光量子产量。

1.2.8 叶片相对含水量的测定 对于对照和干旱 处理的拟南芥,采用烘干称量法测定叶片相对含水 量。每组处理采集5片新鲜的完全展开叶,迅速测 定其鲜重(FW),然后将叶片浸入去离子水中,放置 24h后称其饱和鲜重(SW),之后将叶片置于烘干 箱内烘至恒量,称其干重(DW),采用以下公式计算 叶片相对含水量:

$$RWC = \frac{FW - DW}{SW - DW} \times 100\%$$

1.2.9 离体叶片水分散失速率测定 摘取生长 6 周的 WT 和 ST 植株的相同叶位的成熟叶片,置于 25℃环境下,自然风干 2 h。每 10 min 测 1 次样品 重量,重复 3 次。叶片失水率=(鲜重-风干后重 量)/鲜重×100%。

1.2.10 叶面积测定 为了测定不同株系拟南芥的 叶面积,将正常供水与干旱处理后采的新鲜叶片用 扫描仪 Epson Perfection V700 Photo scanner(Seiko Epson Corporation, Beijing, China)扫描后,用 WinR-RHIZO PRO 2009 软件(Regent Inc., Quebec, Canada)对其叶面积进行统计,每个株系重复3次。 1.2.11 开花时间测定 参照 Zhai 等<sup>[14]</sup>的方法,将

移栽后的拟南芥放于光照培养箱,按1.1中的条件 正常光照培养生长,等拟南芥抽薹1 cm 后,统计莲 座叶叶片数,用叶片数衡量开花时间。

1.2.12 *StSTOMAGEN* 过表达拟南芥的抗旱性分析 用干旱法<sup>[15]</sup> 测定转基因拟南芥的抗旱性。分别将正常生长6周的ST和WT 拟南芥干旱处理7d后,然后复水2d。在干旱处理5d后观察植株的抗旱表型并统计转基因和野生型拟南芥的存活率并 拍照,同时测量WT与ST 拟南芥的地上部生物量、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>含量、相对含水量(RWC)、水分利用效率(iWUE)和其他气体交换参数。

1.2.13 DAB 染色 取 WT 和 ST 拟南芥同一叶位 成熟叶片在自然条件下,风干 1 h 后,使用 DAB(3, 3'-diaminobenzidine-HCl)染色。然后抽真空 2 min,去除染色液,加入适量的脱色液(无水乙醇)于 60℃烘箱中进行脱色。

1.2.14 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>含量测定 参照过氧化氢含量测定试 剂盒(Solarbio, Beijing, China)说明书测定 WT 和 ST 转基因拟南芥植株的过氧化氢含量,每个样品重复 3次。

1.2.15 数据分析 试验数据采用 Microsoft Excel 2010 处理,用 SPSS17.0(version 17.0; SPSS, Chicago, IL, USA)统计分析软件进行方差分析和 Duncan 显著性检验。

## 2 结果与分析

#### 2.1 StSTOMAGEN 基因的克隆及进化树分析

通过 Joint Genome Institute Phytozome 数据库 (www.phytozome.com),利用基于同源性的 BLAST 搜索(DOE JGI,Walnut Creek,CA,USA)从马铃薯中 分离出 StSTOMAGEN 基因的 cDNA,其开放阅读框 (ORF)长度为 288 bp,编码含 96 个氨基酸的蛋白 质。利用 MEGA 6.0 软件将 StSTOMAGEN 的氨基酸 序列与其他 15 个物种的蛋白序列进行分析构建进 化树(图 1A),发现马铃薯 StSTOMAGEN 与番茄 SI-STOMAGEN 亲缘关系最近,同源性最高。通过比较 StSTOMAGEN 和 AtSTOMAGEN 的氨基酸序列发现, StSTOMAGEN 和 AtSTOMAGEN 的氨基酸序列发现, StSTOMAGEN 在 N 端含有信号肽序列,在 C 端含有 6 个保守的半胱氨酸残基(图 1B),这表明 StS-TOMAGEN 基因在功能上存在潜在的保守性。

#### 2.2 StSTOMAGEN 基因的表达模式

为了进一步验证 StSTOMAGEN 的组织表达模式,通过 qRT-PCR 方法检测 StSTOMAGEN 基因在 马铃薯不同组织中的表达情况。结果显示, StS-TOMAGEN 基因主要在叶片中表达,在顶端未展开 叶中的表达量最高,约是块茎的 200 倍(图 2A)。 同时, StSTOMAGEN 基因的表达量会随着叶位的下 降而下降,在新叶中表达量较高,而在底部老叶中 的表达量较低。

此外,为了研究 StSTOMAGEN 在细胞中的表达

位置,将 StSTOMAGEN-FP 融合表达载体注射到烟 草叶片,用激光共聚焦显微镜观察融合蛋白的亚细 胞定位。结果表明,StSTOMAGEN-GFP 融合蛋白的 荧光均匀分布于细胞间隙和细胞核,因此可以推测 *StSTOMAGEN* 基因编码的蛋白主要定位在植物的细 胞间隙和细胞核(图 2B)。

随后,对马铃薯植株进行不同的非生物胁迫处 理,发现在正常条件下,该基因的表达量在一天中 呈现周期性变化,长日照条件下(16 h/8 h,光/暗), 在授时因子为 20 h 时表达量达到最高。PEG 模拟 干旱胁迫处理后,其表达量在 4 h 时达到峰值,ABA 和 NaCl 胁迫处理后,其表达水平呈现出持续降低的 趋势(图 3)。

#### 2.3 过表达 StSTOMAGEN 基因拟南芥的分子鉴定

通过浸花法将含有 StSTOMAGEN 基因过表达 载体的农杆菌 EHA105 对拟南芥进行遗传转化。经 过潮霉素抗性筛选,获得 8 个 T3 代纯合株系,以野 生型拟南芥为对照,对 ST 转基因拟南芥叶片进行 PCR 检测,结果如图 4A 所示,在 8 株转基因拟南芥 的基因组内均检测到目的片段,而在 WT 拟南芥中



注:(A)StSTOMAGEN 蛋白与其他 15 个不同物种 StSTOMAGEN 蛋白的进化分析。(B)马铃薯 StSTOMAGEN 和 AtSTOMAGEN 氨基酸序列比较。黑色阴影表示相同的氨基酸残基,灰色阴影表示相 似的氨基酸残基,C表示保守的半胱氨酸残基。

Note: (A) Phylogenetic analysis of the StSTOMAGEN protein in 15 plant species. (B) Comparison of StSTOMAGEN and AtSTOMAGEN amino acid sequences. Identical and similar amino acid residues are shaded in black and gray, respectively. C is conservative cysteine residue.

#### 图 1 StSTOMAGEN 蛋白的进化分析

Fig.1 Phylogenetic analysis of the deduced StSTOMAGEN amino acid sequence



注:(A)StEPF1-GFP融合蛋白亚细胞定位,比例尺为 50μm;(B)StESTOMAGEN 基因在不同组织的表达分析,包括:ST,茎尖;UE,顶端未展开叶;L1,第一叶;L4,第四叶;L10,第 10 叶;S1,第 1~3 茎段;S2,第 4~6 茎段;S3,第 7~9 茎段;R,根;SS,块茎;用 Stef1α 作为内参基因。

Note: (A) Subcellular localization of the StSTOMAGEN-GFP fusion protein. Scale bars: 50  $\mu$ m; (B) Expression analysis of the *StSOMAGEN* gene in various tissues of 2-month-old potato plants including stem tip (ST); apical unexpanded leaf (UE); 1st, 4th, and 10th leaf (L) from the top; 1st~3rd, 4th~6th, and 7th~9th stem internode (S); root (R); and storage tuber (SS), Stef1 $\alpha$  was used as an internal control for data normalization.

图 2 马铃薯 StSTOMAGEN 基因及蛋白质的表达特征

Fig.2 Molecular characterization of the StSTOMAGEN gene and the corresponding protein in potato



注:对照,正常生长条件;PEG,5%的聚乙二醇(PEG6000) 溶液;NaCl,100 mMNaCl 溶液;ABA,50 μm 脱落酸溶液,用 *Stef*1α作为内参基因。

Note: Control, normal growth condition; PEG, 5% polyethylene glycol (PEG6000); NaCl, 100 mM sodium chloride; ABA, 50  $\mu$ M abscisic acid, *Stef*1 $\alpha$  was used as an internal control for data normalization.

图 3 StSTOMAGEN 基因在多种逆境下的表达情况

Fig.3 Temporal expression analysis of the *StSTOMAGEN* gene in mature leaves of potato plants under abiotic stress conditions 没有检测到,说明 *StSTOMAGEN* 基因已经整合到拟 南芥基因组。qRT-PCR 结果如图 4B,结果表明,8 个 ST 株系的 *StSTOMAGEN* 表达水平都显著升高。选取表达量较高的 ST 7-3 和 ST 26-6 进行后续试 验。通过观察气孔密度发现,这两个株系叶片的气

孔密度显著增大(图 4C 和 5B),相对于 WT,分别增 加了 83.4%和 57.2%(图 4C),同时,地上部生物量 也显著增大(图 5A 和 C)。此外,WT 与 ST 拟南芥 的开花时间(图 4D)和叶面积(图 5D)没有显著差 异,开花时莲座叶的数目都为 10 片左右。

2.4 StSTOMAGEN 转基因拟南芥光响应曲线测定

由图 6A 可知,当光照强度低于 250  $\mu$ mol·m<sup>-2</sup> ·s<sup>-1</sup>时,3 个株系拟南芥的净光合速率(*Pn*)随光强 呈线性增加且转基因系显著高于 WT;当光合有效 辐射达到 300  $\mu$ mol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>及以上时,*Pn* 保持平 缓增加,当光照强度高于 800  $\mu$ mol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>时,转 基因系和 WT 拟南芥的 *Pn* 都保持平缓,说明 *Pn* 已 经达到最大值。此外,在不同光照条件下,转基因拟 南芥的气孔导度(*g*<sub>s</sub>)都显著高于野生型。以上结果 表明,气孔密度对光合作用的光响应产生显著影响, 随着气孔密度增大,植物的光合能力随之增强。

# 2.5 过表达 StSTOMAGEN 基因提高拟南芥对干旱 的敏感性

对获得的 StSTOMAGEN 转基因拟南芥进行干旱处理,7 d后,转基因拟南芥表现出大量萎蔫死亡,而 WT 生长状态较好(图 7A)。干旱处理后,ST



注:\*,P<0.05; \*\*, P<0.01; Duncan 显著性检验。下同。

Note: \*, P<0.05; \* \*, P<0.01; Duncan significance test. The same below.

#### 图 4 转基因拟南芥的鉴定及气孔密度分析





注:(A)WT 与 ST 转基因拟南芥株系的表型观察;(B)WT 与 ST 转基因拟南芥株系的气孔密度观察。 Note:(A) Phenotype of wild-type (WT; Col-0) and StSTOMAGEN overexpression (ST) lines after 1 month of growth in pots.(B) Photos of mature abaxial leaf epidermis of 30-day-old WT and ST plants. Scale bars: 40 μm. 图 5 过表达 StSTOMAGEN 基因拟南芥的表型分析





▲ Col-0 ● ST 7-3 ● ST 26-6

图 6 不同光照强度下 WT 和 ST 拟南芥成熟叶片的光响应曲线(A) 和气孔导度响应曲线(B)

Fig.6 Photosynthetic response (A) and stomatal conductance (B) curres of mature leaves of WT and ST plants under different light intensities 植株的地上部生物量、RWC、F<sub>r</sub>/F<sub>m</sub>、Pn、g<sub>s</sub>和 iWUE 都显著降低(图 7B-G)。复水处理 2 天后, WT 植株 的存活率显著高于 ST(图 7A)。此外, ST 植株的水 分散失速率也显著高于 WT 植株(图 8A)。叶片经

Col-0

(A)

干旱胁迫前 Before drought stress

5 d

p /

千旱胁迫 Drought stress

过1h的水分散失后,通过DAB染色发现,ST株系 叶片的 H,O,含量也显著高于于 WT(图 8B 和 C)。 以上结果表明,StSTOMAGEN 在拟南芥中过量表达 会降低拟南芥的抗旱性。 90 <u>\_</u>\_\_\_1.8 [ (B) (C) 转基因株系Transgenic lines 鲜重/(g・株 <sup>-1</sup>) Fresh weight/(g・plant<sup>-</sup> 75 1.5 相对含水量 RWC/% ST 7-3 ST 26-6 1.2 60 Т 0.9 45 0.6 30 0.3 15 0 Δ 0 5 干旱胁迫时间/d 干旱胁迫时间/d Drought stress time Drought stress time 180 150 (D) (E) 8  $g_s/(\text{mmol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1})$ -2 • S -1 净光合速率 6 120 气孔导度  $Pn/(\mu mol \cdot m)$ 90 60 2 30 0 0 0 5 干旱胁迫时间/d 干旱胁迫时间/d Drought stress time Drought stress time 70 F 1.0 (G) (F) <sup>2</sup> • s<sup>-1</sup>) 60 瞬时水分利用效率 0.8 50 iWUE/(µmol•m<sup>-</sup> ₩0.6 ₩4/A4 40

0.2

Drought stress time

□ ST 7-3

С

🔲 ST 26-6

干旱胁迫时间/d

Drought stress time



注:\*:P<0.05,\*\*:P<0.01,Duncan 显著性检验。 Note: \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 by Duncan significance test.



30

20

10

0 干旱胁迫时间/d

Drought stress time

Col-0



WT 与 ST 拟南芥植株的水分散失(A)和过氧化氢含量(B、C) 图 8 Water loss (A) and hydrogen peroxide content (B,C) of WT and ST Arabidopsis plants Fig.8

### 3 讨 论

全球气候的不断变化使植物的生长受到了严峻的威胁<sup>[16]</sup>。为了应对复杂多变的陆生环境,植物进化出了气孔,它是连接植物光合系统和大气环境的通道<sup>[17]</sup>。气孔的发育过程涉及信号转导、细胞命运转化、细胞不对称分裂等重要的发育调控事件<sup>[18]</sup>。前人研究表明,在拟南芥中过表达气孔密度表皮模式因子 AtSTOMAGEN 会增大拟南芥的气孔密度,同时植物的光合能力也显著提高<sup>[12,19]</sup>。本研究从马铃薯中克隆得到 StSTOMAGEN 基因,并对其在调控气孔发育和调节拟南芥抗旱性中的作用进行研究。

AtSTOMAGEN 是拟南芥表皮模式因子 (EPI-DERMAL PATTERNING FACTOR, EPF)家族的成 员,是目前发现的唯一一个正调控气孔密度的表皮 模式因子<sup>[19]</sup>。前人研究表明,AtSTOMAGEN 主要是 通过竞争性代替表皮模式因子 2 (EPIDERMAL PATTERNING FACTOR 2, EPF2) 与 ER 受体结合, 抑制后者引起下游 MAPK 组分磷酸化,从而促进气 孔发育<sup>[20]</sup>。在本研究中,我们发现 StSTOMAGEN 主 要定位于细胞间隙和细胞核,其表达模式具有组织 特异性,主要在嫩叶中表达,这与气孔主要分布在 茎、叶等器官表皮的现象一致<sup>[21]</sup>。光合组织可能是 通过其调节表皮气孔密度,优化 CO,的吸收,提高光 合效率<sup>[12]</sup>。此外,通过与 AtSTOMAGEN 的氨基酸序 列比对发现,StSTOMAGEN 在 N 端含有信号肽序列, C 段含有相对保守的 6 个半胱氨酸残基。过表达 StSTOMAGEN 基因的拟南芥气孔密度显著增大,这与 AtSTOMAGEN 在调控拟南芥气孔密度中的作用一 致<sup>[18]</sup>,说明 StSTOMAGEN 在进化过程中功能保守。

光响应曲线是以光合产量或相对电子传递速 率为一轴,而以 PPFD 或 PAR 为另一轴作图得到, 可以测量叶片适应不同水平光照的能力以及叶片 的最大净光合速率<sup>[22]</sup>。前人通过研究拟南芥 syp121 气孔开度突变体发现,尽管突变体的气孔开 度降低,但是只有在高光条件下植株的 CO<sub>2</sub>同化速 率和气孔导度才会降低<sup>[23]</sup>。在本试验中,我们通过 测定 ST 和 WT 拟南芥的光响应曲线发现,气孔密度 对光合速率具有积极作用,3 个株系的光合作用随 着光强的增加呈上升趋势且 ST 拟南芥的光合速率 显著高于 WT,但是气孔导度随光照变化不明显。 这与之前的报道是一致的,由干旱胁迫造成的气孔 导度降低仅在高光强下影响植物的光合作用<sup>[24]</sup>。

干旱胁迫会使植物的生长受到抑制、光合速率 降低,体内积累大量活性氧,甚至导致植物死亡<sup>[25]</sup>。 为了研究 StSTOMAGEN 在植物响应干旱胁迫中的 作用.我们对转基因拟南芥讲行干旱处理并观察表 型,结果显示,干旱处理7d后,转基因拟南芥大量 萎蔫甚至死亡,而野生型状态较好。进一步分析显 示,干旱处理后,转基因拟南芥的地上部生物量、相 对含水量、瞬时水分利用效率、二氧化碳同化速率、 气孔导度、蒸腾速率都显著降低,说明在拟南芥中 过表达 StSTOMAGEN 会降低植株对干旱胁迫的抗 性。同时,利用拟南芥叶片测定水分散失速率,发现 转基因拟南芥的水分散失速率显著高于野生型,表明 转基因系通过提高叶片失水速率增强了对干旱胁迫 的敏感性。综上,转基因植株在干旱条件下生长受到 抑制可能与组织水分状况有关<sup>[26]</sup>,因为ST株系叶片 气孔密度增大,会造成更多水分散失,从而使植物在 受到严重胁迫的情况下,叶片水势迅速降低,因此在 干旱胁迫下,转基因株系无法保存叶片内的可用水 分,从而表现出明显的枯黄萎蔫表型。

# 4 结 论

本研究对 StSTOMAGEN 进行干旱胁迫分析发现,该基因能被 PEG 诱导表达;将该基因转化拟南芥,转基因材料叶片中的气孔数量显著增多且光合速率显著增强;对转基因拟南芥和 WT 进行干旱胁迫处理,发现转基因材料的抗旱性降低。上述结果表明,StSTOMAGEN 是气孔密度正调控因子,过表达StSTOMAGEN 可提高拟南芥叶片的气孔密度而降低拟南芥对干旱胁迫的耐受性。本研究初步揭示了StSTOMAGEN 基因与气孔密度和干旱应答的关系,为进一步深入探讨其分子机制提供理论依据。

#### 参考文献:

- [1] 赵婉莹,于太飞,杨军峰,等.大豆 GmbZIP16 的抗旱功能验证及分析 [J].中国农业科学,2018,51(15):6-18.
- [2] 胡银岗,马翎健,宋喜悦,等.麦类作物非生物胁迫抗性基因研究进展 [J].麦类作物学报,2004,24(3):93-100.
- [3] 李岩,徐珊珊,王根轩.气孔发育机制及其内外调控因子的研究进展 [J].生命科学,2018,30(5):491-499.
- [4] 崔国新,韩宝达,赵潇男. 气孔发育及其调控[J].植物生理学报,2012, 48(9):829-836.
- [5] Bertolino L T, Caine R S, Gray J E. Impact of stomatal density and morphology on water-use efficiency in a changing world [J].Plant Science, 2019, 10:225.
- [6] Bergmann D C, Sack F D. Stomatal development [J]. Annual Review of Plant Biology,2007, 58:163-181.
- [7] 刘婧,王宝山,谢先芝.植物气孔发育及其调控研究[J].遗传,2011,33 (2):131-137.
- [8] 陈亮,侯岁稳.植物气孔发育的分子遗传调控[J].中国科学:生命科 学,2017,47(8):798-807.
- [9] Niwa T, Kondo T, Nishizawa M, et al. EPIDERMAL PATTERNING FACTOR LIKE5 peptide represses stomatal development by inhibiting meristemoid maintenance in *Arabidopsis thaliana*[J]. Bioscience Biotechnology Biochemistry, 2013, 77(6):1287-1295.

- [10] Hara K, Yokoo T, Kajita R, et al. Epidermal cell density is auto-regulated via a secretory peptide, EPIDERMAL PATTERNING FACTOR 2 in Arabidopsis leaves [J]. Plant and Cell Physiology, 2009, 50(6): 1019-1031.
- [11] Torii K U. Mix-and-match:ligand-receptor pairs in stomatal development and beyond[J]. Trends in Plant Science, 2012, 17(12):711-719.
- [12] Tanaka Y, Shigeo S, Shimada, et al. Enhancement of leaf photosynthetic capacity through increased stomatal density in Arabidopsis [J]. New Phytologist, 2013, 198(3):757-764.
- [13] Yew C L, Kakui H, Shimizu K K, et al. Agrobacterium-mediated floral dip transformation of the model polyploid species Arabidopsiskamchatica [J]. Journal of Plant Research, 2018, 131(2):349-358.
- [14] Zhai Q Z, Zhang X, Wu F M, et al. Transcriptional mechanism ofjasmonate receptor COII-mediated delay of flowering time in *Arabidopsis*[J]. Plant Cell, 2015, 27(10):2814-2828.
- [15] Cai R, Zhao Y, Wang Y, et al. Overexpression of a maize WRKY58 gene enhances drought and salt tolerance in transgenic rice [J]. Plant Cell Tissu and Organ Culture, 2014, 119:565-577.
- [16] 高勇,任小芸,李倩,等,拟南芥光敏色素作用因子 PIF3 节水抗旱功 能分析[J].扬州大学学报(农业与生命科学版),2019,40(1):8-13.
- [17] Agurla S, Gahir S, Munemasa S, et al. Mechanism of stomatal closure in plants exposed to drought and cold stress[J]. Advance in Experiment Medicine Biology, 2018, 1081:215-232.
- [18] 刘旭新. 过量表达水稻 EPFL 家族基因影响拟南芥气孔的发育[J].

#### (上接第220页)

- [3] 王展,张玉龙,虞娜,等.冻融作用对土壤微团聚体特征及分形维数的 影响[J].土壤学报,2013,50(1):83-88.
- [4] 陈晓东,吴景贵,范围,等,有机物料对原生盐碱土微团聚体特征及稳定性的影响[J].水土保持学报,2020,34(2);201-207.
- [5] Guo Z C,Zhang Z B,Zhou H, et al.Long-term animal manure application promoted biological binding agents but not soil aggregation in a vertisol [J].Soil and Tillage Research,2018,180:232-237.
- [6] 张世祺,王沛裴,王昌全,等.不同植烟年限对土壤团聚体稳定性的影响及其相关因素分析[J].土壤,2017,49(6);1229-1236.
- [7] Wang H, Guan D S, Zhang R D, et al.Soil aggregates and organic carbon affected by the land use change from rice paddy to vegetable field [J].Ecological Engineering, 2014, 70:206-211.
- [8] 王艳玲,蒋发辉,徐江兵,等.长期配施有机肥对旱地红壤微团聚体中 有机碳含量的影响[J].土壤通报,2018,49(2):377-384.
- [9] 尚杰.苹果树生物质炭对土壤团聚体含量及稳定性的影响[J].现代农业科技,2018,(23):184-186,189.
- [10] 王卫华,王全九,张志鹏,流域尺度土壤导气率空间分布特征与影响 因素分析[J].农业机械学报,2014,45(7):118-124.
- [11] 宋洁,李志洪,赵小军,等.秸秆还田对土壤微团聚体特征的影响[J]. 水土保持学报,2018,32(5):116-120.
- [12] 曾江敏,何丙辉,苏锋,等.喀斯特槽谷顺/逆向坡不同植被恢复下土 壤微团聚体特征[J].中南林业科技大学学报,2019,39(10):109-115.
- [13] 郑健,殷李高,李欣怡,等.沼液理化性质对土壤饱和导水率的影响[J].中国沼气,2019,37(4):103-109.
- [14] 韩馥.铅锌矿区植物修复对土壤团聚体稳定性及重金属分布特征的 影响[D].杨凌:西北农林科技大学,2019.
- [15] 黄斌重金属在稻田土壤中的吸附、富集、迁移特征及稳定化研究 [D].长沙:湖南大学,2016.
- [16] 侯彪.不同粒径团聚体中重金属的分配规律及影响因素[D].成都: 成都理工大学,2019.

分子植物育种,2017,(6):18-23.

- [19] Sugano S S, Shimada T, Imai Y, et al. Stomagen positively regulates stomatal density in Arabidopsis[J]. Nature, 2009, 463(7278):241-244.
- [20] Jewaria P K, Hara T, Tanaka H, et al. Differential effects of the peptides Stomagen, EPF1 and EPF2 on activation of MAP kinase MPK6 and the SPCH protein level [J]. Plant and Cell Physiology, 2013, 54 (8):1253-1262.
- [21] 王碧霞,曾永海,王大勇,等.叶片气孔分布及生理特征对环境胁迫的 响应[J].干旱地区农业研究,2010,28(2):122-126.
- [22] 陆佩玲,于强,罗毅,等冬小麦光合作用的光响应曲线的拟合[J].中 国农业气象,2001,(2):13-15.
- [23] Eisenach C, Chen Z H, Christopher G, et al. The trafficking protein SYP121 of Arabidopsis connects programmed stomatal closure and K<sup>+</sup> channel activity with vegetative growth[J]. Plant Journal, 2012, 69(2): 241-251.
- [24] 黄美杰,朱炎辉,孙慧生,等,干旱胁迫下马铃薯品种'克新1号'的光 响应曲线[J]. 中国马铃薯, 2012,(6):325-328.
- [25] Kerchev P I, Fenton B,Foyer C H, et al. Plant responses to insect herbivory: interactions between photosynthesis, reactive oxygen species and hormonal signalling pathways[J]. Plant Cell and Environment, 2012, 35 (2):441-453.
- [26] Karim S, Aronsson H, Ericson H, et al. Improved drought tolerance without undesired side effects in transgenic plants producing trehalose [J].Plant Molecular Biology, 2007, 64(4):371-386.
- [17] Cambardella C A, Elliott E T.Carbon and nitrogen dynamics of soil organic matter fractions from cultivated grassland soils [J]. Soil Science Society of America Journal, 1994, 58(1):123-130.
- [18] Cambardella C A, Elliott E T.Particulate soil organic-matter changes across a grassland cultivation sequence[J].Soil Science Society of America Journal, 1992, 56(3):777-783.
- [19] Roth E, Mancier V, Fabre B.Adsorption of cadmium on different granulometric soil fractions; Influence of organic matter and temperature [J]. Geoderma, 2012, 189-190;133-143.
- [20] Chen J H, He F, Zhang X H, et al.Heavy metal pollution decreases microbial abundance, diversity and activity within particle-size fractions of a paddy soil[J].FEMS Microbiology Ecology, 2014, 87(1):164-181.
- [21] Daniel G S, Donald L S. Effects of soil organic matter on the kinetics and mechanisms of Pb(II) sorption and desorption in soil[J].Soil Science Society of America Journal, 2000, 64(1):144-156.
- [22] 窦森,李凯,关松.土壤团聚体中有机质研究进展[J].土壤学报,2011, 48(2):412-418.
- [23] Hochella M F, Lower S K, Maurice P A, et al.Nanominerals, mineral nanoparticles, and earth systems [J]. Science, 2008, 319 (5870): 1631-1635.
- [24] Li Q, Du H H, Chen W L, et al.Aging shapes the distribution of copper in soil aggregate size fractions[J].Environmental Pollution, 2018, 233: 569-576.
- [25] El-Swaify S A, Emerson W W. Changes in the physical properties of soil clays due to precipitated aluminum and iron hydroxides, I.Swelling and aggregate stability after drying [J].Soil Science Society of America Journal, 1975, 39(6):1056-1063.
- [26] Muggler C C, Griethuysen, Buurman P, et al.Aggregation, organic matter, and iron oxide morphology in oxisols from Minas Gerais, Brazil[J]. Soil Science, 1999, 164(10):759-770.