

○ 马洪双
尹伟伦
夏新莉
著



SCREENING DIFFERENTIAL EXPRESSION GENES OF *POPULUS EUPHRATICA* UNDER SALT STRESS AND

胡杨在盐胁迫下差异表达基因的筛选以及 胡杨*PeSCL7*基因功能分析

FUNCTIONAL ANALYSIS OF *PeSCL7*

北京林业大学优秀博士
论文基金资助丛书

中国环境出版社

013068860

S792
01

北京林业大学优秀博士学位论文基金资助丛书

胡杨在盐胁迫下差异表达基因的筛选以及胡杨 *PeSCL7* 基因功能分析

Screening Differential Expression Genes of
Populus euphratica under Salt Stress and Functional
Analysis of *PeSCL7*

马洪双 尹伟伦 夏新莉 著



中国环境出版社·北京



北航

C1676330

S792
01

038830210

图书在版编目(CIP)数据

胡杨在盐胁迫下差异表达基因的筛选以及胡杨 *PeSCL7*
基因功能分析/马洪双, 尹伟伦, 夏新莉著. — 北京: 中国
环境出版社, 2012.7

(北京林业大学优秀博士论文基金资助丛书. 第6辑)

ISBN 978-7-5111-1053-4

I. ①胡… II. ①马…②尹…③夏… III. ①胡杨—
盐胁迫—基因表达 IV. ①S792.119

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2012) 第 138528 号

出 版 人 王新程
责任编辑 周 煜
责任校对 扣志红
封面设计 玄石至上

出版发行 中国环境出版社
(100062 北京市东城区广渠门内大街 16 号)
网 址: <http://www.cesp.com.cn>
电子邮箱: bjgl@cesp.com.cn
联系电话: 010-67112765 (编辑管理部)
010-67174097 (图书出版中心)
发行热线: 010-67125803, 010-67113405 (传真)

印 刷 北京中科印刷有限公司
经 销 各地新华书店
版 次 2013 年 7 月第 1 版
印 次 2013 年 7 月第 1 次印刷
开 本 850×1168 1/32
印 张 6.625
字 数 180 千字
定 价 25.00 元

【版权所有。未经许可, 请勿翻印、转载, 违者必究。】
如有缺页、破损、倒装等印装质量问题, 请寄回本社更换

北京林业大学优秀博士论文基金资助丛书

编辑委员会

主 任：尹伟伦

副主任：马履一

委 员（按姓氏笔画）：

刘俊昌 余新晓 吴 斌 张启翔 李凤兰

李俊清 俞国胜 赵广杰 骆有庆 贾黎明

续九如 蒋湘宁 翟明普

秘 书：王兰珍

序 言

科学技术水平是知识经济时代评价一个国家国力的重要标准。科技水平高则国力强盛，无论在政治、经济、文化、信息、军事诸方面均会占据优势；而科技水平低则国力弱，就赶不上时代的步伐，就会在竞争日趋激烈的国际大舞台上处于劣势。江泽民同志在庆祝北大建校 100 周年大会上也强调指出：“当今世界，科学技术突飞猛进，知识经济已见端倪，国力竞争日益激烈。”因此，提高科学技术水平，提高科技创新能力已为世界各国寻求高速发展时所共识。我国将“科教兴国”作为国策也表明了政府对于提高科技水平的决心。博士研究生朝气蓬勃，正处于创新思维能力最为活跃的黄金年龄，同时也是我国许多重要科研项目中的中坚力量，他们科研成果水平的高低在一定程度上影响着所高校、一个科研院所乃至我国科研的整体水平。国务院学位委员会每年一度的“全国百篇优秀博士论文”评选工作是对我国博士研究生科研水平的集体检阅，已被看做是博士研究生的最高荣誉，对激励博士勇攀科技高峰起到了重要的促进作用。北京林业大学不仅积极参加“全国百篇优秀博士论文”的推荐工作，还以此为契机每年评选出三篇校级优秀博士论文并设立专项基金全额资助论文以丛书形式出版，这是一项非常有意义的工作，对推动学校科研水平的提高将发挥重要作用。

从人才培养的角度来看，如何提高博士研究生的创新思维能力和综合素质，高质量地向社会输送人才备受世人关注。提高培养质量的措施很多，但在培养中引入激励机制，评选优秀博士论文并资助出版，不失为一种好方法。博士生和导师可据此证明自

己的学术能力，确立自己的学术地位；也可激励新入学的研究生尽早树立目标，从而在培养的全过程严格要求自己，提高自身的素质。

因学科的特殊性，要想出色完成林业大学的博士论文有许多其他学科所不会遇到的困难，如研究周期长、野外条件难以严格控制、工作条件艰苦等。非常欣慰的是北京林业大学的博士生们不仅克服困难完成了学业，而且已经有人中选“全国百篇优秀博士论文”。而该丛书资助出版的“校级优秀博士论文”所涉及的研究领域、研究成果的水平也属博士论文中的佼佼者，令我欣喜。对这些博士生所取得的成果我表示祝贺，同时也希望他们以及今后的同学们再接再厉，取得更好的成绩报效祖国。

中国工程院副院长、院士

沈国舫

2002年8月10日

摘 要

非生物胁迫因子(如高盐、干旱、极端气温、涝害等)是造成世界范围内作物减产,森林退化的主要因素。近年来通过对模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的研究,发现植物通过多种途径感应非生物逆境胁迫,并通过信号传导,能量代谢等生理生化途径来适应和抵抗逆境胁迫,在此生物过程中有大量的基因及其产物的参与。胡杨(*Populus euphratica* Oliv)系杨柳科杨属中最古老、最原始的一个树种,具有极强的耐旱,抗盐性,在生态建设中具有极其重要的作用。通过对其抗逆机制的研究、优良性状及其相关基因的发掘,采用常规育种与分子育种相结合的方法,将其优良抗性基因用于作物与林木的遗传改良,从而培育出具有更强抗性的植物,以减少逆境所造成的损失以及改善不断恶化的生态环境。本研究首次使用 cDNA-AFLP 技术研究胡杨盐胁迫诱导相关基因的表达,将所得基因进行功能分类,对胡杨抗盐机制进行初步探讨,并在 cDNA-AFLP 分析的基础上选取了 *PeSCL7* 基因做了进一步的功能分析。取得的主要研究结果如下:

(1) 建立适用于胡杨抗逆研究的 cDNA-AFLP 反应体系,对影响反应体系的关键因素(RNA 提取、内切酶组合、预扩增体系、选择性扩增体系)进行了探索和优化。结果表明,通过改进后的 2×CTAB 法能成功获得高质量的 RNA; *EcoR* I/*Mse* I 的内切酶组合在 4.5h 内可将 ds-cDNA 酶切完全,与相应接头连接过夜后产物直接用于预扩增;稀释 10 倍的预扩增产物作为模板用于选择性扩增,筛选出 42 对可以获得带型丰富且重复性好的引物组合。胡杨 cDNA-AFLP 反应体系的建立为胡杨抗逆基因的深入研究奠定

了基础。

(2) 运用 cDNA-AFLP 技术对 300 mmol/L NaCl 处理 24h 内的与正常浇水的胡杨幼苗进行差异显示分析, 共获得 342 个差异表达基因, 有 74 个基因在杨树基因组中找到高度同源序列。其中, 调控类基因 12 个, 占 16%; 功能类基因 47 个, 占 64%; 功能未知基因 15 个, 占 20%。胡杨在逆境胁迫下, 多种基因迅速协同表达, 形成复杂的逆境响应体系, 是胡杨抗逆性高的原因所在。

(3) 在 cDNA-AFLP 分析的基础上选取 *SCL7* 基因片段序列为信息探针, 运用生物信息学手段从杨树基因组数据库中检索到 96 个候选 GRAS/SCL 基因。根据拟南芥 GRAS/SCL 蛋白进化发育树分类法, 将毛果杨中 GRAS/SCL 家族分为 9 个分支, 为进一步研究杨属植物中 GRAS/SCL 基因功能奠定基础。

(4) 根据毛果杨中 *SCL7* 基因及其启动子序列, 利用 PCR 技术, 从胡杨中克隆编码 *SCL7* 的同源基因及其启动子, 命名为 *PeSCL7* 和 *PeSCL7*-promoter。在进化树分支中属于 *SCL4/7* 组成员。

(5) 半定量 RT-PCR 和荧光定量 PCR 结果显示, *PeSCL7* 的表达受到多种逆境胁迫的诱导; 对器官表达特异性分析, 发现 *PeSCL7* 在胡杨的根、茎、叶中均有表达; 同时对 *PeSCL7*-promoter-GUS 的转基因植株进行 GUS 活性检测, 也发现其在根、茎、叶中均有表达且转基因植株受到胁迫时 GUS 活性明显增强, 进一步验证了 *PeSCL7* 响应逆境胁迫的诱导。对 *PeSCL7*-GFP 融合蛋白进行亚细胞定位分析, 发现 *PeSCL7* 定位于细胞核内。

(6) 为了进一步探索胡杨 *PeSCL7* 基因与逆境应答的关系, 我们分别以 *atscl7* 突变体和野生型拟南芥为背景, 对 *PeSCL7* 进行了超表达。选择 T_3 代植株进行逆境胁迫处理, 通过测定转基因拟南芥与野生型和突变体的相对萌发率、叶片保水力、根长等变化得出结论: 转基因植株在胁迫条件下受到的生长抑制较小, 体内的 α -淀粉酶和超氧化物歧化酶 (SOD) 活性较高, 说明 *PeSCL7* 的表达能够增强植物抵抗逆境胁迫的能力。通过对转基因植株在

土壤干旱条件下生长状况的深入研究,发现转基因植株的存活率要远高于野生型和突变体植株,进一步说明 *PeSCL7* 基因在提高植株抗逆性方面具有重要作用。

本研究构建了胡杨在盐胁迫下的基因表达谱,从转录组水平上识别了一批受盐胁迫诱导或抑制、与植物耐盐相关的基因,其中发现 15 条 (20%) 未见报道的新基因。并且以此为基础首次揭示了 GRAS/SCL 家族在林木抗逆方面的作用,为进一步研究胡杨耐盐机制,开展杨树及木本植物转基因研究奠定了基础。

关键词: 胡杨, cDNA-AFLP, 逆境胁迫, GRAS/SCL

Expression profile of *Populus euphratica* under salt stress and functional analysis of *PeSCL7*

ABSTRACT

Abiotic stress, such as high salinity, drought, extreme temperature, and flooding is a major cause of crop loss and forest degradation worldwide. Recent studies on model plant *Arabidopsis thaliana* have revealed that plants respond to these stresses at the molecular, cellular, physiological, and biochemical level, enabling them to survive. Various adverse environmental stresses induce the expression of a variety of genes and the products of these genes are thought to promote stress tolerance. *Populus euphratica* Oliv., the oldest species of poplar, is an important species for large-scale forestation projects on saline desert in China with the characteristics of drought-tolerance and salt-resistance. To reduce the influence of abiotic stress and improve the ecological environment, it is a good way to cultivate more stress-resistance plants by studying the special mechanism of *P. euphratica* in stress resistance, exploring its valuable genes and then using modern breeding methods to transfer interested gene into plants to improve the properties of plants directly. This is the first article to study the early salt-responsive genes of *P. euphratica* by cDNA-AFLP technology; to functional classify the TDFs (Transcript Derived Fragments); to discuss the salt resistance mechanism of *P. euphratica*; in further, to analysis the function of *PeSCL7* based on the result of cDNA-AFLP analysis. The major results were summarized as follows:

(1) The cDNA Amplified Fragment Length Polymorphism (cDNA-AFLP) system for *Populus euphratica* was established after optimizing several key factors, which may affect cDNA-AFLP analysis. The result indicated that optimized 2×CTAB method could be suit for extracting ideal RNA from *P. euphratica*; the ds-cDNA could be digested completely by the combination of *EcoR* I/*Mse* I for 4.5h; the reducible result can be obtained when the preamplification products were diluted to 10 times for selective-amplification template; we have testified all primer combinations and identified 42 pairs for *P. euphratica* cDNA-AFLP analysis. This research could be a good reference for further studying the stress-response genes in *Populus euphratica*.

(2) The cDNA-AFLP approach was used to identify genes differently expressed in *P. euphratica* leaves under salt stress. Forty two pairs of primers were used to screening for cDNA-AFLP analysis. 342 TDFs were selected for differential expression under salt stress. Among 342 isolated ESTs, we identified 74 that belonged to groups of genes involved in signal transduction and cellular biogenesis, cell division, metabolism, and protein synthesis. At different stages of salt stress, the expression patterns of seven such genes were analyzed through QRT-PCR. Their direct and indirect relationships with the salt tolerance mechanism are discussed.

(3) Based on the results of cDNA-AFLP analysis, The TDF SCL7 was chosen as the direct query for further study. Using the bioinformatics tools, we identified 96 candidate members of GRAS/SCL from *Populus* genome database. To examine the gene family relationships of Arabidopsis and poplar, a phylogenetic tree was constructed from alignment of the amino acid sequences. Phylogenetic analysis put the representatives of them into 9

subgroups. The work will provide an important foundation for further studying the function of GRAS/SCL.

(4) To isolate the sequences of the promoter and CDS in SCL7 from *Populus euphratica*, PCR strategy was performed with the specific primers, which is designed by the SCL7 sequences in *Populus trichocarpa*. We named them as *PeSCL7* and *PeSCL7*-promoter, which are distributed in the SCL4/7 subgroup in the evolution.

(5) The results of Semi-quantitative RT-PCR and real-time PCR showed that *PeSCL7* was induced by a variety of environmental stress; *PeSCL7* was detected in leaves, stems and roots in *Populus euphratica* via the analysis on the organ specificity of *PeSCL7* expression. GUS activity was also assayed in *PeSCL7*-promoter-GUS transgenic plants, which showed that GUS expressed in leaves, stems and roots and GUS activity was significantly enhanced under stress conditions, further validated that *PeSCL7* was responsive to stress. Investigation of *PeSCL7*-GFP fusion protein subcellular localization showed that *PeSCL7* localized in the nucleus.

(6) To further explore the relationship between *PeSCL7* genes and stress response, we choose Arabidopsis *atscl7* mutants and wild-type as background, performing overexpression of the *PeSCL7*. T₃ generation of transgenic plants was treated with stress, we had conclusions by measuring the changes of the relative germination rate, water holding capacity of leaf, root length changes in mutant, wild-type and transgenic Arabidopsis: the growth of the transgenic plants were less inhibited under stress, the activity of α -amylase and superoxide dismutase (SOD) was higher in transgenic plants, indicated *PeSCL7* expression could enhance stress resistance of plant. Moreover, the research on the growth of transgenic plants under drought conditions showed that the survival rate of transgenic plants

was far higher than the mutant and wild type plants, further suggested the important role of *PeSCL7* in improving plant resistance.

In this study, we constructed the gene expression profiles under salt stress in *Populus euphratica*, identifying a number of genes induced or inhibited by salt stress and salt tolerance-related genes on the transcriptome level, of which 15 (20%) are new genes, which never were reported. Based on our study, we revealed the stress resistance role of the GRAS/SCL family in the forest for the first time, and laid the foundation for further studying salt-tolerant mechanism of *P. euphratica* and developing populus and woody transgenic plants.

Key words: *Populus euphratica*, cDNA-AFLP, abiotic stress, GRAS/SCL

目 录

1 引言	1
1.1 植物抗逆相关基因研究进展	1
1.2 胡杨抗逆性研究现状	23
1.3 cDNA-AFLP 技术应用现状	24
1.4 研究意义与必要性	29
1.5 研究思路与技术路线	29
2 材料方法	32
2.1 材料	32
2.2 方法	34
3 胡杨 cDNA-AFLP 体系的建立	47
3.1 材料与方法	48
3.2 结果与分析	49
3.3 讨论	56
4 胡杨盐胁迫诱导相关基因的表达与功能分析	59
4.1 材料与方法	60

4.2	结果与分析	62
4.3	讨论	77
4.4	结论	80
5	毛果杨 GRAS/SCL 基因的电子克隆	82
5.1	材料和方法	83
5.2	结果与分析	84
6	胡杨 SCL7 基因及其启动子的克隆与分析	92
6.1	材料与方法	93
6.2	结果与分析	99
6.3	讨论	106
7	<i>PeSCL7</i> 的表达特征分析及亚细胞定位分析	107
7.1	材料与方法	107
7.2	结果与分析	114
7.3	讨论	120
8	T-DNA 插入缺失突变体的鉴定	124
8.1	材料与方法	124
8.2	结果与分析	125
8.3	讨论	126

9 在 <i>atscl7</i> 突变体和野生型拟南芥中超表达 <i>PeSCL7</i> 的转基因植株表型分析	128
9.1 材料与方法	128
9.2 结果与分析	132
9.3 讨论	137
10 结论与展望	140
10.1 结论	140
10.2 正在进行的工作	142
10.3 研究前景	142
参考文献	144
附录 1 缩略词表	173
附录 2 本研究所克隆胡杨序列.....	175
致 谢	190

1 引言

1.1 植物抗逆相关基因研究进展

逆境是指对植物生存与生长发育不利,使植物产生伤害的各种环境因素的总称,根据环境的种类分为寒害、干旱、涝害、盐害等。在逆境条件下,植物体会发生一系列生理变化:如原生质膜结构遭到破坏、主动运输能力下降、透性增大、胞内物质外渗;气孔关闭、酶活性降低、光合作用下降;呼吸作用增强、消耗大量营养物质;糖类和蛋白质大量水解;各细胞器也遭受可逆或不可逆的损伤等。而另一方面,植物在长期的逆境锻炼中也进化形成了多种抵抗机制和复杂的信号网络,使它们能够迅速感知胁迫,主动地调控抗胁迫反应(Wu 等, 2008)。尽管植物因种类不同而对于干旱,低温和高盐等逆境的敏感性有差异,但是可推测出所有的植物都具有对逆境胁迫感知、传导和响应的能力。首先,大多数植物对逆境胁迫都具有一定的耐受能力;其次,在逆境胁迫条件下,不同植物都具有相似的代谢产物积累的过程;最后,植物在受到胁迫时会引起一系列相似基因和蛋白的表达(Kasuga 等, 1999)。随着分子生物学和基因组学的发展,大量与胁迫相关的基因及其调控因子得到了功能鉴定与验证。本部分重点综述当逆境发生时,植物的调控性相关以及功能性相关基因的研究现状。