

矮牵牛 *PhUGT74E2* 基因的克隆 及对逆境胁迫的响应

董丽丽, 王雪娣, 刘同瑞, 高迪, 王琦, 熊枫

(安徽农业大学 园艺学院, 合肥 230036)

摘要:糖基化转移酶(UGTs)能够维持植物体内的激素平衡,广泛参与植物的生长发育及逆境胁迫应答。该研究从矮牵牛(*Petunia hybrida* var. Mitchel diploid)中克隆了 *UGT74E2* 的同源基因 *PhUGT74E2* 及其启动子序列,并分析了序列特征和蛋白结构特点,同时采用 qRT-PCR 对该基因在不同组织、不同逆境胁迫下的转录水平进行了检测,以探讨矮牵牛 *UGT74E2* 基因的功能,为揭示其调控矮牵牛抗逆性的分子机制奠定基础。结果显示:(1)成功克隆获得矮牵牛 *UGT74E2* 基因全长序列,命名为 *PhUGT74E2*。(2) *PhUGT74E2* 基因 cDNA 全长 1 986 bp,包含一个 1 347 bp 开放阅读框,编码 448 个氨基酸;其蛋白分子式为 $C_{2278}H_{3544}N_{586}O_{676}S_{18}$, 分子量为 50.53 kDa, 等电点为 5.18; *PhUGT74E2* 无信号肽和跨膜域,主要定位于叶绿体;同时克隆了 *PhUGT74E2* 基因上游 2 083 bp 启动子序列,该序列中含有脱落酸、赤霉素、光及逆境等响应元件。(3)系统进化树分析显示, *PhUGT74E2* 与其他物种 *UGT74E2* 起源相同,而与烟草 *NtUGT74E2* 的亲缘关系最近。(4)荧光定量 PCR 分析表明, *PhUGT74E2* 基因在叶片、茎、根、叶腋和顶端 5 个组织中均有表达,其中叶腋中的表达量最高,而茎和根中的表达量最低;PEG6000 模拟干旱处理及 NaCl 处理均引起了 *PhUGT74E2* 表达水平的显著上调,且随着时间的延长表达水平相应增加,说明 *PhUGT74E2* 能够参与矮牵牛对干旱及盐胁迫的响应。

关键词:矮牵牛; *UGT74E2*; 启动子; 干旱胁迫; 盐胁迫; 表达分析

中图分类号: Q785; Q786 文献标志码: A

Cloning of Glycosyltransferase *PhUGT74E2* Gene from *Petunia* and Its Response to Stress

DONG Lili, WANG Xuedi, LIU Tongrui, GAO Di, WANG Qi, XIONG Feng

(School of Horticulture, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract: Glycosyltransferase can maintain the hormone balance in plants and widely participate in plant growth and development and stress response. *PhUGT74E2*, the homologous gene of *UGT74E2* and its promoter sequence were cloned from petunia (*Petunia hybrida* var. Mitchel diploid). The sequence characteristics and protein structure characteristics were analyzed, to study the function of petunia *UGT74E2*, and laid a theoretical foundation for further research on the function of *PhUGT74E2* and its molecular mechanism regulating the stress tolerance of petunia. The results showed: (1) the homologous gene of *UGT74E2* was cloned from petunia (*Petunia hybrida* var. Mitchel diploid), named *PhUGT74E2*. (2) The full length of *PhUGT74E2* was 1 986 bp, encoding 448 amino acids. The molecular formula of the protein was speculated to be $C_{2278}H_{3544}N_{586}O_{676}S_{18}$. The molecular weight was 50.53 kD and the isoelectric point was 5.18. No signal peptide and transmembrane domain were found in *PhUGT74E2*, and the protein was mainly located in chloroplast. The promoter sequence of 2 083 bp upstream of *PhUGT74E2* gene was also

收稿日期: 2019-07-29; 修改稿收到日期: 2019-10-12

基金项目: 安徽省自然科学研究面上项目(1808085MC85); 国家自然科学基金(31902042)

作者简介: 董丽丽(1982-), 女, 博士, 讲师, 主要从事园艺植物种质资源与生物技术。E-mail: dongli0608@163.com

cloned. The sequence contains abscisic acid, gibberellin, light and stress response elements. (3) Phylogenetic tree analysis showed that *PhUGT74E2* had the same origin as other species, but was most closely related to tobacco *NtUGT74E2*. (4) Fluorescence quantitative PCR analysis showed that *PhUGT74E2* gene was expressed in leaves, stems, roots, axil and apical. The expression level of *PhUGT74E2* in axil was the highest, while the lowest in stems and roots. Both PEG6000 and NaCl treatments caused significant upregulation of *PhUGT74E2* expression, and the expression level increased with time. The result indicated that *PhUGT74E2* was involved in drought and salt stress response of petunia.

Key words: *Petunia hybrida*; *UGT74E2*; promoter; drought stress; salt stress; expression analysis

干旱及盐胁迫是限制植物生长发育及应用范围的主要环境因子。随着全球淡水资源的减少以及土壤盐渍化的加重,抗旱及抗盐植物新品种的培育成为重要的研究方向。盐胁迫作用于植物体能够引起水分亏缺而导致干旱胁迫,故植物对干旱和盐胁迫的响应密切相关,其分子机理存在相互重叠^[1]。

糖基化是多种防御化合物合成的关键步骤之一,而糖基转移酶通常被称为尿苷二磷酸-糖基转移酶(UDP-glycosyltransferases, UGTs),是专门负责催化分子糖基化修饰反应的酶类^[2]。拟南芥、油菜、桃、苹果中分别存在 107、147、168、254 个 UGT 基因^[3]。因此,UGT 是植物界中最大的基因家族之一。UGT 蛋白具有较强的底物特异性,目前多个生长素糖基化转移酶被鉴定,包括以 IAA 为底物的 UGT84B1、UGT84B2、UGT75B1 和 UGT75B2^[4],以及以 IBA 为底物的 UGT74E2 和 UGT74D1^[5-6]。UGT74E2 属于拟南芥糖基化转移酶基因家族 L (Family-L)成员,编码 453 个氨基酸^[7]。UGT74E2 的过量表达导致转基因植株的分枝数目及干旱、盐胁迫耐性增加,说明 UGT74E2 参与植物的形态建成及抗旱及抗盐过程,进一步研究发现 IBA 能够独立于 ABA 参与植物的水胁迫响应,表明植物体内存在一条通过调节 IBA 的动态平衡以保护自己免受旱害的干旱胁迫响应新路径^[5]。而 UGT74E2 的研究主要集中于拟南芥,在其他植物中尚未见报道。

本研究从矮牵牛中克隆并分析了 UGT74E2 的同源基因 *PhUGT74E2* 及其启动子序列,采用 qRT-PCR 对该基因在不同组织、不同逆境胁迫下的转录水平进行了检测,为进一步揭示其调控矮牵牛抗旱抗盐的分子机制奠定基础,也为培育抗逆性强的矮牵牛新品种提供了基因资源。

1 材料和方法

1.1 试验材料

本研究以矮牵牛(*Petunia hybrida* var. Mitchell diploid)为材料。材料种植于安徽农业大学矮牵牛

转基因中心组织培养室。培养条件设置为:光周期 16 h/8 h (光/暗),温度(25±2) °C,光照强度 3 500 lx。

1.2 *PhUGT74E2* 基因的克隆

以矮牵牛叶片为材料,使用天根多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒提取 RNA。选取吸光度比值 $OD_{260}/OD_{280} > 1.70$ 且无降解的 RNA 作为模板,使用 TransScript One-Step gDNA Removal 反转录试剂盒(TaKaRa)去除基因组并合成 cDNA。根据已经公布的矮牵牛基因组序列(<https://solgenomics.net/>),设计上游引物 F(ATGGAAGAAAAC-TTAACCCGCAAAA),下游引物 R(TTACAA-GTCTGAAAGAAATCTTGG)。使用高保真酶对全长序列进行扩增,并将胶回收产物送由通用生物系统(安徽)有限公司进行测序。

1.3 基因表达分析

分别取 30 d 龄矮牵牛的根、茎、叶、叶腋、顶端等部位,使用天根 DP441 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒提取 RNA,反转录后用于检测不同组织中 *PhUT74E2* 的表达量。

将 30 d 龄矮牵牛分别置于含有 10% PEG 6000 和 200 mmol/L NaCl 的营养液中,分别于 12 和 24 h 后取叶片提取 RNA。将提取的 RNA 反转录后分别用于检测模拟干旱和盐胁迫下 *PhUT74E2* 的表达水平,以置于营养液中的矮牵牛作为对照。

以上每个处理 15 棵苗,共进行 3 次生物学重复。反转录及荧光定量 PCR 参照董丽丽等的方法^[8];荧光定量 PCR 引物为 UGT74E2-RT-F(GCAGTTG-GCTCAGTTGTCTATG)和 UGT74E2-RT-R(GCGT-TA-CTCCTTTCTCTTCCTC)。GAPDH-F(CAAG-GCTGGAATTGCTTTGAG)和 GAPDH-R(CACCAC-TTACTCCACTGATGCA)作为内参基因引物。

1.4 序列分析、系统进化树的构建及数据分析

利用 DNAMAN 6.0 软件进行蛋白序列比对,使用 Plant CARE 对启动子序列的作用元件进行分析。利用 ExPASy ProtParam tool 在线工具对蛋白质分子量、等电点、分子式等理化性质进行分析。分

别使用 WOLF PSORT、TMHMM 和 signalP 对蛋白的亚细胞定位、跨膜区及信号肽进行预测。使用 SOPMA 和 Phyre 2 对蛋白的二级结构和三级结构进行预测。系统进化树的构建及数据分析均参考 Dong 等的方法^[9]。

2 结果与分析

2.1 矮牵牛 *PhUGT74E2* 基因及启动子的克隆与序列分析

根据矮牵牛已经公布的基因组序列,设计上下游引物,使用 kod 高保真酶进行 PCR 扩增,克隆获得矮牵牛 *UGT74E2* 基因全长序列,命名为 *PhUGT74E2*(图 1)。该基因长度为 1 986 bp,包含一个 1 347 bp 开放阅读框,编码 448 个氨基酸。设计 *PhUGT74E2* 启动子引物,扩增获得长度为 2 083 bp 的目的片段。

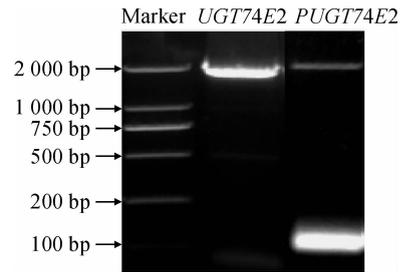
2.2 *PhUGT74E2* 基因及其蛋白的生物信息学分析

2.2.1 *PhUGT74E2* 基因结构及启动子元件分析

对 *PhUGT74E2* 基因进行结构分析,结果显示 *PhUGT74E2* 包含 2 个外显子和 1 个内含子。根据

Plantcare 软件分析,矮牵牛 *UGT74E2* 基因启动子中含有多个典型的 TATA-box 和 CAAT-box 元件,光响应元件以及参与光响应的顺式作用元件,脱落酸、赤霉素以及逆境响应元件,WRKY 转录因子、MYB 及 MYC 结合位点(表 1)。

2.2.2 *PhUGT74E2* 蛋白的理化性质分析
PhUGT74E2 蛋白分子量为 50.53 kD,等电点为 5.18。推测其蛋白分子式为 $C_{2278}H_{3544}N_{586}O_{676}S_{18}$,



PUGT74E2 表示 *PhUGT74E2* 的启动子序列

图 1 *PhUGT74E2* 基因及启动子扩增结果

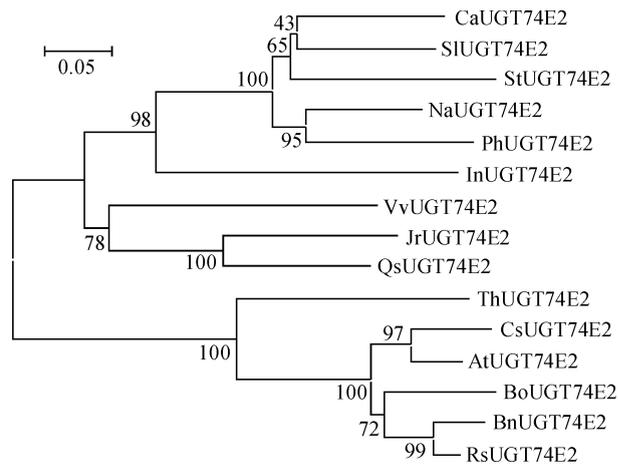
PUGT74E2 represents the promoter of *PhUGT74E2*

Fig.1 Amplification results of *PhUGT74E2* and promoter

表 1 *PhUGT74E2* 所含顺式作用元件生物信息学分析

Table 1 Biological analysis of *cis*-acting elements of *PhUGT74E2*

调控元件 Regulatory element	序列 Sequence	数量 Number	生物学功能 Biological function
3-AF1 binding site	TAAGAGAGGAA	1	光响应元件 Light responsive element
A-box	CCGTCC	1	顺式调控元件 <i>cis</i> -acting regulatory element
ABRE	ACGTG	1	脱落酸响应元件 <i>cis</i> -acting element involved in the abscisic acid responsiveness
ARE	AAACCA	3	厌氧诱导必需的顺式作用调控元件 <i>cis</i> -acting regulatory element essential for the anaerobic induction
Box 4	ATTAAT	1	参与光响应的保守 DNA 模块的一部分 Part of a conserved DNA module involved in light responsiveness
CAAT-box	CAAAT/CAAT	5	启动子区和增强子区的共同顺式作用元件 Common <i>cis</i> -acting element in promoter and enhancer regions
G-box	CACGTC	1	参与光响应的顺式作用元件 <i>cis</i> -acting regulatory element involved in light responsiveness
GARE-motif	TCTGTTG	1	赤霉素响应元件 Gibberellin-responsive element
HD-Zip 3	GTAAT(G/C)ATTAC	1	蛋白质结合位点 Protein binding site
TATA-box	TATATA	13	-30 区的核心启动元件 Core promoter element around -30 of transcription start
W-box	TTGACC	5	WRKY 转录因子结合位点 Binding site of WRKY transcription factor
ACE	CTAACGTATT	1	光响应顺式作用元件 <i>cis</i> -acting element involved in light responsiveness
CARE	CAACTCAC	1	假定 Myb 结合位点 Putative Myb-binding sites
GT1-motif	GGTTAA	1	光响应元件 Light responsive element
MYB	CAACCA(AG)	5	MYB 结合位点 MYB-binding site
MYC	TCTCTTA/CATTTG/CAATTG	4	MYC 结合位点 MYC-binding site
STRE	AGGGG	2	逆境响应元件 Stress response element
TCT-motif	TCTTAC	1	部分光响应元件 Part of a light responsive element



CaUGT74E2. 辣椒(XP_016552092.1); SIUGT74E2. 番茄(XP_004253028.2); StUGT74E2. 马铃薯(XP_006342417.1); NaUGT74E2. 烟草(XP_019232967.1); InUGT74E2. 牵牛(XP_019195931.1); VvUGT74E2. 葡萄(XP_019075279.1); JrUGT74E2. 核桃(XP_018851345.1); QsUGT74E2. 栓皮栎(XP_023887464.1); ThUGT74E2. 醉蝶花(XP_010522243.1); CsUGT74E2. 芥蓝(XP_010475277.1); AtUGT74E2. 拟南芥(NP_172059.1); BoUGT74E2. 甘蓝(XP_013586746.1); BnUGT74E2. 油菜(XP_022564055.1); RsUGT74E2. 萝卜(XP_018447261.1)

图4 不同物种间 UGT74E2 蛋白的进化树分析

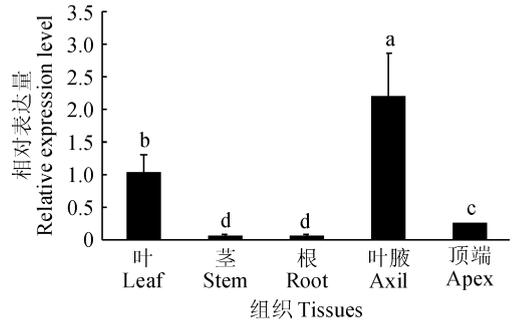
CaUGT74E2. *Capiscum annuum* (XP_016552092.1); SIUGT74E2. *Solanum lycopersicum* (XP_004253028.2); StUGT74E2. *Solanum tuberosum* (XP_006342417.1); NaUGT74E2. *Nicotiana attenuata* (XP_019232967.1); InUGT74E2. *Ipomoea nil* (XP_019195931.1); VvUGT74E2. *Vitis vini fera* (XP_019075279.1); JrUGT74E2. *Juglans regia* (XP_018851345.1); QsUGT74E2. *Quercus suber* (XP_023887464.1); ThUGT74E2. *Tarenaya hassleriana* (XP_010522243.1); CsUGT74E2. *Camelina sativa* (XP_010475277.1); AtUGT74E2. *Arabidopsis thaliana* (NP_172059.1); BoUGT74E2. *Brassica oleracea* (XP_013586746.1); BnUGT74E2. *Brassica napus* (XP_022564055.1); RsUGT74E2. *Raphanus sativus* (XP_018447261.1)

Fig. 4 Phylogenetic tree analysis of UGT74E2 protein among different species

3 讨论

随着高通量测序技术的发展,越来越多的 UGT 基因被发现。拟南芥中 UGT 基因共分为 17 类(A~Q)^[7,10-11],能够糖基化生长素 (AtUGT84B1)^[12]、细胞分裂素 (AtUGT85A1、AtUGT73C1)^[12]、油菜素内酯 (AtUGT73C5)^[13]、脱落酸 (AtUGT71B1)^[14] 以及赤霉素^[15]等。生长素除了影响植物的多个生长发育过程外,还能够参与植物的干旱及盐胁迫响应^[16]。

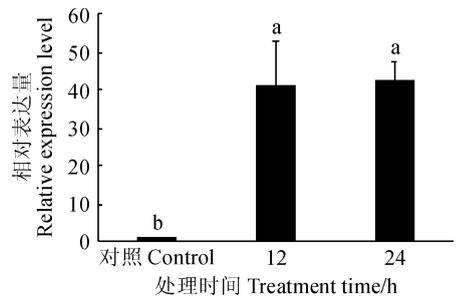
本研究利用 RT-PCR 方法从矮牵牛中克隆了生长素糖基化转移酶基因 *UGT74E2* 的全长序列,并命名为 *PhUGT74E2*。*PhUGT74E2* 蛋白含有 PSPG box 结构域,该保守序列被认为是糖基供体的结合



不同小写字母表示不同组织间在 0.05 水平存在显著性差异 ($P < 0.05$)

图5 矮牵牛不同组织中 *PhUGT74E2* 的表达水平
The different normal letters indicated the significant differences of expression level among different tissues at 0.05 level ($P < 0.05$)

Fig. 5 Expression level of *PhUGT74E2* in different tissues of petunia



不同小写字母表示不同处理时间下表达水平在 0.05 水平存在显著性差异 ($P < 0.05$);下同

图6 PEG 6000 模拟干旱胁迫条件下矮牵牛叶片 *PhUGT74E2* 基因表达水平

The different normal letters indicated the significant differences of expression level among different treatment time at 0.05 level ($P < 0.05$); The same as below

Fig. 6 The expression level of *PhUGT74E2* in leaves of petunia with PEG 6000 treatment at different time points

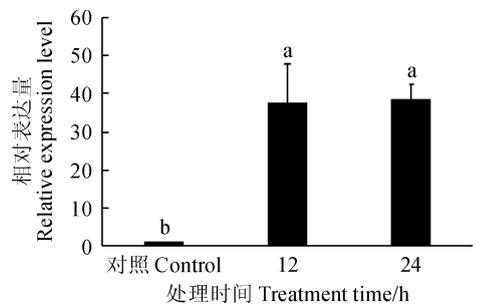


图7 NaCl 处理下矮牵牛叶片 *PhUGT74E2* 基因表达水平

Fig. 7 Expression of *PhUGT74E2* in leaves of petunia under NaCl treatment

和识别位点^[10]。*PhUGT74E2* 与同为茄科的烟草 NtUGT74E2 亲缘关系最近,序列相似性为 78.70%,说明它的确是 *UGT74E2* 的同源基因。启动子序列分析显示,存在赤霉素、脱落酸、逆境等响应元件,说

明 *PhUGT74E2* 能够参与激素及抗逆响应。序列中含有多个光响应元件,推测 *PhUGT74E2* 参与矮牵牛的光响应过程。此外,启动子序列中存在 WRKY 转录因子以及 MYB、MYC 结合位点,推测 *PhUGT74E2* 能够与 WRKY、MYB、MYC 家族基因相互作用,以调控植物的生长发育及逆境响应。

组织特异性表达分析显示, *PhUGT74E2* 在矮牵牛不同组织中的表达水平由高到低依次为叶腋>叶片>顶端>茎>根,且茎与根中的表达水平相近。这与拟南芥中 *AtUGT74E2* 根>叶片>茎的表达特性不同^[17],说明不同物种中的 *UGT74E2* 表达特性存在差异。 *PhUGT74E2* 在叶腋中的表达量较高,推测该基因可能通过维持叶腋部位的生长素动态平衡以参与植物的分枝发育。

在干旱模拟胁迫处理下,矮牵牛 *PhUGT74E2* 转录水平急剧上升,12 h 时达到对照的 40 倍,24 h 时仍然保持较高表达水平。同样,NaCl 胁迫处理 12~24 h 后,矮牵牛 *PhUGT74E2* 的转录水平上调约 37 倍,说明 *PhUGT74E2* 参与了矮牵牛的抗旱及抗盐响应过程,推测 *PhUGT74E2* 通过糖基化修饰 IBA,调节矮牵牛体内 IBA 的动态平衡,使其避免干旱及盐胁迫损伤。

综合以上研究结果, *PhUGT74E2* 在矮牵牛的抗旱及抗盐中具有重要作用,但具体的分子作用机制需要进一步探究。该研究为了解生长素参与逆境胁迫提供了实验依据,并为揭示 *PhUGT74E2* 的功能及调控机理奠定了理论基础,同时对于培育抗盐、抗旱性强的矮牵牛新品种提供了潜在功能基因。

参考文献:

- [1] 徐 猛,马巧荣,张继涛,等. 盐胁迫下不同基因型冬小麦渗透及离子的毒害效应[J]. 生态学报,2011,31(3): 784-792.
XU M, MA Q R, ZHANG J T, et al. Osmotic and ionic stress effects of high NaCl concentration on seedlings of four wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2011,31(3): 784-792.
- [2] 袁红梅,郭文栋,赵丽娟,等. 亚麻糖基转移酶基因 *LuUGT72E1* 的克隆与表达分析[J]. 作物杂志, 2016,32(4): 62-67.
YUAN H M, GUO W D, ZHAO L J, et al. Cloning and expression analysis of the glycosyltransferase gene *LuUGT72E1* in flax[J]. *Crops*, 2016,32(4): 62-67.
- [3] REHMAN H M, NAWAZ M A, SHAH Z H, et al. Comparative genomic and transcriptomic analyses of Family-1 UDP glycosyltransferase in three *Brassica* species and *Arabidopsis* indicates stress-responsive regulation[J]. *Scientific Reports*, 2018,8(1): 1 875.
- [4] OSTROWSKI M, JAKUBOWSKA A. UDP-glycosyltransferases of plant hormones[J]. *Advances in Cell Biology*, 2014,4(1): 43-60.
- [5] TOGNETTI V B, VAN AKEN O, MORREEL K, et al. Perturbation of indole-3-butyric acid homeostasis by the UDP-glycosyltransferase *UGT74E2* modulates *Arabidopsis* architecture and water stress tolerance[J]. *The Plant Cell*, 2010,22(8): 2 660-2 679.
- [6] JIN S H, MA X M, et al. UGT74D1 is a novel auxin glycosyltransferase from *Arabidopsis thaliana* [J]. *PLoS One*, 2013,8(4): e61705.
- [7] ROSS J, LI Y, LIM E, et al. Higher plant glycosyltransferases[J]. *Genome Biology*, 2001,2(2): 1-6.
- [8] 董丽丽,龚凌燕,陈 磊,等. 石榴肉桂酰辅酶 A 还原酶基因的克隆与表达分析[J]. 南京农业大学学报, 2016,39(5): 747-753.
DONG L L, GONG L Y, CHEN L, et al. Cloning and expression analysis of *PgCCR* from pomegranate[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2016,39(5): 747-753.
- [9] DONG L, ISHAK A, YU J, et al. Identification and functional analysis of three *MAX2* orthologs in chrysanthemum[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2013,55(5): 434-442.
- [10] SONG Z H, NIU L L, YANG Q, et al. Genome-wide identification and characterization of UGT family in pigeonpea (*Cajanus cajan*) and expression analysis in abiotic stress[J]. *Trees*, 2019,33(4): 987-1 002.
- [11] LI Y, BALDAUF S, et al. Phylogenetic analysis of the UDP-glycosyltransferase multigene family of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000,276(6): 4 338-4 343.
- [12] JACKSON R G, LIM E K, LI Y, et al. Identification and biochemical characterization of an *Arabidopsis* indole-3-acetic acid glucosyltransferase[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000,276(6): 4 350-4 356.
- [13] POPPENBERGER B, FUJIOKA S, SOENO K, et al. The UGT73C5 of *Arabidopsis thaliana* glucosylates brassinosteroids[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2005,102(42): 15 253-15 258.
- [14] DONG T, Hwang I. Contribution of ABA UDP-glucosyltransferases in coordination of ABA biosynthesis and catabolism for ABA homeostasis[J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2014,9(7): e28888.
- [15] XU C X, YU Y, ZHANG Y X, et al. Gibberellins are involved in effect of near-null magnetic field on *Arabidopsis* flowering[J]. *Bioelectromagnetics*, 2017,38(1): 1-10.
- [16] VERMA V, RAVINDRAN P, et al. Plant hormone-mediated regulation of stress responses[J]. *BMC Plant Biology*, 2016,16(1): 86.
- [17] PARK H J, KWON C S, WOO J Y, et al. Suppression of UDP-glycosyltransferase-coding *Arabidopsis thaliana* *UGT74E2* gene expression leads to increased resistance to *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 infection[J]. *The Plant Pathology Journal*, 2011,27(2): 170-182.