

异源表达唐菖蒲 *GhOPR3* 提高了拟南芥的抗逆性

连青龙^{1,2}, 辛海波², 李晓昕², 钟雄辉², 尹义蕾¹, 义鸣放^{2,*}

(¹农业部规划设计研究院设施农业研究所, 农业部农业设施结构工程重点实验室, 北京 100125; ²中国农业大学观赏园艺与园林系, 北京 100193)

摘要: 通过 RT-PCR 与 RACE 技术从唐菖蒲 (*Gladiolus hybridus*) 品种 ‘Rose Supreme’ 球茎中克隆茉莉酸生物合成途径中的关键酶——12-氧-植物二烯酸还原酶 (12-oxo-phytodienoic acid reductase, OPR) 基因的 1 489 bp 全长 cDNA 序列, quantitative RT-PCR 结果表明, *GhOPR3* 在唐菖蒲叶、花、根、匍匐茎、新球茎和籽球中都表达, 其中在籽球和匍匐茎中相对表达量较高; 0.1 ~ 0.5 mmol · L⁻¹ 的茉莉酸甲酯 (Methyl jasmonate, MJ) 处理后, 提高了 *GhOPR3* 在球茎中的表达量和内源 MJ 含量; 采用农杆菌介导侵染拟南芥花粉, 进行 *GhOPR3* 基因的过表达分析, 过表达拟南芥株系较野生型提高了耐盐性和抗旱性; 提高了机械损伤后相关基因的表达水平和内源 MJ 含量。

关键词: 唐菖蒲; 茉莉酸; 12-氧-植物二烯酸还原酶; 异源表达; 抗逆性

中图分类号: S 682.2⁺4

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2014) 03-0498-11

Heterologous Expression of *Gladiolus GhOPR3* Enhances the Abiotic Stress Resistance of *Arabidopsis*

LIAN Qing-long^{1,2}, XIN Hai-bo², LI Xiao-xin², ZHONG Xiong-hui², YIN Yi-lei¹, and YI Ming-fang^{2,*}

(¹Institute of Facility Agriculture, Chinese Academy of Agricultural Engineering, Key Laboratory of Farm Building in Structure and Construction, Ministry of Agriculture, Beijing 100125, China; ²Department of Ornamental Horticulture and Landscape Architecture, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract: OPR is a key enzyme in jasmonic acid biosynthesis pathway, a full-length cDNA named *GhOPR3* was cloned in *Gladiolus hybridus* ‘Rose Supreme’ corms by RT-PCR and RACE. The results of quantitative RT-PCR showed that *GhOPR3* gene was expressed in leaf, flower, root, stolon, corm and cormel, and the relatively high expression level of *GhOPR3* was observed in cormel and stolon. Meanwhile, the expression level and the endogenous MJ content in corms steadily increased under MJ treatment with a raising concentration gradients from 0.1 mmol · L⁻¹ to 0.5 mmol · L⁻¹. *GhOPR3* was overexpressed in *Arabidopsis*, which increased the salt tolerance and drought-resistant in *Arabidopsis*. After mechanical damage, the expression level of related resistance genes and the content of endogenous MJ were increased.

Key words: *Gladiolus hybridus*; JA; OPR; heterologous expression; stress resistance

收稿日期: 2013 - 12 - 09; 修回日期: 2014 - 03 - 02

基金项目: 公益性行业 (农业) 科研专项 (200903002); 国家自然科学基金项目 (31171991)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: ymfang@cau.edu.cn)

唐菖蒲 (*Gladiolus hybridus*) 是鸢尾科唐菖蒲属球根花卉, 在目前的实际生产中, 由于受外界逆境的伤害导致唐菖蒲种性退化问题突出, 严重影响了生产切花的品质。茉莉酸类化合物 (jasmonic acids, JAs) 在植物生长过程中的生理发育和防卫系统方面具有重要的作用 (Li et al., 2002; 蒋科技 等, 2010)。茉莉酸是一种创伤诱导的内源信号分子, 当植物受到伤害时体内的 JA 明显增加, 由它通知未受伤部位进入警戒状态以抵御害虫和致病菌的入侵 (Liechti & Faemer, 2002)。而且创伤和其它胁迫等能够诱导 JA 反应的因素也能促使 JA 生物合成途径中相关基因的表达, 并且这些基因转录的激活就发生在 JAs 合成的位置。此外, JAs 还调控与植物生长发育以及防卫系统等相关基因的表达水平, 而此类相关基因功能的研究将会进一步揭示植物茉莉酸类化合物的作用。

JAs 是由脂氧合酶途径, 经过 LOX、AOS、AOC 以及 OPR 等一系列的酶促反应形成的。12-氧-植物二烯酸还原酶 (12-oxo-phytodienoic acid reductase, OPR) 是茉莉酸生物合成途径中的关键酶, 它催化 OPDA 的还原反应 (Strassner et al., 2002), 最终生成茉莉酸类化合物。可通过调控 OPR3 基因的表达水平来控制 JAs 的生物合成, 从而调节植物的许多生理过程。

JAs 通过开启一系列生物合成基因的协调表达从而在转录水平上影响植物次生代谢 (vom Endt et al., 2007)。JAs 调整了与植物发育及植物防御相关基因的表达, 这些基因功能的深入分析将详尽地揭示植物中 JAs 的作用。OPR 与 JA 的生物合成关系密切。在拟南芥中, 除 *OPR3* 外还发现了另外的 *OPR* 基因, 其中有两个基因 (*OPR1* 和 *OPR2*) 的转录也受到伤诱导 (Biesgen & Weiler, 1999)。但这两个基因并不能催化 OPDA 的还原反应 (Schaller et al., 2000)。拟南芥的两个等位基因 *OPR3* 的突变体 *dde1* (delayed dehiscence 1) 和 *opr3* (oxo-phytodienoic acid reductase 3) 均缺失合成 JA 的功能, 在伤诱导下可致使 OPDA 积累。试验表明, *opr3* 突变体还具有对抗虫害的 JA 防御反应 (Stintzi et al., 2001), 并且 *OPR3* 的转录也能被 JA 诱导 (Mussig et al., 2000)。拟南芥 *opr3* / *dde1* 突变体为雄性不育, 在施加 JA 后可以恢复育性表型, 这表明 *OPR3* 对 JA 的合成至关重要。

本研究中克隆了唐菖蒲 *OPR3* 基因的 cDNA 全长序列, 分析了该基因的生物信息学特征, 运用 quantitative RT-PCR 技术研究其表达模式, 并通过在拟南芥中过量表达唐菖蒲的 *GhOPR3* 基因, 研究 *GhOPR3* 基因调控 JAs 的生物合成以及对植物的抗逆性、伤害防御等调控作用, 并为更深入的研究 *GhOPR3* 基因的相关功能与分子机理提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

试验在中国农业大学观赏园艺栽培生理与生物技术实验室中进行, 所用试验材料为唐菖蒲栽培品种 ‘Rose Supreme’。*GhOPR3* 基因的分离是以组培球茎为材料, 实时荧光定量 PCR 表达分析用的叶片、根、新球等材料取自组培试管苗; 花、匍匐茎和籽球等材料于 2009 年 7—8 月在中国农业大学试验田中采得。以野生型拟南芥 Columbia 作为转基因材料, 以 pCAMBIA1301 + 35S 为过表达载体, GV3101 为转基因所用菌株。

1.2 *GhOPR3* 基因 cDNA 全长序列的克隆

唐菖蒲新球和籽球 RNA 的分离采用 MyLab 通用型 RNA 快速提取试剂盒; 叶片、花和根采用百泰克 RNAPure 高纯总 RNA 快速提取试剂盒; 匍匐茎采用北京强欣博瑞生物技术有限公司生产的 EASYspin 植物 RNA 快速提取试剂盒。cDNA 反转录按照 Promega 的 M-MLV Reverse Transcriptase 说明书进行。*OPR3* 5'端 cDNA 的合成按照 TaKaRa 公司的 5'-Full RACE Kit 试剂盒说明书进行。cDNA

合成及 PCR 反应所用引物及反应程序见表 1。

表 1 引物、序列及 PCR 程序
Table 1 Primers, sequence and PCR reaction process in this study

目的 Purpose	反应程序 Reaction process	引物 Primer	引物序列 (5' - 3') Primer sequence	退火温度 Annealing temperature
保守区扩增 Conserved region amplification	一轮 PCR The first round	OPRF1	C(C/T)GA(A/G)GGCAC (C/T) AT(C/G)(A/G)T(C/T)TCTCC	50 °C
	PCR reaction	OPRR1	TGGAT(T/C)TC(A/G)AT(A/C/G)CCATCGAAACC	
	二轮 PCR The second round	OPRF2	TGGCATGT(A/T)GG(A/T)CG(A/T/C)GC(A/T)TCTCA	54 °C
	PCR reaction	OPRR1	TGGAT(T/C)TC(A/G)AT(A/C/G)CCATCGAAACC	
cDNA 3'末端快速扩增 3'RACE	逆转录 Reverse transcription	AP1	CCAGTGAGCAGAGTGACGAGGACTCGAGCTCAAGC (T) ₁₇	
	一轮 PCR The first round	OPRF3	GCGTCTACCAAGTGATACCA	50 °C
	PCR reaction	AP2	CCAGTGAGCAGAGTGACG	
	二轮 PCR The second round	OPRF4	TGGGACCTATGGCAGCTATC	54 °C
	PCR reaction	AP3	GAGGACTCGAGCTCAAGC	
cDNA 5'末端快速扩增 5'RACE	一轮 PCR The first round	外引物 Outer primer	CATGGCTACATGCTGACAGCCTA	52 °C
	PCR reaction	OPRR2	GTTGATCCCGTCTTTGAGGA	
	二轮 PCR The second round	内引物 Inner primer	CGCGGATCCACAGCCTACTGATGATCAGTCGATG	52 °C
	PCR reaction	OPRR3	TAGCTGCCATAGGTCCCATC	
编码区序列 CDS	PCR	OPRF5	AATCCCGGGGATCCAATGGCGGCGT	53 °C
		OPRR4	AACTGCAGAACTACATCCTCGACCGT	
实时定量 PCR Quantitative RT-PCR	PCR	GSPOPR-F	AGGCACGGTCGAGGATGTAG	95 °C 30 s, 95 °C 5 s, 60 °C 34 s, 45 cycles
		GSPOPR-R	TCCCAATTCCCATTTCTTTC	
	PCR	GhACTIN-F	TCGAGGTGCTGTTGGGTACT	95 °C 30 s, 95 °C 5 s, 60 °C 34 s, 45 cycles
		GhACTIN-R	AACAAAACATGCGACCAAGC	
半定量 PCR RT-PCR	PCR	AtLOX1-F	GGCTCTGGAGAAGGAGAGGT	59 °C
		AtLOX1-R	TAATGCTTGGTCAGGGAAG	
	PCR	AtAOS-F	TTTATCGCCGAGAATCCAC	59 °C
		AtAOS-R	CCTCCGCTAATCGGTTATGA	
	PCR	AtAOC-F	AACTGAGCGTGTACGAAATCAAT	59 °C
		AtAOC-R	CAAACATACTGCATTACAAGGA	
	PCR	AtOPR3-F	CGGCGTTGGCAGAGTATTAT	59 °C
		AtOPR3-R	GCGAGCTTTGAGCCATTAAC	
	PCR	AtACTIN-F	GGTAACATTGTGCTCAGTGGTGG	59 °C
		AtACTIN-R	GCATCAATTTCGATCACTCAGAG	

根据 GenBank 核酸数据库中报道的拟南芥 (NM_001084415.1)、烟草 (EF467331.1)、玉米 (EU962029.1) 番茄 (AJ278332.1) 等 *OPR3* RNA 序列, 通过 DNAMAN 软件进行同源比对并设计保守区兼并引物进行巢式 PCR 扩增, 引物序列及扩增程序见表 1。以唐菖蒲组培球茎提取 RNA 反转录的 cDNA 为模板, 以兼并引物 OPRF1、OPRR1 以及 OPRF2、OPRR1 进行巢式 PCR 扩增 *OPR3* 基因的保守区序列; 根据该保守区片段序列, 利用 2 条 3'RACE 上游引物 OPRF3 和 OPRF4, 进行 2 轮 PCR 扩增进行 3'端 cDNA 序列的克隆; 结合保守区片段设计 2 条下游引物, 用引物 Random 9 mers 进行反转录, OPRR2 和 OPRR3 分别进行 5'端第 1 轮和第 2 轮 PCR 扩增获得 5'端 cDNA 序列。

应用 DNAMAN 对 *OPR3* 基因的 3'端和 5'端序列进行拼接, 并在 NCBI 网站上预测其 ORF。根据 ORF 两端序列设计特异引物扩增该基因的编码区序列 (CDS), 并在上游引物 5'端和下游引物 3'端分别设计 *Sma* I 和 *Pst* I 限制性内切酶酶切位点。

将所有 PCR 产物凝胶电泳后回收目的片段, 与 pMD18-T 载体连接并转化 DH5 α , 重组质粒鉴定后送北京华大基因公司进行测序。

1.3 唐菖蒲试管球茎不同浓度 MJ 处理

选择长势相对较为一致的唐菖蒲试管苗进行 MJ 处理。以 $60 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖的 MS 培养基为基本培养基。在培养基中分别加入经过滤灭菌后的 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MJ。以基本培养基作为对照, 每处理做 3 次重复, 每次重复 9 瓶组培苗, 每瓶 3 株。放在室温 (25 ± 2) $^{\circ}\text{C}$ 的培养室进行培养。

1.4 实时荧光定量 PCR 分析

提取唐菖蒲新球、籽球、匍匐茎、花、叶片、根等不同器官以及不同浓度 MJ 处理后试管新球茎的总 RNA, 检测质量后反转录为 cDNA。将 cDNA 稀释 10 倍后进行实时荧光定量 PCR 反应, 实时定量 PCR 仪的型号是 ABI 7500。反应体系为: $2 \mu\text{L}$ cDNA 作为模板, $10 \mu\text{L}$ $2\times$ SYBR Premix Ex TaqTM, 特异引物和内参 *Actin* 引物 (表 1) 为 $0.4 \mu\text{L}$ ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), $0.4 \mu\text{L}$ $50\times$ ROX Reference Dye II, 用无菌水补足 $20 \mu\text{L}$ 。4 次重复, $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法数据分析。

1.5 内源 MJ 含量的测定

测定前抽取测定液的方法为: 将材料放入研钵 (预冷后), 按照 1:3~4 (质量体积比) 的比例加入 80% 甲醇提取液 (100 mL 80% 甲醇提取液中含有 22 mg BHT, 经 4°C 预冷)、少许石英砂、 0.1 g PVP, 研磨成匀浆并转移出 4°C 过夜储存, 4°C $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min , 取上清液。采用间接 ELISA 法 (何钟佩, 1993) 测定内源 MJ 含量, 测定在中国农业大学农学与生物技术学院化控室完成。

1.6 *GhOPR3* 在拟南芥中的过表达分析

基因过表达载体使用改造后的 35S + pCAMBIA1301, 根据基因信息序列构建 35S: *GhOPR3* 过表达载体。运用浸染拟南芥花粉法获得转基因 T3 代纯合系植株。

盐胁迫处理: 将拟南芥野生型与 T3 代转基因种子分别播于含 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 的 1/2MS 培养基中, 于 4°C 冰箱中放置 2 d 后, 转移到 22°C 培养室培养 10 d 后进行拍照分析。

干旱处理: 分别将野生型和 T3 代转基因拟南芥种子播于 1/2MS 培养基上, 于 4°C 冰箱中放置 2 d 后, 转移到 22°C 培养室培养 10 d 后移栽, 于 22°C 培养室培养 3 周后停止浇水, 4 周后进行拍照分析。

机械伤害处理: 将在培养室培养 4 周的拟南芥叶片用剪刀剪伤处理, 待 0、1、3、6、12、24 h 后, 分别取受伤叶片的邻叶, 在液氮中保存。提取叶片的总 RNA, 反转录成 cDNA 后, 运用半定量 RT-PCR 技术进行相关抗性基因的表达分析, 采用间接 ELISA 法 (何钟佩, 1993) 测定拟南芥叶片的内源 MJ 含量。

2 结果与分析

2.1 *GhOPR3* 基因全长 cDNA 序列的克隆

通过巢式 PCR 扩增 *OPR3* 基因的保守区 (图 1, A), 经测序得到保守区的核苷酸序列大小为 233 bp ; 3'RACE 和 5'RACE 的扩增产物大小分别为 992 bp (图 1, B) 和 515 bp (图 1, C)。使用 DNAMAN 把中间片段序列、3'端以及 5'端序列进行拼接, 得到全长为 $1\,489 \text{ bp}$ *OPR3* 基因序列; 预测并扩增 ORF, 得到 *OPR3* 基因的 CDS $1\,158 \text{ bp}$ (图 1, D)。

2.2 *GhOPR3* 基因序列的分析

对唐菖蒲 *OPR3* 基因的全长序列进行分析得知, 该基因全长 1 489 bp, 包含一个编码 385 个氨基酸的开放阅读框 1 158 bp, 3'UTR 和 5'UTR 分别为 992 bp 和 515 bp (图 1)。将该基因命名为 *GhOPR3*, 提交至 NCBI 数据库, 登录号为 JF831197。

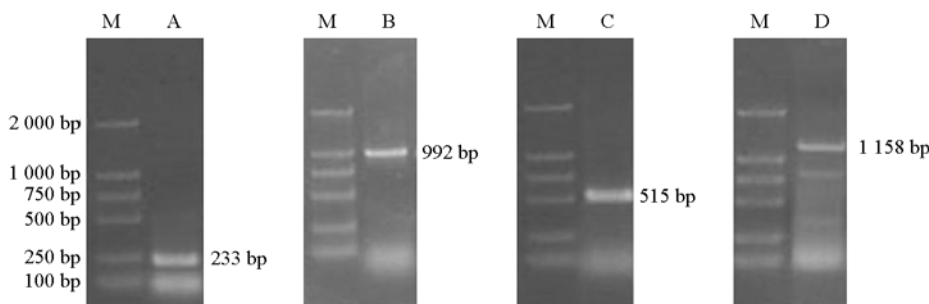


图 1 PCR 产物检测

A: 中间片段产物; B: 3'RACE 产物; C: 5'RACE 产物; D: 编码区产物; M: DL2000 marker。

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of PCR products

A: Fragment product; B: 3'RACE product; C: 5'RACE product; D: CDS product; M: DL2000 marker.

利用 ExPASyD 分析唐菖蒲 *GhOPR3* 基因, 推导的蛋白质分子量为 42.49 kD, 等电点 7.76。同时将其编码区核酸序列提交 NCBI 在线比对 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), 将同源性较

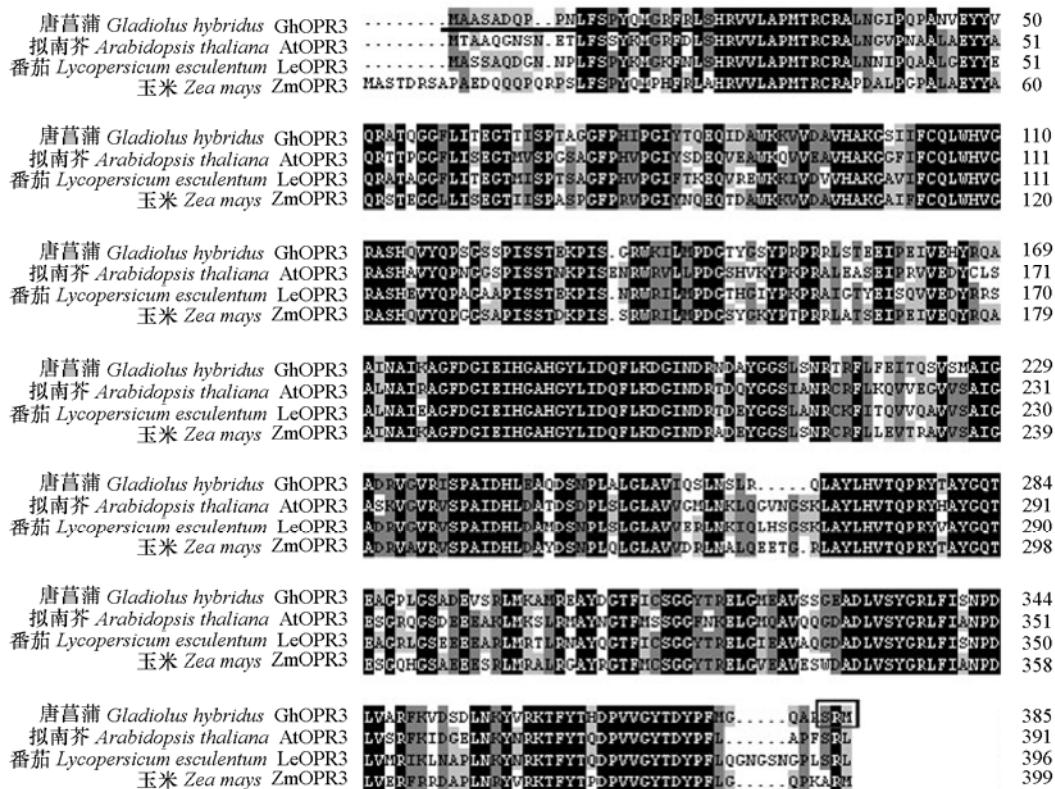


图 2 唐菖蒲与几种植物 OPR3 氨基酸序列同源性比较

Fig. 2 Homology comparison of amino acid sequence of *Gladiolus hybridus* OPR3 with other plants

高和研究相对较多的候选序列下载,使用 DNAMAN 将唐菖蒲 *OPR3* 氨基酸序列与这些序列进行比对。结果表明,唐菖蒲 *OPR3* 的氨基酸序列与玉米 (EU962029.1)、拟南芥 (NM_201702.2) 和番茄 (AJ278332.1) 都有较高的同源性,其中与玉米的最高,为 77.1%,其次是番茄,为 73.5%,与拟南芥的最低,为 69.0%。此外,唐菖蒲 *OPR3* 的氨基酸 C 端含有一个过氧化物酶体定位信号 SRM (图 2)。

系统进化树显示,*GhOPR3* 和玉米、番茄和拟南芥 *OPR3* 聚为一类 (图 3)。

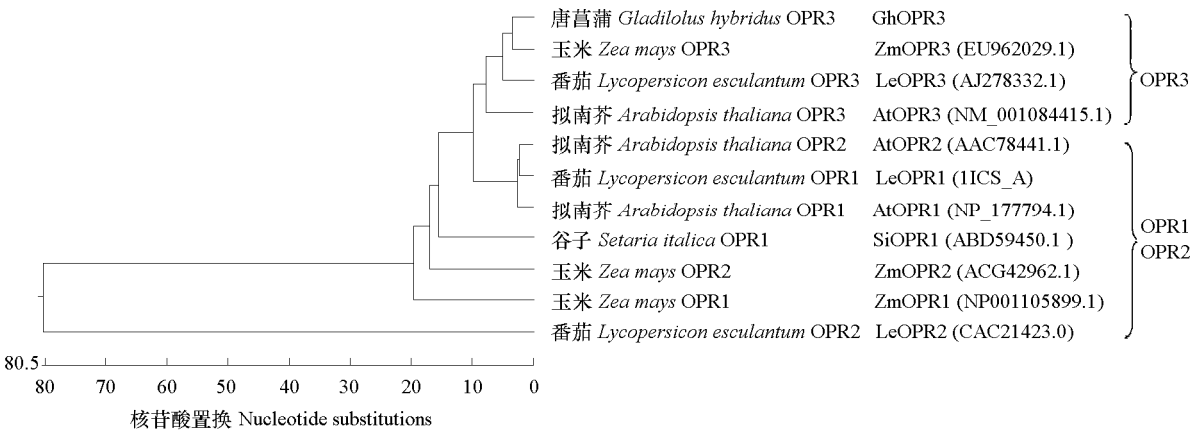


图 3 *GhOPR3* 与其它已克隆的 OPR 类蛋白序列的系统进化树分析
Fig. 3 Phylogenetic analysis of *GhOPR3* and other OPR-type protein sequences

2.3 唐菖蒲不同器官中 *GhOPR3* 的表达和 MJ 含量的分析

实时荧光定量 PCR 分析表明, *GhOPR3* 在所检测的唐菖蒲各器官中均有表达,其中在籽球中的表达量最高,在匍匐茎中也有相对较高的表达量,在根中的表达量最低,其它各器官的表达量与根部器官比较均呈显著性差异 (图 4)。

内源 MJ 含量在匍匐茎中最高,而叶、花与根部相差并不明显。新球和籽球也显著高于根部 (图 4)。

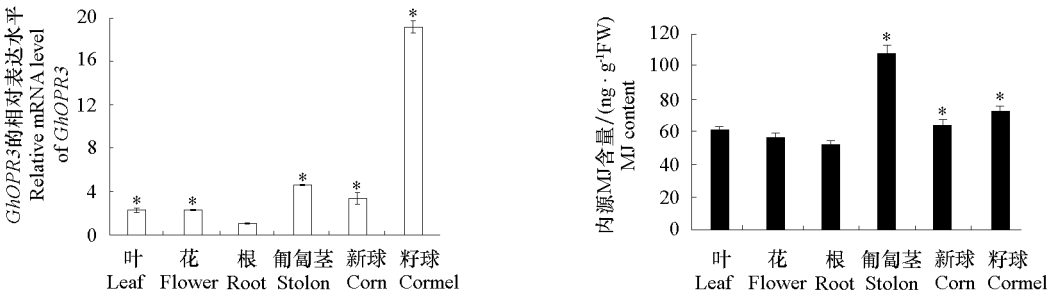


图 4 唐菖蒲不同器官的 *GhOPR3* 表达水平和内源 MJ 含量
*: 与根部差异显著 ($P < 0.05$)。
Fig. 4 The transcriptional levels of *GhOPR3* and the endogenous MJ content in different organs of *Gladiolus*
The asterisks indicate significant differences ($P < 0.05$) between the different organs and the roots.

2.4 MJ 处理对唐菖蒲试管球茎 *GhOPR3* 表达水平和内源 MJ 含量的影响

组培球茎中 *GhOPR3* 基因的表达水平随着 MJ 处理浓度的增加而显著提高, 0.5 mmol · L⁻¹ MJ 处理的表达水平是对照表达水平的 19.3 倍 (图 5)。

在 0 ~ 0.5 mmol · L⁻¹ 的 MJ 处理浓度范围内, 唐菖蒲组培球茎内源 MJ 含量随着处理浓度的增加而逐渐升高, 0.5 mmol · L⁻¹ 和 0.2 mmol · L⁻¹ 处理浓度时球茎中的内源 MJ 含量分别比对照提高了 65.6% 和 20.2% (图 5)。

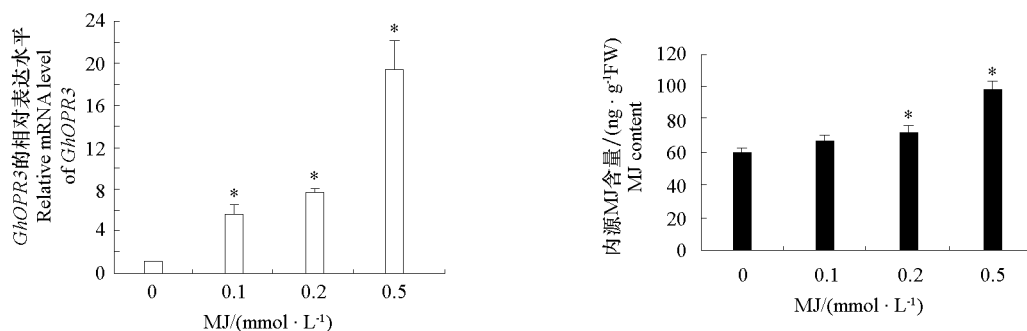


图 5 MJ 处理对 *GhOPR3* 基因表达以及内源 MJ 含量在唐菖蒲球茎的影响

* 与对照差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig. 5 Effect of MJ treatment on *GhOPR3* transcript and the MJ endogenous content in *Gladiolus* corm

The asterisks indicate significant differences ($P < 0.05$) between MJ treatments and the control.

2.5 过表达 *GhOPR3* 拟南芥的耐盐与抗旱性分析

将野生型和 T3 代转基因 *GhOPR3* 拟南芥种子分别播在含有 50 mmol · L⁻¹ NaCl 的 1/2MS 培养基上, 经过 10 d 的培养后发现, 转基因株系生长正常, 叶片绿色, 根系较长, 植株成活率达到 90% 以上。但拟南芥野生型植株的叶片呈现黄白色, 其根系短小, 并且出现了大部分植株死亡的现象 (图 6)。

将野生型和转基因拟南芥植株移栽至培养室培养 3 周后进行干旱胁迫, 停止浇水 4 周后观察发现, 野生型拟南芥植株已基本死亡。而部分转基因拟南芥的植株仍未死亡, 其叶片呈现绿色, 经统计得出转基因拟南芥植株成活率为 66.7% (图 7)。

2.6 机械损伤对过表达 *GhOPR3* 拟南芥相关基因的表达与 MJ 含量的影响

对野生型拟南芥进行机械损伤, 发现在受到伤害 1 ~ 24 h 后 *AtLOX1*、*AtAOS*、*AtAOC* 和 *AtOPR3* 基因的表达水平得到了不同程度的提高, 其中在损伤 1 ~ 3 h 后提高相对较大, 但各基因在拟南芥损伤相同时间内表达水平的差异并不显著 (图 8)。

与野生型相比, 过表达 *GhOPR3* 拟南芥植株中 *AtLOX1*、*AtAOS*、*AtAOC* 和 *AtOPR3* 基因的表达水平在损伤后的一定时间内得到了相对较大提高, 其中在损伤 3 ~ 6 h 的表达水平达到最高值, 后又呈现下降趋势 (图 8)。

但在未受伤前, 转基因拟南芥植株叶片的 MJ 含量比野生型提高了 65.9% (图 9)。

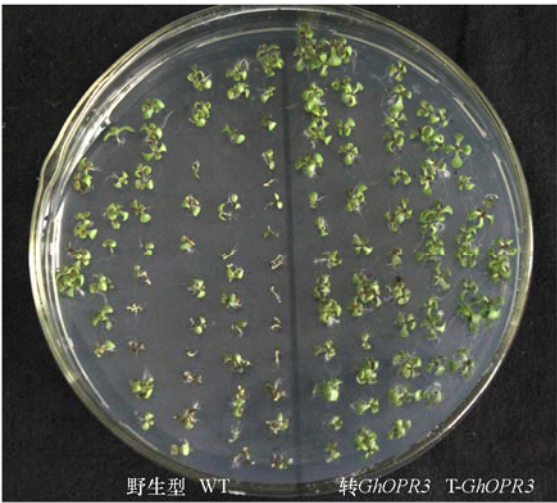


图 6 过表达 *GhOPR3* 增强了转基因拟南芥的耐盐性

Fig. 6 Overexpression of *GhOPR3* enhanced the salt tolerance of transgenic *Arabidopsis* respectively



图 7 过表达 *GhOPR3* 增强了转基因拟南芥的耐旱性

Fig. 7 Overexpression of *GhOPR3* enhanced the drought tolerance of transgenic *Arabidopsis*

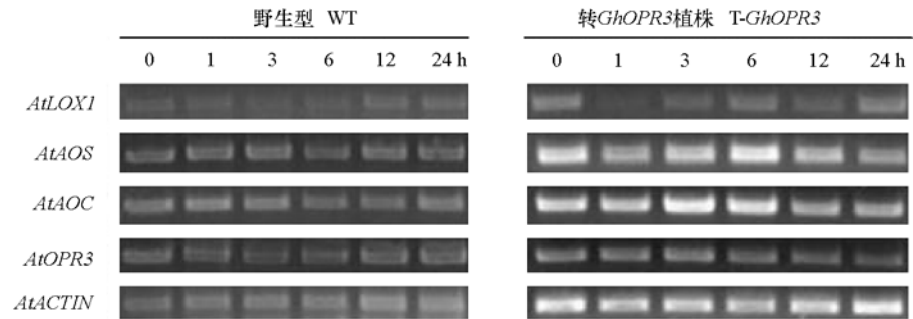


图 8 机械损伤对过表达 *GhOPR3* 拟南芥相关基因表达的影响

Fig. 8 Effect of mechanical damage to related genes expression in transgenic *GhOPR3* *Arabidopsis*

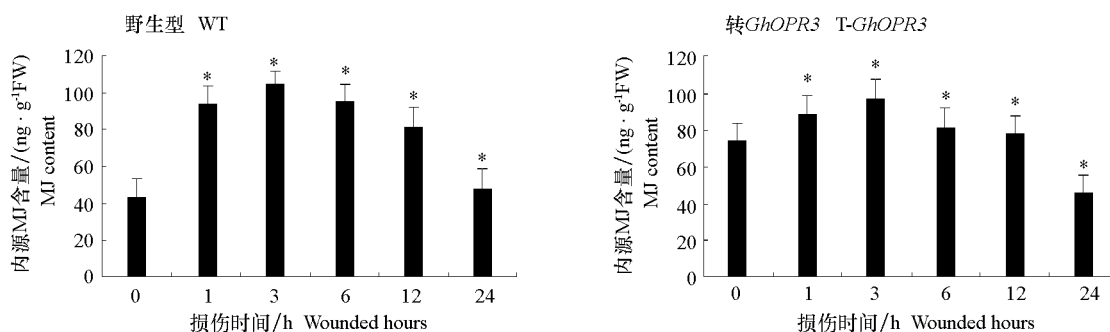


图9 机械损伤对转基因 *GhOPR3* 拟南芥 MJ 含量的影响

*: 与对照差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig. 9 Effect of mechanical damage to MJ content in transgenic *GhOPR3* *Arabidopsis*

The asterisks indicate significant differences ($P < 0.05$) between mechanical damage and the control.

3 讨论

本研究中克隆了一个唐菖蒲茉莉酸生物合成途径关键酶 OPR 基因的全长序列, 该基因的氨基酸 C 端含有一个过氧化物酶体定位信号 SRM (图 2), 系统进化树结果表明该基因属于 OPR3 一类 (图 3), 且有研究表明 OPR3 的转录被 JA 诱导, 对 JA 的合成具有重要作用 (Mussig et al., 2000)。

GhOPR3 基因的表达模式研究结果显示, *GhOPR3* 基因在唐菖蒲的匍匐茎、新球和籽球茎中表达量较高, 其中在籽球中表达量最高, 而在叶子、花和根中相对表达量较低。同时测定的内源 MJ 含量结果显示, 同样是在匍匐茎、籽球和新球茎中含量较高, 但在匍匐茎中含量最高, 而在叶、花和根中含量相对较低, 与 *GhLOX1* 基因的组织性表达模式类似 (Lian et al., 2011)。*GhOPR3* 的表达水平和内源 MJ 含量的最大值分别发生在唐菖蒲的籽球和匍匐茎中, 这可能与唐菖蒲的发育过程有关。在唐菖蒲球茎的发育过程中, 籽球由匍匐茎的顶端逐渐膨大而成, 所以匍匐茎和籽球的连接部位较难分离得特别清楚, 这或许对试验的结果造成了一定的影响, 但其更深入的原因需要进一步的研究。此外, 外施 $0.1 \sim 0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MJ 提高了 *GhOPR3* 基因的表达水平, 同时也促进了内源茉莉酸化合物的合成, 研究结果与唐菖蒲茉莉酸合成途径中的其它酶 *GhLOX1*、*GhAOS* 和 *GhAOC* 基因的表达模式 (He et al., 2008; Lian et al., 2011, 2013) 类似。而拟南芥的芯片分析研究显示, 在 41 个 JA 响应的基因中有 5 个是 JA 合成途径的基因, 表明 JAs 的合成途径属于正反馈调控 (Sasaki et al., 2001), 这与其它的研究结果一致。综合以往研究可以发现, JA 合成途径中的所有基因包括 *DAD1*、*LOX*、*AOS*、*AOC*、*OPR3* 和 *JMT* 的转录均受到 JA 诱导 (Heitz et al., 1997; Laudert & Weiler, 1998; Mussig et al., 2000; Ishiguro et al., 2001; Seo et al., 2001; Agrawal et al., 2003), 而且创伤和其它胁迫等能够诱导 JA 反应的因素也能促使这些基因表达, 并且这些基因转录的激活就发生在 JAs 合成的位置。

此外, 本研究结果显示, 转基因 *GhOPR3* 拟南芥植株的耐盐性和抗旱性分别得到了提高, 在 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaCl 的胁迫下, 成活率达到了 90% 以上, 并且, 干旱胁迫后的成活率达到了 66.7%。研究表明, 基因表达数据只是研究 JA 生物合成规律的一部分, 例如在含有大量 LOX、AOS 和 AOC 蛋白的拟南芥叶片中, 只有在经过如伤害的外界刺激后, 茉莉酸的合成才能发生 (Stenzel et al., 2003a)。受伤诱导提高 JA 的合成是短暂的, 发生在 *LOX*、*AOS* 和 *AOC* 的基因表达之前 (Howe et al., 2000; Stenzel et al., 2003a, 2003b), 所以, 本试验中野生型和过表达拟南芥植株受伤后, MJ 含量

都出现了先升高后下降的趋势。并且, 有研究表明在过表达 *AOS* 或 *AOC* 植株中, 经过伤害或其它刺激之前并没有提高 MJ 的水平 (Laudert et al., 2000; Stenzel et al., 2003b)。与此不同的是, 本试验结果显示, 在过表达株系中出现了经伤害之前 MJ 水平比野生型拟南芥 MJ 水平较高的现象, 提高了 65.9%, 其具体原因有待进一步研究。但茉莉酸在植物经受干旱、外界伤害等环境刺激后的防御作用在拟南芥上、烟草、马铃薯中都得到了证实 (Beckers & Spoel, 2006; Wasternack, 2006)。

本研究中, 野生型和过表达 *GhOPR3* 的拟南芥植株经过外部机械伤害后, 其 *AtLOX1*、*AtAOS*、*AtAOC* 和 *AtOPR3* 等各基因的表达量和 MJ 含量总体上在受伤后的不同时间内得到了不同程度的提高, 并且过表达植株受伤后各基因的表达量要比野生型植株受伤后的表达量高 (图 8)。本研究结果与对黄瓜以及大豆等植物的研究结果 (Grimes et al., 1992; Avdiushko et al., 1995) 趋向一致。因此, 茉莉酸的生物合成不只受到基因的调控, 外界的刺激也是一个重要的因素。

这些结果表明, *GhOPR3* 基因的表达促进了茉莉酸类化合物的生物合成, 增强了转基因拟南芥的耐盐性与抗旱性, 并且提高了外界损伤后过表达拟南芥植株茉莉酸生物合成途径中各相关抗性基因的表达水平。本研究中将深入研究 *GhOPR3* 的基因功能, 并通过转基因技术进一步探讨 *GhOPR3* 在调控唐菖蒲茉莉酸及其化合物的生物合成中的作用, 进而探讨 OPR 在唐菖蒲生长发育过程以及防御系统中的生理功能。

References

- Agrawal G K, Jwa N S, Shibato J, Han O, Iwahashi H, Rakwal R. 2003. Diverse environmental cues transiently regulate OsOPR1 of the "Octadecanoid pathway" revealing its importance in rice defense/stress and development. *Biochem Biophys Res Commun*, 310 (4): 1073 - 1082.
- Avdiushko S, Croft K P, Brown G C, Jackson D M, Hamilton-Kemp T R, Hildebrand D. 1995. Effect of volatile methyl jasmonate on the oxylipin pathway in tobacco, cucumber, and *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 109: 1227 - 1230.
- Beckers G J, Spoel S H. 2006. Fine-tuning plant defence signalling: Salicylate versus jasmonate. *Plant Biology*, 8: 1 - 10.
- Biesgen C, Weiler E W. 1999. Structure and regulation of OPR1 and OPR2, two closely related genes encoding 12-oxophytodienoic acid-10,11-reductases from *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 208: 155 - 165.
- Grimes H D, Koetje D S, Franceschi V R. 1992. Expression, activity, and cellular accumulation of methyl jasmonate-responsive lipoxygenase in soybean seedlings. *Plant Physiol*, 100: 433 - 443.
- He Xiu-li, Shi Li-wei, Yuan Zhi-hua, Xu Zhe, Zhang Zhi-qian, Yi Ming-fang. 2008. Effects of lipoxygenase on the corm formation and enlargement in *Gladiolus hybridus*. *Scientia Horticulturae*, 118: 60 - 69.
- He Zhong-pei. 1993. The experimental instructor of crop chemistry control. Beijing: Beijing Agricultural University Press: 60 - 68. (in Chinese)
- 何钟佩. 1993. 农作物化学控制实验指导. 北京: 北京农业大学出版社: 60 - 68.
- Heitz T, Bergey D R, Ryan C A. 1997. A gene encoding a chloroplast-targeted lipoxygenase in tomato leaves is transiently induced by wounding, systemin, and methyl jasmonate. *Plant Physiol*, 114 (3): 1085 - 1093.
- Howe G A, Lee G I, Itoh A, Li L, DeRocher A E. 2000. Cytochrome P450-dependent metabolism of oxylipins in tomato. Cloning and expression of allene oxide synthase and fatty acid hydroperoxide lyase. *Plant Physiology*, 123: 711 - 724.
- Ishiguro S, Kawai-Oda A, Ueda J, Nishida I, Okada K. 2001. The defective in anther dehiscence1 gene encodes a novel phospholipase A1 catalyzing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 13: 2191 - 2209.
- Jiang Ke-ji, Pi Yan, Hou Rong, Tang Ke-xuan. 2010. Jasmonate biosynthetic pathway: Its physiological role and potential application in plant secondary metabolic engineering. *Chinese Bulletin of Botany*, 45 (2): 137 - 148. (in Chinese)
- 蒋科技, 皮妍, 侯嵘, 唐克轩. 2010. 植物内源茉莉酸类物质的生物合成途径及其生物学意义. *植物学报*, 45 (2): 137 - 148.
- Laudert D, Weiler E W. 1998. Allene oxide synthase: A major control point in *Arabidopsis thaliana* octadecanoid signaling. *Plant Journal*, 15: 675 - 684.

- Laudert D, Schaller F, Weiler E W. 2000. Transgenic *Nicotiana tabacum* and *Arabidopsis thaliana* plants overexpressing allene oxide synthase. *Planta*, 211: 163 – 165.
- Li L, Li C, In-Lee G, Howe G A. 2002. Distinct roles for jasmonate synthesis and action in the systemic wound response of tomato. *Plant Biology*, 99 (9): 6416 – 6421.
- Lian Qing-long, Xin Hai-bo, Zhong Xiong-hui, Zhang Zi-you, Han Hao-jun, Yi Ming-fang. 2011. Cloning, characterization and expression analysis of a 9-lipoxygenase gene in *Gladiolus hybridus*. *Scientia Horticulturae*, (130): 468 – 475.
- Lian Qing-long, Xin Hai-bo, Li Xiao-xin, Zhong Xiong-hui, Yin Yi-lei, Yi Ming-fang. 2013. Isolation, characterization and expression analysis of the genes—*GhAOS*, *GhAOC* and *GhOPR3*: Encoding the key enzymes involved in jasmonic acid biosynthesis in *Gladiolus hybridus*. *Scientia Horticulturae*, (154): 88 – 95.
- Liechti R, Farmer E E. 2002. The jasmonate pathway. *Science*, 296 (5573): 1649 – 1650.
- Mussig C, Biesgen C, Lisso J, Uwer U, Weiler E W, Altmann T. 2000. A novel stress-inducible 12-oxophytodienoate reductase from *Arabidopsis thaliana* provides a potential link between brassinosteroid-action and jasmonic-acid synthesis. *J Plant Physiol*, 157: 143 – 152.
- Sasaki Y, Asamizu E, Shibata D, Nakamura Y, Kaneko T, Awai K, Amagai M, Kuwata C, Tsugane T, Masuda T, Shimada H, Takamiya X, Ohta H, Tabata S. 2001. Monitoring of methyl jasmonate-responsive genes in *Arabidopsis* by cDNA macroarray: Self-activation of jasmonic acid biosynthesis and crosstalk with other phytohormone signaling pathways. *DNA Res*, 8: 153 – 161.
- Seo H S, Song J T, Cheong J J, Lee Y H, Lee Y W, Hwang I, Lee J S, Choi Y D. 2001. Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: A key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 4788 – 4793.
- Stenzel I, Hause B, Miersch O, Kurz T, Maucher H, Weichert H, Ziegler J, Feussner I, Wasternack C. 2003a. Jasmonate biosynthesis and the allene oxide cyclase family of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 51: 895 – 911.
- Stenzel I, Hause B, Maucher H, Pitzschke A, Miersch O, Ziegler J, Ryan C, Wasternack C. 2003b. Allene oxide cyclase dependence of the wound response and vascular bundle-specific generation of jasmonates in tomato – amplification in wound signalling. *The Plant Journal*, 33(3): 577 – 589.
- Stintzi A, Weber H, Reymond P, Browse J, Farmer E E. 2001. Plant defense in the absence of jasmonic acid: The role of cyclopentenones. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 12837 – 12842.
- Strassner J, Schaller F, Frick U B, Howe G A, Weiler E W, Amrhein N, Macheroux P, Schaller A. 2002. Characterization and cDNA-microarray expression analysis of 12-oxophytodienoate reductases reveals differential roles for octadecanoid biosynthesis in the local versus the systemic wound response. *Plant J*, 32: 585 – 601.
- Vom Endt D, Soares e Silva M, Kijne J W, Pasquali G, Memelink J. 2007. Identification of a bipartite jasmonate-responsive promoter element in the *Catharanthus roseus ORCA3* transcription factor gene that interacts specifically with AT-hook DNA-binding proteins. *Plant Physiology*, 144(3): 1680 – 1689.
- Wasternack C. 2006. Oxylipins: Biosynthesis, signal transduction and action. In//: Hedden P, Thomas S G. *Plant hormone signalling*. Oxford, UK: Blackwell: 185 – 228.