



论文

拟南芥 F-box 基因 *FOA1* 参与 ABA 信号转导

彭娟, 喻达时, 王利群, 谢敏敏, 袁聪颖, 王育, 唐冬英, 赵小英*, 刘选明*

湖南大学生物学院, 化学生物传感与计量学国家重点实验室, 长沙 410082

* 联系人, E-mail: zxy_mm@163.com; xmL05@hnu.edu.cn

收稿日期: 2012-03-12; 接收日期: 2012-04-22

国家自然科学基金(批准号: 31171176)、高等学校博士学科点专项科研基金(批准号: 755228001)、湖南省自然科学基金(批准号: 11JJJA002)和中国科学院植物生理生态研究所植物分子遗传国家重点实验室开放基金资助项目

摘要 分析了 F-box 基因 *FOA1*(F-box overexpressed/oppresed ABA signaling)在拟南芥不同组织器官的表达模式, 以及 ABA 和 NaCl 对其表达的调节. 结果发现, *FOA1* 在根和花中表达较高, 茎中表达较低; 外源 ABA 和 NaCl 处理能迅速诱导 *FOA1* 基因的表达. 分析 ABA 处理条件下, 过量表达株系 *FOA1ox1*, *FOA1ox2* 和 T-DNA 插入突变体 *foal* 的表型发现, 突变体 *foal* 的种子萌发率下降、根较短、气孔开度较大、脯氨酸积累增加, 且对外源 ABA 敏感; 过量表达株系的表型则相反, 对 ABA 的敏感性降低. ABA 处理条件下, 一系列 ABA 信号转导转录因子在 *foal* 突变体中的转录水平比野生型高, 而 ABA 及胁迫应答基因在 *foal* 突变体中的转录水平则比野生型低. 这些研究结果表明, *FOA1* 是 ABA 信号通路相关基因, 并可能起负调控作用.

关键词F-box 基因
FOA1
ABA
信号转导
拟南芥

蛋白质降解是一个重要的转录后调控过程, 通过调节关键蛋白的表达水平, 促使生物体对胞内信号和外界环境条件的改变迅速作出反应. UPS(ubiquitin proteasome system)途径是真核生物体内主要的蛋白水解途径^[1,2]. 在 UPS 途径中, 靶蛋白的泛素化需要 3 种酶的参与, 它们分别为泛素活化酶(ubiquitin-activating enzyme, E1), 泛素偶联酶(ubiquitin-conjugating enzyme, Ubc, E2)和泛素连接酶(ubiquitin ligase, E3). E3 具有底物特异性, 通过识别特异靶蛋白而介导靶蛋白通过 UPS 途径降解是目前研究的热点. 在拟南芥基因组中大约有 1200 个 E3^[2-4], 这些 E3 可归为几个大的家族, 其中 SCF (SKP1-CUL1-F-box)是 E3 中最大、最具特点、被广泛研究的家族之一^[5,6]. F-box 蛋白作为 SCF 复合物的成员在低等到高等生物中普遍存在, 通过特异识别不同的靶蛋白而参与调控许多生理现象, 包括激素信号转导, 如 SLY1 和 GID2

参与赤霉素(gibberellins, GA)信号转导^[7]、EDL3 参与脱落酸(abscisic acid, ABA)信号转导^[8]、EBF1 和 EBF2 参与乙烯信号转导^[9]、TIR1 参与生长素信号转导^[10]等, 以及自交不亲和、花器官发育、生物钟调控等生物学过程^[11,12]. 另外, F-box 蛋白还参与了植物的非生物胁迫反应^[13-15], 包括干旱^[16-19]、冷^[20]和高盐^[18]等胁迫反应. 对 F-box 蛋白及其靶蛋白进行相关研究将有助于人们更加深入的了解植物生长发育及相关信号转导过程.

有研究估计, 在拟南芥中约存在 700 个 F-box 蛋白^[1], 至今还有大量 F-box 蛋白的功能尚不清楚. 编码 F-box 蛋白的 *AT3G17320* 基因位于拟南芥第三条染色体上, 全长 1230 bp, 无内含子. 该蛋白除了具有典型的 F-box 结构域^[1,21]外, 还包含 1 个新的可能参与蛋白互作的 FBA_1(F-box associated)保守结构域^[21]. 采用 PLACE 软件(<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>)分

析 *AT3G17320* 基因-1201~+3 区间的基因组序列发现, 该区域存在大量植物激素及胁迫响应元件, 包括 AuxRE(Auxine responsive element), GARE (Gibberellin responsive element), ABRE(ABA responsive element)和 LTRE(low temperature responsive element)等. 由此推测, *FOA1* 基因的表达可能受激素、环境胁迫等调节, 在激素或胁迫应答信号通路中起调控作用. 本研究为确认 *FOA1* 基因的生物功能, 首先检测了 *FOA1* 基因在拟南芥不同组织器官的表达模式, 以及 ABA 和 NaCl 对其表达的调节. 同时, 以 T-DNA 插入突变体和过量表达转基因株系为材料, 系统研究了 F-box 蛋白 FOA1 在 ABA 信号通路中的作用.

1 材料与方法

1.1 *FOA1* 基因克隆及植物转化

以野生型拟南芥(Col-0)cDNA 为模版, 根据 Gateway 技术要求, 设计含有 attB 接头的引物 *FOA1F* 和 *FOA1R*(表 1, 下画线序列为 attB 位点), 利用 prime STAR 高保真酶(TaKaRa), 通过 PCR 反应获得带有 attB 位点的 PCR 产物. 利用 BP Clonase (Invitrogen) 经 BP 重组反应将 PCR 产物克隆到入门载体 pDONR/ZEO. 测序后, 利用 LR Clonase (Invitrogen)将阳性克隆与目标载体 pEarleyGate 203(N-Myc)进行重组反应, 获得的重组质粒经电击转入农杆菌 GV3101 中, 然后采用浸花蕾的方法^[22]转化拟南芥 *sgs*(suppressor of gene silencing)突变体(由加州大学洛杉矶分校林辰涛教授实验室惠赠). *sgs* 突变体为 EMS (ethyl-methanesulfonate)诱变突变体, 该突变体携带隐性单基因突变, 可特异抑制转基因诱导的转录后基因沉默, 因此用于转基因可避免共抑制现象^[23]. 转基因拟南芥经除草剂 Basta 筛选 2 代, 获得纯合子. 收集纯合子株系的叶片, 液氮速冻后, 于-80℃保存用于 RNA 提取和基因表达分析.

1.2 T-DNA 插入突变体分子鉴定

从美国生物资源中心(ABRC)购买了 *FOA1* 基因的 T-DNA 插入突变体 *CS857416* (背景为哥伦比亚生态型 Col-0). 根据插入位点分别设计引物 R, F(表 1). 取突变体植株叶片, 采用 CTAB 法提取 DNA, 然后以此 DNA 为模板, R, F 和 ATIDB(*arabidopsis thaliana*

表 1 *FOA1* 编码序列克隆及 T-DNA 插入突变体纯合子鉴定的引物^{a)}

引物名称	引物序列(5'→3')
<i>FOA1</i>	F:CAAAAAAGCAGGCTTCATGACGAAAATTCC GATCTT R: CAAGAAAGCTGGGTCTAGATTGACACAGA ACTTGGA
R0	ATTTTGCCGATTTTCGGAAC
<i>CS857416</i>	F: CAGAAACTTCTCCTCGTGGTG R: AAGAAAAAGCCGAAGCAAAAG

a) 下画线为 attB 位点

integrated database)提供的 T-DNA 左边界 R0 序列(表 1)为引物, 采用 PCR 鉴定纯合子. 然后, 取纯合子植株叶片, 液氮速冻后, 于-80℃保存用于 RNA 提取和基因表达分析.

1.3 ABA 和 NaCl 处理、种子萌发及根长分析

将拟南芥种子用 75%酒精浸泡 30 s, 然后用 10% NaClO 浸泡 10 min, 无菌水清洗 4~6 次后, 置于 4℃黑暗环境春化 4 天, 分别用于 ABA 和 NaCl 处理、种子萌发及根长分析.

(1) ABA 和 NaCl 处理. 用 0.1%的琼脂糖悬浮种子, 均匀点播于 MS 固体培养基(含 0.8%琼脂)上, 转移至温度为 22~23℃, 光强为 50 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ 的全日照培养箱. 14 天后, 将野生型 Col-0 幼苗的根泡在含 ABA(10 $\mu\text{mol/L}$)或 NaCl(100 mmol/L)的 MS 液体培养基中分别处理 0, 1, 2, 4, 6 和 8 h, 用于分析外源 ABA 和 NaCl 对 *FOA1* 基因表达的调节; 此外, 将野生型 Col-0 和 *foa1* 突变体幼苗同时用含 ABA(100 $\mu\text{mol/L}$)的液体培养基处理 0 和 6 h, 用于比较分析 ABA 及胁迫应答基因在野生型和 *foa1* 突变体中的表达变化情况. 处理材料收集后放入液氮速冻, -80℃保存用于 RNA 提取和基因表达分析.

(2) 种子萌发分析. 用 0.1%的琼脂糖悬浮种子, 均匀点播于含不同浓度 ABA(0, 0.3, 0.6 $\mu\text{mol/L}$)的 MS 固体培养基(含 0.8%琼脂)表面, 转移至培养室. 于第 5 天统计种子萌发率. 结果取 3 次独立实验的平均值 \pm 标准误差, 每次实验约统计 100 粒种子的萌发率.

(3) 根长分析. 用 0.1%的琼脂糖悬浮种子, 均匀点播于 MS 固体培养基上, 在培养箱培养 3 天后, 将幼苗移植到含不同浓度 ABA(0, 5, 10 $\mu\text{mol/L}$)的 MS 固体培养基(含 0.8%琼脂)表面, 继续培养 6 天后, 测其根长. 结果取 3 次独立实验的平均值 \pm 标准误差,

每处理统计 20 棵幼苗根的长度。

1.4 气孔观察与气孔开度的测定

参照 Pei 等人的研究方法^[24], 取生长在同一条件下 4~5 周龄大的野生型、缺失突变体、过量表达植株的莲座叶, 在气孔开放缓冲液中(10 mmol/L KCl, 7.5 mmol/L 亚氨基醋酸, 10 mmol/L 乙磺酸, 10 mmol/L Tris-HCl, pH 6.2)浸泡 10 h 使气孔充分开放, 然后加入不同浓度(0, 1 和 10 μ mol/L)ABA 继续浸泡 2 h, 在倒置显微镜(NICON TE2000)下测定叶片下表皮气孔纵横径, 并拍照。每个处理重复 3 次。

1.5 蒸腾失水速率的测定

参照 Shan 等人^[25]的方法, 取约 3 周龄大的野生型、缺失突变体、过量表达植株的莲座叶各 4 片称取其初重, 放在室温 25 $^{\circ}$ C、60%湿度的环境下干燥, 每隔 30 min 称重 1 次, 统计数据后计算蒸腾失水率。每个材料重复 3 次。

1.6 脯氨酸含量的测定

用 100 μ mol/L ABA 溶液喷洒成年野生型、缺失突变体、过量表达植株, 喷水的野生型和各突变体植株作为对照。每天喷一次, 连续喷 3 天后取植株叶片, 采用磺基水杨酸方法^[26]提取脯氨酸, 测其在 250 nm 处的吸光值, 计算脯氨酸含量。每个材料重复 3 次。

1.7 总 RNA 提取和 RT-PCR 分析

总 RNA 的提取采用 RNAeasy Mini Kit (Ambiogen 生物技术有限公司)按照说明进行, 然后利用 Maxima[®] First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas)按照说明合成 cDNA 第一链。cDNA 产物稀释 10 倍后, 取 1 μ L 作为模板, 进行 PCR 反应。RT-PCR 引物序列见表 2。PCR 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 5 min, 95 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 共 26(*ACTIN2* 基因)或 32(*FOA1* 基因)个循环。PCR 产物在 1.5%的琼脂糖凝胶上进行电泳。每个实验至少重复 3 次, 持家基因 *ACTIN2* 的 PCR 产物作为分子内标。

1.8 实时荧光定量 PCR 分析

将合成的 cDNA 产物稀释 20 倍后, 取 2 μ L 作为模板, 采用 SYBR[®] Green 试剂盒(TOYOBO, Japan), 在 Mx3000P(Stratagene)定量 PCR 仪中进行反应。实

表 2 RT-PCR 引物序列

引物名称	引物序列 5'→3'
<i>FOA1</i>	F: GCCTTGTTGTTGATGATACCATA R: GATTGACAGAACTTGAACAT
<i>ACTIN2</i>	F: CACTGTGCCAATCTACGAGGGT R: CACAAACGAGGGCTGGAACAAG

时荧光定量 PCR 反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 10 min, 95 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 共 40 个循环。每个实验重复 3 次。以持家基因 *ACTIN2* 为内参, 用 Mx3000P 软件分析计算被检测基因的相对表达水平。定量 PCR 引物序列见表 3。

2 结果

2.1 *FOA1* 基因的组织器官表达模式分析

基因的组织器官表达特异性通常可为预测和研究其生物学功能提供参考信息。为研究 *FOA1* 基因在不同组织器官的表达模式, 收集拟南芥野生型 Col-0 成熟植株的根、茎、茎生叶、花及叶柄 5 个部位材料提取总 RNA 进行实时荧光定量 PCR 分析。结果表明, 该基因在拟南芥各个组织器官中均有表达, 根和花中的表达量较高, 茎中的表达量较低(图 1), 说明该基因可能在根和花的生长发育过程中起作用。

2.2 外源 ABA 和 NaCl 诱导 *FOA1* 基因的表达

鉴于 *FOA1* 基因启动子序列中含有 ABRE 顺时

表 3 实时荧光定量 PCR 引物序列

引物名称	引物序列(5'→3')
<i>FOA1</i>	F: GCTTACATCGTTGGAGAAG R: GCACAGAACTTGAACATAA
<i>ABF3</i>	F: AATGGCGGATCTATGGATT R: GCATCTGTAGTGGCTGAG
<i>OST1</i>	F: GGATCAACCGGGCCAAAG R: TGAGTGCCTGCAGGAGGAA
<i>ABI1</i>	F: AGCTGCTGATATAGTCGTCGTTGATA R: GAGGATCAAACCGACCATCTAACA
<i>RD22</i>	F: GACCATTGAGGAGTGTGAA R: TCGGTGCGTTCTTCTTAG
<i>RD29A</i>	F: AGGAACCACCCTCAACA R: GCTCGTCATCATCATCT
<i>RD29B</i>	F: AAGGAGACGCAACAAGG R: ACGGTGGTGCCAAGTGAT
<i>ACTIN2</i>	F: CACTGTGCCAATCTACGAGGGT R: CACAAACGAGGGCTGGAACAAG

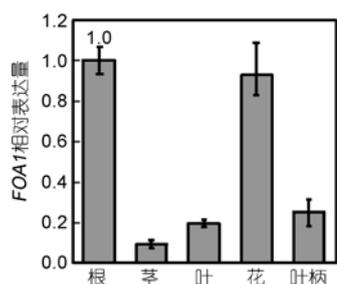


图 1 实时荧光定量 PCR 法分析 *FOA1* 在拟南芥不同组织器官中的表达

1.0 表示 *FOA1* 在根中的相对表达量设为 1

作用元件, 本研究利用 ABA 处理拟南芥幼苗(14 天), 研究了外源 ABA 和 NaCl 处理对 *FOA1* 基因表达的调节. 实时荧光定量 PCR 分析结果表明, *FOA1* 基因的表达受 ABA 和 NaCl 迅速诱导, 分别在 ABA 处理 4 h 和 NaCl 处理 2 h 时表达量最高, 随 ABA 和 NaCl 处理时间延长 *FOA1* 基因的表达量均降低(图 2), 说明 *FOA1* 可能是 ABA 信号通路相关基因, 并可能参与植物的盐胁迫应答反应.

2.3 T-DNA 插入突变体及 *FOA1* 过量表达植株分子鉴定

为进一步研究 *FOA1* 基因的生物学功能, 从美国 ABRC 购买了 T-DNA 插入突变体 CS857416, T-DNA 插入位点位于 *FOA1* 基因起始密码子下游 599 bp 处的外显子中(图 3A). 为了获得 T-DNA 插入突变体纯合子, 采用 CTAB 法提取突变体及野生型植株叶片的 DNA, 然后以此 DNA 为模板, 将 R, F 和 R0 引物放入同一反应体系中进行 PCR 鉴定. 结果获得 4 株纯合子(图 3B), 命名为 *foa1*. 对纯合子植

株进行 RT-PCR 鉴定, 发现 *FOA1* 在 *foa1* 突变体中的表达明显受到抑制(图 3C). 此外, 将 *FOA1* 的编码序列连接到植物表达载体 35S 启动子之后, 通过植物转化和 Basta 抗性筛选获得以拟南芥 *sgs* 突变体为遗传背景的转基因株系(本研究中将 *sgs* 突变体表述为野生型 *sgs*). 实时荧光定量 PCR 分析结果表明, *FOA1* 在 *FOA1ox1* 和 *FOA1ox2* 转基因株系中得到过量表达, 表达量分别为野生型 *sgs* 的 5 和 25 倍(图 3D).

2.4 *FOA1* 参与 ABA 对种子萌发和根伸长的抑制

为研究 *FOA1* 基因是否在 ABA 信号通路中起作用, 将野生型、T-DNA 插入突变体 *foa1* 及过量表达株系 *FOA1ox1* 和 *FOA1ox2* 培养在含不同浓度 ABA 的 MS 固体培养基中, 于第 5 天统计种子萌发率并拍照. 结果显示, *FOA1* 突变导致种子萌发率降低(图 4A). 随 ABA 处理浓度增加, 拟南芥种子萌发受到抑制, 当 ABA 增加到 0.6 $\mu\text{mol/L}$ 时, *foa1* 缺失突变体的种子萌发率下降 25%, 野生型种子 Col-0 的萌发率下降 20%; 过量表达株系 *FOA1ox1* 和 *FOA1ox2* 的种子萌发率分别下降 22% 和 31%, 野生型 *sgs* 的种子萌发率下降 36%(图 4B), 表明缺失突变体的种子萌发对 ABA 较野生型 Col-0 敏感, 而过量表达株系 *FOA1ox1* 和 *FOA1ox2* 的种子萌发对 ABA 的敏感性较野生型 *sgs* 有所下降.

与种子萌发结果相似, *FOA1* 突变导致主根变短, 过量表达导致主根变长, 并且影响根伸长对 ABA 的反应. 当 ABA 浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 时, *foa1* 缺失突变体根的伸长对 ABA 较野生型 Col-0 敏感, 受 ABA 抑制的程度较野生型大; 当 ABA 浓度为 5 和 10 $\mu\text{mol/L}$

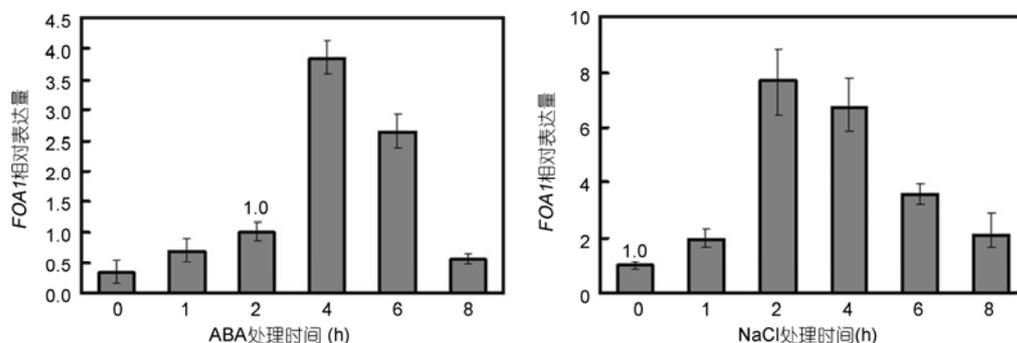


图 2 实时荧光定量 PCR 法检测外源 ABA, NaCl 对 *FOA1* 基因表达的调节

1.0 表示 *FOA1* 在该时间点的相对表达量设为 1

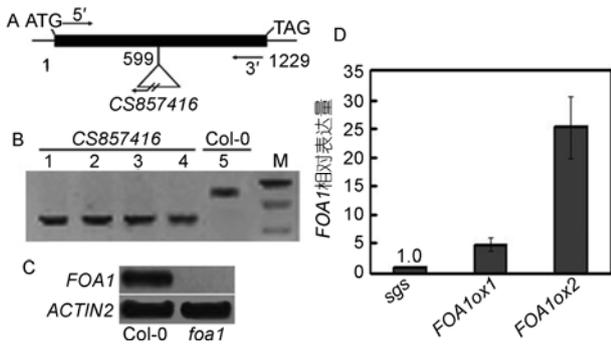


图3 T-DNA 插入突变体及过量表达转基因株系的分子鉴定
 A: T-DNA 在 *FOA1* 基因组中的插入位点; B: T-DNA 插入突变体纯合子鉴定的 PCR 电泳图, 1~4 为突变体株系, 5 为野生型 Col-0, M 为 DNA marker; C: RT-PCR 分析 *FOA1* 在 T-DNA 插入突变体中的表达, *ACTIN2* 为内参; D: 实时定量 PCR 分析 *FOA1* 在转基因株系 *FOA1ox1* 和 *FOA1ox2* 中的表达, 图中 1.0 表示 *FOA1* 基因在 *sgs* 中的相对表达量设为 1

时, 过量表达株系根的伸长对 ABA 的敏感性降低,

受 ABA 抑制的程度较野生型 *sgs* 小(图 5), 表明 *FOA1* 基因在一定程度上参与了 ABA 对种子萌发及根伸长的抑制作用, 并可能起负调节作用。

2.5 FOA1 参与 ABA 调节气孔关闭和蒸腾失水速率

众所周知, ABA 可诱导气孔关闭. 为研究 *FOA1* 是否参与 ABA 调节气孔关闭, 将野生型、突变体及过量表达植株的莲座叶, 在气孔开放缓冲液中浸泡 10 h, 使气孔完全打开, 然后加入不同浓度 ABA 浸泡 2 h. 结果发现, ABA 处理之前(0 $\mu\text{mol/L}$ ABA), *foa1* 缺失突变体的气孔开度比野生型大(图 6A), 纵横径比值比野生型高(图 6B). ABA 处理促进气孔关闭, 且突变体对 ABA 敏感, ABA 为 10 $\mu\text{mol/L}$ 时, 突变体的气孔纵横径比值比野生型低(图 6B). 与突变体相反, ABA 处理之前(0 $\mu\text{mol/L}$ ABA), *FOA1ox1* 和 *FOA1ox2* 过量表达株系的气孔开度比野生型小(图 6A), 气孔纵横径比值比野生型 *sgs* 明显要小(图 6B). ABA 为 10

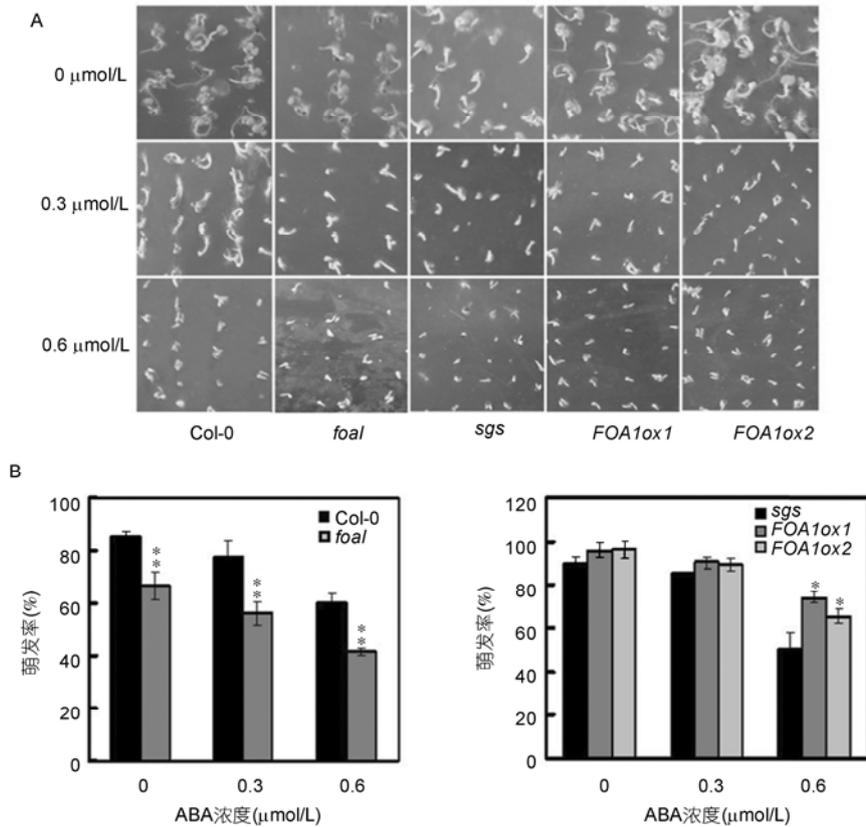


图4 野生型、突变体 *foa1* 和过量表达株系 *FOA1ox1* 和 *FOA1ox2* 的种子萌发对不同浓度外源 ABA 的反应

A: 野生型、突变体 *foa1* 和过量表达株系 *FOA1ox1* 和 *FOA1ox2* 的种子萌发情况; B: 与 A 中相对应的野生型、突变体 *foa1* 和过量表达株系 *FOA1ox1* 和 *FOA1ox2* 的种子萌发率. *和**分别表示野生型与突变体或过量表达转基因株系相比, *t* 测验的 $P<0.05$ 和 $P<0.01$

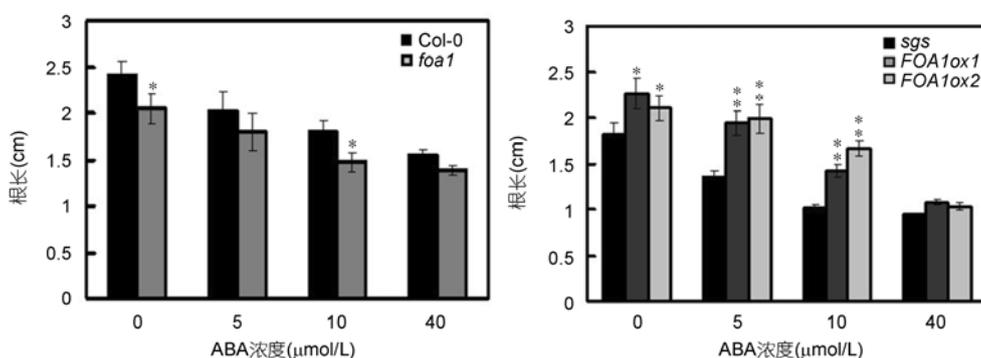


图5 野生型、突变体 *foa1* 和过量表达株系 *FOA1ox1* 和 *FOA1ox2* 根的伸长对不同浓度外源 ABA 的反应
将幼苗在 MS 培养基上培养 3 天, 然后移植到含不同浓度 ABA(0, 5, 10, 40 μmol/L) 的 MS 固体培养基表面, 继续培养 6 天后, 测其根长。图中数据为至少 20 株幼苗根长的平均值。*和**分别表示野生型与突变体或过量表达转基因株系相比, *t* 测验的 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$

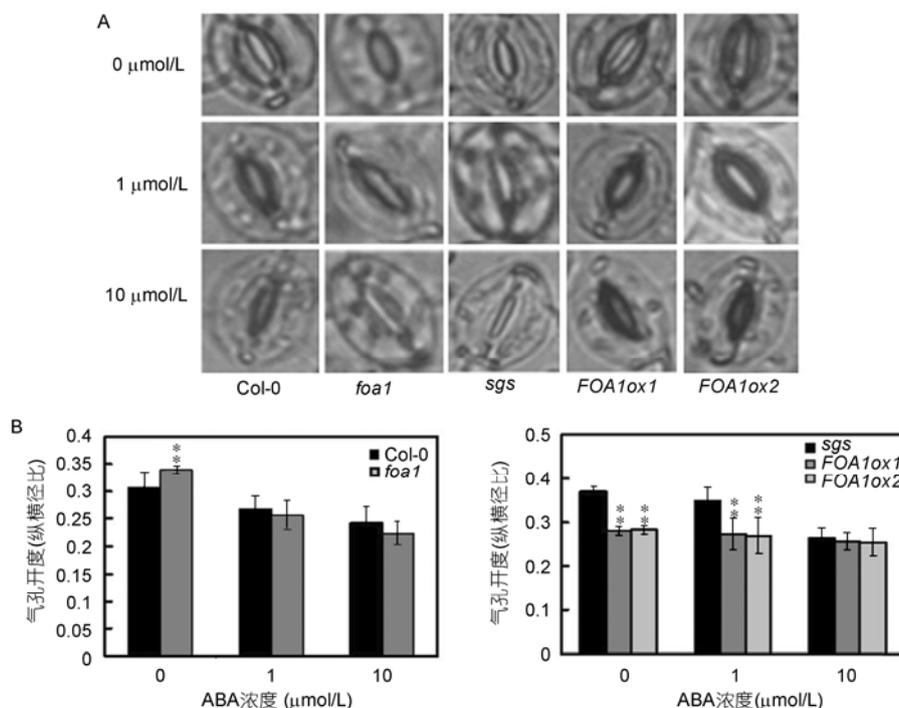


图6 ABA 处理前后野生型、突变体 *foa1* 和过量表达株系 *FOA1ox1* 和 *FOA1ox2* 气孔开度变化

A: 不同浓度 ABA 处理后野生型、突变体 *foa1* 和过量表达株系 *FOA1ox1* 和 *FOA1ox2* 气孔开度的变化; B: 与 A 中相对应的气孔纵横径比值变化统计。*和**分别表示野生型与突变体或过量表达转基因株系相比, *t* 测验的 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$

μmol/L 时, 野生型的气孔纵横径比值明显下降, 而过量表达株系的气孔纵横径比值无明显变化(图 6B)。结果表明, *FOA1* 突变或过量表达可改变气孔开度, 并且在 ABA 调控气孔关闭过程中也可能起负向作用。ABA 对气孔开闭的调控通常影响植物的蒸腾失水速率, 这也是植物应对干旱胁迫的一种重要调控机制^[16,27]。

为研究 *FOA1* 是否参与 ABA 调控植物的蒸腾失水速率, 取野生型、突变体、过量表达植株的叶片, 放在室温 25℃、60%湿度的环境下干燥, 每隔半小时称一次重量, 计算失水率。与气孔关闭对 ABA 的反应结果不相一致, 在本研究 ABA 处理时间范围内, *foa1* 缺失突变体的蒸腾失水速度比野生型快, 失水率约为

野生型的1.5倍; 过量表达株系 *FOA1ox1* 和 *FOA1ox2* 的蒸腾失水速度则比野生型慢, 失水率比野生型低1.5~2倍(图7). 这可能与 ABA 处理之前 *foa1* 突变体的气孔孔径比野生型大, 而过量表达株系的气孔孔径比野生型小有关(图6).

2.6 FOA1 参与 ABA 影响植物体内脯氨酸的积累

有研究报道外源 ABA 处理可导致包括大麦、玉米、水稻、大豆和拟南芥在内的植物体内脯氨酸的积累^[28]. 本研究测定了 ABA 处理前后野生型、突变体及过量表达植株体内脯氨酸的含量. 研究发现, ABA 处理后, 野生型、突变体和过量表达植株体内脯氨酸积累增加, 但野生型和突变体之间存在明显差异. *foa1* 突变体中脯氨酸的含量约增加了1.2倍, 野生型 Col-0 中则约增加了1倍(图8); *FOA1* 过量表达植株体内脯氨酸的含量约增加了0.7倍, 野生型 *sgs* 中则约增加了1.6倍(图8). 这说明 ABA 处理条件下, *foa1*

突变体中脯氨酸的增加量要明显高于野生型 Col-0, *FOA1* 过量表达植株体内脯氨酸的增加量要明显低于野生型 *sgs*, 表明 *FOA1* 在 ABA 调节脯氨酸在植物体内的积累过程中也可能起负调节作用.

2.7 FOA1 调节 ABA 及胁迫应答基因的表达

为进一步从分子水平上证明 *FOA1* 在 ABA 信号通路中起作用, 本研究采用实时荧光定量 PCR 方法检测比较了 ABA 胁迫条件下野生型和 *foa1* 缺失突变体中一系列 ABA、干旱、盐胁迫相关基因, 包括转录因子 *ABI1*^[29]和 *ABF3*^[30], 与 *ABF3* 互作的蛋白激酶 *OST1*^[31]以及 ABA 和胁迫应答基因 *RD29A*, *RD29B* 和 *RD22*^[32,33]的表达变化情况. 研究结果显示, 所有被检测基因都受 ABA 诱导, 但在突变体和野生型中的表达量存在差异(图9). 其中 *ABI1*, *OST1* 和 *ABF3* 在 *foa1* 突变体中的表达量高于野生型, *RD29A*, *RD29B* 和 *RD22* 在 *foa1* 突变体中的表达量则低于野

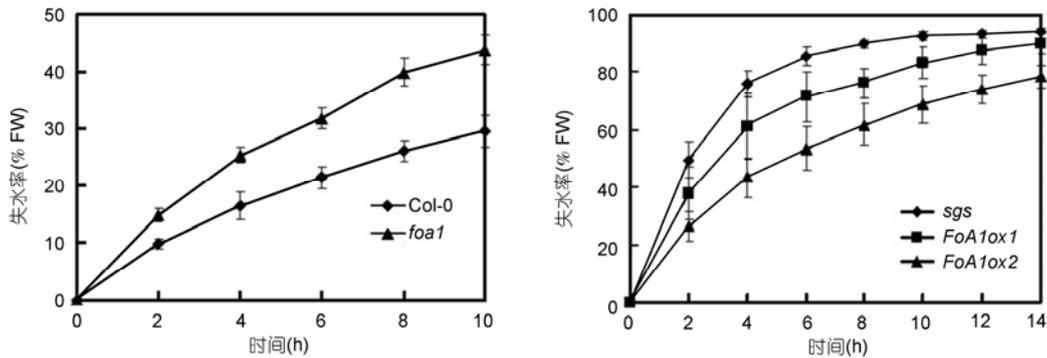


图7 野生型、突变体 *foa1* 和过量表达株系 *FOA1ox1* 和 *FOA1ox2* 的蒸腾失水率
FW: 鲜重

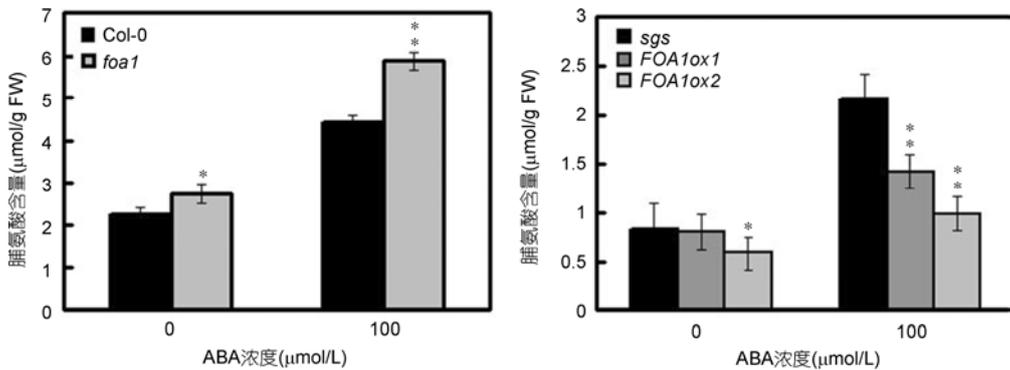


图8 ABA 处理前后野生型、突变体 *foa1* 和过量表达株系 *FOA1ox1* 和 *FOA1ox2* 中脯氨酸的积累量
FW: 鲜重, *和**分别表示野生型与突变体或过量表达转基因株系相比, *t* 测验的 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$

生型(图 9), 表明 *FOA1* 基因缺失可导致 ABA、干旱、盐胁迫应答相关基因的表达发生变化, 进一步说明 *FOA1* 是 ABA 信号相关基因, 并可能通过 ABA 信号通路在植物应对逆境胁迫过程中发挥作用。

3 讨论

F-box 蛋白作为 SCF 复合物的成员通过识别靶蛋白并介导靶蛋白的降解, 从而调控许多激素信号转导, 包括 GA^[7]、生长素^[9]、乙烯^[10]信号转导。近来也发现一些参与 ABA 信号转导的 F-box 蛋白^[34]。如 F-box 蛋白 EDL3 是 ABA 信号转导的正调节子, 参与调控种子萌发、根的生长、黄花苗转绿和开花^[8]; F-box 蛋白 TLP9 可能通过识别 ABA 信号转导负调节子参与调控 ABA 介导的反应, 致使 *TLP9* 突变体对 ABA 不敏感, *TLP9* 过量表达株系对 ABA 超敏感^[35]; F-box 蛋白 DOR 突变促进气孔关闭, 增强植物的耐旱性, 相反 DOR 过量表达导致植物对干旱胁迫更加敏感, 说明 DOR 通过 ABA 信号通路负调控植物的干旱胁迫响应过程^[16]。本研究结果表明, F-box 蛋白 *FOA1* 是 ABA 信号通路相关因子, 参与 ABA 调控拟南芥种子萌发、根的伸长、气孔关闭、植物蒸腾失水速率以

及脯氨酸的积累。

本研究首先分析了 F-box 基因 *FOA1* 在不同组织器官的表达, 发现 *FOA1* 在各个组织器官中都有表达, 根和花中表达最高(图 1), 推测该基因可能参与植物根和花的发育。之后的研究结果显示, 突变体 *foa1* 的主根变短, 过量表达株系 *FOA1ox1* 和 *FOA1ox2* 的主根变长(图 5), 但突变体、过量表达株系成年植株的开花时间及花的发育与野生型之间无明显差异, 说明 *FOA1* 可能在根的伸长生长中起正调控作用, 但对开花无影响。

FOA1 基因的启动子中含有 ABA 反应元件 ABRE, 实时定量 PCR 检测结果证实了外源 ABA 和 NaCl 可迅速诱导 *FOA1* 基因的表达(图 2), 说明该基因可能是 ABA 信号通路相关基因, 并可能参与盐胁迫应答反应。分析突变体 *foa1* 及过量表达株系 *FOA1ox1* 和 *FOA1ox2* 的表型发现, *FOA1* 突变导致种子萌发、根伸长、气孔关闭对 ABA 更加敏感; 相反, *FOA1* 过量表达导致种子萌发、根伸长、气孔关闭对 ABA 的敏感性较野生型有所降低; ABA 处理条件下, 脯氨酸在 *foa1* 突变体中的积累量明显高于野生型 Col-0, 在 *FOA1* 过量表达株系中的积累量则明显低于野生型 *sgs*。上述研究结果表明, *FOA1* 可能在 ABA

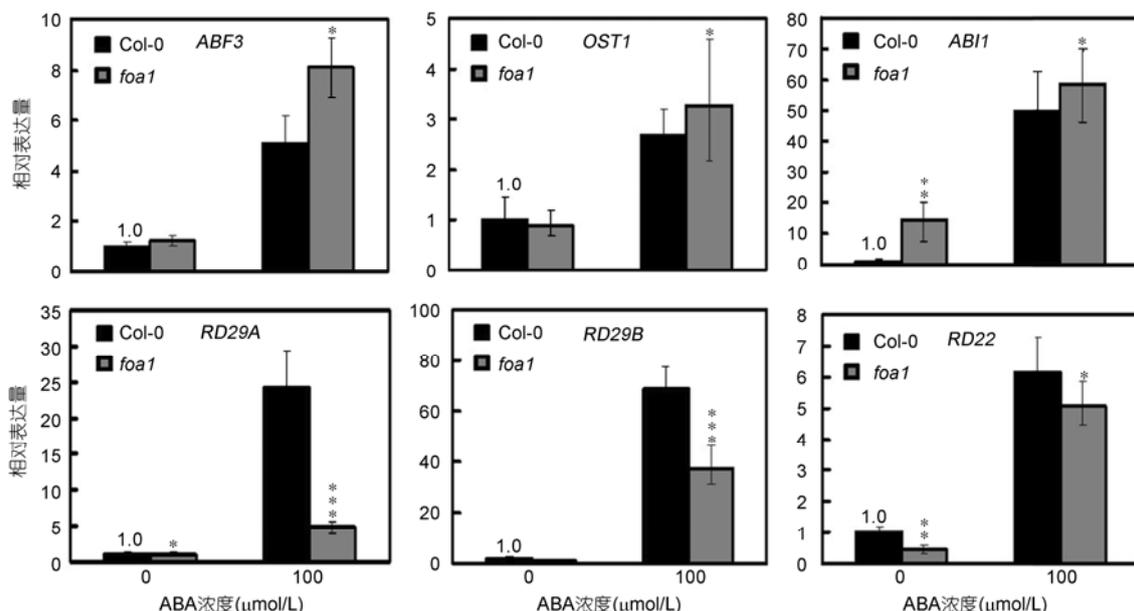


图 9 ABA 处理条件下 *foa1* 突变体中 ABA 及胁迫应答基因的表达

将 14 龄野生型及突变体幼苗用 100 μmol/L ABA 处理 0 和 6 h 后, 收集材料, 提取 RNA, 采用实时荧光定量 PCR 分析比较野生型、突变体 *foa1* 中 ABA 及胁迫应答基因的表达情况。*, **和*** 分别表示野生型与突变体相比, *t* 测验的 $P < 0.05$, $P < 0.01$ 和 $P < 0.001$ 。图中 1.0 表示将 *FOA1* 基因在没有用 ABA 处理的 Col-0 中的相对表达量设为 1

信号转导通路中起负调控作用. 有研究表明, 胁迫条件下植物体内脯氨酸含量的高低在一定程度上反映了植物抗逆性的强弱^[28], 由此可推测 *FOAI* 基因可能参与依赖于 ABA 的植物抗逆境反应. 本研究中还发现, 拟南芥 Col-0 与突变体 *sgs* 的种子萌发、根伸长、气孔关闭对于 ABA 反应的敏感性存在一定差异(图 4~6), 这可能与 *sgs* 突变体中所携带的隐性单基因突变有关^[23].

ABA 及胁迫应答基因表达分析结果显示, 在 ABA 信号通路中起正调节作用的转录因子 *ABF3*^[30,36], 在 *foal* 突变体中的表达量比野生型中要高, 受 ABA 激活且对 *ABF3* 有激活作用的 *OST1*^[32] 的转录水平在突变体中的表达也较野生型高, 说明 *FOAI* 突变可加强 ABA 信号转导, 这与 *foal* 突变体对 ABA 的超敏感表型相一致. 有研究报道, 在 ABA 信号转导中起负调节作用的编码 PP2Cs (protein phosphatases 2C) 的 *ABI1* 受 ABA 强烈诱导^[8,25,29,36], 在 ABA 信号增强

的 *ABF3*, *ABF4*^[30] 及 *TSK1*^[36] 过量表达植株中的表达增加, 在 ABA 信号减弱的 ABA 不敏感突变体 *abi5-1* 和 *snrk2.2/snrk2.3/snrk2.6* 三突变体中的转录水平则下降^[37]. 与前人的研究结果相一致, 本研究中 *ABI1* 在 ABA 敏感突变体 *foal* 中的表达量增加. 有研究表明, *RD29A*, *RD29B* 和 *RD22* 受盐、干旱、冷及外源 ABA 强烈诱导^[32,33]. 本研究中也发现, ABA 处理可导致拟南野生型及突变体芥幼苗中 *RD29A*, *RD29B* 和 *RD22* 的表达量明显增加, 但突变体中的表达水平比野生型中低. 这说明 *FOAI* 突变可导致 ABA 及胁迫应答基因的转录水平发生变化, 进一步证明了 *FOAI* 基因是 ABA 信号通路相关基因, 并可能参与调控植物的胁迫应答反应.

FOAI 蛋白具有 F-box 结构域, 因此可能作为 SCF 复合物的组分, 通过调节 ABA 及胁迫应答基因相关转录因子的降解而参与 ABA 信号转导及胁迫应答反应, 这还需要作深入研究验证.

致谢 感谢美国加州大学洛杉矶分校林辰涛教授对本文的指导.

参考文献

- Gagne J M, Downes B P, Shiu S, et al. The F-box subunit of the SCF E3 complex is encoded by a diverse superfamily of genes in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 11519–11524
- Lechner E, Achard P, Vansiri A, et al. F-box proteins everywhere. *Curr Opin Plant Biol*, 2006, 9: 631–638
- Smalle J, Vierstra R D. The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Annu Rev Plant Biol*, 2004, 55: 555–590
- Somers D E, Fujiwara S. Thinking outside the F-box: novel ligands for novel receptors. *Trends Plant Sci*, 2009, 14: 206–213
- Petroski M D, Deshaies R J. Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, 6: 9–20
- Schwechheimer C, Willige B C, Zourelidou M, et al. Examining protein stability and its relevance for plant growth and development. *Methods Mol Biol*, 2009, 479: 147–171
- Wang F, Deng X W. Plant ubiquitin-proteasome pathway and its role in gibberellin signaling. *Cell Res*, 2011, 21: 1286–1294
- Koops P, Pelser S, Ignatz M, et al. EDL3 is an F-box protein involved in the regulation of abscisic acid signalling in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot*, 2011, 62: 5547–5560
- Potuschak T, Lechner E, Parmentier Y, et al. EIN3-dependent regulation of plant ethylene hormone signaling by two *Arabidopsis* F-box proteins: EBF1 and EBF2. *Cell*, 2003, 115: 679–689
- Kepinski S, Leyser O. The *Arabidopsis* F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature*, 2005, 435: 446–451
- Samach A, Klenz J E, Kohalmi S E, et al. The UNUSUAL FLORAL ORGANS gene of *Arabidopsis thaliana* is an F-box protein required for normal patterning and growth in the floral meristem. *Plant J*, 1999, 20: 433–445
- Ni W, Xie D, Hobbie L, et al. Regulation of flower development in *Arabidopsis* by SCF complexes. *Plant Physiol*, 2004, 134: 1574–1585
- Lee J H, Kim W T. Regulation of abiotic stress signal transduction by E3 ubiquitin ligases in *Arabidopsis*. *Mol Cell*, 2011, 31: 201–208
- Lyzenga W J, Stone S L. Abiotic stress tolerance mediated by protein ubiquitination. *J Exp Bot*, 2011, 63: 599–616
- Yan Y S, Chen X Y, Yang K, et al. Overexpression of an F-box protein gene reduces abiotic stress tolerance and promotes root growth in rice. *Mol Plant*, 2011, 4: 190–197
- Zhang Y, Xu W Y, Li Z H, et al. F-box protein DOR functions as a novel inhibitory factor for abscisic acid-induced stomatal closure under

- drought stress in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2008, 148: 2121–2133
- 17 Sharma N, Shen H, Luong P, et al. Regulation of drought tolerance by the F-box protein MAX2 in *Arabidopsis*. *Plant Biology*, Conference in Meridia. Mexico, 2008, 126
 - 18 Jia Y, Gu H, Wang X, et al. Molecular cloning and characterization of an F-box family gene CarF-box1 from chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Mol Biol Rep*, 2011, 39: 2337–2345
 - 19 宁约瑟, 王国梁, 谢旗. 泛素连接酶 E3 介导的植物干旱胁迫反应. *植物学报*, 2011, 46: 606–616
 - 20 Calderon-Villalobos L I, Nill C, Marrocco K, et al. The evolutionarily conserved *Arabidopsis thaliana* F-box protein AtFBP7 is required for efficient translation during temperature stress. *Gene*, 2007, 392: 106–116
 - 21 Kuroda H, Takahashi N, Shimada H, et al. Classification and expression analysis of *Arabidopsis* F-Box-containing protein genes. *Plant Cell Physiol*, 2002, 43: 1073–1085
 - 22 Clough S J, Bent A F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 1998, 16: 735–743
 - 23 Elmayan T, Balzergue S, Beon F, et al. *Arabidopsis* mutants impaired in cosuppression. *Plant Cell*, 1998, 10: 1747–1758
 - 24 Pei Z M, Kuchitsu K, Ward J M, et al. Differential abscisic acid regulation of guard cell slow anion channels in *Arabidopsis* wild-type and *abi1* and *abi2* mutants. *Plant Cell*, 1997, 9: 409–423
 - 25 Shan H, Chen S, Jiang J, et al. Heterologous expression of the chrysanthemum R2R3-MYB transcription factor CmMYB2 enhances drought and salinity tolerance, increases hypersensitivity to ABA and delays flowering in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Biotechnol*, 2012, 51: 160–173
 - 26 Serpil Ü, Yüksel K, Elif Ü. Proline and ABA levels in two sunflower genotypes subjected to water stress. *Bulg J Plant Physiol*, 2004, 30: 34–47
 - 27 Kim Y Y, Jung K W, Yoo K S, et al. A stress-responsive caleosin-like protein, AtCLO4, acts as a negative regulator of ABA responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol*, 2011, 52: 874–884
 - 28 Savouré A, Hua X J, Bertauche N, et al. Abscisic acid-independent and abscisic acid-dependent regulation of proline biosynthesis following cold and osmotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet*, 1997, 254: 104–109
 - 29 Leung J, Merlot S, Giraudat J. The *Arabidopsis* *ABSCISIC ACID-INSENSITIVE2 (ABI2)* and *ABI1* genes encode homologous protein phosphatases 2C involved in abscisic acid signal transduction. *Plant Cell*, 1997, 9: 759–771
 - 30 Kang J Y, Choi H I, Im M Y, et al. *Arabidopsis* basic leucine zipper proteins that mediate stressresponsive abscisic acid signaling. *Plant Cell*, 2002, 14: 343–357
 - 31 Sirichandra C, Avanture M, Turk B E, et al. The *Arabidopsis* ABA-activated kinase OST1 phosphorylates the bZIP transcription factor ABF3 and creates a 14-3-3 binding site involved in its turnover. *PLoS One*, 2010, 5: e13935
 - 32 Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. A novel cis acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *Plant Cell*, 1994, 6: 251–264
 - 33 Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. The plant hormone abscisic acid mediates the drought-induced expression but not the seed-specific expression of *rd22*, a gene responsive to dehydration stress in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet*, 1993, 238: 97–105
 - 34 Liu H, Stone S L. E3 ubiquitin ligases and abscisic acid signaling. *Plant Signal Behav*, 2011, 6: 344–348
 - 35 Lai C P, Lee C L, Chen P H, et al. Molecular analyses of the *Arabidopsis* TUBBY-like protein gene family. *Plant Physiol*, 2004, 134: 1586–1597
 - 36 Li C, Liu Z, Zhang Q, et al. SKP1 is involved in abscisic acid signalling to regulate seed germination, stomatal opening and root growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ*, 2012, 35: 952–965
 - 37 Nakashima K, Fujita Y, Kanamori N, et al. Three *Arabidopsis* SnRK2 protein kinases, SRK2D/SnRK2.2, SRK2E/ SnRK2.6/OST1 and SRK2I/SnRK2.3, involved in ABA signaling are essential for the control of seed development and dormancy. *Plant Cell Physiol*, 2009, 50: 1345–1363