

核桃 *JrGA20ox1* 基因表达砧木对野生型接穗的性状调控

王凤敏¹ 张启香¹ 黄坚钦¹

(¹ 浙江农林大学亚热带森林培育国家重点实验室, 浙江省杭州市, 311100)

摘要:【目的】本研究建立了基于核桃赤霉素氧化酶基因 *JrGA20ox1* 表达砧木的微型嫁接体系, 旨在阐明干旱胁迫下核桃砧木和接穗之间 *JrGA20ox1* 衍生信号通信的机制, 为果树砧穗信号调控机理研究提供技术平台和理论依据。【方法】本研究建立了基于核桃赤霉素氧化酶基因 *JrGA20ox1* 表达砧木的微型嫁接体系, 分别以核桃 *JrGA20ox1*-OE、*JrGA20ox1*-RNAi 和野生型植株为砧木, 核桃野生型植株为接穗进行嫁接, 待嫁接单元愈合完全后对接穗进行株高、节间长、气孔形态等表型观察、生理指标测定、转录组测序、sRNA 测序等, 筛选差异基因, 并利用荧光定量 PCR 和双荧光素酶报告系统实验对差异基因进行进一步验证。【结果】(1) 核桃砧木 *JrGA20ox1* 表达量负调控野生型接穗的抗旱性。对 WT/WT、WT/OE、WT/RNAi 微型嫁接植株干旱胁迫 2 W 后, WT/RNAi 嫁接组合接穗的生长状况良好, 叶片翠绿, 而 WT/OE 和 WT/WT 嫁接组合接穗的叶片呈现黄化脱落。WT/RNAi 嫁接组合接穗的自然失水率和气孔开度显著低于 WT/WT, WT/OE 嫁接组合接穗的自然失水率和气孔开度显著高于 WT/WT; 进一步研究发现 WT/RNAi 嫁接组合接穗的内源 ABA 含量显著高于 WT/WT, WT/OE 嫁接组合接穗的内源 ABA 含量显著低于 WT/WT。(2) 砧木 *JrGA20ox1* 基因 DNA、mRNA 及其蛋白质未向野生型接穗移动, 活性 GAs 可向野生型接穗移动。对干旱胁迫下 WT/WT 和 WT/OE 嫁接组合的野生型接穗进行 PCR、qRT-PCR 和 GFP 荧光信号观察, 发现 *JrGA20ox1*-GFP 的 DNA 和 GFP 荧光仅存在 *JrGA20ox1*-OE 砧木中, WT/OE 与 WT/WT 接穗 *JrGA20ox1* 表达量无显著差异, 表明砧木 *JrGA20ox1* 基因 DNA、mRNA 及其蛋白质未向野生型接穗移动。分别测定各嫁接组合砧穗活性 GAs 含量发现, WT/OE 接穗中 GA₄ 含量显著高于 WT/WT, WT/RNAi 接穗中 GA₁、GA₄ 和 GA₇ 的含量显著低于 WT/WT 接穗; 表明 GA₄ 或其前体 GA₁₂ 从 *JrGA20ox1* 过表达砧木移动到野生型接穗。表明砧木 *JrGA20ox1* 基因 DNA、mRNA 及其蛋白质未向野生型接穗移动, 活性 GAs 向野生型接穗移动, 进而影响接穗的生长和抗旱性。(3) *JrGA20ox1*-RNAi 砧木中产生的 sRNAs 传递到野生型接穗。对干旱胁迫下 WT/WT 和 WT/RNAi 嫁接组合的野生型接穗进行 qRT-PCR, 发现与 WT/WT 相比, WT/RNAi 接穗 *JrGA20ox1* 表达量降低; 而 sRNAs 测序发现在 WT/RNAi 接穗中约比对到 2069 条目标 sRNAs, 其中最多的是 21-nt sRNAs, 其次是 24-nt sRNAs, 而在 WT/WT 接穗中, 几乎比对不到目标 sRNAs。表明 *JrGA20ox1*-RNAi 砧木中产生的 sRNAs 转移到野生型接穗, 影响了接穗 *JrGA20ox1* 的表达, 进而使野生型接穗中活性 GAs 含量下降, 从而影响野生型接穗的抗旱性。(4) 砧木 *JrGA20ox1* 基因表达调控野生型接穗干旱胁迫响应转录因子 LOL1 和 FAR1, 进而调控 *LUBP* 和 *Stigl* 等多个干旱胁迫响应基因, 从而调控野生型接穗抗旱性。利用转录组测序技术对 WT/WT、WT/OE、WT/RNAi 在干旱胁迫条件下的野生型接穗进行测序, 获得 49 个干旱胁迫响应基因, 其中包含两个转录因子 LOL1 和 FAR1, 且 49 个响应干旱胁迫基因中 37 个基因响应外源 GAs 处理。双荧光素酶报告系统实验和酵母单杂交验证干旱相应基因的上游调控机制发现, 干旱胁迫响应转录因子 LOL1 和 FAR1 与分别调控 12 个和 11 个干旱胁迫响应基因启动子, 并存在多个结合位点。

表明砧木 *JrGA20ox1* 表达影响转录因子 FAR1 和 LOL1 与 LUBP 和 *Stig1* 等启动子的多个位点相结合, 进而响应干旱胁迫。【结论】本研究基于核桃 *JrGA20ox1* 基因表达砧木的微型嫁接体系, 验证了 *JrGA20ox1* 基因 DNA、mRNA 及其蛋白质不由砧木向野生型接穗移动, sRNAs 和活性 GAs 等可由砧木向野生型接穗移动, 调控野生型接穗的生长及抗旱性。为阐明木本植物砧穗间信号传递及调控机制提供了研究模型, 具有重要的理论和实践价值。