

大豆 RNA 依赖的 RNA 聚合酶基因 *GmRDR1* 的克隆与表达特性分析

吴冰月^{1,2}, 沈 良^{1,2}, 宋普文^{1,3}, 陈华涛¹, 崔 瑾², 许晓明², 陈 新¹

(1. 江苏省农业科学院 蔬菜研究所, 江苏 南京 210014; 2. 南京农业大学 生命科学学院, 江苏 南京 210095; 3. 南京农业大学 农学院, 江苏 南京 210095)

摘 要: 为了寻找大豆抗病新基因, 培育大豆新型抗性品种, 利用同源克隆的方法从大豆品种科丰 1 号中分离出 1 个新的 *GmRDR1* 基因, 并对其进行序列分析, 组织表达、抗逆境胁迫表达分析及该基因的亚细胞定位研究。结果表明: *GmRDR1* 基因位于大豆基因组的第 2 号染色体, 基因全长为 3 956 bp, 其中 ORF 为 3 378 bp, 编码 1 125 个氨基酸, 相对分子量和等电点分别为 279.72×10^3 和 4.63; *GmRDR1* 含有 RDRs 家族的保守序列“DLGD”; 该基因在所有被检测组织中均表达, 并且在叶中的表达量最高; 荧光定量结果发现: 在大豆花叶病毒 (*Soybean mosaic virus*, SMV) 处理下, *GmRDR1* 在抗病材料科丰 1 号中的表达量显著高于感病材料南农 1138-2。盐及干旱胁迫下, 48 h 之内, 该基因的表达量明显升高, SA 诱导条件下该基因在 6 h 出现了早期响应, 冷害处理下 24 h 表达量出现了突然的升高。*GmRDR1* 基因的亚细胞定位结果表明: 该基因所编码的蛋白定位在细胞核里。根据以上结果判定 *GmRDR1* 基因参与了大豆对 SMV 的抗性反应, 并且能够强烈响应盐和干旱的胁迫, 因此该基因在大豆抗逆分子育种中具有较好的应用价值。

关键词: 大豆; 基因克隆; 组织表达; 荧光定量 PCR; 生物胁迫; 非生物胁迫; 亚细胞定位

中图分类号: S565.1 **文献标识码:** A **DOI:** 10.11861/j.issn.1000-9841.2015.01.0019

Cloning and Expression Pattern Analysis of a RNA - dependant RNA Polymerase Gene *GmRDR1* in Soybean

WU Bing - yue^{1,2}, SHEN Liang^{1,2}, SONG Pu - wen^{1,3}, CHEN Hua - tao¹, CUI Jin², XU Xiao - ming², CHEN Xin¹

(1. Institute of Vegetable Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 2. College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 3. College of Agronomy, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: In order to find new resistant gene and cultivate new resistant varieties of soybean, a novel soybean gene named *GmRDR1* was identified using homologous cloning method. Sequence of the gene was analyzed by bioinformatics software, expression pattern of the gene in different tissues and its response to biotic and abiotic stresses were performed using real - time PCR. The transformation system of onion epidermal cells mediated *Agrobacterium* was established for subcelluar localization. The results showed that *GmRDR1* gene was located on chromosome 2 in soybean and the length was 3 956 bp. The ORF of *GmRDR1* was 3 378 bp and encoded 1 125 amino acids (279.72 kDa) with an isoelectric point of 4.63. The conserved motif ‘DLGD’ of RDRs gene family was identified in *GmRDR1*. The expression pattern of the gene was identified in all tissues of soybean, and showed the highest expression level in leaves of soybean; Real - time PCR analysis revealed that mRNA levels of the gene in the resistant material Kefeng 1 were much higher than the susceptible material Nannong 1138 - 2 after *soybean mosaic virus* (SMV) treatment. For abiotic stress, *GmRDR1* showed high expression levels under salt stress and drought treatment. There was an early response after 6 hours ABA treatment, the expression level of *GmRDR1* gene showed a suddenly rise after 24 hours under chilling stress. The result of subcellular localization revealed that *GmRDR1* gene encoding the protein was located in the nucleus. Therefore, a preliminary judgment was that *GmRDR1* gene had the function of salt and drought tolerance, and it was involved in the resistant response in soybean. The new gene showed the value for breeding resistant soybean cultivar by molecular breeding method.

Keywords: Soybean; Gene cloning; Expression pattern; Biotic stress; Abiotic stress; Subcellular localization

RNA 依赖的 RNA 聚合酶 (RNA - dependant RNA polymerase, RDR 或 RdRP, EC2.7.7.48) 是一类能以 RNA 为模板从 5' 到 3' 方向进行延伸合成互补 RNA 链的聚合酶的统称^[1], 最初是在卷心菜中被发现的, 随后在棉花、烟草、真菌、RNA 病毒以及原生物中也发现了 RDR 的存在, 但是在果蝇、老鼠以及人的体内还未发现^[2]。植物中的 RDR 是一个大家族, 目前在拟南芥中分离了 6 个同源基因 [*AtRDR1*、*AtRDR2* (*RDR2a*)、*AtRDR3* (*RDR2b*)、*AtRDR4* (*RDR3a*)、*AtRDR5* (*RDR3b*)、*AtRDR6*^[3]] 在水稻中已经分离了 5 个同源基因 (*OsRDR1*、*OsRDR2*、*OsRDR3a*、*OsRDR3b*、*OsRDR6*)^[4]。RDRS 主要是通过基因沉默途径参与植物的生长发育调节、逆境表达以及表观遗传修饰等多种生物学过程,

收稿日期: 2014 - 03 - 19
基金项目: 转基因生物新品种培育重大专项 (2011ZX08004 - 004); 江苏省农业科技自主创新项目 (CX(13)3001); 江苏省自然科学基金 (BK2012374)。
第一作者简介: 吴冰月 (1989 -), 女, 硕士, 主要从事大豆抗逆分子遗传学研究。E - mail: why1989@126.com。
通讯作者: 陈新 (1970 -), 男, 博士, 研究员, 主要从事豆类作物分子遗传及育种研究。E - mail: cx@jaas.ac.cn。

目前已经鉴定出3种功能独特的基因 *RDR1*、*RDR2* 和 *RDR6*。

RDR1 基因已在多种植物中被分离出来,如拟南芥、棉花以及番茄等^[3,5,6]。*RDR1* 主要具有以下功能:该基因在植物中的表达受多种内源信号分子、生物以及非生物逆境胁迫的调节,MeJA 和 SA 等内源激素可以诱导植物 *RDR1* 的表达,不同植物 *RDR1* 基因对病毒、细菌和真菌的诱导表达具有选择性,在盐和冷害等环境胁迫条件下 *RDR1* 基因的表达量都发生了变化^[3,5,7,8];此外,*RDR1* 基因具有抗病性,像 *RDR2* 和 *RDR6* 一样,该基因对拟南芥内源性 siRNAs 的数量有影响,尽管这方面还没得到具体的细节证实^[9],在被病毒感染的植物中,*RDR1* 基因的主要作用在于能够生产和放大病毒诱导的外源性的 siRNAs 数量^[10-11],另外还有研究证实 *RDR1* 基因可以保护植物免受虫害^[12]。

大豆花叶病毒(SMV)严重影响了大豆的产量,目前的研究致力于筛选抵抗该病毒病的抗性品种^[13],这对于新型抗性品种的培育至关重要,目前在大豆中还没有 *RDR1* 基因的相关报道。本研究利用同源克隆的方法从大豆中分离出了1个新的 *GmRDR1* 基因,通过生物信息学方法对其进行序列分析,确定它们属于 *RDR1* 家族,利用荧光定量 PCR 检测它们在大豆不同组织器官中的表达情况以及在生物胁迫 SMV 以及非生物胁迫下的表达特征,通过农杆菌介导的洋葱表皮亚细胞对该基因表达的蛋白质进行定位,旨在为进一步探究该基因的功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株、载体及试剂

大豆抗病品种科丰1号,大豆感病品种南农1138-2,大豆花叶病毒(SMV)SC18株系毒样,大肠杆菌DH5 α 均由江苏省农业科学院蔬菜研究所豆类作物分子生物学实验室保存。分子量标准5000 bp Marker (TaKaRa),荧光定量酶SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa),植物RNAprep Pure提取试剂盒(天根),质粒小提试剂盒(天根),反转录酶(Fermentas),基因克隆酶Long Taq PCR Mix(东胜),胶回收试剂盒(OMEGA),T-A克隆载体T-easy(Promega),Fast-Digest KpnI (Thermo Scientific),ABI7500 荧光定量PCR仪(ABI)。引物合成以及测序由上海英骏生物技术有限公司(Invitrogen)完成。

1.2 方法

1.2.1 *GmRDR1* 基因的克隆 当大豆品种科丰1号生长至两叶期时取其叶片提取总RNA,RNA的提取方法参照天根公司的RNAprep Pure 试剂盒说明书;用 Ferment-as 公司的反转录试剂盒合成 cDNA

的第1链,合成方法参照说明书;根据拟南芥 *AtRDR1* 基因的保守序列比对大豆的全基因组序列(<http://www.phytozome.net/>),用 Primer 3 在线设计引物,GmRDR1 上游引物 F: 5' ATGGGAAAAA-CAATTGAGTTGT3';下游引物 R: 5' TCAACTCAAACGCAACCCAC3'。内参 tubulin 的上游引物 F: 5' CTCTTGGAGCACACC - GATG 3';下游引物 R: 5' TGATGGTGGCAACAGCAG3'。PCR 反应体系(25 μ L):Long Taq PCR Mix 12.5 μ L,PCR enhancer 4 μ L,cDNA 1 μ L,上下游引物各 1 μ L,最后用 ddH₂O 补足至 25 μ L。PCR 反应程序:94 $^{\circ}$ C 3 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,52 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 4 min,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物经过割胶回收后与 T 载体连接,转化大肠杆菌感受态细胞,筛选阳性克隆送 Invitrogen 公司测序。

1.2.2 生物信息学分析 *GmRDR1* 基因编码的氨基酸序列、蛋白质分子量、等电点由软件 BioXM2.6 分析,采用 <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index> 在线分析其蛋白质三级结构,采用 DNAssit 软件将其与其他物种的 *RDR1* 基因进行氨基酸序列比对,采用 MEGA 4.0^[14] 构建系统进化树。

1.2.3 植物组织表达分析 分别取大豆品种科丰1号的根、茎、叶、花、荚、种子等不同器官进行总RNA的提取(同1.2.1)以及荧光定量PCR分析,操作方法同1.2.4。

1.2.4 抗逆境胁迫表达分析 在大豆品种科丰1号以及南农1138-2的叶片处于两叶期时对其进行SMV处理,采用SMV强毒株系SC18对叶片进行摩擦接种,对照采用磷酸缓冲液处理。分别于0,1,2,5,10,24和48 h 取样。当大豆品种科丰1号叶片处于两叶期时对其进行盐、干旱、低温以及ABA非生物胁迫,采用 Hogland 营养液水培,进行盐(200 mmol \cdot L⁻¹ NaCl)以及干旱(2% PEG8000)处理,分别于0,6,12,24和48 h 取其根、茎、叶;4 $^{\circ}$ C处理后分别于0,1,2,5,10和24 h 取其叶片;200 μ mol \cdot L⁻¹ SA 喷洒叶片后分别于0,6,9,12,24和48 h 取叶片,以上处理取样后即刻用液氮保存。RNA 提取以及反转录的方法同1.2.1。荧光定量引物设计 *GmRDR1* 上游引物 F:5'TGTCCCCATTGTTGCTCCTC3';下游引物 R: 5'TCACCATCAAGTGCAGGTCC3'。tubulin 上游引物 F: 5' GGAGTTCACAGAGGCAGAG3';下游引物 R: 5' CACTTACGCATCACATAGCA3'。反应体系:SYBR 10 μ L、ROX Reference Dye II 0.14 μ L、cDNA 2 μ L、引物 F 和 R 分别为 0.4 μ L,补水至总体积20 μ L。反应程序:95 $^{\circ}$ C 30 s;95 $^{\circ}$ C 10 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 34 s,40 个循环。采用 2^{- Δ Ct}法^[15] 分析数据,确定基因的相对表达量。每

个取样点设 3 次重复。

1.2.5 *GmRDR1* 基因的亚细胞定位 通过 RT-PCR 的方法从大豆的 cDNA 中分离出包含完整 ORF 的 *GmRDR1* 基因,但是不包含终止密码子。随后根据 Gateway 试剂盒的操作说明进行 BP 和 LR 反应,将不包含终止密码子的 *GmRDR1* 基因完整的 ORF 插入到表达载体 pMDC83 中,构建了融合表达载体 35S-pMDC83-*GmRDR1*-GFP。将其和空载分别通过冻融法转化农杆菌 EHA105,然后通过农杆菌介导法转化洋葱表皮细胞,利用激光共聚焦显微镜观察结果。

2 结果与分析

2.1 *GmRDR1* 基因的克隆

以大豆品种科丰 1 号叶片的 cDNA 为模板,采用 RT-PCR 克隆出 *GmRDR1* 基因,其 ORF 长度均为 3 378 bp(图 1)。

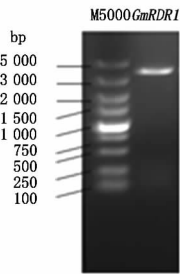


图 1 *GmRDR1* 基因的扩增

Fig.1 Amplification of *GmRDR1*

2.2 *GmRDR1* 基因的序列分析

GmRDR1 基因位于大豆基因组的 2 号染色体上,全长为 3 956 bp, ORF 长度为 3 378 bp,编码

1 125 个氨基酸,分子量和等电点分别为 279.72×10^3 和 4.63;蛋白质的三级结构预测结果显示(图 2),*GmRDR1* 具有 RDR 蛋白的保守结构域,是一个典型的 RNA 依赖的 RNA 聚合酶基因。

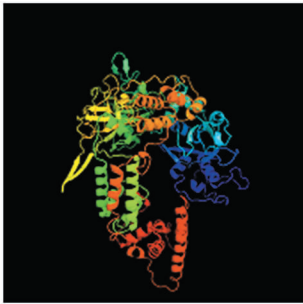


图 2 *GmRDR1* 三级结构预测

Fig.2 Tertiary structure prediction of *GmRDR1*

已有研究表明,RDR 的 β 亚链包含一个 DpBB 结构域,该结构域含有一个特征性的蛋白序列 Db-DGD(b 代表任意碱基),该结构域是二价阳离子结合并产生催化活性的位点^[16],在植物中 b 一般代表 L (Leu) 和 F (Phe),除了拟南芥中 *AtRDR3a*、*AtRDR3b*、*AtRDR3c* 和水稻中 *OsRDR3a*、*OsRDR3b* 的保守序列为 DFDGD,其他植物 RDR 的保守序列为 DLDGD。将大豆 *GmRDR1* 与拟南芥、棉花以及烟草等 RDR1 的部分氨基酸序列进行比对后发现,*GmRDR1* 和其他作物的 RDR1 一样具有 RDR 家族典型的保守序列 DLDGD(图 3),因此它们可能具有相同的功能。

利用 MEGA 4.0 对不同植物的 RDR1 蛋白序列构建系统进化树(图 4),系统进化树分布表明,*GmRDR1* 与拟南芥和黄瓜的 RDR1 蛋白亲缘关系较近,与其他作物的 RDR1 蛋白亲缘关系较远。

<i>GhRDR1</i>	737	FIVQGVIVAKNECLHFGIVFVLQVIVPDLHHVICVVFQCGIRFHFNECSGSLILG	795
<i>AtRDR1</i>	742	FIITGEVIVAKNECLHSGIVFVLQVIVPALNHVICVVFQCGIRFHFNECSGSLILG	800
<i>GmRDR1</i>	756	YVVGGVIVAKNECLHFGIVFVLQVIVPDLHHVICVVFQCGIRFHFNECSGSLILG	814
<i>NtRDR1</i>	748	FILKGVIVAKNECLHFGIVFVLQVIVPALHHVICVVFQCGIRFHFNECSGSLILG	806
<i>LeRDR1</i>	746	FILKGVIVAKNECLHFGIVFVLQVIVPALHHVICVVFQCGIRFHFNECSGSLILG	804
<i>GhRDR1</i>	796	LIYFVVCWDFELIPYKQIDFMDYSEASTTKLDHEVTIEEIEEYETINYIVNLSLGIISNAH	854
<i>AtRDR1</i>	801	LIYFVVCWDFELIPYKQIDFMDYSEASTTKLDHEVTIEEIEEYETINYIVNLSLGIISNAH	859
<i>GmRDR1</i>	815	LIYFVVCWDFELIPYKQIDFMDYSEASTTKLDHEVTIEEIEEYETINYIVNLSLGIISNAH	873
<i>NtRDR1</i>	807	LIYFVVCWDFELIPYKQIDFMDYSEASTTKLDHEVTIEEIEEYETINYIVNLSLGIISNAH	865
<i>LeRDR1</i>	805	LIYFVVCWDFELIPYKQIDFMDYSEASTTKLDHEVTIEEIEEYETINYIVNLSLGIISNAH	863
<i>GhRDR1</i>	855	TVFAIRFEPDMASDFCKQLAELESTAVDFEFKTCVPAEIPSQLEFPEYEFEMKFKKTSY	913
<i>AtRDR1</i>	860	TVFAIRFEPDMASDFCKQLAELESTAVDFEFKTCVPAEIPSQLEFPEYEFEMKFKKTSY	918
<i>GmRDR1</i>	874	TVFAIRFEPDMASDFCKQLAELESTAVDFEFKTCVPAEIPSQLEFPEYEFEMKFKKTSY	932
<i>NtRDR1</i>	866	TVFAIRFEPDMASDFCKQLAELESTAVDFEFKTCVPAEIPSQLEFPEYEFEMKFKKTSY	924
<i>LeRDR1</i>	864	TVFAIRFEPDMASDFCKQLAELESTAVDFEFKTCVPAEIPSQLEFPEYEFEMKFKKTSY	922

从上至下依次对应为棉花、拟南芥、大豆、普通烟草和番茄的 RDR1 部分氨基酸序列。
From top to bottom were partial amino acid sequences of *Gossypium hirsutum*, *Arabidopsis thaliana*, *Glycine max*, *Nicotiana tabacum* and *Lycopersicon esculentum*, respectively.

图 3 *GmRDR1* 与其他植物 RDR1 的部分氨基酸序列比对

Fig.3 Partial amino acid sequences alignments of *GmRDR1* and RDR1 in other plants

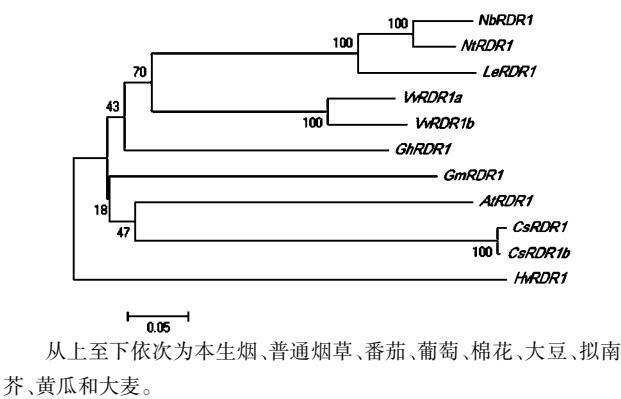


图 4 *GmRDR1* 进化树分析

Fig. 4 The phylogenetic tree of *GmRDR1*

2.3 *GmRDR1* 基因的植物组织表达分析

如图 5 所示, *GmRDR1* 基因在大豆所有被检测的组织中均有表达, 从表达量来看, 该基因在叶中的表达量远远高于其他组织器官, 茎中的表达量较高, 表达量较低的是根和花。

2.4 *GmRDR1* 基因的抗逆境胁迫结果分析

从图 6 可知, SMV 处理 2 和 5 h, *GmRDR1* 基因在抗病材料科丰 1 号中的表达量远远高于感病材料南农 1138-2, 差异极显著, 出现了早期响应, SMV 处理 1, 24 和 48 h, 该基因在抗病材料科丰 1 号中的表达量显著高于感病材料南农 1138-2, 而在 SMV 处理的其他时段, *GmRDR1* 基因在抗病材料科丰 1 号中的表达量只是稍稍高于感病材料南农 1138-2, 表达对比不明显, 以上结果可以初步判断 *GmRDR1* 基因在抗 SMV 方面具有一定的功能, 还需进一步研究。

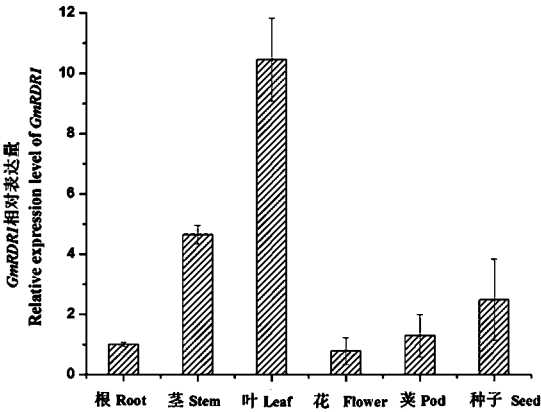
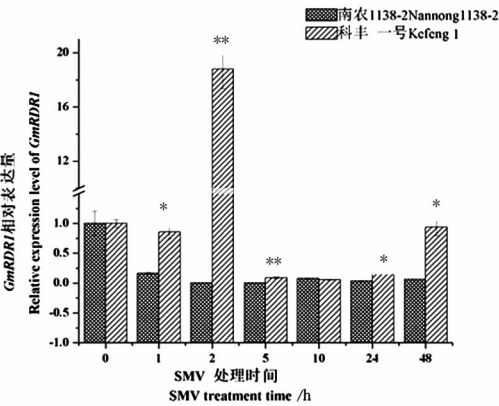


图 5 *GmRDR1* 在大豆品种科丰 1 号不同组织器官中的表达

Fig. 5 Expression analysis of *GmRDR1* in different tissues of Kefeng 1



* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

图 6 SMV 处理下 *GmRDR1* 在科丰 1 号和南农 1138-2 中的表达分析

Fig. 6 Expression analysis of *GmRDR1* in Kefeng 1 and Nannong 1138-2 after SMV treatment

植物生长必须要面对多种环境胁迫如高盐、干旱、低温等。从图 7 可知, 盐处理条件下, 48 h 之内, *GmRDR1* 基因在茎、叶中的表达量明显高于对照, 且在 24 h 时表达量达到最高, *GmRDR1* 基因在根中的

表达量 6 h 时出现短暂升高, 而后表达量呈现下降趋势; 干旱处理下, 48 h 之内, *GmRDR1* 基因在根、茎、叶中的表达量均高于对照, 在根、茎、叶中分别于 6, 48, 24 h 表达量达到最高, 该基因在茎中的表达

量呈持续上升趋势;在 SA 诱导条件下在 6 h 时出现了早期响应;在冷害处理下该基因在 24 h 时表达量

出现了突然的升高。因此初步判断 *GmRDR1* 基因具有耐盐和耐干旱的功能,还有待进一步研究。

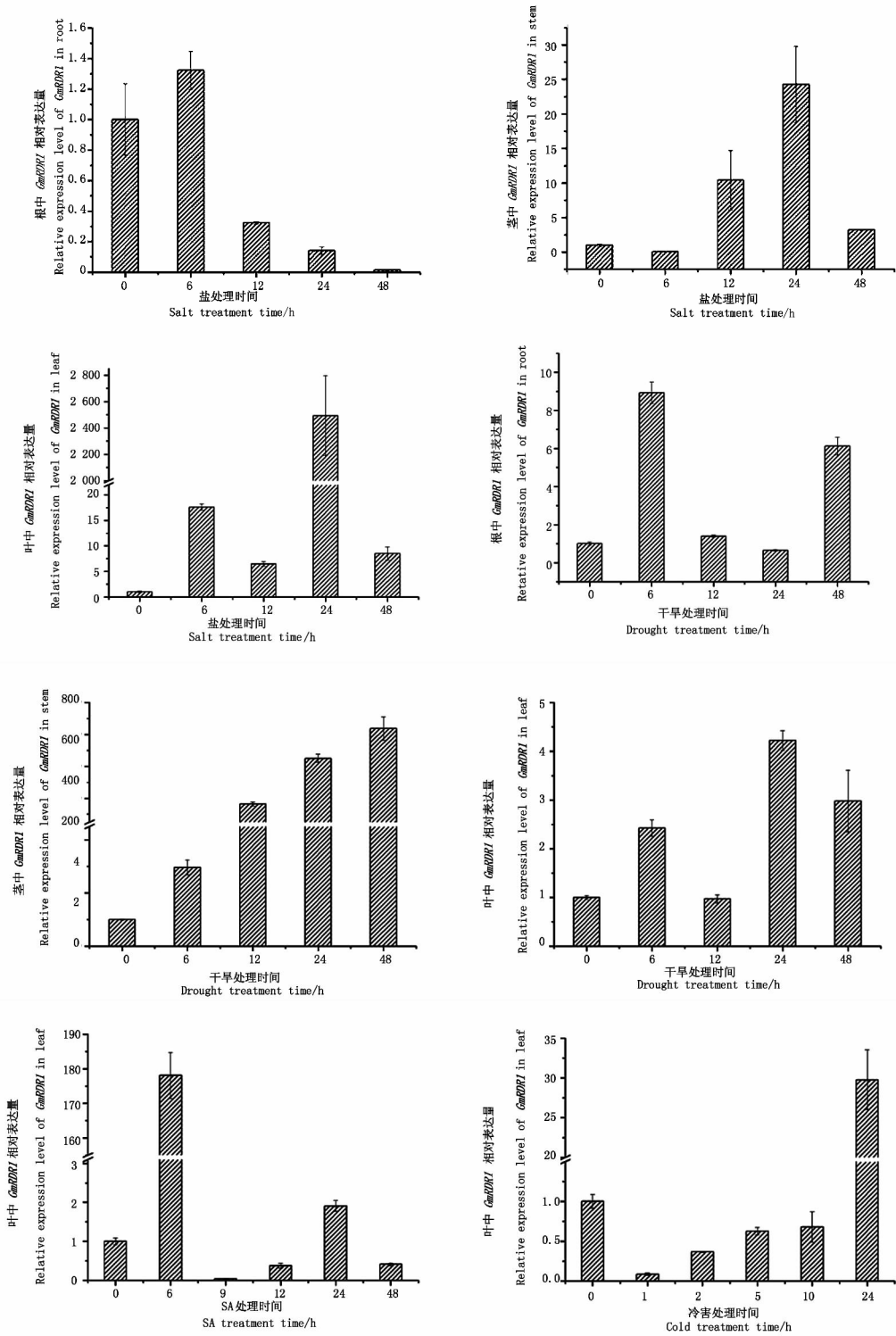


图 7 非生物胁迫下 *GmRDR1* 基因表达分析

Fig. 7 Expression analysis of *GmRDR1* gene in response to abiotic stresses

2.5 *GmRDR1* 基因的亚细胞定位分析

利用农杆菌介导法观察洋葱表皮细胞内 *GmRDR1* 基因的亚细胞定位,激光共聚焦显微镜观察到 *GmRDR1* 与 GFP 融合蛋白的瞬时表达(图 8)。利用只导入携带 GFP 的 pMDC83 空载体的洋葱表

皮细胞作对照,可以看出绿色荧光在整个细胞中均有分布,无明确的定位性;而 *GmRDR1* 与 GFP 融合后瞬时表达主要在洋葱细胞的细胞核内有绿色荧光,细胞质中没有,表明该基因所编码的蛋白定位在细胞核里。

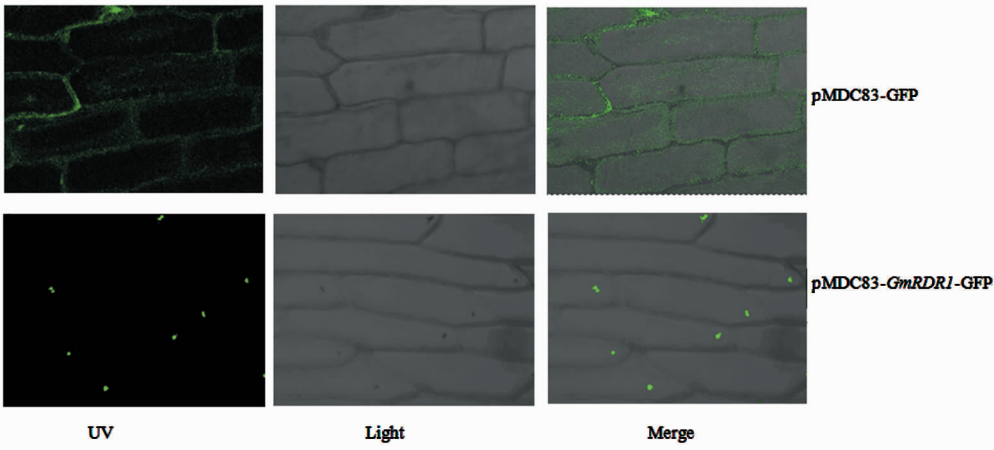


图 8 大豆 *GmRDR1* 基因的亚细胞定位研究
Fig.8 Subcellular localization of *GmRDR1*

3 结论与讨论

本研究采用同源克隆的方法,从抗 SMV 大豆品种科丰 1 号中分离出 1 个 *GmRDR1* 新基因,该基因位于大豆基因组的第 2 号染色体,全长为 3 956 bp,其 ORF 长度为 3 378 bp,编码 1 125 个氨基酸,相对分子量和等电点分别为 279.72×10^3 和 4.63。与拟南芥、棉花及烟草等作物中的 RDR1 比对后发现,*GmRDR1* 和其他作物的 RDR1 一样具有 RDR 家族典型的保守序列“DL DGD”,这一保守序列是该基因二价阳离子结合并产生催化活性的位点^[16]。系统进化树分布表明,*GmRDR1* 与拟南芥和黄瓜的 RDR1 蛋白亲缘关系较近,与其他作物的 RDR1 蛋白亲缘关系较远。

在不同植物的器官发育中,*RDR1* 基因的表达差异较大。研究表明,*LeRDR1* 在番茄花萼和雌蕊中表达量最高,叶片和花瓣中次之,在根、茎和雄蕊中的表达量几乎没有,因此该基因在番茄花器官发育和果实形成中起着重要的作用^[17]。拟南芥 *AtRDR1* 基因在花序以及老叶中的表达量较高^[3]。对于烟草 *NbRDR1* 基因来说,在烟草开花时期花中的表达量最强^[18]。本研究中克隆的 *GmRDR1* 新基因在所有被检测的组织中均有表达,从表达量来看,与以上植物中的基因不相同,该基因在叶中的表达量远远高于其他组织,茎中的表达量较高,表达量较低的是根和花,因此,推测该基因主要在大豆叶片中行使生物学功能。

植物 *RDR1* 面对外界生物如真菌、细菌、病毒以及昆虫等胁迫作用时会作出相应的应答,这种基因表达量的变化和该基因的抗病作用密切相关。如拟南芥 *AtRDR1* 和烟草 *NbRDR1* 受到烟草花叶病毒 (TMV) 和马铃薯 X 病毒 (PVX) 感染后其基因的

mRNA 表达量升高,在抗病毒过程中发挥重要的作用^[19];心叶烟接种马铃薯 Y 病毒 (PVY)、TMV 以及黄瓜花叶病毒 (CMV) 后,*NgRDR1* 表达量也有明显提高,并且在接种不同种类的真菌后,也能诱导 *NgRDR1* 的表达,可以推测 *NgRDR1* 参与了病原感染反应过程^[20-21];植物 *RDR1* 基因通过 RNA 沉默途径抵御病毒的侵染,本文探究了 *GmRDR1* 在 SMV 诱导下表达量的变化,结果发现,SMV 处理 2 和 5 h, *GmRDR1* 基因在抗病材料科丰 1 号中的表达量远远高于感病材料南农 1138-2,差异极显著,出现了早期响应,SMV 处理 1,24 和 48 h,该基因在抗病材料科丰 1 号中的表达量显著高于感病材料南农 1138-2,而在 SMV 处理的其他时段,*GmRDR1* 基因在抗病材料科丰 1 号中的表达量只是稍稍高于感病材料南农 1138-2,表达对比不明显,以上结果可以初步判断 *GmRDR1* 基因在抗 SMV 方面具有一定的功能,推测其与病毒诱导的基因沉默有关。

植物 *RDR1* 的表达受多种内源信号分子以及非生物逆境胁迫的调节,如 *NgRDR1* 转录水平受水杨酸 (SA)、异烟酸 (INA)、过氧化氢 (H_2O_2) 和茉莉酸甲酯 (MeJA) 的诱导而提高^[20-21];拟南芥、棉花、玉米等作物的 *RDR1* 受 SA 的诱导^[5,8,19],因此判断 *RDR1* 参与 SA 诱导的生物防御反应机制;本文探究了 *GmRDR1* 在非生物胁迫诱导下表达量的变化,盐处理条件下,48 h 之内,*GmRDR1* 基因在茎、叶中的表达量明显高于对照,且在 24 h 表达量达到最高,*GmRDR1* 基因在根中的表达量 6 h 出现短暂升高,而后表达量呈现下降趋势;干旱处理下,48 h 之内,*GmRDR1* 基因在根、茎、叶中的表达量均高于对照,在根、茎、叶中分别于 6,48,24 h 表达量达到最高,该基因在茎中的表达量呈持续上升趋势;在 SA 诱导条件下在 6 h 出现了早期响应;在冷害处理下该

基因在 24 h 表达量出现了突然的升高。因此,初步判断 *GmRDR1* 基因参与了大豆盐和干旱的胁迫反应,而这种机制是否和 SA 诱导的防御反应机制是否存在交叉尚需进一步确认。

由于在生命活动中真正起作用的是基因的表达产物——蛋白质,而蛋白质的功能与其在细胞中的位置相关,尤其对于真核细胞,蛋白质位于细胞的不同部位所行使的功能也不同,因此对蛋白质进行亚细胞定位是研究其功能必不可少的环节之一。为了确定 *GmRDR1* 基因蛋白在细胞的存在位置,本试验采用农杆菌转化洋葱表皮的方法观察该基因所编码蛋白在细胞中的位置,结果表明,*GmRDR1* 与 GFP 融合后瞬时表达仅在洋葱细胞的细胞核内有绿色荧光,表明该基因所编码的蛋白定位在细胞核里。上述结果为进一步研究该基因的功能奠定了基础。

参考文献

- [1] Wassenegger M, Krczal G. Nomenclature and functions of RNA - directed RNA polymerases[J]. Trends in Plant Science, 2006, 11(3): 142 - 151.
- [2] Zong, J, Yao, X, Yin, J, et al. Evolution of the RNA - dependent RNA polymerase (RdRP) genes; duplications and possible losses before and after the divergence of major eukaryotic groups [J]. Gene, 2009, 447: 29 - 39.
- [3] Willmann M R, Endres M W, Cook R T, et al. The functions of RNA - Dependent RNA polymerases in *Arabidopsis* [J]. The Arabidopsis Book, 2011: e0146, doi:10.1199/tab.0146.
- [4] Yang J H, Seo H H, Han S J, et al. Phytohormone abscisic acid control RNA - dependent RNA polymerase 6 gene expression and post - transcriptional gene silencing in rice cells [J]. Nucleic Acids Research, 2008, 36(4): 1220 - 1226.
- [5] Gao Q, Liu Y, Wang M, et al. Molecular cloning and characterization of an inducible RNA - dependent RNA polymerase gene, GhRdRP, from cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. Molecular Biology Reports, 2009, 36(1): 47 - 56.
- [6] Schiebel W, Pelissier T, Riedel L, et al. Isolation of an RNA - directed RNA polymerase - specific cDNA clone from tomato [J]. Plant Cell, 1998, 10(12): 2087 - 2101.
- [7] Liu Y, Gao Q, Wu B, et al. NgRDR1, an RNA - dependent RNA polymerase isolated from *Nicotiana glutinosa*, was involved in biotic and abiotic stresses [J]. Plant Physiol Biochem, 2009, 47(5): 359 - 368.
- [8] He J, Dong Z, Jia Z, et al. Isolation, expression and functional analysis of a putative RNA - dependent RNA polymerase gene from maize (*Zea mays* L.) [J]. Molecular Biology Reports, 2010, 37(2): 865 - 874.
- [9] Kasschau K D, Fahlgren N, Chapman E J, et al. siRNAs [J]. PLoS Biology, 2007, 5(3): e57.
- [10] Donaire L, Barajas D, Martinez - Garcia B, et al. Structural and genetic requirements for the biogenesis of tobacco rattle virus - derived small interfering RNAs [J]. Journal of Virology, 2008, 82(11): 5167 - 5177.
- [11] Wang X B, Wu Q, Ito T, et al. RNAi - mediated viral immunity requires amplification of virus - derived siRNAs in *Arabidopsis thaliana* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences USA Genome - wide profiling and analysis of *Arabidopsis*, 2010, 107(1): 484 - 489.
- [12] Pandey S P, Baldwin I T. RNA - directed RNA polymerase 1 (RdR1) mediates the resistance of *Nicotiana attenuata* to herbivore attack in nature [J]. Plant Journal, 2007, 50(1): 40 - 53.
- [13] 智海剑, 盖钧镒, 郭东全, 等. 对大豆花叶病毒不同抗性类型品种的细胞超微结构特征 [J]. 南京农业大学学报, 2005, 28(1): 6 - 10. doi:10.7685/j.issn.1000-2030.2005.01.002. (Zhi H J, Gai J Y, Guo D Q, et al. Ultrastructural characterization of soybeans with different types of resistance to soybean mosaic virus [J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2005, 28(1): 6 - 10.)
- [14] Kumar S, Dudley J, Nei M, et al. MEGA: a biologist - centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences [J]. Brief Bioinform, 2008, 9: 299 - 306.
- [15] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real - time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402 - 408.
- [16] Makeyev E V, Bamford D H. Cellular RNA - dependent RNA polymerase involved in posttranscriptional gene silencing has two distinct activity modes [J]. Molecular Cell, 2002, 10(6): 1417 - 1427.
- [17] 卫波. 普通小麦和短柄草微 RNA 的发现及番茄小分子 RNA 合成相关基因 RDR1 的功能研究 [D]. 北京: 中国农业科学院研究生院, 2009: 78 - 81. (Wei B. Discovery of microRNAs in wheat (*Triticum aestivum* L.) and *Brachypodium distachyon* L. and functional analysis of small RNA biogenesis - related genes RDR1 in tomato (*Lycopersicon esculentum*) [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2009: 78 - 81.)
- [18] Yang S J, Carter S A, Cole A B, et al. A natural variant of a host RNA - dependent RNA polymerase is associated with increased susceptibility to viruses by *Nicotiana benthamiana* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 2004, 101(16): 6297 - 6302.
- [19] Yu D, Fan B, Macfarlane S A, et al. Analysis of the involvement of an inducible *Arabidopsis* RNA - dependent RNA polymerase in antiviral defense [J]. Molecular Plant Microbe Interactions, 2003, 16(3): 206 - 216.
- [20] 刘燕. 心叶烟 RNA 依赖的 RNA 聚合酶基因 (*NgRDR1*) 的克隆及其表达特性研究 [D]. 济南: 山东农业大学, 2009. (Liu Y. Cloning and expression analysis of an RNA - dependent RNA Polymerase gene, *NgRDR1*, from *Nicotiana glutinosa* [D]. Jinan: Shandong Agricultural University, 2009.)
- [21] Liu Y, Gao Q, Wu B, et al. *NgRDR1*, an RNA - dependent RNA polymerase isolated from *Nicotiana glutinosa*, was involved in biotic and abiotic stresses [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2009, 47(5): 359 - 368.