



刘嘉斐 张璐 孟永娇 等. 过表达钙调素类似蛋白基因 *CML25-like* 诱导黄瓜单性结实的研究 [J]. 南京农业大学学报 2019 A2(3) : 421–429.

过表达钙调素类似蛋白基因 *CML25-like* 诱导 黄瓜单性结实的研究

刘嘉斐 张璐 孟永娇 段莉莉 罗雨薇 李季* 陈劲枫

(南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室/园艺学院 江苏南京 210095)

摘要: [目的] 钙调素类似蛋白(calmodulin-like protein, CML)是一类含有EF-hand结构域的钙受体蛋白,与植物细胞的分裂及形态建成密切相关。本文基于前期克隆的一个黄瓜果实特异性表达基因*CML25-like*,研究其调控单性结实的机制。**[方法]**采用RT-qPCR方法研究*CML25-like*表达的时空特点;构建植物表达载体pLP100-35S-*CML25-like*,利用农杆菌介导子叶节法转化黄瓜自交系CCMC,并研究转基因植株的表达特点;观察转基因植株的表型,采用RT-qPCR方法检测其坐果期激素相关基因的表达变化。**[结果]** *CML25-like*在黄瓜幼叶和雌花中表达量最高,在雄花中表达量最低,而且*CML25-like*在果实发育过程中上调表达,在果实败育过程中下调表达;性状统计发现过表达*CML25-like*植株的单性结实率最高可达到98.25%,比对照CCMC提高了86%,而且单性结实果实与对照授粉果实的长度和横径均无明显差异。RT-qPCR检测结果显示,在转基因植株坐果期22个激素相关基因中有16个显著上调表达。**[结论]** *CML25-like*基因的活跃表达与果实发育密切相关,而且*CML25-like*能够诱导黄瓜单性结实,促进果实膨大,推测*CML25-like*通过上调弱单性结实黄瓜子房中激素相关基因表达而诱导单性结实。

关键词: 黄瓜; 钙调素类似蛋白; 单性结实; 激素相关基因

中图分类号: S642.2

文献标志码: A

文章编号: 1000-2030(2019)03-0421-09

Study on cucumber parthenocarpy induced by over-expressing of calmodulin-like protein gene *CML25-like*

LIU Jiafei ZHANG Lu ,MENG Yongjiao ,DUAN Lili ,LUO Yuwei ,LI Ji*, CHEN Jinfeng

(State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement/College of Horticulture,
Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract [Objectives] Calmodulin-like protein(CML) a class of Ca^{2+} binding proteins containing the EF-hand domain are closely related to the division and morphogenesis of plant cells. Based on the cloned *CML25-like* gene which expressed specifically in the cucumber fruit, we studied its mechanism of regulating parthenocarpy. [Methods] RT-qPCR method was used to study the temporal and spatial characteristics of *CML25-like* expression. Plant expression vector pLP100-35S-*CML25-like* was constructed, the cucumber inbred line CCMC was transformed by *Agrobacterium*-mediated transformation method using cotyledon as explants, and the expression characteristics of the transgenic plants were studied. The phenotypes of transgenic plants were observed, and the expression changes of hormone-related genes in fruit-set period of transgenic plants were detected using RT-qPCR method. [Results] In transgenic plants, the expression level of *CML25-like* was the highest in young leaves and female flowers of cucumber, and the lowest in male flowers. Moreover, *CML25-like* was up-regulated expression during the fruit development, and down-regulated expression during the fruit abortion. Statistical results of traits showed that the parthenocarpy rate of transgenic plants of over-expressing *CML25-like* could reach to 98.25%, which increased 86% compared with control CCMC. And there were no significant differences in length and transverse diameter between the parthenocarpic fruits and control pollinated fruits. The results of RT-qPCR showed that 16 of the 22 hormone-related genes were significant up-regulated expression during the fruit setting of transgenic plants. [Conclusions] The active expression of *CML25-like* was closely related to fruit development, and *CML25-like* could induce parthenocarpy of cucumber and promote fruit enlargement. We inferred that *CML25-like* induced parthenocarpy by promoting the up-regulated expression of hormone-related genes in the ovaries of weakly parthenocarpic cucumber.

Keywords: cucumber; calmodulin-like protein; parthenocarpy; hormone-related genes

收稿日期: 2018-05-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(31430075, 31672168); 国家重点研发计划项目(2016YFD0101705-5); 国家公益性行业(农业)科研专项(201403032)

作者简介: 刘嘉斐,硕士研究生。*通信作者: 李季,副教授,主要从事蔬菜遗传育种与生物技术研究,E-mail: liji1981@njau.edu.cn。

黄瓜(*Cucumis sativus* L.)是葫芦科甜瓜属作物,是世界十大蔬菜之一。据联合国粮食和农业组织(FAO)统计2016年全球黄瓜产量达到 $8\ 062\times10^4\text{t}$,中国产量为 $6\ 194\times10^4\text{t}$,占全球产量的76.7%,而且设施栽培为其最主要的栽培模式。在黄瓜设施生产中坐花与坐果是产量形成的前提,由于缺乏授粉媒介以及环境胁迫,黄瓜植株会出现坐果率低、果实发育不正常、畸形果多等问题,黄瓜产量和质量下降^[1]。单性结实性可以很好解决这个问题,是目前黄瓜新品种选育的热点之一。钙调素类似蛋白(calmodulin-like protein,CML)是一类含有EF-hand结构域的植物细胞特异性的钙受体蛋白。研究发现,CML与植物细胞的分裂及形态建成密切相关,如拟南芥CML42功能缺失突变体表皮毛的分枝数目会显著增加^[2];CML还与植物生长发育过程中的光信号和激素信号介导相关,如拟南芥CML39参与了光信号介导幼苗生长的过程^[3];此外,CML也能够调控器官的形成与发育,如拟南芥CML24功能敲除突变体开花延迟,而功能获得性突变体则提前开花;同时,拟南芥CML24和CML25基因可以调节花粉粒萌发和花粉管伸长^[4-5],CML24基因的2个缺失突变体cml24-T和cml24-4的花粉萌发率较野生型低、花粉管伸长较野生型短,而过量表达CML24基因可恢复正常表型。

钙调素(CaM)也是一类含有EF-hand结构域的钙受体蛋白,与钙调素类似蛋白的结构相似,在参与植物细胞分裂和形态建成、调控花粉萌发以及响应生物和非生物胁迫方面的作用与钙调素类似蛋白相似。研究表明,钙调素蛋白可以调控果实发育,例如在刺梨果实发育的中前期,CaM含量处于较高的水平,而果实处于发育缓慢生长期时,CaM含量则处于低谷^[6]。罗充等^[7]研究发现梨果实CaM含量整体水平高,在果实膨大期和成熟前含量低且稳定,这可能是果实性状维持稳定的因素之一。在番茄果实的研究中,还发现CaM含量与乙烯生成量成正比^[8]。虽然CaM和CML是相近的钙离子受体蛋白家族,但是目前并未有CML调控果实发育的相关研究报道。

前期研究中,Li等^[9]借助RNA-Seq技术挖掘与黄瓜单性结实相关的基因,发现在天然单性结实和激素诱导单性结实果实的发育过程中均大量特异表达钙调素类似蛋白基因CML25-like,并成功克隆了该基因。在此基础上,本研究采用转基因技术在低单性结实黄瓜CCMC中过表达CML25-like,鉴定和分析转基因植株的表型并研究CML25-like的功能,从而验证CML25-like能否诱导黄瓜单性结实,为黄瓜育种研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

黄瓜转基因受体材料为高代自交系CCMC,由南京农业大学葫芦科作物遗传与种质创新实验室保存,为华北类型弱单性结实性,遗传转化效率高。pMD19-CML25-like亚克隆质粒、大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5α、根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)C58和植物表达载体pLP100-35S由本实验室保存。pLP100-35S载体以pLP100植物表达载体为骨架载体改造而来。限制性内切酶Pst I和Xba I,T₄DNA连接酶,琼脂糖凝胶回收试剂盒、反转录试剂盒和PCR试剂均购自大连宝生物工程有限公司。PCR引物由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成。

1.2 总RNA的提取及cDNA的合成

用总RNA提取试剂盒(天根生化科技有限公司)提取样品RNA,利用10 g·L⁻¹的琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计分别对RNA的完整性、纯度和浓度进行检测,再反转录得到cDNA模板,-20℃保存备用。

1.3 CML25-like的表达分析

选取长势旺盛、无病虫害的黄瓜CCMC,分别取根、茎、幼叶、成熟叶及开花当天(0dpa, days post-anthesis)的雌花和雄花鲜样,采摘开花前1 d(-1dpa)、开花当天(0dpa)、花后1 d(1dpa)、花后2 d(2dpa)、花后3 d(3dpa)和自交授粉后1、2、3 d的果实样品,用液氮速冻,每个样品重复3次。全部样品贮存于-80℃超低温冰箱,待用。

根据CML25-like全长CDS序列设计qPCR引物CML25-like-F和CML25-like-R,以黄瓜Actin(Csa6M484600.1)为内参(表1),以上述反转录的cDNA为模板。根据SYBR Premix Ex Taq(Perfect Real Time)试剂盒(TaKaRa)说明书操作,反应体系为20 μL:cDNA模版1 μL,上、下游引物各0.5 μL,2×SYBR Premix Ex Taq Mix 10 μL,ddH₂O 8 μL。反应条件为95℃10 min;95℃30 s,55℃30 s,72℃30 s,共40个循环。数据采用2^{-ΔΔCt}法计算目标基因的相对表达量。

表 1 相关引物序列及用途
Table 1 Sequence and application of primers

引物 Primer	引物对序列(5'→3') Primer pairs sequence	用途 Application
<i>CML25-like</i> -F/R	CCGAGGAAGAGCTTCAGAAC/GGAATCAACGCCCTAGTGT	荧光定量 PCR Quantitative real-time PCR
<i>Actin</i> -F/R	ACTGTGCTGCTCATATTG/AGGGTGAAAGCAAGAA GAGC	内参基因 Reference gene
M13-F/R	CCCCGAAAAGTGCACCTGACGT/TGAATCTTGACTCCATGC	载体检测引物 Vector detection primer
<i>NPT II</i> -F/R	CTGGGCACAAACAGACAATC/TACCGTAAAGCACGAGGAA	转基因 PCR 鉴定 PCR identification of transgenic plants

1.4 植物表达载体构建及转化

用限制性内切酶 *Xba* I 和 *Pst* I 分别双酶切植物表达载体 pLP100-35S 和含目的基因的 pMD19-*CML25-like*, 回收 pLP100-35S 载体大片段和目标基因 *CML25-like*, *T₄* 连接酶连接、转化, 获得表达载体 pLP100-35S-*CML25-like*(图 1), 并进行 PCR 和测序鉴定。采用冻融法将重组质粒 pLP100-35S-*CML25-like* 转化到农杆菌 C58 中。

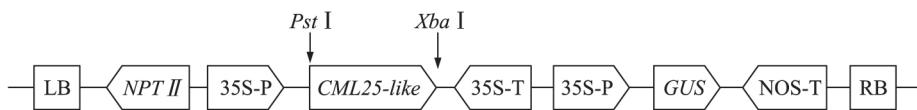


图 1 pLP100-35S-*CML25-like* 过量表达载体构建示意图

Fig. 1 Construction of over-expression vector of pLP100-35S-*CML25-like*

LB: T-DNA 区左边界 Left T-DNA border; *NPT II*: 选择标记基因 Selection marker gene; 35S-P: 35S 启动子 35S promoter; 35S-T: 35S 终止子 35S terminator; GUS: 报告基因 Reporter gene; NOS-T: NOS 终止子 NOS terminator; RB: T-DNA 区右边界 Right T-DNA border.

以 CCMC 为受体材料, 利用农杆菌介导的子叶节法^[10] 进行黄瓜遗传转化, 获得的转化材料种植于南京农业大学江浦试验基地转基因植株专用温室中, 编号为 OEL1—OELn(over-expression line 1-n)。

1.5 再生植株检测

以再生植株的基因组 DNA 为模板, 质粒 pLP100-35S 为阳性对照, CCMC 为阴性对照, ddH₂O 为空白对照, 进行基因 *NPT II* 的 PCR 检测, 引物见表 1。PCR 程序: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 52 °C 40 s, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 10 min。

1.6 *T₂* 代转基因植株中 *CML25-like* 基因的 Real-time PCR 分析

PCR 检测条带较亮的植株自交纯化至 *T₂* 代, 取 *T₂* 代转基因植株和对照 CCMC 的新鲜叶片, 提取 RNA 并反转录成 cDNA, 每个样品 3 次重复。以 cDNA 为模板, 根据 SYBR Premix Ex Taq(Perfect Real Time) 试剂盒说明书操作, 反应体系、反应条件和数据分析同 1.3 节。

1.7 *T₂* 和 *T₃* 代转基因植株表型鉴定与数据分析

将表达量明显上升的转基因植株和对照 CCMC 种植于南京农业大学园艺学院江浦实验基地转基因植株专用温室观察表型。于盛花期选取相同长势的 *T₃* 代转基因植株和对照 CCMC 开花前 1 d 的雌花用彩色花扎夹花, 防止雌花授粉。之后每天采用不同颜色的花扎夹花并挂牌标记, 同时记录每天的夹花数。所有单株夹花结束 8~10 d 后, 逐株调查单性结实坐果情况, 计算单性结实率(单性结实果实数/所夹雌花数×100%)。果实长度大于 3.5 cm, 直径大于 1 cm 以上的瓜(正常子房平均长度为 3.3 cm, 直径为 0.68 cm) 都记为单性结实瓜^[11], 发黄萎蔫即为化瓜。夹花结束 2 周后, 对同一天夹花的单性结实果实进行果实横径和长度的测量。横径用游标卡尺测量, 果实长度用卷尺测量。

所得数据用 Excel 2007 软件进行处理, 用最小显著差异法(LSD 法) 进行显著性分析。每个数据样本(*n*) 不小于 5。

1.8 转基因植株坐果期间激素相关基因的表达分析

取 *T₃* 代转基因植株和 CCMC 开花当天的果实样品, 用液氮速冻后贮存于 -80 °C 冰箱中待用, 每个取样点设 3 个生物学重复(*n*=3)。总 RNA 提取、cDNA 合成以及 qPCR 方法同 1.2 和 1.3 节。对各个样品的熔解曲线进行分析, 确定每个引物均为特异性扩增。采用 *Actin* 作为内参基因(表 2) , 按照 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算出基因的相对表达量。采用 Excel 2007 软件绘图。

根据 Li 等^[9] 前期报道, 挑选 22 个比较关键的基因, 包括生长素相关基因: PYROX(pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase) , *AUX1-1* 和 *AUX1-2*(auxin transporter-like protein) , *TIR1-1* 和 *TIR1-2*(transport

inhibitor response 1) *AUX/IAA-1* 和 *AUX/IAA-2*(auxin-responsive protein) ,*SAUR-1*、*SAUR-2*、*GH3-1* 和 *GH3-2* (auxin-induced protein) ; 细胞分裂素相关基因: *CYP735A* (cytokinin trans-hydroxylase) ,*CRE1-1* 和 *CRE1-2* (glucan endo-1,3-beta-glucosidase-like protein) ,*AHP* (Histidine-containing phosphotransfer protein) ,*B-ARR* (Myb family transcription factor) ; 赤霉素相关基因: *GA-S1*(kaurene oxidase) ,*GA-S2*(DELLA) ,*GA-S3*(gibberellin-insensitive dwarf 1) ; 油菜素内酯相关基因: *BIRK1a*、*BIRK1b* 和 *BIRK1c*(brassinolide insensitive 1-associated receptor kinase 1)。通过同源比对以及在 NCBI 上搜索相关基因序列设计引物, 引物序列见表 2。

表 2 激素相关基因的荧光定量 PCR 引物

Table 2 The primers of hormone-related genes designed for RT-qPCR

基因 Gene	基因编号 Gene ID	引物对序列 Primer pairs sequences	基因描述 Gene description
<i>Actin</i>	Csa6M484600.1	ACTGTGCTGCCATTATTG/AGGGTAAAGCAAGAACAGC	内参基因 Reference gene
<i>PYROX</i>	Csa2M379350.1	AGCCCTGTCGCAAATTAGAT/CAACTTGGCACATTGCTCT	生长素相关基因 Auxin-related gene
<i>AUX1-1</i>	Csa6M011040.1	GAAATAATGGACCGCGATCTG/GGAGTGGGTGAGAAGTTG	
<i>AUX1-2</i>	Csa5M201310.1	GTGAGGCTCCGGTTTAT/TAACAAGAAGGGCACCAACA	
<i>TIR1-1</i>	Csa7M393970.1	AGAGTGTTCATCCGAAACC/TTGGGCAACCTTCAGATACA	
<i>TIR1-2</i>	Csa3M597350.1	GTGGTGCACATGGCACTTC/ACGTTCAGCCTAGGCATCTT	
<i>AUX/IAA-1</i>	Csa6M497220.1	TCTTCTGCCCTCGAGAAGAT/TCCATGCAGATGATCCCTTA	
<i>AUX/IAA-2</i>	Csa1M397130.2	GGCTCTCTGGAAATGAGGA/CAAGCTTACCGCAGATATGGC	
<i>SAUR-1</i>	Csa3M866530.1	ACTGGTGGAGGGATCAATT/GGCCGAATTAGCAACACTTT	
<i>SAUR-2</i>	Csa6M137590.1	GCCGAATTACTCAACCATCC/GGACTCCTTCTGTTCATACCC	
<i>GH3-1</i>	Csa3M198490.1	AAGGAAGAGTGGAGGAAT/AGAAATCGAGGCTTCCAATG	
<i>GH3-2</i>	Csa3M431430.1	CCAATTCCACCCCTGTCTT/AGGACCAATGGACTTATCGG	
<i>CYP735A</i>	Csa5M166390.1	GCTGAAGGAGATGAATGGGT/ATTAAGCTTGCCATTGCTT	细胞分裂素相关基因 Cytokinin-related gene
<i>CRE1-1</i>	Csa4M280410.1	AGCCATGCTTCTCTGAT/GTTAACCTTGCTGTGCCATC	
<i>CRE1-2</i>	Csa6M420530.1	CGCCTTCAACGATTACTTCA/TGGCTTGAGAAATTCCCATT	
<i>AHP</i>	Csa6M067360.1	GCCATGTTCACAGCTAAA/GCAGACATCTTAGGCATCCA	
<i>B-ARR</i>	Csa4M614170.1	ACCCCTCAATGACACAGCAA/AGTTGGAAATGGAGGACAG	
<i>GA-S1</i>	Csa3M015360.1	AGGCCAAGGAAGAACAGAA/ACTTAGGCCAAGCGTCTCAT	赤霉素相关基因 Gibberellin-related gene
<i>GA-S2</i>	Csa6M111930.1	AACTGGAGGAGATGTTGGG/GATCGCTGTGAATCTGATG	
<i>GA-S3</i>	Csa3M043910.1	GCACCATAGCTGAAGTGAAG/TAGCCTCTGTACCCTCCA	
<i>BIRK1a</i>	Csa1M276450.1	CACGAGAGGCTTGGTGA/AGGATCACATTGCTCATGGA	油菜素内酯相关基因 Brassinolide-related gene
<i>BIRK1b</i>	Csa3M854180.1	ATCTTGAGAGACGGCCAAGT/TGCACAACTCAACACTCGAA	
<i>BIRK1c</i>	Csa4M036610.1	ATGTGGTGAATGCTGGAA/CGAATCAACCATCCATTCTG	

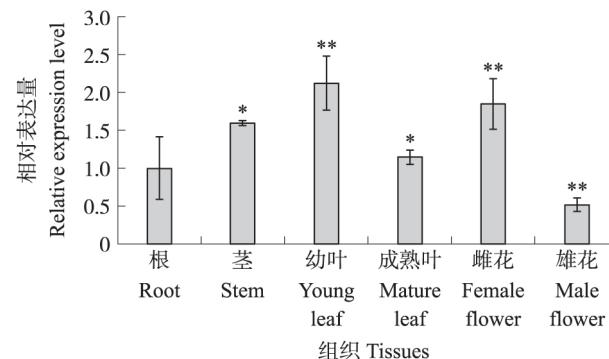
2 结果与分析

2.1 黄瓜 *CML25-like* 表达的组织特异性

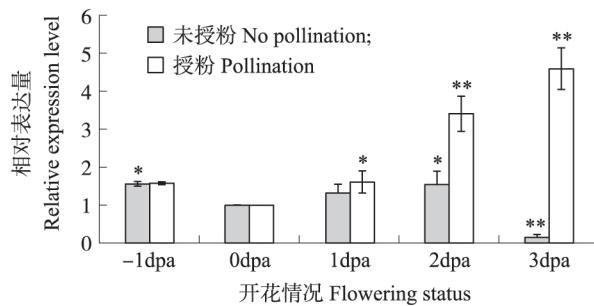
由图 2 可见: *CML25-like* 在幼叶中表达量最高, 其次是雌花, 在雄花中表达量最低。由图 3 可见: *CML25-like* 在果实正常发育过程中呈上调表达趋势, 而在果实败育过程中呈下调表达趋势, 这与前期在欧洲温室型黄瓜‘8419’中的研究结果相一致^[12], 说明无论在华北型还是欧洲温室型黄瓜材料中 *CML25-like* 的活跃表达均与果实发育密切相关。

2.2 黄瓜转基因植株的获得与分子鉴定

用过表达载体 pLP100-35S-*CML25-like* 转化农杆菌 C58, 通过农杆菌介导的子叶节法转化 CCMC, 并获得了多个再生植株。在卡那霉素(Kan) 抗性筛选的基础上, 利用 PCR 方法进行分子检测。结果(图 4) 显示, 有 13 个植株在 750 bp 左右出现目的条带, 其中 OEL137、OEL144、OEL173、OEL177 及 OEL178 的条带特别清晰。

图 2 *CML25-like* 在黄瓜不同组织中的表达水平Fig. 2 Expression level of *CML25-like* gene in different cucumber tissues

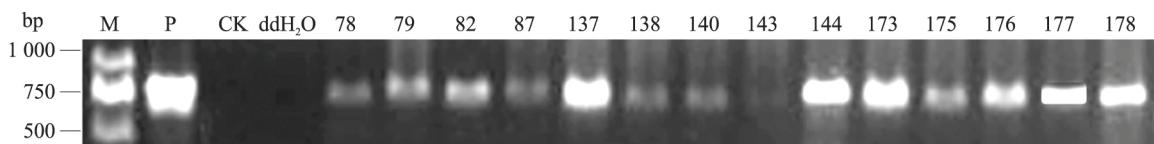
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (以根样品为对照 Root samples as a control $n=3$) .

图3 *CML25-like* 在黄瓜果实发育早期的表达水平Fig. 3 Expression level of *CML25-like* gene during early cucumber fruit development stages

-1dpa、0dpa、1dpa、2dpa、3dpa 分别表示开花前 1 d、开花当天、花后 1 d、花后 2 d 和花后 3 d。

-1dpa, 0dpa, 1dpa, 2dpa and 3dpa indicate 1 day before anthesis, the day of anthesis, 1 day post anthesis, 2 days post anthesis and 3 days post anthesis respectively.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (以开花当天样品为对照 Samples of the day of anthesis as a control, $n = 3$)。

图4 再生植株 *NPTII* 基因的 PCR 分析Fig. 4 PCR analysis of *NPTII* in regeneration plants

M: DL1000 marker; P: 阳性对照质粒 pLP100-35S Positive control plasmid pLP100-35S; CK: 阴性对照 CCMC Negative control CCMC. 数字为再生植株编号。The numbers are regenerated plant numbers.

2.3 T₂ 代转基因植株的表达分析与表型观察

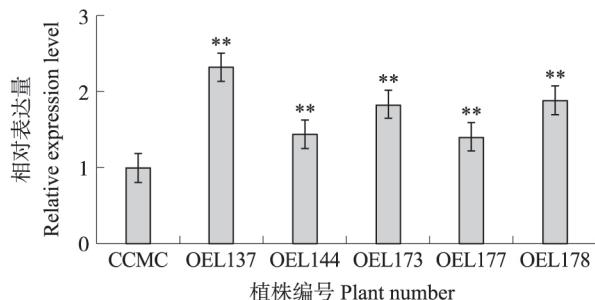
将 PCR 分子鉴定出的植株进行自交纯合, 收获的种子在含有 Kan 的 MS 培养基上进行抗性筛选。选取 T₂ 代植株 OEL137、OEL144、OEL173、OEL177 及 OEL178 进行表达量分析。结果(图 5)显示: 与对照 CCMC 相比, 目的基因在这 5 个转基因植株中均过量表达, 且差异极显著 ($P < 0.01$), 尤其是 OEL137、OEL173 和 OEL178。

对转基因植株进行田间观察, 发现过表达植株在幼苗期生长速度快于对照 CCMC(图 6-A), 顶芽下第 2 片真叶面积大于对照 CCMC; 生长初期转基因植株基部出现大量雄花花芽分化, 生长后期出现“花打顶”现象(图 6-B); 对开花前一天的雌花夹花发现转基因植株出现单性结实现象, 而对照 CCMC 大部分化瓜(图 6-C)。

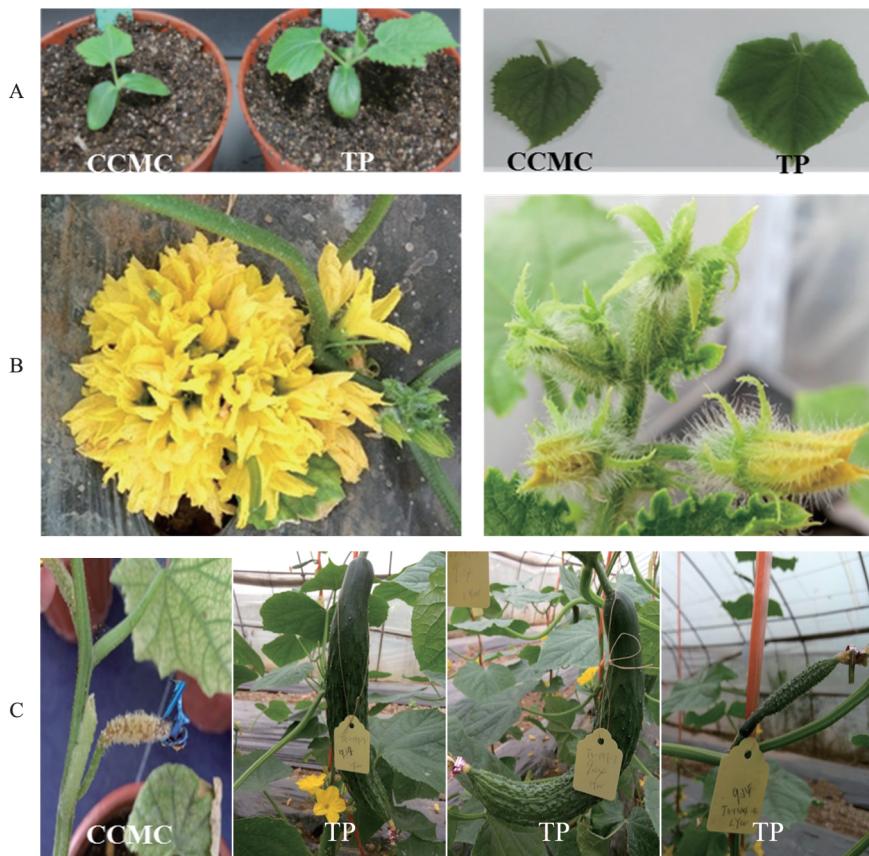
2.4 过表达 *CML25-like* 植株的单性结实情况

在对转基因植株的表型观察发现, 过表达 *CML25-like* 的植株中出现单性结实的现象。为了研究过表达 *CML25-like* 对果实发育的影响, 我们统计了 T₃ 代转基因植株 OEL137、OEL144、OEL173、OEL177、OEL178 和对照 CCMC 的单性结实率。如表 3 所示: T₃ 代转基因植株 OEL137、OEL144、OEL173、OEL177、OEL178 的单性结实率分别为 98.25%、97.96%、89.81%、92.36%、97.14%, 而对照 CCMC 的单性结实率仅为 12.16%。转基因植株单性结实率最高比对照提高了 86%。表明过表达 *CML25-like* 可提高黄瓜单性结实率, 促进果实形成。

由图 7 可见: 过表达 *CML25-like* 诱导的单性结实果实与对照 CCMC 正常授粉果实相比, 其果实横径与长度无明显差异, 而自然发生的 CCMC 单性结实果实的横径和长度极显著小于 CCMC 正常授粉果实。表明过表达 *CML25-like* 不仅能够诱导果实的形成, 还可促进果实的膨大。

图5 转基因植株 *CML25-like* 表达分析Fig. 5 Expression level of *CML25-like* gene in transgenic lines

** $P < 0.01$ (以 CCMC 为对照 CCMC as a control)。

图 6 过表达 *CML25-like* 的转基因植株表型观察Fig. 6 Phenotype observation of transgenic plants induced by over-expressing of *CML25-like*

A. 过表达 *CML25-like* 植株与叶片发育; B. 过表达 *CML25-like* 植株花芽大量分化(左)和“花打顶”(右)现象; C. 过表达 *CML25-like* 植株单性结实。

A. The plant and leaves development was induced by over-expression of *CML25-like* gene; B. Over-expression of *CML25-like* gene could cause ‘clusters of flowers’ (left) and ‘blunt with blossom’ (right); C. Parthenocarpy was induced by over-expression of *CML25-like* gene.

TP: 转基因植株 Transgenic plant.

表 3 转基因黄瓜和对照 CCMC 的单性结实情况

Table 3 The parthenocarpy status in transgenic cucumber and control CCMC

指标 Index	OEL137	OEL144	OEL173	OEL177	OEL178	CCMC
植株数量 Number of individual	21	7	6	6	7	7
所夹雌花总数 Total number of female flowers	94	38	45	39	40	35
单性结实总数 Total number of parthenocarpic fruits	92	37	43	36	39	3
单性结实率/% Parthenocarpy rate	98.25±5.54	97.96±5.40	89.81±20.00	92.36±13.54	97.14±7.56	12.16±13.30

2.5 过表达 *CML25-like* 植株成熟果实中植物激素相关基因的表达分析

由图 8 可见: 与对照 CCMC 相比, 转基因植株 OEL137 的成熟果实中有 16 个激素相关基因上调表达, 其余 6 个基因表达无明显差异。其中, 生长素运输蛋白基因 (*AUX1-1* 和 *AUX1-2*)、受体蛋白基因 (*TIR1-1* 和 *TIR1-2*)、应答基因 (*AUX/IAA-2*)、诱导基因 (*SAUR-2*、*GH3-1* 和 *GH3-2*)、细胞分裂素的合成基因 (*CYP735A*) 和磷酸转运蛋白基因 (*AHP* 和 *B-ARR*)、赤霉素合成基因 (*GA-S1*) 和信号转导基因 (*GA-S3*)、油菜素内酯受体蛋白基因 (*BIRK1a*、*BIRK1b* 和 *BIRK1c*) 均显著上调表达, 而应答基因 (*AUX/IAA-1*) 和 *DELLA* 蛋白基因 (*GA-S2*) 上调表达不显著, 生长素合成基因 (*PYROX*)、诱导基因 (*SAUR-1*) 和细胞分裂素下游基因 (*CRE1-1* 和 *CRE1-2*) 的表达没有明显变化。这说明生长素、细胞分裂素、赤霉素和油菜素内酯都参与了过表达 *CML25-like* 诱导的单性结实过程。

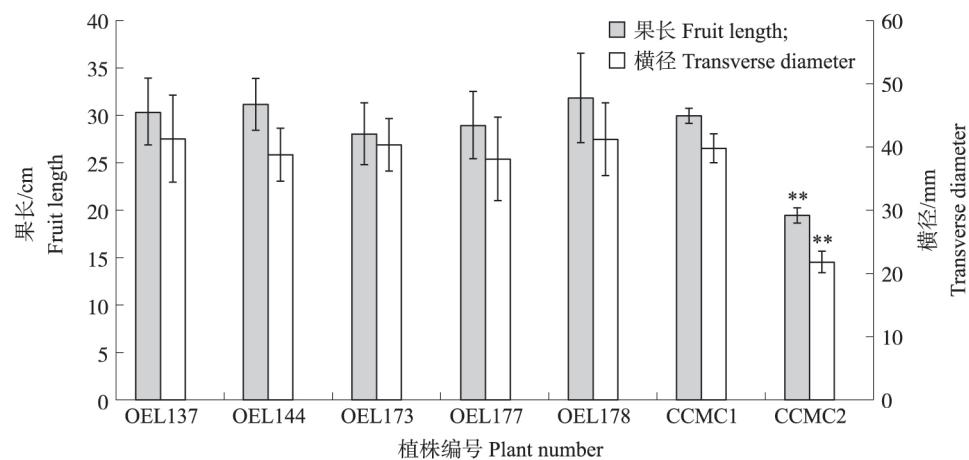


图7 转基因植株和CCMC的单性结实果实及正常授粉果实的果长和横径比较

Fig. 7 The comparative analysis of fruit length and transverse diameter of parthenocarpic fruits of transgenic plants and CCMC and normally pollinated fruits of CCMC

CCMC1: CCMC 授粉果实 Normally pollinated fruits of CCMC; CCMC2: CCMC 单性结实果实 Parthenocarpic fruits of CCMC.

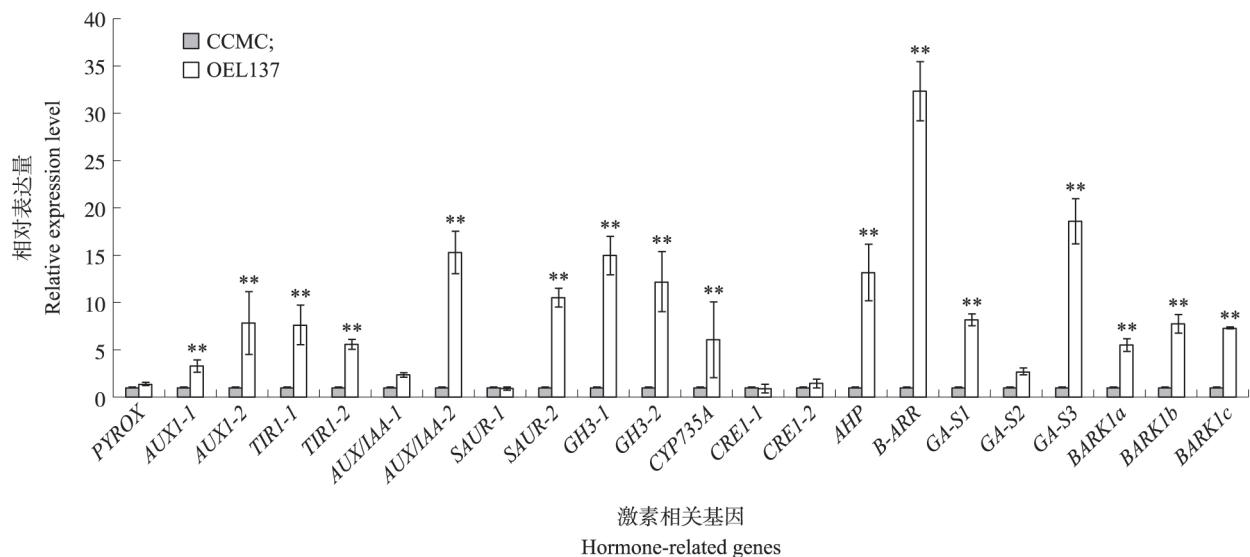
** $P<0.01$ (以 CCMC 授粉果实为对照 Normally pollinated fruits of CCMC as a control $n>5$).

图8 黄瓜成熟果实中激素相关基因的表达分析

Fig. 8 The expression analysis of hormone related genes in mature fruits of cucumber

** $P<0.01$ (以 CCMC 果实为对照 The fruits of CCMC as a control $n=3$).

3 讨论

研究表明,钙调素类似蛋白基因在植物不同组织部位或者同一组织的不同发育时期表达活性各不相同^[4]。本研究发现,在黄瓜中*CML25-like*的表达也具有组织特异性,在根、茎、老叶以及雄花中的表达量较低,而在嫩叶及雌花中的表达量较高。幼叶和雌花都是细胞快速增殖和生长的器官,表明*CML25-like*与细胞分裂和分化有关。钙调素类似蛋白是细胞Ca²⁺信号转导途径中的主要部分,而Ca²⁺是细胞内信号传递的第二信使,对果实的发育具有极其重要的作用。本研究通过*CML25-like*在黄瓜果实发育不同时期中的表达分析发现,*CML25-like*在正常果实发育过程中上调表达,而在果实败育过程中下调表达。*CML25-like*在雌花中表达量较高,而雌花又与果实发育相关,表明*CML25-like*与黄瓜果实发育密切相关。

果实的发育包括果实形成和膨大2个阶段^[13-15]。白吉刚等^[16]将拟南芥生长素结合蛋白基因*ABP1*转入黄瓜后提高了植株的单性结实率,得出生长素结合蛋白参与黄瓜果实生长发育的结论。本研究通过在CCMC中过表达*CML25-like*显著提高了植株的单性结实率,表明*CML25-like*与果实形成有关。很多单性结实的黄瓜品种在坐果后由于温度、营养、根瓜抑制等原因停止继续膨大,形成“僵瓜”状态^[17]。在本研究中,对照CCMC虽有单性结实能力,但其单性结实的果实长度和横径远远小于正常授粉坐果的果实。

与对照 CCMC 相比,过表达 *CML25-like* 的转基因植株单性结实果实数量多,单性结实率高,果实的长度和横径可以发育到正常授粉瓜的大小,且显著大于对照 CCMC。说明黄瓜钙调素类似蛋白基因 *CML25-like* 不仅能诱导黄瓜单性结实,也能够促进果实的膨大。

大量研究发现 *A* 种植物生长物质(生长素、细胞分裂素、赤霉素和油菜素内酯)在果实发育的不同阶段起不同的调节作用^[18-20]。在非单性结实的品种中,外源添加植物生长物质也能诱导单性结实^[21-22]。前人研究发现,当在子房中表达与生长素合成相关的基因时,生长素信号通过生长素受体 TIR1/AFB 和 Aux/IAA 等蛋白家族在植物体内传递,促进下游相关基因的表达,进而诱导单性结实^[23-25]。本研究发现在过表达 *CML25-like* 诱导的单性结实果实中,生长素受体蛋白基因(*TIR1-1* 和 *TIR1-2*)、应答基因(*AUX/IAA-2*)和诱导基因(*SAUR-2*、*GH3-1* 和 *GH3-2*)的表达均显著上调。在果实生长发育过程中,赤霉素合成酶及氧化酶基因的大量表达能够诱导果实单性结实,而 DELLA 蛋白的存在可以负调控 GA 信号转导途径从而抑制果实生长发育^[26]。本研究中,赤霉素合成基因(*GA-S1*)相比 DELLA 蛋白基因(*GA-S2*)上调表达极显著。我们推测过表达 *CML25-like* 的果实中生长素受体蛋白基因、应答基因、诱导基因和赤霉素合成基因的上调表达促进了果实发育,进而诱导单性结实。Fu 等^[27]研究发现油菜素内酯能够通过诱导黄瓜活性细胞分裂从而促进黄瓜单性结实,在植物体内 Brassinolide insensitive 1 是油菜素内酯的信号转导受体蛋白^[28]。本研究中 3 个油菜素内酯信号转导受体蛋白基因(*BIRK1a*、*BIRK1b* 和 *BIRK1c*)的表达在转基因植株 OEL137 果实中也都明显上调,推测 *CML25-like* 通过上调表达油菜素内酯信号转导受体蛋白基因诱导黄瓜活性细胞分裂进而促进单性结实。目前关于细胞分裂素相关基因功能与单性结实之间的关联尚不清楚,只发现细胞分裂素生物合成的关键酶基因 *ipt*(isopentenyl transferase gene)能够引起单性结实^[29]。本研究发现,OEL137 果实中细胞分裂素的合成基因(*CYP735A*)显著上调表达,而细胞分裂素的下游基因(*CRE1-1* 和 *CRE1-2*)没有明显变化,因此推测细胞分裂素的合成基因参与了过表达 *CML25-like* 诱导的单性结实过程。Li 等^[30]提出黄瓜的单性结实可能是由 1 个“平行的开关”控制,它包括激素依赖型和激素非依赖型 2 种通路;在足够的激素作用下,黄瓜子房能够通过这 2 种通路形成幼果并最终发育成熟;当激素缺少时,激素依赖型的黄瓜子房表现出果实败育,而激素不依赖型的子房则保持“僵瓜”状态。本研究发现,过表达 *CML25-like* 能够引起黄瓜单性结实,且单性结实果实中生长素、细胞分裂素、赤霉素和油菜素内酯的相关基因大量显著上调表达。前期的转录组学分析发现,*CML25-like* 是 1 个非激素依赖性基因,因此我们推测 *CML25-like* 通过上调表达生长素、细胞分裂素、赤霉素和油菜素内酯相关基因,从而使果实内激素含量满足形成单性结实的需求,进而促进细胞的分裂及生长,最终促进果实的形成与膨大,诱导单性结实。

参考文献 References:

- [1] 张婷,武喆,张开京,等. 黄瓜单性结实候选基因预测与表达分析[J]. 核农学报,2016,30(2):224-230.
Zhang T,Wu Z,Zhang K J,et al. Prediction and expression analysis of parthenocarpy candidate genes in cucumber [J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences,2016,30(2):224-230(in Chinese with English abstract).
- [2] Dobney S,Chiasson D,Lam P,et al. The calmodulin-related calcium sensor CML42 plays a role in trichome branching[J]. Journal of Biological Chemistry,2009,284(46):31647-31657.
- [3] Bender K W,Rosenbaum D M,Vanderbeld B,et al. The *Arabidopsis* calmodulin-like protein,CML39,functions during early seedling establishment[J]. The Plant Journal,2013,76(4):634-647.
- [4] Yang X,Wang S S,Wang M,et al. *Arabidopsis thaliana* calmodulin-like protein CML24 regulates pollen tube growth by modulating the actin cytoskeleton and controlling the cytosolic Ca²⁺ concentration[J]. Plant Molecular Biology,2014,86(3):225-236.
- [5] Wang S S,Diao W Z,Yang X,et al. *Arabidopsis thaliana* CML25 mediates the Ca²⁺ regulation of K⁺ transmembrane trafficking during pollen germination and tube elongation[J]. Plant,Cell and Environment,2015,38:2372-2386.
- [6] 罗充,樊卫国,刘进平,等. 钙、钙调素在刺梨果实发育过程中的含量变化研究[J]. 种子,2004,23(12):6-8.
Luo C,Fan W G,Liu J P,et al. Studies on changes of calcium and calmodulin contents during fruit development in *Rosa roxburghii* Tratt [J]. Seed,2004,23(12):6-8(in Chinese with English abstract).
- [7] 罗充,彭抒昂,李国怀. 梨不同品种果实发育中钙与钙调素的动态研究[J]. 华中农业大学学报,2001,20(3):286-288.
Luo C,Peng S A,Li G H. Studies on dynamics of Ca and CaM during fruit development of different pear varieties [J]. Journal of Huazhong Agricultural University,2001,20(3):286-288(in Chinese with English abstract).
- [8] 吴有梅,刘愚. 番茄果实成熟过程中钙调素含量变化及其与乙烯生成的关系[J]. 植物生理学报,1990,16(3):245-250.
Wu Y M,Liu Y. Changes of calmodulin content in tomato during ripening and its relation to ethylene production [J]. Acta Phytophysiolica Sinica,1990,16(3):245-250(in Chinese with English abstract).
- [9] Li J,Wu Z,Cui L,et al. Transcriptome comparison of global distinctive features between pollination and parthenocarpic fruit set reveals transcrip-

- tional phytohormone cross-talk in cucumber(*Cucumis sativus* L.) [J]. Plant and Cell Physiology 2014, 55(7) : 1325–1342.
- [10] 李蕾 李季 孟永娇 等. 黄瓜 T-DNA 插入突变体库的构建[J]. 南京农业大学学报 2016, 39(1) : 40–47. DOI: 10.7685/jnau.201504014.
Li L ,Li J ,Meng Y J ,et al. Construction of cucumber(*Cucumis sativus* L.) T-DNA insertion mutant library [J]. Journal of Nanjing Agricultural University 2016, 39(1) : 40–47(in Chinese with English abstract) .
- [11] 武喆 李蕾 张婷 等. 黄瓜单性结实性状的 QTL 定位[J]. 中国农业科学 2015, 48(1) : 112–119.
Wu Z ,Li L ,Zhang T ,et al. QTL mapping for parthenocarpy in cucumber [J]. Scientia Agricultura Sinica ,2015, 48(1) : 112–119(in Chinese with English abstract) .
- [12] 孟永娇 李季 徐建 等. 黄瓜扩张素蛋白基因 *CsEXPb1* 的克隆及表达分析[J]. 园艺学报 2015, 42(4) : 679–688.
Meng Y J ,Li J ,Xu J ,et al. Cloning and expression analysis of the expansin gene *CsEXPb1* in cucumber [J]. Acta Horticulturae Sinica ,2015 , 42(4) : 679–688(in Chinese with English abstract) .
- [13] Ding J ,Chen B ,Xia X ,et al. Cytokinin-induced parthenocarpic fruit development in tomato is partly dependent on enhanced gibberellin and auxin biosynthesis[J]. PLoS One 2013, 8(7) : e70080.
- [14] Chen Z H ,Hu L Z ,Han N ,et al. Overexpression of a miR393-resistant form of *transport inhibitor response protein 1*(*mTIR1*) enhances salt tolerance by increased osmoregulation and Na⁺ exclusion in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Cell and Physiology 2015, 56(1) : 73–83.
- [15] El-Sharkawy I ,Sherif S ,El-Kayal W ,et al. Overexpression of plum auxin receptor *PsITIR1* in tomato alters plant growth ,fruit development and fruit shelf-life characteristics[J]. BMC Plant Biology 2016, 16: 56.
- [16] 白吉刚 王秀娟 尹谦逊 等. 生长素结合蛋白基因转化黄瓜的研究[J]. 中国农业科学 2004, 37(2) : 263–267.
Bai J G ,Wang X J ,Yin Q X ,et al. Regeneration and Transformation of *Cucumis sativus* cv. Jinyansihao [J]. Scientia Agricultura Sinica 2004 , 37(2) : 263–267(in Chinese with English abstract) .
- [17] Piyada A T ,Atitaya S ,Paniti P. Effects of exogenous plant growth regulators on yield ,fruit growth and concentration of endogenous hormones in gynoecious parthenocarpic cucumber(*Cucumis sativus* L.) [J]. The Horticulture Journal 2015, 84(4) : 342–349.
- [18] 孙涌栋. 授粉后黄瓜果实膨大生长相关基因的克隆与表达分析[D]. 重庆: 西南大学 2006.
Sun Y D. Cloning and expression analysis of expanding growth related genes from cucumber fruit after pollination [D]. Chongqing: Southwest University 2006(in Chinese with English abstract) .
- [19] 王垒 娄丽娜 闫立英 等. 黄瓜果实发育早期 Aux/IAA 家族部分基因的差异表达分析[J]. 南京农业大学学报 2011, 34(4) : 13–17.
DOI: 10.7685/j.issn.1000–2030.2011.04.003.
Wang L ,Lou L N ,Yan L Y ,et al. A differential expression analysis of some Aux/IAA family genes in cucumber fruit during the early development [J]. Journal of Nanjing Agricultural University 2011, 34(4) : 13–17(in Chinese with English abstract) .
- [20] 陆晓民 孙锦 郭世荣 等. 外源 24–表油菜素内酯对低氧胁迫下黄瓜幼苗生长和可溶性蛋白表达的影响[J]. 南京农业大学学报 , 2011, 34(6) : 31–35. DOI: 10.7685/j.issn.1000–2030.2011.06.006.
Lu X M ,Sun J ,Guo S R ,et al. Effects of exogenous 24-epibrassinolide on the growth and soluble protein expression in cucumber seedlings under hypoxia stress [J]. Journal of Nanjing Agricultural University 2011, 34(6) : 31–35(in Chinese with English abstract) .
- [21] Ozga J A ,Reinecke D M. Hormonal interactions in fruit development [J]. Journal of Plant Growth Regulation 2003, 22: 73–81.
- [22] 刘春香 曹齐卫 ,于玉梅 等. 外源激素及内源激素对黄瓜果实发育的影响[J]. 安徽农业科学 2011, 39(18) : 10772–10774.
Liu C X ,Cao Q W ,Yu Y M ,et al. Effects of exogenous hormone treatments on the fruit development of cucumber and analysis on its endogenous [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences 2011, 39(18) : 10772–10774(in Chinese with English abstract) .
- [23] Korasick D A ,Jez J M ,Strader L C. Refining the nuclear auxin response pathway through structural biology [J]. Current Opinion in Plant Biology 2015, 27: 22–28.
- [24] Salehin M ,Bagchi R ,Estelle M. SCF^{TIR1/AFB}-based auxin perception: mechanism and role in plant growth and development [J]. The Plant Cell , 2015, 27(1) : 9–19.
- [25] Yu H ,Zhang Y ,Moss B L ,et al. Untethering the TIR1 auxin receptor from the SCF complex increases its stability and inhibits auxin response [J]. Nature Plants 2015, 1(3) : 14030.
- [26] 张彤 赵琳 赵建刚 等. 植物 DELLA 蛋白的功能及其在大豆中的研究[J]. 大豆科学 2011, 30(5) : 874–879.
Zhang T ,Zhao L ,Zhao J G ,et al. Function of plant DELLA protein and its research advancement in soybean [J]. Soybean Science ,2011 , 30(5) : 874–879(in Chinese with English abstract) .
- [27] Fu F Q ,Mao W H ,Shi K ,et al. A role of brassinosteroids in early fruit development in cucumber [J]. Journal of Experimental Botany 2008 , 59(9) : 2299–2308.
- [28] 邹雪 邓孟胜 李立芹 等. 油菜素内酯合成和信号转导基因在马铃薯块茎贮藏期间的表达变化及对萌芽的影响[J]. 作物学报 ,2017 , 43(6) : 811–820.
Zou X ,Deng M S ,Li L Q ,et al. Expression changes of genes related to brassinosteroid biosynthesis and signal transduction during potato storage and its effect on tuber sprouting [J]. Acta Agronomica Sinica 2017, 43(6) : 811–820(in Chinese with English abstract) .
- [29] 毛自朝 于秋菊 甄伟 等. 果实专一性启动子驱动 *ipt* 基因在番茄中的表达及其对番茄果实发育的影响[J]. 科学通报 2002, 47(6) : 444–448.
Mao Z Z ,Yu Q J ,Zhen W ,et al. Expression of *ipt* gene driven by a fruit-specific promotor in tomato and the effects on the development of fruit [J]. Chinese Science Bulletin 2002, 47(6) : 444–448(in Chinese with English abstract) .
- [30] Li J ,Xu J ,Guo Q W ,et al. Proteomic insight into fruit set of cucumber(*Cucumis sativus* L.) suggests the cues of hormone-independent parthenocarpy [J]. BMC Genomics 2017, 18: 896.

责任编辑: 范雪梅