



巨桉*EgrUTr1*基因的克隆及其在内质网胁迫下的表达分析

赵泽平, 杨涛, 黄梦娇, 王晓萍, 刘文杰, 刘世明, 刘林川

引用本文:

赵泽平, 杨涛, 黄梦娇, 等. 巨桉*EgrUTr1*基因的克隆及其在内质网胁迫下的表达分析[J]. 热带亚热带植物学报, 2026, 34(3): 346–354.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11926/jtsb.5046>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

巨桉*BRI1*基因的克隆和表达分析

Gene Cloning and Expression Analysis of *BRI1* in *Eucalyptus grandis*

热带亚热带植物学报. 2019, 27(6): 684–692 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4044>

毛竹*APX*家族基因鉴定和表达分析

Identification and Expression Analysis of the *APX* Gene Family in *Phyllostachys edulis*

热带亚热带植物学报. 2020, 28(3): 255–264 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4155>

青花菜*BoSCL3*基因的克隆和渍水胁迫下的表达特征分析

Cloning *BoSCL3* Gene from *Brassica oleracea* var. *italica* and Expression Analysis under Waterlogging Stress

热带亚热带植物学报. 2021, 29(2): 195–200 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4263>

马尾松*PmPGK1*和*PmGPIC*基因的克隆和表达分析

Cloning and Expression Analysis on *PmPGK1* and *PmGPIC* Genes in *Pinus massoniana*

热带亚热带植物学报. 2021, 29(4): 339–348 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4315>

5种相思树和尾巨桉人工林土壤养分和酶活性特征

Characteristics of Soil Nutrient and Enzyme Activities in Plantations of *Eucalyptus urophylla* × *E. grandis* and Five *Acacia* Species

热带亚热带植物学报. 2021, 29(5): 483–493 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4334>

向下翻页，浏览PDF全文

巨桉 *EgrUTr1* 基因的克隆及其在内质网胁迫下的表达分析

赵泽平, 杨涛, 黄梦娇, 王晓萍, 刘文杰, 刘世明, 刘林川*

(华南农业大学林学与风景园林学院, 广东省森林植物种质创新与利用重点实验室, 广州 510642)

摘要: 桉树(*Eucalyptus* spp.)作为我国南方重要的经济速生树种, 在林业生产中占据重要地位。然而, 随着单株无性系的大规模使用和人工林面积的持续扩大, 桉树面临的生物和非生物胁迫风险显著增加。内质网应激是真核生物进化过程中形成的一种重要的细胞器胁迫响应机制, 在维持细胞内蛋白质稳态和抵御不利环境中发挥着关键作用。本研究从巨桉(*E. grandis*)中成功克隆获得 *EgrUTr1* 基因, 其编码区全长 1 023 bp, 编码由 340 个氨基酸残基组成的跨膜蛋白。亚细胞定位分析证实 *EgrUTr1* 定位于内质网。表达模式分析表明, *EgrUTr1* 在巨桉各组织中均有表达, 且其表达水平在内质网胁迫诱导剂二硫苏糖醇(DTT)和衣霉素(TM)的诱导下显著上调。在模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中异源表达 *EgrUTr1* 可显著增强植株对 TM 胁迫的抗性, 这表明 *EgrUTr1* 可能参与内质网胁迫响应途径, 在植物应对内质网胁迫过程中发挥重要的调控作用, 为深入解析巨桉内质网胁迫响应的分子机制提供了重要线索。

关键词: 巨桉; *EgrUTr1*; 内质网应激; 胁迫响应; 基因功能

doi: 10.11926/jtsb.5046

CSTR:32235.14:jtsb.5046

Cloning of *EgrUTr1* from *Eucalyptus grandis* and Its Expression Analysis Under Endoplasmic Reticulum Stress

ZHAO Zeping, YANG Tao, HUANG Mengjiao, WANG Xiaoping, LIU Wenjie, LIU Shiming, LIU Linchuan*

(College of Forestry and Landscape Architecture, South China Agricultural University, Guangdong Provincial Key Laboratory of Forest Plant Germplasm Innovation and Utilization, Guangzhou 510642, China)

Abstract: *Eucalyptus* spp., as an important fast-growing economic tree species in southern China, plays a significant role in forestry production. However, with the large-scale use of single clone and the continuous expansion of plantation area, the risk of biotic and abiotic stress faced by *Eucalyptus* has significantly increased. Endoplasmic reticulum (ER) stress is an important organelle stress response mechanism formed during the evolution of eukaryotes, which plays a key role in maintaining protein homeostasis within cells and resisting adverse environments. The *EgrUTr1* gene was successfully cloned from *E. grandis*. The full-length coding sequence (CDS) of *EgrUTr1* is 1 023 bp encoding a putative transmembrane protein of 340 amino acids. Subcellular localization analysis confirmed that *EgrUTr1* was located in ER. *EgrUTr1* was expressed in all tissues of *E. grandis*, and its expression was significantly upregulated under the induction of ER stress inducers dithiothreitol (DTT) and tunicamycin (TM). Heterologous expression of *EgrUTr1* in the model plant *Arabidopsis thaliana* significantly enhanced the plant resistance to TM stress, indicating that *EgrUTr1* might be involved in

收稿日期: 2025-07-10

接受日期: 2025-09-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(32370269, 31970187)资助

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 32370269, 31970187).

作者简介: 赵泽平(2000年生), 男, 硕士研究生, 研究方向为林木遗传育种。E-mail: 1716907458@qq.com

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: lcliu@scau.edu.cn

the ER stress response pathway and play an important regulatory role in the process of plants responding to ER stress. These would provide important clues for further understanding the molecular mechanism of ER stress response in *E. grandis*.

Key words: *Eucalyptus grandis*; *EgrUTr1*; Endoplasmic reticulum stress; Stress response; Gene function

桉树(*Eucalyptus* spp.)具有生长快速、适应性强和材质好等特点,是我国南方地区最重要的速生经济树种之一,广泛应用于造纸、人造板、生物能源等多个工业领域^[1-2]。据统计,我国桉树人工林面积近 6.0×10^6 hm²,年产值超过千亿元,在林业产业中占据重要地位^[3]。然而,随着全球气候变化加剧和人工林经营强度的提高,桉树种植面临着巨大的挑战。一方面,单一无性系的大规模推广导致遗传多样性降低,使人工林生态系统变得更加脆弱;另一方面,极端气候事件频发、土壤退化、病虫害加剧等环境胁迫因素严重制约了桉树的健康生长和可持续经营^[4-5]。因此,深入解析桉树抗逆分子机制,发掘关键抗性基因资源,对保障我国桉树产业健康发展具有重要的理论和实践意义。

内质网作为真核细胞中最大的膜系统细胞器,在蛋白质合成、折叠、修饰以及钙离子稳态维持等过程中发挥着核心作用^[6]。当细胞遭遇环境胁迫或内部生理紊乱时,内质网内未折叠或错误折叠蛋白异常积累,引发内质网应激(ER stress)。为应对这些不利因素,真核细胞进化出了高度保守的未折叠蛋白反应信号通路^[7-8]。该通路通过跨膜传感器或转录因子感知胁迫信号,进而调控数百个下游靶基因的表达,最终实现蛋白质稳态的重建^[9]。近年来研究表明,内质网应激响应不仅在动物疾病和细胞凋亡中起关键作用,在植物适应非生物胁迫(如干旱、高温、盐碱等)过程中同样扮演着重要角色^[10]。然而,与模式植物拟南芥相比,目前对本本植物特别是重要经济树种桉树的内质网应激响应机制仍知之甚少。

本研究以巨桉(*E. grandis*)为研究对象,采用分子生物学的研究策略,重点解析了内质网胁迫响应基因 *EgrUTr1* 的功能特性。通过基因克隆、序列分析、亚细胞定位、表达模式检测以及转基因功能验证等系统研究,发现 *EgrUTr1* 编码一个定位于内质网的多次跨膜蛋白,其表达受典型内质网胁迫诱导剂(DTT 和 TM)显著上调。更重要的是,在模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中异源过表达 *EgrUTr1* 能显著提高转基因植株对内质网胁迫的抗性。这些

发现不仅丰富了人们对木本植物内质网应激响应的认知,也为桉树抗逆分子育种提供了新的基因资源和理论依据。

1 材料和方法

1.1 植物材料与菌株

植物材料包括巨桉(*Eucalyptus grandis*)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)和本氏烟草(*Nicotiana benthamiana*)。拟南芥为哥伦比亚(Columbia, Col-0)生态型,巨桉无性系为 GL1,组培苗扩繁后移栽至华南农业大学林学与风景园林学院温室培育,培养6个月后,分别采集幼嫩叶片、成熟叶片、根、茎及茎尖组织以供后续实验使用。选取生长状态良好且株高(10~15 cm)的幼苗,分别用 2 mmol/L 二巯苏糖醇(DTT)或 5 μ g/mL 衣霉素(TM)进行叶片喷施,于 0、1、6、12 和 24 h 分别采集叶片样本,经液氮速冻后保存于-80 $^{\circ}$ C 超低温冰箱中,用于 RNA 提取。每个处理取 5 株幼苗,所有实验均设置 3 次技术重复。

大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株为 DH5 α ;根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)菌株为 GV3101,均由本实验室保存,KOD-Plus-NEO 高保真 DNA 聚合酶购于上海东洋纺生物科技有限公司;DNA 回收试剂盒、质粒提取试剂盒、核酸染料均购于南京诺唯赞生物科技股份有限公司;限制性核酸内切酶购自纽英伦生物技术(北京)有限公司;SYBR Premix Ex Taq 购自爱博泰克生物科技有限公司,引物合成和 DNA 测序由生工生物工程(上海)有限公司完成。

1.2 *EgrUTr1* 的生物信息学分析

利用 ExPASy ProtParam 工具(<http://web.expasy.org/protparam/>)分析并预测 *EgrUTr1* 蛋白的理化性质。通过 TMHMM 网站(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)对 *EgrUTr1* 蛋白的跨膜结构进行预测分析。利用 SOPMA 网站(http://npsapbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)对 *EgrUTr1* 蛋白的二级结构进行预测。利用 InterPro 网站(<http://www.ebi.ac.uk/inter-pro/>)对 *EgrUTr1* 蛋白的结构域进行分析。利用 AlphaFold 网站(<https://alphafold.com>)

对 *EgrUTr* 蛋白的三级结构进行预测。在 NCBI 数据库中,通过 BLAST 工具(<http://phytozome-next.jgi.doe.gov/blast-search>)检索不同植物的同源序列,选择与 *EgrUTr1* 蛋白相似度较高的物种进行多序列比对,利用 IBIVU 工具(<https://www.ibi.vu.nl/programs/pralinewww/>)绘制比对结果图,并在 MEGA X 软件中采用邻接法构建系统进化树。

1.3 总 RNA 的提取及 cDNA 第一链的合成

准确称取 0.05 g 植物组织,置于预先冷却的 1.5 mL EP 管中,迅速用液氮速冻。随后,利用研磨仪在低温状态下将样品研磨至粉末状。采用 Fast Pure® Plant Total RNA Isolation Kit RC401 (Vazyme) 试剂盒提取总 RNA。提取完成后,使用 HiScript® III RT SuperMix for qPCR R323 (Vazyme) 试剂盒去除 RNA 中残留的 DNA,并进行快速反转录,最终合成 cDNA,以供后续实验使用。

1.4 实时荧光定量 PCR

选定需要检测的基因,通过 IDT 在线网站(<https://sg.idtdna.com/scitools/Applications/Real-TimePCR/default.aspx>)设计引物。以 cDNA 为模板,采用实时荧光定量 PCR 技术进行基因表达分析。实验中以 *EF2* 基因为内参,样本和内参均设置 3 个技术重复,采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法对荧光定量 PCR 扩增结果进行相对基因表达分析。整个反应在 BIO-RED 实时荧光定量 PCR 仪中进行,反应条件为:95 °C 预变性 10 s;随后 94 °C 变性 10 s、60 °C 退火和延伸 40 s,共 40 个循环,每个循环包括荧光信号在 60 °C 时采集,重复 3 次。最终,利用 GraphPad Prism 8 软件进行数据的统计学分析和绘图。

1.5 *EgrUTr1* 基因克隆

以巨桉的 cDNA 为模板,利用 SnapGene 软件和 NCBI 中的 Prime BLAST 在线工具设计引物,通过 Phanta 高保真 DNA 聚合酶进行 PCR 扩增。PCR 反应体系如下:2×Phanta Max buffer 25 μ L, dNTP Mix 1 μ L, 正向引物 2 μ L, 反向引物 2 μ L, Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 1 μ L, cDNA/gDNA 1 μ L, ddH₂O 补齐至 50 μ L。反应程序为:95 °C 预变性 3 min,随后 95 °C 变性 15 s、58 °C 退火 15 s、72 °C 延伸 1 min,共 34 个循环;最后 72 °C 延伸 5 min;反应完成后于 4 °C 保存。

1.6 表达载体构建

将 *EgrUTr1* 基因的编码区片段与双元载体 *pCA MBIA1300* 35s:MCS-FLAG/*eGFP* 进行连接。通过同

源重组的方法,将带同源臂的目的片段与酶切后的载体共同转化至大肠杆菌感受态细胞中。利用菌液 PCR 和酶切质粒的方法筛选正确的克隆,并进行测序验证。随后,将经过验证的重组质粒转化根癌农杆菌 GV3101 中,用于 *EgrUTr1* 蛋白的亚细胞定位研究以及获得过表达 *EgrUTr1* 的转基因拟南芥植株。

1.7 烟草瞬时表达及蛋白亚细胞定位分析

取生长 4~5 周的本氏烟草,从叶片背面注射 0.5 mL 含目的基因的农杆菌悬浮液($OD_{600}=0.6$)。然后将烟草置于 22 °C 的暗环境中培养 48 h。随后,剪取注射区域的叶片,制备玻片样本。利用共聚焦显微镜(Leica STELLARIS 5)在 488 nm 和 532 nm 激发光下分别观察 GFP 和 RFP 荧光信号。最后,使用 ImageJ 软件对采集到的图像进行整合分析。

1.8 拟南芥遗传转化

采用花序浸染法对拟南芥植株进行处理。首先,将根癌农杆菌以 1:100 的比例接种至含有利福平抗性的液体 LB 培养基中。在 28 °C 的摇床中培养,直至其 OD_{600} 值达到 1.5。随后,利用高速离心机以 2 700 $\times g$ 的转速离心 10 min,收集菌体。使用 100 mL 预先配制好的侵染液将菌体重悬。侵染液的配方为:5 g 蔗糖、20 μ L Silwet L-77、0.22 g MgCl₂,用 ddH₂O 定容至 100 mL。将拟南芥的花序浸入该侵染液中 10~20 s,确保花序充分接触侵染液。随后将植株置于黑暗环境中生长 12 h,以促进农杆菌的侵染。处理完成后,立即将拟南芥移至培养室中继续培养,直至种子成熟。

1.9 过表达 *EgrUTr1* 的拟南芥阳性苗胁迫处理

配制 1 mol/L DTT 母液(将 1.54 g DTT 溶于 10 mL ddH₂O 中)和 5 mmol/L TM 母液(将 5 mg TM 溶于 1.22 mL 的 DMSO 中),后分别稀释为 1.5 mmol/L DTT 和 0.15 μ g/mL TM 的 1/2MS 培养基。将转基因拟南芥阳性苗种子均匀地播种在上述培养基上,每个处理均设 3 次重复。播种后,将培养皿置于 4 °C 避光进行春化处理,2 d 后将培养皿转移至 22 °C 光照培养间培养 10 d。培养结束后,利用 ImageJ 软件对叶片面积和根长进行精确测量,采用 GraphPad Prism 8 软件对数据进行统计分析并绘图。

2 结果和分析

2.1 *EgrUTr1* 基因克隆和序列分析

从 Phytozome13 数据库中获取了巨桉 *EgrUTr1*

表 1 所用引物

Table 1 Primers in this study

用途 Use	引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')
基因克隆 Gene cloning	<i>EgrUTr1</i>	F: ACGATGATAAGGGCGGTACCATGGAAGCTCACGGCGCCGG R: GGAAATTCGAGCTCACTAGTTCACATGGCCTTCCTCTTCT
	<i>GFP-EgrUTr1</i>	F: TGTACAAGGAGCTCGGATCCATGGAAGCTCACGGCGCCGG R: CATAATACTCGAACCTGCAGTCACATGGCCTTCCTCTTCT
荧光表达载体构建 Construction of fluorescent expression vector		
实时荧光定量 PCR qRT-PCR	<i>EgrEF2</i>	F: TCCAATCCGAGTCGCTGTCATTGT R: TGATGAGCCTCTCTGGTTTGACCT
	<i>QP-EgrUTr1</i>	F: GGACTTTTTGGAGCCCTGGA R: ACTGTCATATCAGGTTGGCAGA

基因的参考序列,该基因包含 7 个外显子(图 1: A)。以巨桉 cDNA 为模板,利用特异性引物(表 1)对 *EgrUTr1* 基因的编码区序列进行 PCR 扩增。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测后,切取目标大小的 DNA 条带进行胶回收。回收产物连接至双元表达载体 *pCAMBIA1300 35S::FLAG*,并转化至大肠杆菌,对经 PCR 验证的阳性菌落进行测序。序列比对分析表明, *EgrUTr1* 基因 CDS 全长为 1 023 bp,编码 340 个氨基酸。该蛋白的理论分子量约为 37 kDa,等电点为 9.62,不稳定系数为 23.45,脂肪系数为 97.53。此外,该蛋白未检测到信号肽,其二级结构主要由 α 螺旋、延伸链和无规则卷曲组成,其中 α 螺旋占 54.82%,延伸链占 11.45%,无规则卷曲占 33.73%;

该蛋白共有 10 次跨膜区域(图 1: B, C)。结构域分析表明, *EgrUTr1* 蛋白含有 UAA 结构域(图 1: D),该结构域被注释为具有转运尿苷二磷酸-葡萄糖(UDP-Glc)的功能。利用 AlphaFold 在线工具对 *EgrUTr1* 蛋白序列进行分析,获得了其三维结构模型(图 1: E)。

2.2 *EgrUTr1* 系统进化分析和同源性分析

为了探究 *EgrUTr1* 的进化关系,从 NCBI 数据库中下载了拟南芥、毛果杨(*Populus trichocarpa*)、玉米(*Zea mays*)、可可(*Theobroma cacao*)、水稻(*Oryza sativa*)、桃(*Prunus persica*)等物种的 UTr1 同源蛋白的氨基酸序列,利用 MEGA X 软件进行多序列比对,并采用邻接法构建系统进化树(图 2),结果表明 *EgrUTr1* 与双子叶植物聚为一支,与甜橙

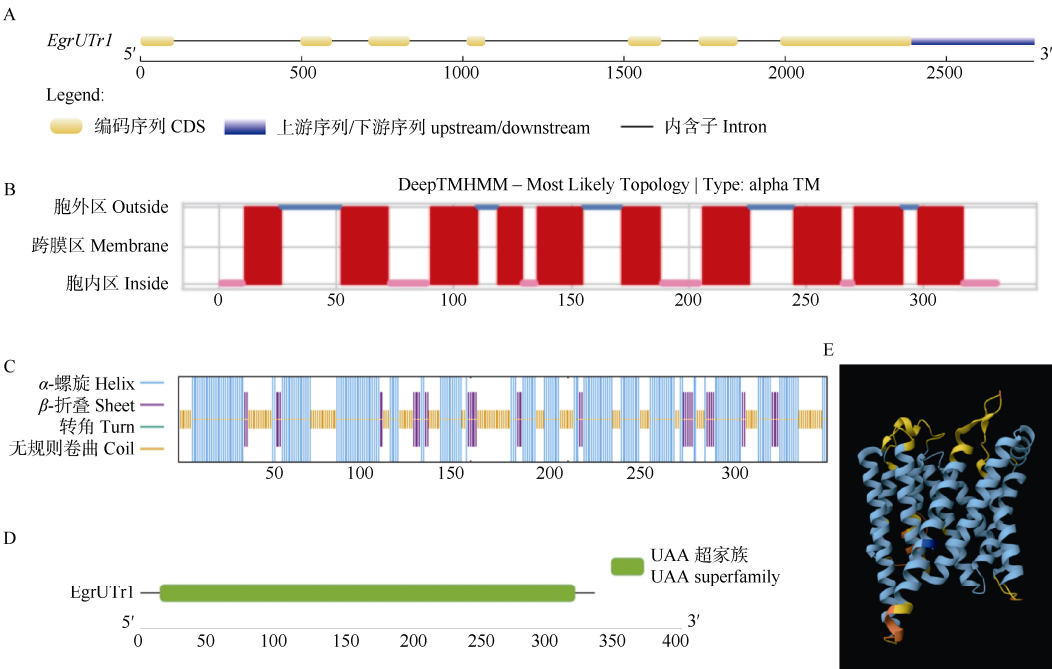


图 1 *EgrUTr1* 基因结构(A)和 *EgrUTr1* 蛋白结构(B~E)。B: 跨膜结构预测(红色方块); C: 二级结构预测; D: 结构域分析; E: 三级结构预测。

Fig. 1 Structures of *EgrUTr1* gene (A) and *EgrUTr1* protein (B~E). B: Prediction of transmembrane structure (Red rectanglent); C: Prediction of secondary structure; D: Domain analysis; E: Prediction of tertiary structure.

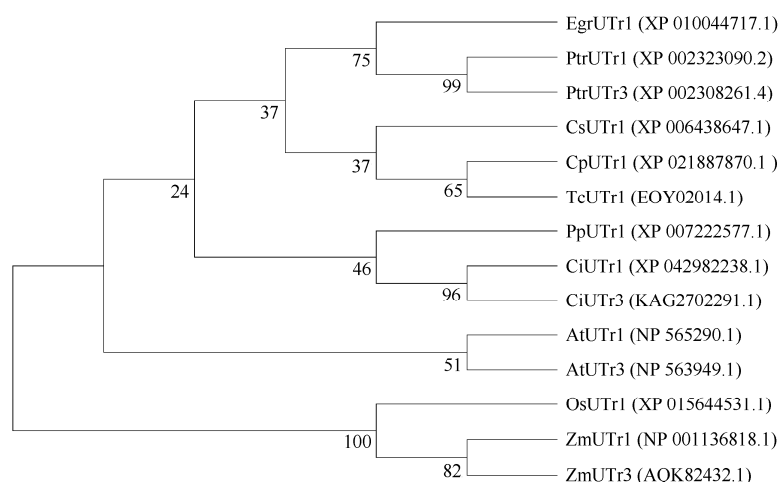


图 2 EgrUTr1 的系统进化树。Egr: 巨桉; Pt: 毛果杨; Cs: 甜橙; Cp: 番木瓜; Tc: 可可; Pp: 桃树; Ci: 美国山核桃; At: 拟南芥; Os: 水稻; Zm: 玉米。

Fig. 2 Phylogenetic tree of EgrUTr1. Egr: *Eucalyptus grandis*; Pt: *Populus trichocarpa*; Cs: *Citrus sinensis*; Cp: *Carica papaya*; Tc: *Theobroma cacao*; Pp: *Prunus persica*; Ci: *Carya illinoensis*; At: *Arabidopsis thaliana*; Os: *Oryza sativa*; Zm: *Zea mays*.

(*Citrus sinensis*)中 CsUTr1 相似度最高(84.6%), 其次为毛果杨(80.7%)。EgrUTr1 与拟南芥 AtUTr1 的相似度为 75.2%, 略低于木本植物(甜橙、毛果杨), 但仍然表现出较高的序列保守性, 这为研究 EgrUTr1 在巨桉内质网胁迫响应中的作用提供了重要的进化依据。

2.3 EgrUTr1 基因的组织表达模式

为解析 *EgrUTr1* 的表达模式, 采用实时荧光定量 PCR 对巨桉不同组织部位中的 *EgrUTr1* 表达情况进行检测(图 3)。分别提取巨桉根、茎尖、茎、幼叶和老叶的总 RNA, 并将其反转录为 cDNA。利用特异性引物对 *EgrUTr1* 的表达量进行定量分析。*EgrUTr1* 在巨桉所有检测组织中均有表达, 表明该

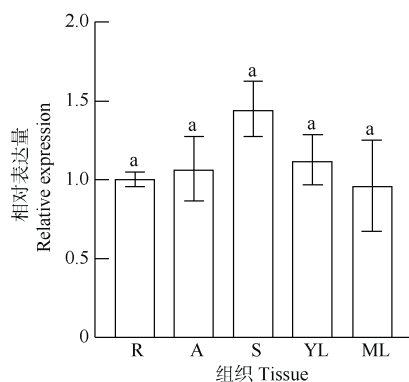


图 3 *EgrUTr1* 在不同组织中的相对表达量。R: 根; A: 茎尖; S: 茎; YL: 幼叶; ML: 成熟叶; a: $P > 0.05$ 。

Fig. 3 Relative expression of *EgrUTr1* in different tissues. R: Root; A: Shoot apex; S: Stem; YL: Young leaf; ML: Mature leaf; a: $P > 0.05$.

基因在维持不同部位的基础细胞功能方面可能发挥重要作用, 这一表达模式的解析为后续深入研究 *EgrUTr1* 的功能提供了重要的基础数据。

2.4 EgrUTr1 的亚细胞定位

蛋白质的功能与其在细胞中的定位密切相关, 为研究 EgrUTr1 的亚细胞定位, 构建了 *pCAMBIA 1300 35S::eGFP-EgrUTr1* 融合载体, 通过根癌农杆菌介导本氏烟草瞬时表达系统观察了 EgrUTr1-GFP 融合蛋白的亚细胞定位。由图 4 可见, EgrUTr1-GFP 融合蛋白的绿色荧光信号与内质网标志蛋白 RFP-HDEL 产生的红色荧光蛋白信号发生重叠, 表明 EgrUTr1 主要定位于细胞内质网, 为理解 EgrUTr1 在内质网中的功能提供了直接的细胞生物学证据。

2.5 EgrUTr1 基因表达受内质网胁迫诱导

内质网是膜蛋白和分泌蛋白折叠和组装的关键场所, 众多内质网蛋白参与了蛋白折叠过程, 并对内质网胁迫产生响应。为了探究 EgrUTr1 在内质网中的生物学功能, 首先检测了 EgrUTr1 是否参与内质网胁迫响应过程。

二巯苏糖醇(DTT)是一种强还原剂, 能够阻止半胱氨酸残基之间形成蛋白质分子内或分子间二硫键, 从而引发植物细胞内质网的未折叠蛋白反应。经 DTT 处理巨桉 1 h 后, 利用 qRT-PCR 检测了 *EgrUTr1* 的表达量。与对照相比, *EgrUTr1* 的表达量显著上升, 达到对照组的 28.61 倍, 表明在内质网应激条件下, 巨桉细胞显著上调 *EgrUTr1* 的表

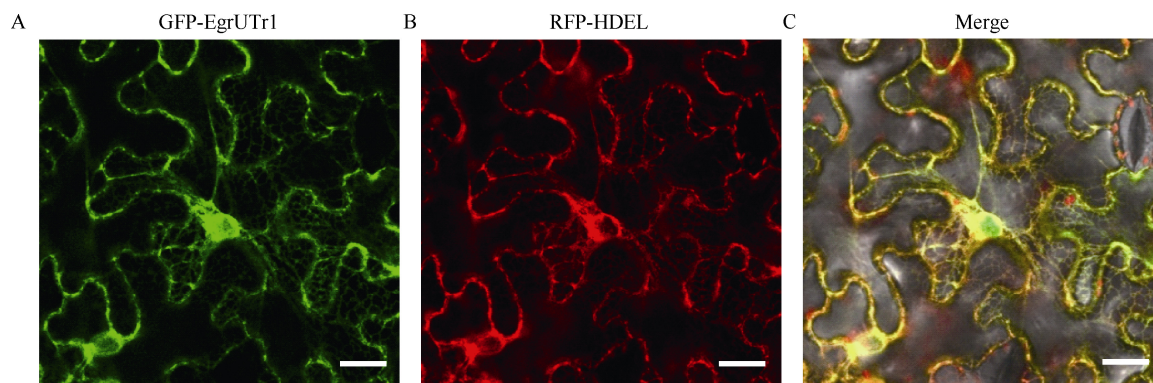


图 4 *EgrUTr1* 蛋白的烟草亚细胞定位。A: 绿色荧光通道; B: 红色荧光通道; C: 叠加图片。标尺=20 μm

Fig. 4 Subcellular localization of *EgrUTr1* protein in tobacco. A: Green fluorescence channel; B: Red fluorescence channel; C: Merged images. Bars=20 μm

达。在 DTT 处理 6 h 后, *EgrUTr1* 的表达量趋于稳定, 达到对照的 12.61 倍(图 5: A)。

衣霉素(TM)是一种核苷酸类抗生素, 能够抑制内质网中糖蛋白的糖链合成, 进而影响错误折叠蛋白的修复过程, 因此也能引发植物细胞内质网的未折叠蛋白反应。经 TM 处理巨桉 1 h 后, *EgrUTr1* 的表达未发生显著变化, 处理 6 h 后, *EgrUTr1* 表达量显著升高, 为对照组的 4.66 倍; 处理 12 h 后, *EgrUTr1* 的表达量达到最高, 为对照组的 11.18 倍, 随后趋于稳定(图 5: B), 这表明 *EgrUTr1* 在内质网应激胁迫响应中发挥着重要作用, 是巨桉细胞维持内质网稳态的关键基因。然而当对巨桉进行 NaCl 处理时, *EgrUTr1* 的表达量变化在 0.5 倍到 2 倍之间(图 5: C), 说明 *EgrUTr1* 的表达对盐胁迫的响应并不剧烈。

2.6 过表达 *EgrUTr1* 提高拟南芥对 TM 的抗性

为了进一步验证 *EgrUTr1* 在内质网胁迫中的功能, 构建了 *pCAMBIA1300 35S::FLAG-EgrUTr1* 过

量表达载体, 并将其转到拟南芥中。对转基因植株进行胁迫处理, 结果表明, 1.5 mmol/L DTT 处理后, 过表达 *EgrUTr1* 株系的表型与野生型相似, 均受到 DTT 的抑制, 表明 *EgrUTr1* 的过量表达无法挽救由蛋白质二硫键还原引发的内质网胁迫。然而, 0.15 $\mu\text{g/mL}$ TM 处理后, 过表达 *EgrUTr1* 株系表现出一定的抗性, 其叶片比野生型显著增大(图 6: A, B)。此外, TM 处理的转基因株系根长与野生型差异显著(图 6: C)。这表明 *EgrUTr1* 基因能够缓解由 N-糖基化缺陷导致的内质网胁迫, 推测其功能可能与糖蛋白在内质网中的折叠过程密切相关。

3 讨论和结论

内质网应激响应在植物应对环境胁迫中起着至关重要的作用。然而, 目前关于木本植物在这一领域的研究仍相对匮乏。本研究在巨桉中成功克隆

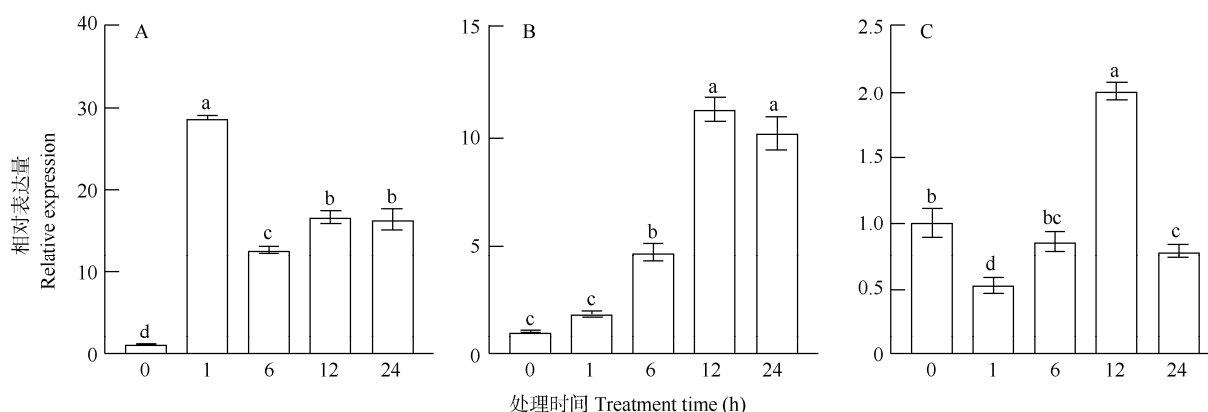


图 5 *EgrUTr1* 基因在不同胁迫下的表达。A: DTT; B: TM; C: NaCl。柱上不同字母表示差异显著($P < 0.05$)。

Fig. 5 Expression patterns of *EgrUTr1* gene under different stress. A: DTT; B: TM; C: NaCl. Different letters upon column indicate significant differences at 0.05 level.

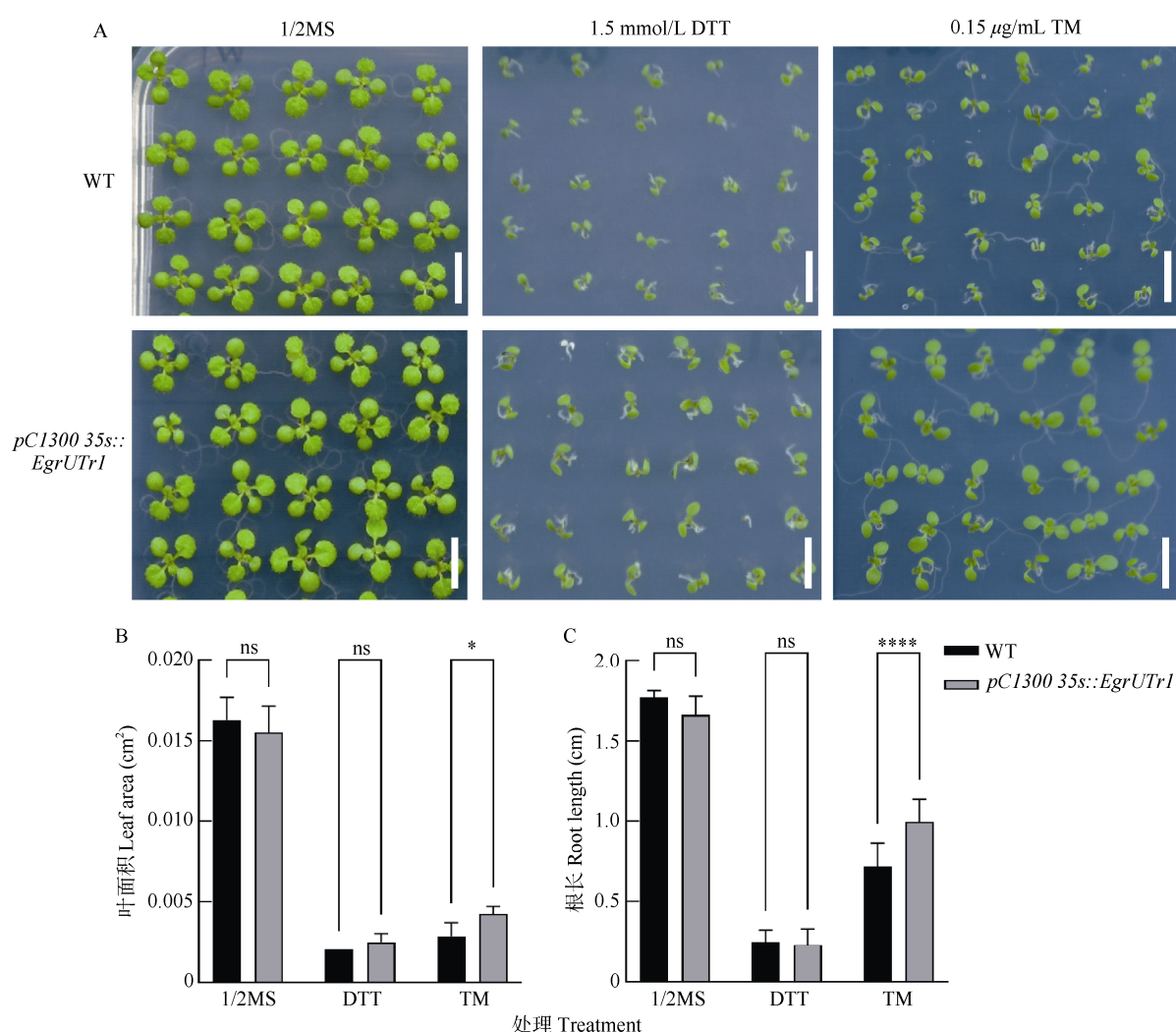


图 6 过表达 *EgrUTr1* 拟南芥株系在不同胁迫处理下的表型(A)、叶面积(B)和根长(C)。WT: 野生型; ns: 没有显著差异; *: $P<0.05$; ****: $P<0.0001$ 。标尺=0.5 cm

Fig. 6 Phenotype (A), leaf area (B) and root length (C) of *EgrUTr1* overexpressing lines of *Arabidopsis thaliana* under different stress treatments. WT: Wild-type; ns: No significant difference; *: $P<0.05$; ****: $P<0.0001$. Bars=0.5 cm

并鉴定出与拟南芥 *AtUTr1* 基因同源的 *EgrUTr1* 基因。研究表明, *EgrUTr1* 与 *AtUTr1* 具有相似的三维空间结构, 并且均包含多个跨膜结构域。在拟南芥的 *atutr1* 突变体中, 与内质网胁迫相关的分子伴侣基因 *BIP* 和 *CNXs* (*Calnexin*) 表现出显著上调, 但其具体的生化机制尚不明确^[11]。本研究表明在拟南芥中过量表达 *EgrUTr1* 能够显著增强植株对内质网胁迫诱导剂 TM 的抗性, 这些结果支持了 *UTr1* 这类多次跨膜蛋白在植物响应内质网胁迫中发挥的重要作用。值得注意的是, *EgrUTr1* 在巨桉各组织中均有表达, 但在不同胁迫处理下表现出差异性的诱导模式。例如 *EgrUTr1* 的表达量在 DTT 和 TM 处理下显著上调, 而在 NaCl 处理下, *EgrUTr1* 的

表达变化并不剧烈。这与在拟南芥中的研究结果相似, UPR 相关基因 *BIPs* 和 *CNXs* 等同样不受盐胁迫的显著诱导^[12]。

在拟南芥基因组中, 存在与 *EgrUTr1* 同源的基因 *AtUTr1* 和 *AtUTr3*^[13]。研究人员通过在酿酒酵母中异源表达 *AtUTr1* 发现其具有尿苷二磷酸半乳糖 (UDP-Gal) 以及尿苷二磷酸葡萄糖 (UDP-Glc) 的转运活性^[14]。随后, 研究者们还报道了与 *AtUTr1* 高度同源的 *AtUTr3*, 该蛋白同样参与了 UDP-Glc 的转运。在 *atutr3* 突变体中, UDP-Glc 的内质网摄入量减少了近 50%^[15], 这表明在拟南芥中, *AtUTr1* 和 *AtUTr3* 共同参与了内质网中 UDP-Glc 的转运过程, 并且 UDP-Glc 是植物细胞中最丰富的核苷酸糖之

一^[16], 在细胞内许多反应中发挥关键作用。在内质网中, UDP-Glc 被用于 Glc₃Man₉GlcNAc₂ 低聚糖的生物合成, 这种低聚糖会在蛋白质共翻译时被转移到新合成的 N-糖蛋白上^[17]。蛋白质合成完成后, 它们会经历折叠过程, 在此过程中, 内质网伴侣和酶共同辅助蛋白质形成正确的构象^[18-19]。这一过程被称为内质网蛋白质质量控制。其中, UDP-葡萄糖糖蛋白葡萄糖基转移酶是一种关键酶, 它将 UDP-葡萄糖添加到未折叠蛋白质中的 Man₉GlcNAc₂ N-寡糖上, 形成 GlcMan₉GlcNAc₂ 的糖链结构, 该糖链结构能被钙连蛋白/钙网蛋白识别, 进而招募更多的分子伴侣, 辅助蛋白质完成折叠^[20]。因此, 推测 *EgrUTr1* 可能通过参与内质网蛋白质的质量控制, 进而影响内质网稳态的调控。然而, *EgrUTr1* 是否确实具有核苷酸糖转运活性, 尚需通过生化实验进行验证。此外, *EgrUTr1* 在内质网中的具体作用机制及其与其他内质网胁迫响应蛋白的关系, 仍有待进一步阐明。同时, *EgrUTr1* 在巨桉不同发育阶段和不同环境条件下的动态表达模式也值得深入研究。

综上, 本研究初步揭示了 *EgrUTr1* 基因在巨桉抵御内质网应激中的潜在作用, 对其基因序列进行分析发现, 其编码的蛋白具有 UAA 结构域。与内质网标志物共定位表明 *EgrUTr1* 定位于内质网。在 DTT 和 TM 的处理下, *EgrUTr1* 基因表达量显著上升, 表明巨桉 *EgrUTr1* 是 UPR 应答基因, 是巨桉缓解其内质网胁迫的重要组分。此外, 在模式植物拟南芥中过表达 *EgrUTr1* 基因, 其能部分增强拟南芥对 TM 的抗性。后续研究将构建基因编辑和过量表达载体, 并利用根癌农杆菌介导的转化体系对巨桉进行遗传转化, 以进一步明确 *EgrUTr1* 基因在巨桉中的功能, 此外, 本研究结果也将为探究 *UTr1* 基因在其他木本植物中的作用提供重要的参考依据。

参考文献

- [1] VUONG Q V, CHALMERS A C, JYOTI BHUYAN D, et al. Botanical, phytochemical, and anticancer properties of the *Eucalyptus* species [J]. Chem Biodiv, 2015, 12(6): 907–924. doi: 10.1002/cbdv.201400327.
- [2] MYBURG A A, GRATTAPAGLIA D, TUSKAN G A, et al. The genome of *Eucalyptus grandis* [J]. Nature, 2014, 510(7505): 356–362. doi: 10.1038/nature13308.
- [3] HUANG G Q, ZHAO Q G. The history, status quo, ecological problems and countermeasures of *Eucalyptus* plantations in Guangxi [J]. Acta Ecol Sin, 2014, 34(18): 5142–5152. [黄国勤, 赵其国. 广西桉树种植的历史、现状、生态问题及应对策略 [J]. 生态学报, 2014, 34(18): 5142–5152. doi: 10.5846/stxb201405100943.]
- [4] WHYTE G, HOWARD K, HARDY G, et al. Foliar pests and pathogens of *Eucalyptus dunnii* plantations in southern Queensland [J]. Aus For, 2011, 74: 161–169. doi: 10.1080/00049158.2011.10676359.
- [5] TIBBITS W N, WHITE T L, HODGE G R, et al. Genetic variation in frost resistance of *Eucalyptus globulus* ssp. *globulus* assessed by artificial freezing in winter [J]. Aus J Bot, 2006, 54: 521–529. doi: 10.1071/BT02061.
- [6] FAGONE P, JACKOWSKI S. Membrane phospholipid synthesis and endoplasmic reticulum function [J]. J Lipid Res, 2009, 50(Suppl): S311–S316. doi: 10.1194/jlr.R800049-JLR200.
- [7] KAUFMAN R J. Orchestrating the unfolded protein response in health and disease [J]. J Clin Invest, 2002, 110(10): 1389–1398. doi: 10.1172/jci16886.
- [8] RON D, WALTER P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007, 8(7): 519–529. doi: 10.1038/nrm2199.
- [9] OAKES S A, PAPA F R. The role of endoplasmic reticulum stress in human pathology [J]. Annu Rev Pathol, 2015, 10: 173–194. doi: 10.1146/annurev-pathol-012513-104649.
- [10] ADHIKARI B, VERCHOT J, BRANDIZZI F, et al. ER stress and viral defense: Advances and future perspectives on plant unfolded protein response in pathogenesis [J]. J Biol Chem, 2025, 301(4): 108354. doi: 10.1016/j.jbc.2025.108354.
- [11] REYES F, MARCHANT L, NORAMBUENA L, et al. AtUTr1, a UDP-glucose/UDP-galactose transporter from *Arabidopsis thaliana*, is located in the endoplasmic reticulum and up-regulated by the unfolded protein response [J]. J Biol Chem, 2006, 281(14): 9145–9151. doi: 10.1074/jbc.M512210200.
- [12] HENRIQUEZ-VALENCIA C, MORENO A A, SANDOVAL-IBÁÑEZ O, et al. bZIP17 and bZIP60 regulate the expression of BiP3 and other salt stress responsive genes in an UPR-independent manner in *Arabidopsis thaliana* [J]. J Cell Biochem, 2015, 116(8): 1638–1645. doi: 10.1002/jcb.25121.
- [13] RAUTENGARTEN C, EBERT B, MORENO I, et al. The golgi localized bifunctional UDP-rhamnose/UDP-galactose transporter family of *Arabidopsis* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2014, 111(31): 11563–11568. doi: 10.1073/pnas.1406073111.
- [14] NORAMBUENA L, MARCHANT L, BERNINSONE P, et al. Trans-

- port of UDP-galactose in plants. Identification and functional characterization of AtUTr1, an *Arabidopsis thaliana* UDP-galactose/UDP-glucose transporter [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(36): 32923–32929. doi: 10.1074/jbc.M204081200.
- [15] REYES F, LEÓN G, DONOSO M, et al. The nucleotide sugar transporters AtUTr1 and AtUTr3 are required for the incorporation of UDP-glucose into the endoplasmic reticulum, are essential for pollen development and are needed for embryo sac progress in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant J*, 2010, 61(3): 423–435. doi: 10.1111/j.1365-313X.2009.04066.x.
- [16] DANCER J, NEUHAUS H E, STITT M. Subcellular compartmentation of uridine nucleotides and nucleoside-5'-diphosphate kinase in leaves [J]. *Plant Physiol*, 1990, 92(3): 637–641. doi: 10.1104/pp.92.3.637.
- [17] KANEHARA K, KAWAGUCHI S, NG D T. The EDEM and Yos9p families of lectin-like ERAD factors [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2007, 18(6): 743–750. doi: 10.1016/j.semdb.2007.09.007.
- [18] CLERC S, HIRSCH C, OGGIER D M, et al. Htm1 protein generates the N-glycan signal for glycoprotein degradation in the endoplasmic reticulum [J]. *J Cell Biol*, 2009, 184(1): 159–172. doi: 10.1083/jcb.200809198.
- [19] HAMMOND C, BRAAKMAN I, HELENIUS A. Role of N-linked oligosaccharide recognition, glucose trimming, and calnexin in glycoprotein folding and quality control [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(3): 913–917. doi: 10.1073/pnas.91.3.913.
- [20] PARODI A J. Protein glucosylation and its role in protein folding [J]. *Annu Rev Biochem*, 2000, 69: 69–93. doi: 10.1146/annurev.biochem.69.1.69.