

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2026.05.001

王薪妤, 王天禧, 褚镇静, 等. 柱型苹果 *MdDWF4* 基因调控盐胁迫响应的功能研究 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2026, 48(5): 2-12.

柱型苹果 *MdDWF4* 基因调控 盐胁迫响应的功能研究

王薪妤, 王天禧, 褚镇静, 杨静静, 乔绪强, 梁美霞

鲁东大学 园艺学院, 山东 烟台 264025

摘要: *DWF4* 基因是编码油菜素内酯生物合成途径的一个关键酶, 在植物生长及逆境胁迫中发挥重要作用。研究从柱型苹果中克隆得到 *MdDWF4* 基因, 并对该基因进行生物信息学、表达模式、亚细胞定位及异源过表达拟南芥分析。研究表明: *MdDWF4* 基因编码区长度为 1 482 bp, 其编码的蛋白质由 493 个氨基酸组成, 亚细胞定位结果表明 *MdDWF4* 蛋白定位于内质网; 研究发现 *MdDWF4* 在拟南芥中异源过表达后, 转基因拟南芥植株的株高、根长及鲜质量平均分别增加 46.16%、60.75%、68.60%, 并显著提高盐胁迫抗性。综合研究结果证明 *MdDWF4* 基因的表达调控苹果生长和盐胁迫应答。

关键词: *DWF4* 基因; 盐胁迫; 柱型苹果; 油菜素内酯

中图分类号: S661.1; Q945.78

文献标识码: A

文章编号: 1673-9868(2026)05-0002-11

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Functional Study of the *MdDWF4* Gene Regulating Salt Stress Response in Columnar Apple

WANG Xinyu, WANG Tianxi, CHU Zhenjing,
YANG Jingjing, QIAO Xuqiang, LIANG Meixia

Horticulture College, Ludong University, Yantai Shandong 264025, China

Abstract: The *DWF4* gene encodes a key enzyme in the biosynthetic pathway of brassinolide, which plays an important role in plant growth and stress responses. In this study, the *MdDWF4* gene was cloned from columnar apple, and the bioinformatics, expression pattern, subcellular localization and heterologous over-

收稿日期: 2025-09-24

基金项目: 山东省自然科学基金面上项目(ZR2020MC138)。

作者简介: 王薪妤, 硕士研究生, 主要从事果树遗传育种研究。

通信作者: 梁美霞, 博士, 教授。

expression in *Arabidopsis thaliana* were analyzed. The coding region of *MdDWF4* gene is 1 482 bp long, which encodes a protein of 493 amino acids. Subcellular localization results showed that *MdDWF4* protein is located in the endoplasmic reticulum. After heterologous overexpression of *MdDWF4*, the plant height, root length and fresh weight of transgenic *Arabidopsis* plants increased by 46.16%, 60.75% and 68.60%, respectively, and the transgenic plants showed significantly improved salt stress resistance. In summary, *MdDWF4* expression plays a regulatory role in growth and salt stress response in columnar apple.

Key words: *DWF4* gene; salt stress; columnar apples; brassinolide

苹果是世界四大水果之一, 其产业健康发展对全球果品供应至关重要。盐胁迫会引发离子毒害、渗透胁迫和氧化胁迫, 严重抑制苹果生长发育进而影响苹果的产量和品质^[1]。因此, 解析苹果的耐盐机制并开展盐胁迫条件下的苹果育种研究, 对推动相关产业发展具有重要的现实意义。目前, 关于苹果的研究多集中于形态建成与激素调控, 而对其抗逆性, 特别是耐盐机制的研究则相对薄弱。

油菜素甾醇(Brassinosteroids, BR)是调控植物生长发育和逆境响应的关键激素, 其信号通路的核心转录因子 BZR1 在介导非生物胁迫响应中扮演着重要角色。研究表明: 在盐胁迫下, BZR1 可通过调控活性氧清除系统, 如超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase, SOD)等相关基因的表达来增强植物的氧化耐受性, 这是植物耐盐性的关键机制之一^[2-5]。油菜素内酯(Brassinolide, BL)是 BR 家族中首个被分离鉴定的成员, 因其具有最高的生物学活性, 且其生理功能与分子信号通路表征最为明确, 故而被视为该类植物激素的典型代表。外源施用活性 BR 类似物, 如 2, 4-表油菜素内酯(2, 4-Epibrassinolide, EBR)能显著增强多种植物对逆境胁迫的耐受性^[6-8]。植物遭遇非生物胁迫时, 通过外施 EBR 能够显著减轻其受到的负面影响。在黄瓜(*Cucumis sativus* L.)、水稻(*Oryza sativa* L.)和玉米(*Zea mays* L.)等作物上的研究表明: EBR 增强逆境耐受性的机制依赖于其对植株 H_2O_2 的清除作用^[9-10], 涉及 NO(Nitric Oxide)的调控^[11]。同时, EBR 处理可有效促进植物渗透调节能力, 显著激活 SOD、过氧化物酶(Peroxidase, POD)等抗氧化酶系统的活性, 提高光合作用效率^[12-14]。这些协同作用的生理响应共同构成了植物应对非生物胁迫的综合防御机制, 从而大幅提升其在逆境条件下的生存能力^[15-16]。

BR 功能的发挥依赖于其内源水平的精确调控。在 BR 生物合成途径中, *DWF4* 基因编码的 C-22 羟化酶催化限速步骤, 是控制 BR 内源水平的关键枢纽。研究表明: *DWF4* 不仅调控细胞伸长、分裂和生物量积累, 更在非生物胁迫应答中起重要作用^[17-19]。然而, 上述功能研究多集中于模式植物和草本作物。以苹果为代表的木本植物中, 具有特殊株型的苹果材料尤为典型, 其 *MdDWF4* 基因如何通过差异性表达调控, *MdBZR1* 转录因子是否通过直接结合并调控 *MdDWF4* 基因的启动子来协同增强耐盐性, 均属未知。因此, 研究以柱型苹果为材料, 聚焦 BR 合成关键基因 *MdDWF4*, 旨在解析其表达模式、外源 EBR 的生理效应及生长调控功能, 最终阐明 *MdDWF4* 通过动态调控 BR 水平介导耐盐性的分子机制, 为苹果抗逆遗传改良提供新靶点与理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

试验中植物材料: 柱型苹果品种“威赛克旭(Wijcik McIntosh)”(*Malus domestica*), 以及野生型拟南芥品种“哥伦比亚(Col)”(*Arabidopsis thaliana*)。

拟南芥在环境温度 23 °C、湿度 70%、光照时长 16 h 中培养, 盐胁迫处理采用 300 mmol/L NaCl 溶液。观察胁迫 0、4、7、14、40 和 50 d 的拟南芥植株状态, 并取拟南芥叶片, 测定相关生理指标。试验所得数据均通过 3 次独立的生物学重复获得。

1.2 系统进化树

利用 MEGAX7.0 软件,采用邻接法(Neighbour Joining, NJ)对拟南芥、胡杨、水稻等多个物种已发表的 *DWF4* 基因进行氨基酸序列比对,并构建系统进化树。

1.3 表达分析

分别从柱型苹果叶片和转基因拟南芥的整株样本中提取 RNA。采用实时荧光定量技术,在热循环仪(CFX Connect Real-Time System; Bio-Rad, Hercules, CA)上进行 qRT-PCR 检测。基因表达定量分析使用 Bio-Rad CFX96 Touch 实时荧光定量 PCR 仪,以内源性参照基因 *MdActin* 作为内参。反应体系为: 2x Pre STAR MAX 10 μ L, 上下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L(表 1), cDNA 4 μ L, 用 dd H₂O 补足至 20 μ L。扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 循环数为 34; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min^[20-21]。通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法定量基因表达水平,所有数据源自 3 次独立重复试验并计算相对表达量及其标准差(SD)。试验数据通过 SPSS 软件(IBM SPSS Statistics 25, USA)进行 *t* 检验和 ANOVA 单因素方差分析($p < 0.05$)。

表 1 荧光定量引物序列

引物名称	引物序列	引物名称	引物序列
QCPD-F	TCAAGGACGCTCGAACTTTT	QMdDWF4-R	ACGGTGGTGGTGGTTGTTAT
QCPD-R	TACCTCTTCTGCGTCCTCGT	QDET2-F	ATAGCTCCCCAACCTTCAT
QCYP90-F	AGTAGCAGCAGCAACAGCAA	QDET2-R	GCGGTGGAAATAGTGGAAGA
QCYP90-R	CTCAGGGCAGTCGGAGTAAG	QROT3-2-F	CCCTGTGGCGTTAGACAAAT
QROT3-F	GTATCCACGGATGCTGAGGT	QROT3-2-R	GCCAAGACACACCATCCTTT
QROT3-R	TCGAGCTTTGAACTGTGGTG	<i>MdActin</i> -F	TGACCGAATGAGCAAGGAAATTACT
QMdDWF4-F	GCTTGGGAATGTGGTGAGAT	<i>MdActin</i> -R	TACTCAGCTTTGGCAATCCACATC

1.4 MdDWF4 蛋白的亚细胞定位

克隆去除终止密码子的 *MdDWF4* 基因,并将其连接至绿色荧光蛋白表达载体的 N 端,成功构建 *MdDWF4*-GFP 融合表达载体。通过含利福平、庆大霉素和卡那霉素抗性的 LB 培养基筛选阳性克隆,经 PCR 鉴定正确后,用含 10 mmol/L MES、10 mmol/L MgCl₂、100 μ mol/L AS 液体培养基重悬农杆菌至 OD₆₀₀ 约 0.6,通过瞬时转化法^[11-12]将 pCambia-1301GFP 载体注射到本氏烟草叶片中观察。空载体与 *MdDWF4* 基因载体均表现出正常的荧光信号。

1.5 MdDWF4 基因的基因克隆与载体构建

试验中使用的高保真酶 PCR Mix 为 TAKARA 公司生产的 primer STAR 产品(货号: R045A)。以含 *MdDWF4* 的克隆质粒为模板,亚细胞定位引物 PCR 扩增(表 2)。载体 pCambia-1301GFP 经过 TAKARA 公司提供的 *Bam*HI 限制性内切酶,单酶切处理,酶切产物依次进行胶回收纯化、连接转化、阳性克隆筛选及测序验证,最终构建重组载体。选取 25 龄的本氏烟草植株,在光照培养室中种植,进行瞬时转化法注射后标记叶片,经 24 h 暗培养和 24 h 光培养后,取下表皮层的烟草叶片,用激光共聚焦显微镜进行观察。

1.6 MdDWF4 基因的过表达载体构建与拟南芥遗传转化和鉴定

载体选用 pCambia-1301,限制性内切酶为 *Pst*I,引物序列见表 2。野生型拟南芥植株去顶并生长 3 d 后,使用农杆菌(OD₆₀₀ = 1.2~1.6)进行侵染。转化后收集的 T₀ 代种子经过表面灭菌,均匀播种在 1/2 MS 选择培养基上。培育 3 代获得过表达的纯合株系,从 6 个株系中各取 3 株整株样品提取 RNA,使用引物 QMdDWF4-F/QMdDWF4-R 进行荧光定量 PCR,内参引物为 AtUBQ-F/AtUBQ-R。

表 2 亚细胞定位引物和过表达载体引物序列

引物名称	序列
MdDWF4- <i>Bam</i> HI-F	gagctcggtagccggggatccATGTCTGACTCAGAGATTATTCTCTGTCT
MdDWF4- <i>Bam</i> HI-R	catgtcgcactctagagatccGTTTGGTACGTAGCGGTGGG
OEMdDWF4- <i>Pst</i> I-F	ctcgcagcttgcagctcgcagATGTCTGACTCAGAGATTATTCTCTGTCT
OEMdDWF4- <i>Pst</i> I-R	tcctctagagctgcagctcgcagTTAGTTTGGTACGTAGCGGTGGG

1.7 酵母单杂交(Y1H)

将 PHIS-*MdDWF4* (含启动子) 与 ADT7-*MdBZR1* (含诱饵蛋白) 共转化至酵母 Y187 感受态细胞, 转化采用 PEG/LiAc 法, 经过热激处理后, 将细胞涂布于 SD/-Leu/-Trp 选择性培养基上筛选共转化阳性菌落。阳性菌落转接至含 3-氨基三唑(3-AT, 80 mmol/L) 的 SD/-His/-Leu/-Trp 选择性培养基, 以抑制背景自激活。观察 SD/-His/-Leu/-Trp 选择性培养基上菌落的生长情况。

2 结果与分析

2.1 苹果 *MdDWF4* 基因的生物信息学分析

通过同源比对与系统进化分析, 从柱型苹果中鉴定出一个与拟南芥 *AtDWF4* 亲缘关系最近的基因, 并将其命名为 *MdDWF4* (图 1)。序列分析表明, *MdDWF4* 基因的编码区(CDS)全长为 1 482 bp, 编码一个由 493 个氨基酸组成的蛋白质。对该蛋白进行保守结构域预测发现, 其包含典型的细胞色素 P450 超家族结构域(图 2)。进一步探究其进化保守性, 将其与拟南芥、土豆、水稻等多个物种的 DWF4 蛋白进行了多重序列比对。结果显示, 这些蛋白之间存在多个短且高度保守的氨基酸片段, 且这些序列中以高度一致的线性顺序排列, 通过系统进化树分析进一步支持了它们功能的相似性(图 3)。上述结果表明: *DWF4* 基因在进化过程中高度保守。此外, 对 *MdDWF4* 基因启动子序列(起始密码子 ATG 上游约 2 000 bp)的分析发现, 其含有多个潜在的顺式作用元件, 包括 2 个参与茉莉酸甲酯应答的 CGTCA-motif、1 个与非生物胁迫相关的 MBS 元件, 以及其他与水杨酸、脱落酸等激素应答相关的元件(图 4)。研究结果表明: *MdDWF4* 的表达可能受到多种激素与非生物胁迫的复杂调控。

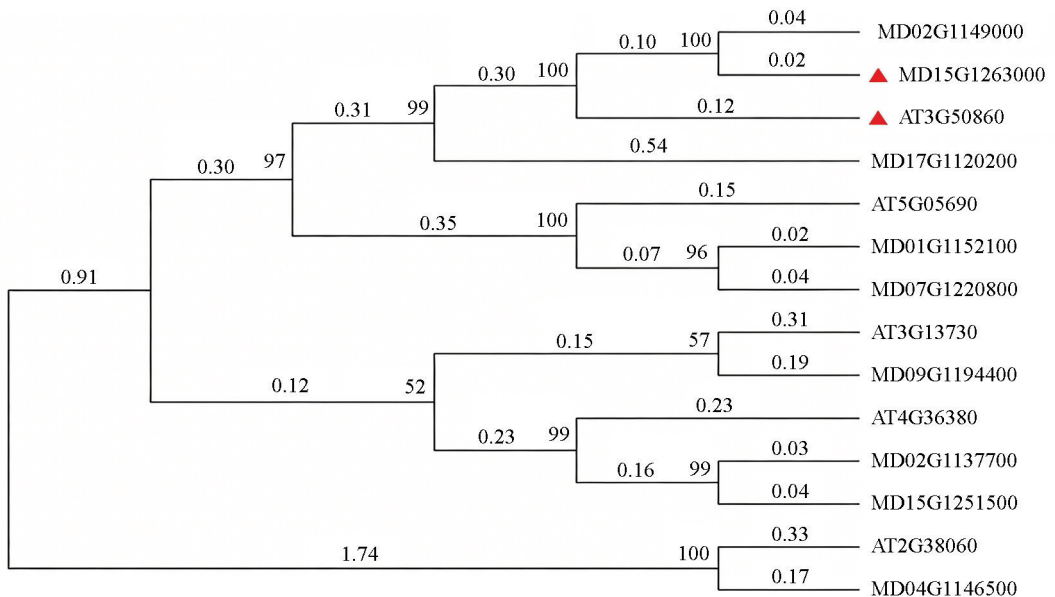


图 1 拟南芥与苹果 P450 蛋白的系统进化树分析

AtDWF4MFETEHTLPLLLLLPSLLSLLFLI LLKRRN.....RKTRFNLPPG	42
MdDWF4MSDSEIILC.LLPSI VA..LFLI LLRRKCN.....QKTRLNLPPG	37
StDWF4MSDLEFFL...LVPI LAVLI I LNFLKRRK.....KFNLP	35
OsDWFMAAMMASI TSELEFFLPFI LLALLTFYTTTAKCHGWRRGGTTPAKRRMN..PPG	54
PeDWF4	MVERQASASMSDSEVILCLLLLLPSVLALFLFLI LI RRRQ.....QQTRLHLPPG	49
ZmDWF4NGAMMASI TSELEFFLPFI LLALLAL YTTAVAKCH....GTHPWRRQKRPNLPPG	51
AtDWF4	KS GWPFLGETI GYLKPYTATTL GDFMQCHVSKYGKI YRSNLFGEPTI VSADAGLNRFILQ	102
MdDWF4	NMGWPFLEGETI GYLKPYSAITTI GKFMEEHI SRYGKI YKSNLFGEPTI VSADAGLNRFILQ	97
StDWF4	DMGWPFLEGETI GYLRPYSVITTI GDFMQDHI SRYGKI FKS NLFGEPTI VSADAGLNRFILQ	95
OsDWF	AAGWPLVGETI GYLRAHPATSVGRFMECHI ARYGKI YRSNLFGEPTI VSADAGLNRFILQ	114
PeDWF4	NMGWPFLEGETI GYLKPYSATCTGCFMECHI SRYGKI YKSNLFGEPTI VSADAGLNRFILQ	109
ZmDWF4	ARGWPLVGETI GYLRAHPATSVGRFMERHVARYGKI YRSNLFGEPTI VSADAGLNRFILQ	109
AtDWF4	NEGRLL..FECSYPRSI GGI LGKWSMLVLV GDMHRDMRSI SLNFLSHARLRTI LLK DVERH	160
MdDWF4	NEGRLL..FECSYPRSI GGI LGKWSMLV..GDMHRDMRNR..NFLSHARLT.HLMREVEKH	150
StDWF4	NEGRLEFEFCNYPRSI GGI LGKWSMLVQVGMHRDMRMS.NFLSNARLRNGLSEVEKH	154
OsDWF	NEGRLEFEFCSYPRSI GGI LGKWSMLV..GDPHREMRAI SLNFLSSVRLRAVLLPEVERH	172
PeDWF4	NEGRLL..FECSYPRSI GGI LGKWSMLVLV GDMHRMRM S..LFLSHARLT.HLMREVEKH	164
ZmDWF4	NEGRLL..FECSYPRSI G..GKWSMLVLVGDAREMRAI SLNFLSSVRR..VLLPEVERH	162
AtDWF4	T..LFLVLDSSVQCNS.IFSAQDEAKKFTFNLMAKHI MSMDPGEEETBQLKKEVYTFMKGVV	217
MdDWF4	T..LLVLGSWKENS.VFSAQDEAKKFTFNLMAKHI MSLDPGKPETBQLKKL VYTFMKG.V	206
StDWF4	TVLVLVLGSWKQDS.VVGAQDEAKKFTFNFAEHI MSLCPGNPETBKKKE..YITFMKG.V	210
OsDWF	T..LLVLRWPPSS.TFSAHQCAKKFTFNLMAKNI MSMDPGEEERRE...YITFMKG.V	223
PeDWF4	T..LLVLGSWKENS.VFSAQDEAKKFTFNLMA..HIMSLDPGKPETBQLK.LYVTFMKG.V	217
ZmDWF4	T..LLVLRWPPSDGTFSAQHEAKKFTFNLMAKNI MSMDPGEEETBRLLE.YITFMKG.V	218
AtDWF4	SAPLNLPGTAYHKALQSRATI LKFI ERKMEE...RKLDI KEEDQEEEEVKTEDEAEMSK	273
MdDWF4	SPPLNLPGTAYRRALQSRSTI LKFI ECKMKE...RLMEGTENI GE.....	248
StDWF4	SAPLNLPGTAYRKALQSRSTI LKFI ERKMEE...RRNE..MNGNE.....	250
OsDWF	SAPLNLPGTAYWKALKSRAAI L.VIE.....RKKDSVEQ.....	256
PeDWF4	SAPVNLPGTAYRKALQSRSTI LKFI ESKMEG...RLKEGKENI DE.....	259
ZmDWF4	SAPLNLPGTAYWKALKSRASI LGVIEERKMEEDRLEKMSREKSSVEE.....	263
AtDWF4	SDHVRKQRTDDLLGW..VLKHSNLSSTEQ...I LDLLLSLLFAGHETSVAI ALAI FFLQ	328
MdDWF4DLLGW..LKNSNLSKEQ...I LDLLLSLLFAGHETSVAI ALAI YFLP	292
StDWF4NDLLGW..LKNSNLSKEQ...I LDLLLSLLFAGHETSVAI ALSI FFLE	294
OsDWFDLLGW..ALKQSNLSKSKSKSL LLLLSLLFAGHETSVAI MALAI FFLE	304
PeDWF4DLLGLGWVLKHSNLSKEQ...I LDLLLSLLFAGHETSVAI ALAI YFLP	306
ZmDWF4DLLGW..ALKQSNLSKEQ...I LDLLLSLLFAGHETS.MALAI FFLE	307
AtDWF4	ACPKA VEELREEHLEI ARAKKELGESELNWDYKKMDFTC CVI NETLRLGN VRFLHRKA	388
MdDWF4	SCPNAI LQLREEHSEI AKAKKLAGE TELNWDYKKMDFTC CVI CETLRLGN VRFLHRKA	351
StDWF4	SCPAAVQQLREEHLEI SRAKKQSGE TELNWDYKKMDFTC CVI NETLRLGN VRFLHRKA	353
OsDWF	GCPKAVQELREEHLEI ARRQR.RGECKLSWEDYKEMVFTCCVI NETLRLGN VRFLHRKV	362
PeDWF4	GCPNAI LQLREEHSEI AKAKKQAGE TELNWDYKKMDFTC CVI SETLRLGN VRFLHRKA	365
ZmDWF4	GCPKAVQELREEHLLI ARRQRLRGASKLSWEDYKEMVFTCCVI NETLRLGN VRFLHRKV	366
AtDWF4	LKDVR YKGYDI PS GWK VLPVI SA VHL DNSRYDCPNL FNPWRVQQCNGNASSSGSGS.FST	447
MdDWF4	LKDVR YKGYDI PS GWK VLPVI AA VHL DPL F DHPQHFN PWRVQCNHHRGSSSSCYTSM	411
StDWF4	VKDVR YKGYDI PCGWK VLPVI SA VHL DPL FDRPHDF PWRVQNAEESPSSGKGS..TGT	411
OsDWF	I KDVR YKGYDI PS GWK VLPVI AA VHL DSSL YEDPQRFPN PWRVQSSSGGLAQSS....	417
PeDWF4	LKDVR YKGYDI PCGWK VLPVI AA VHL DPL F DCPQHFN PWRVQ.....	408
ZmDWF4	I RDVR YNGYDI PRGWK VLPVI AA VHL DSSL YEDPSRFNPWRVK.....	409
AtDWF4	WGNNYMPFGGGPRLCAGSELAKLEN AVFI HHLVLKFNWELAEDDKPFAPFVDFPNGLPI	507
MdDWF4	TSNHFMPFGGGPRLCA.SELAKLEN AVFI HHLVLNF.HWELADPFFFFFDFDF.NGLPI	468
StDWF4	SSNNFMP.GGGPRLCAGSELAKLENAI FI HYLVLNF.WKLAAPDQAFAYPVDF.NALPI	468
OsDWF	...SFMPYGGGTRLCAGSELAKLEN AVFLHHL.LNFRWELAEPDQAFVFFDFP..GLPI	471
PeDWF4	408
ZmDWF4	409
AtDWF4	RVSRIL....	513
MdDWF4	TAHRYVPN...	476
StDWF4	TI QHRSSTKLH	479
OsDWF	RVHRI AQDDEQ	482
PeDWF4	408
ZmDWF4	409

图 2 跨物种 DWF4 蛋白氨基酸序列的多重序列比对

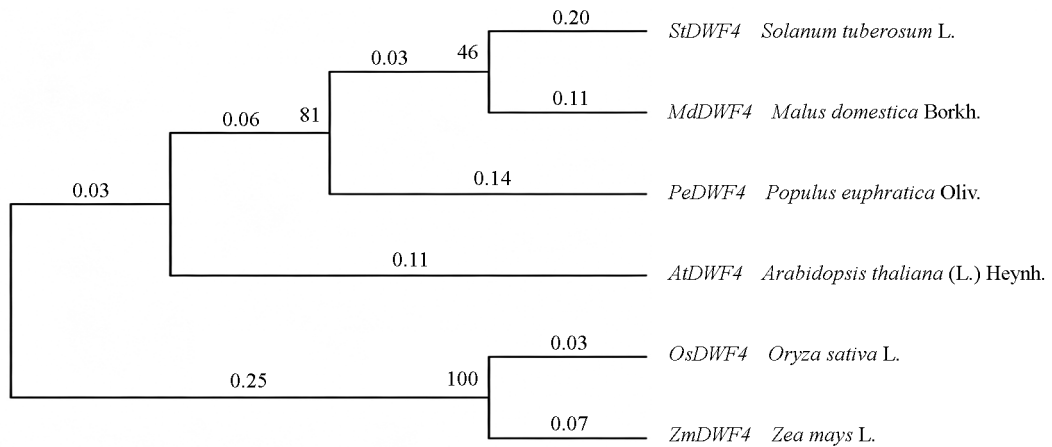
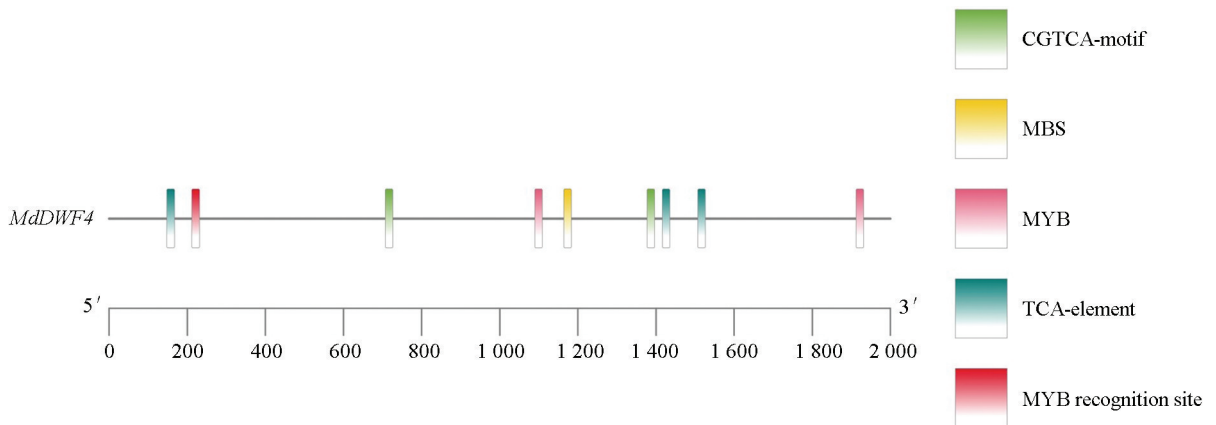


图 3 不同植物物种间 DWF4 进化树分析

图 4 *MdDWF4* 顺式作用元件可视化

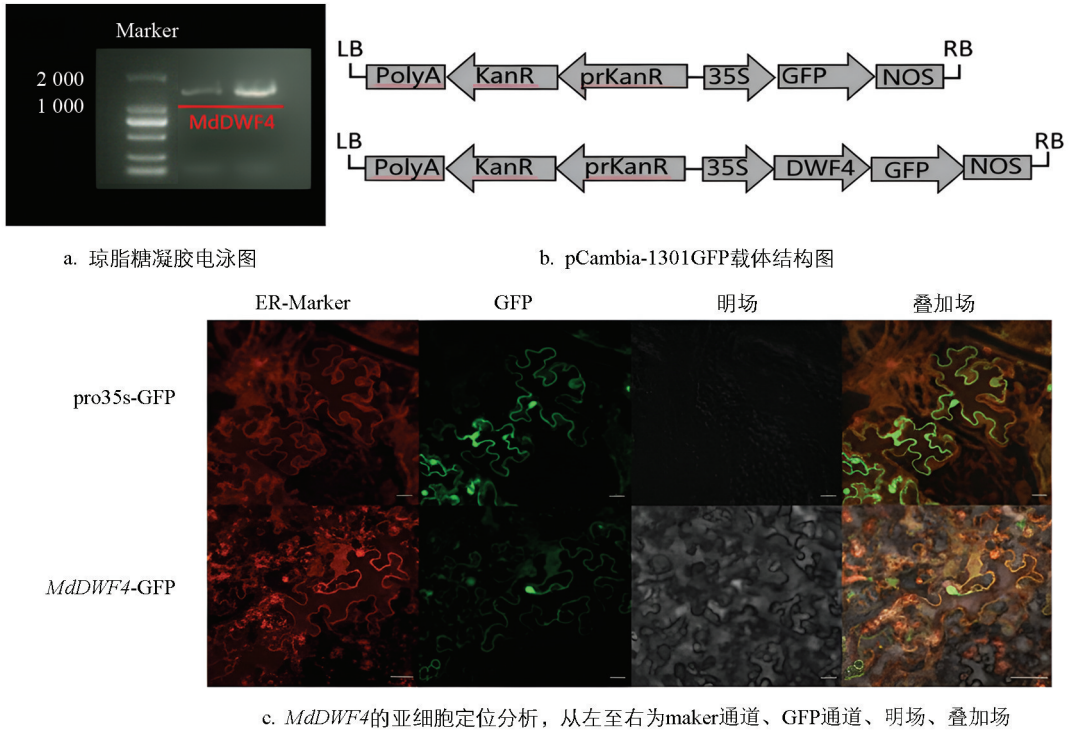
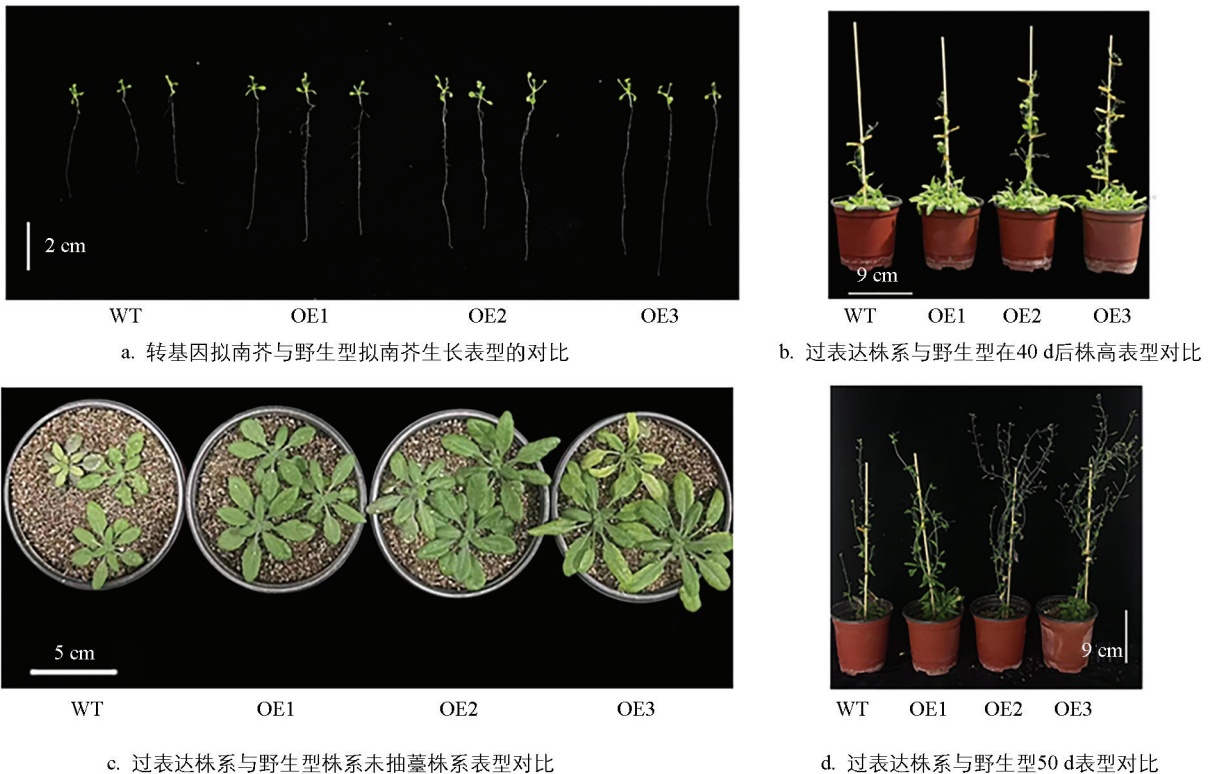
2.2 *MdDWF4* 蛋白的亚细胞定位

通过荧光信号叠加分析,绿色与红色荧光在相同位置完全重合,进一步证明了 *MdDWF4* 蛋白定位于内质网(图 5)。这一结果与真核细胞色素 P450 酶通常定位于内质网的研究结果一致。由于 *MdDWF4* 催化 BL 合成途径中的限速步骤,其在内质网的定位与植物细胞内质网合成 BR 的假设高度吻合,进一步支持了 *MdDWF4* 在 BR 合成中的关键作用。

2.3 过表达 *MdDWF4* 基因的拟南芥的表型分析及鉴定

通过对过表达 *MdDWF4* 的转基因拟南芥的表型观察分析,表明野生型与转基因拟南芥的根长在 14 d 后的表现存在显著差异。野生型拟南芥的平均根长为 35.5 mm,而转基因拟南芥分别为 54.3、57.8、59.1 mm,分别显著增加了 52.96%、62.82%、66.48%。继续培养 14 d 后,过表达株系和野生型叶片形状相同,但是生物量显著增加。野生型植株鲜质量为 32.6 mg,3 个过表达株系 OE1、OE2、OE3 鲜质量平均分别为 45.3、51.6、68.0 mg,与野生型相比分别增加了 38.95%、58.28%、108.58%(图 6)。

在试验进行至第 40 d 时,观察到拟南芥进入生殖生长阶段,顶端开始开花并形成果荚(图 6b)。对野生型和不同过表达株系的株高进行测量结果显示,野生型植株的平均高度为 11.26 cm,而过表达株系的株高分别为 14.31、17.00、22.96 cm,较野生型拟南芥显著增加了 27.08%、50.97%、60.44%。进一步分析表明,过表达株系的表型变异程度与 *MdDWF4* 基因的表达水平呈显著正相关,证明了 *MdDWF4* 基因的过量表达是拟南芥表型改变的主要因素。到第 50 d 时,过表达植株的果荚大部分已成熟,而野生型拟南芥果荚则多数未成熟,且过表达拟南芥的分枝数明显多于野生型拟南芥(图 6d)。

图 5 苹果基因 *MdDWF4* 的克隆与亚细胞定位载体构建

WT: 野生型拟南芥; OE1、OE2 和 OE3 代表不同的过表达拟南芥株系。

图 6 各株系拟南芥与野生型拟南芥表型对比

2.4 过表达 *MdDWF4* 提升拟南芥的盐胁迫抗性

为验证 *MdDWF4* 在植物盐胁迫响应中的功能, 对野生型拟南芥及其 *MdDWF4* 过表达株系 OE1、OE2、OE3 进行了盐胁迫处理。在 300 mmol/L NaCl 溶液处理 4 d 后, 野生型植株出现典型的盐胁迫症状,

包括叶缘脱水、叶片黄化及生长停滞等现象。相比之下, 过表达株系的萎蔫程度明显减轻, OE1 株系(其 *MdDWF4* 表达量低于 OE2 和 OE3)表现出稍优于野生型的生长状态, 但差异不显著; 而 OE2 和 OE3 株系则表现出显著的抗盐性, 叶片保持较好的水分和绿色程度。上述结果初步证明 *MdDWF4* 能增强拟南芥的盐胁迫耐受性。

2.4.1 过表达 *MdDWF4* 激活拟南芥抗氧化系统缓解氧化损伤

盐胁迫诱导的活性氧(ROS)暴发是造成细胞损伤的关键因素。随着盐胁迫时间的延长, 野生型植株的过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)和超氧化物歧化酶(SOD)虽有一定的升高, 但其清除能力不足, 导致超氧阴离子(O_2^-)产生速率和过氧化氢(H_2O_2)含量急剧上升。过表达株系则展现出更强的抗氧化潜力: 其 POD、CAT 和 SOD 的活性较野生型显著升高(图 7a、b、c), 同时 O_2^- 的产生速率和 H_2O_2 含量增幅较野生型显著下降。作为细胞膜脂质过氧化的重要标志物, 丙二醛(Malondialdehyde, MDA)含量在过表达株系中显著低于野生型, 进一步证明了 *MdDWF4* 在缓解膜脂过氧化中的作用(图 7d、e、f)。这些结果表明: *MdDWF4* 能正向调控抗氧化酶的活性, 增强植物对 ROS 的清除能力, 从而缓解植株在盐胁迫下受到的氧化损伤和膜脂过氧化。

2.4.2 过表达 *MdDWF4* 缓解拟南芥盐胁迫对光合系统的损伤

氧化损伤的减轻有助于保护光合器官。测定光合色素, 发现盐胁迫条件下, 拟南芥叶绿素 a(ChlorophyllA, Chla)、叶绿素 b(ChlorophyllB, Chlb)和类胡萝卜素(Carotenoid)的含量显著降低, 说明盐胁迫对光合系统产生了严重的破坏。与此相对, 过表达株系的 3 种关键合成色素含量明显高于野生型植株, 这表明 *MdDWF4* 的过表达有助于减轻盐胁迫对光合作用系统的损害(图 7g、h、i), 直接保护了光合机构, 维持了光合色素的稳态, 这为转基因植株在盐胁迫下能保持更好的光合能力与绿色表型提供了生理基础。

2.5 *MdBZR1* 与 *MdDWF4* 启动子互作

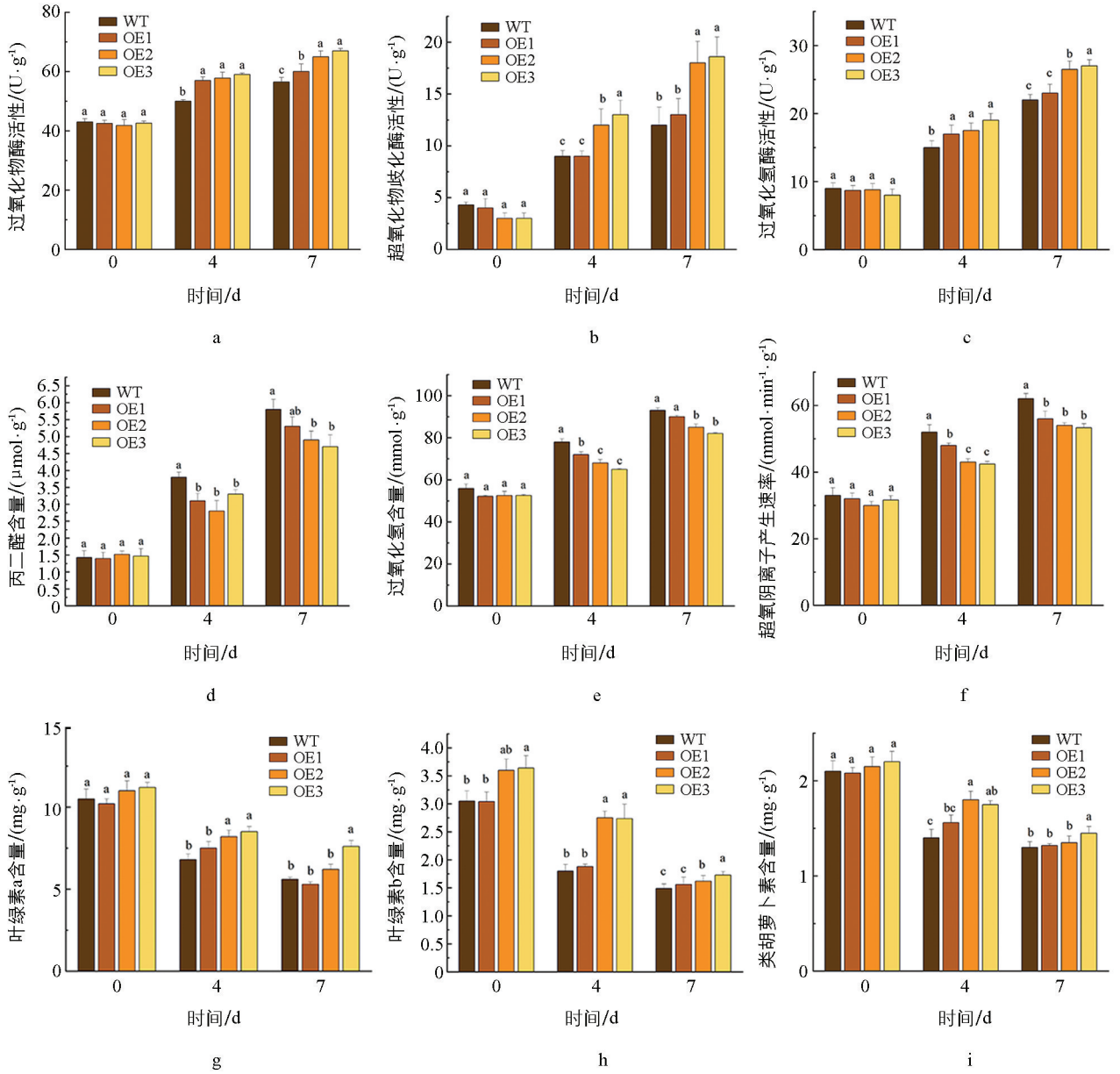
鉴于 BZR1 在整合盐胁迫等信号中的核心作用, 推测 *MdBZR1* 可能直接调控 *MdDWF4* 的转录。酵母杂交试验结果显示, 在不同培养基条件下观察到明显的生长差异(图 8)。在 SD/-Leu/-Trp 选择性培养基中, 试验组、阳性对照和阴性对照均显示酵母生长; 而在 SD/-His/-Leu/-Trp 选择性培养基中, 试验组和阳性对照表现出生长活性, 阴性对照则未表现出生长。这一现象表明: *MdBZR1* 转录因子能够特异性结合并调控 *MdDWF4* 基因启动子区域, 进而影响其表达。

3 讨论与结论

3.1 讨论

本研究结果表明: *MdDWF4* 作为油菜素内酯生物合成的限速酶, 是柱型苹果中协同调控正常生长与盐胁迫耐受性的关键因子。这一结论得到了转基因拟南芥试验的支持, 过表达 *MdDWF4* 不仅能重现典型的 BR 过量表型(如株高、生物量显著增加), 更显著增强了植株的耐盐能力, 提示 *MdDWF4* 在生长与抗逆协同调控中具有普适功能。

通过对 *MdDWF4* 的克隆与生物信息学分析结果显示: 该基因编码区的序列长度为 1 482 bp, 其编码蛋白质由 493 个氨基酸组成。亚细胞定位结果证明了 *MdDWF4* 蛋白定位于内质网。分析系统进化树发现其与马铃薯、胡杨等物种的 DWF4 同源蛋白高度相似^[22], 因此推测 DWF4 在植物中可能具有相似的、保守的生物学功能。此外, 本研究不仅通过生物信息学分析佐证了不同物种间 DWF4 蛋白功能的保守性, 也通过转基因手段验证了 *MdDWF4* 的生物学功能。在拟南芥中异源过表达 *MdDWF4* 所引发的促生长表型, 与前述物种中的报道一致^[23-24]。*MdDWF4* 蛋白功能在玉米、水稻、毛白杨和胡杨等物种中高度保守。



小写字母不同表示差异显著 ($p < 0.05$)。

图 7 盐胁迫下转基因拟南芥和野生型拟南芥的抗性指标

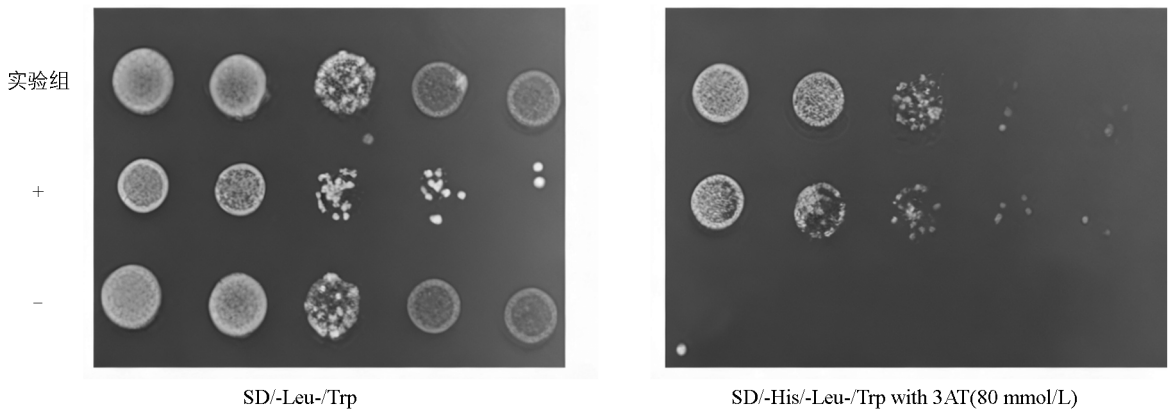


图 8 *MtdWF4* 与 *MdbZR1* 酵母单杂交验证

不同物种的 *DWF4* 同源基因在调控植物生长发育、非生物胁迫响应及光合作用中具有保守功能,体现了 *DWF4* 蛋白结构域的保守性。同时, BR 生物合成基因(如 *DWF4*)可显著增强植物对多种胁迫的耐受性^[25]。更为重要的是,酵母单杂交试验表明,苹果 BR 信号通路的核心转录因子 *MdBZR1* 能够特异性结合 *MdDWF4* 基因启动子区域,这表明 *MdBZR1* 通过调控 *MdDWF4* 的表达影响内源 BR 的生物合成。这一发现揭示了在苹果中存在一个保守的 BR 信号反馈调控回路:即 BR 信号激活后, *MdBZR1* 不仅调控下游应答基因,还通过正向调控 *MdDWF4* 的表达来放大 BR 合成信号,从而精细调控内源 BR 水平以应对发育和环境需求。这为解释盐胁迫下 *MdDWF4* 表达上调提供了潜在的分子机制。然而, *MdDWF4* 调控抗逆性的具体分子机制,特别是其与脱落酸(Abscisic acid, ABA)合成、ROS 稳态以及植物形态建成-胁迫耐受性互作的关系有待深入研究。

综上,本研究为利用 BR 信号通路协同苹果抗逆性提供了理论依据。未来工作将聚焦于解析 *MdDWF4* 的具体分子调控网络,以推动耐盐苹果品种的定向育种。

3.2 结论

本研究鉴定并克隆了柱型苹果中参与 BR 合成的关键基因 *MdDWF4*, 其蛋白结构保守且定位于内质网;功能试验表明 *MdDWF4* 过表达可提高转基因拟南芥的盐胁迫抗逆性。本研究证实了该基因通过 BR 通路协同参与苹果的非生物胁迫响应,为苹果耐逆育种提供了关键基因与理论依据。

参考文献:

- [1] 张海园. 苹果 BR 生物合成基因 *MdBR6OX2* 在盐胁迫中的功能研究 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2024.
- [2] 尚秉琛, 何昊, 李丹丹, 等. 油菜素内酯引发对盐胁迫下水稻幼苗生长及生理特性的影响 [J]. 江西农业大学学报, 2023, 45(4): 795-805.
- [3] 陈晨, 程大伟, 李兰, 等. 油菜素内酯调控植物耐盐机理研究进展 [J]. 中国农业科技导报, 2024, 26(2): 1-12.
- [4] 吕树立, 丁芳, 田壮博. 2, 4-表油菜素内酯对干旱胁迫下芝麻苗期生长和生理的调控效应 [J]. 河南农业科学, 2025, 54(10): 60-70.
- [5] 宋欣阳. 水稻耐盐种质筛选及 BR 缓解盐胁迫的效应研究 [D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2023.
- [6] 张国恒, 李荣峰, 田玲. 表油菜素内酯对干旱胁迫条件下黄瓜幼苗的影响 [J]. 中国瓜菜, 2025, 38(11): 77-84.
- [7] 姚海瑞, 陈轲, 张利霞, 等. 2, 4-表油菜素内酯对干旱胁迫下夏枯草种子萌发与幼苗生理特性的影响 [J]. 中国草地学报, 2025, 47(7): 48-60.
- [8] 张伟, 杨国慧, 于辉. 2, 4-表油菜素内酯对干旱胁迫下西瓜幼苗生长及相关基因表达的影响 [J]. 新疆农业科学, 2024, 61(3): 615-622.
- [9] ZHANG A Y, ZHANG J, YE N H, et al. *ZmMPK5* Is Required for the NADPH Oxidase-Mediated Self-Propagation of Apoplastic H₂O₂ in Brassinosteroid-Induced Antioxidant Defence in Leaves of Maize [J]. Journal of Experimental Botany, 2010, 61(15): 4399-4411.
- [10] 桂金凤, 赵颖, 刘文瑜, 等. 外源 2, 4-表油菜素内酯对盐碱胁迫下藜麦种子萌发及幼苗生长的影响 [J]. 中国草地学报, 2025, 47(10): 34-43.
- [11] CUI J X, ZHOU Y H, DING J G, et al. Role of Nitric Oxide in Hydrogen Peroxide-Dependent Induction of Abiotic Stress Tolerance by Brassinosteroids in Cucumber [J]. Plant, Cell & Environment, 2011, 34(2): 347-358.
- [12] 马超, 陈长青, 刘在国, 等. 2, 4-表油菜素内酯处理增强平欧杂种榛幼苗对盐碱胁迫耐受性的生理机制 [J]. 果树学报, 2025, 42(7): 1541-1556.
- [13] 魏茜, 何敏, 胡小京. 外源油菜素内酯对盐胁迫下紫罗兰幼苗生长及生理特性的影响 [J]. 西南农业学报, 2023, 36(6): 1165-1171.

- [14] 孙嘉茂, 崔全石, 王语晴, 等. 苹果采前喷施 EBR 与 MeJA 对采后品质的影响 [J]. 园艺学报, 2022, 49(10): 2236-2248.
- [15] 任若然, 韩晓华, 孙旭晗, 等. 油菜素内酯对盐碱胁迫下大豆生理特性及产量的影响 [J]. 江苏农业科学, 2025, 53(18): 270-277.
- [16] 张煜婷, 李家群, 王玲玲, 等. 油菜素内酯和水杨酸缓解菊花盐碱胁迫的机制研究 [J]. 植物生理学报, 2025, 61(9): 1315-1330.
- [17] CHOE S, DILKES B P, FUJIOKA S, et al. The *DWF4* Gene of Arabidopsis Encodes a Cytochrome P450 that Mediates Multiple 22 α -Hydroxylation Steps in Brassinosteroid Biosynthesis [J]. The Plant Cell, 1998, 10(2): 231-243.
- [18] SHEN Y, LI Y L, XU D, et al. Molecular Cloning and Characterization of a Brassinosteroid Biosynthesis-Related Gene *PtoDWF4* from *Populus tomentosa* [J]. Tree Physiology, 2018, 38(9): 1424-1436.
- [19] 吴晶, 项显波, 钱周婷, 等. 基于农杆菌介导瞬时转化法的 *AtGLR1.4* 亚细胞定位分析 [J]. 生物学杂志, 2012, 29(2): 51-54.
- [20] 魏佳琦, 王洪涛, 田雨晨, 等. 苹果 *MdCRTISO* 基因的鉴定与表达模式分析 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2024, 46(12): 60-70.
- [21] 王天禧, 杨炳松, 潘荣君, 等. 苹果 *PLATZ* 基因家族鉴定及 *MdPLATZ9* 基因功能研究 [J]. 生物技术通报, 2025, 41(4): 176-187.
- [22] LIU N, ZHAO Y J, WU J W, et al. Overexpression of *ZmDWF4* Improves Major Agronomic Traits and Enhances Yield in Maize [J]. Molecular Breeding, 2020, 40(8): 71.
- [23] SI J P, SUN Y, WANG L, et al. Functional Analyses of Populus Euphratica Brassinosteroid Biosynthesis Enzyme Genes *DWF4* (*PeDWF4*) and *CPD* (*PeCPD*) in the Regulation of Growth and Development of *Arabidopsis thaliana* [J]. Journal of Biosciences, 2016, 41(4): 727-742.
- [24] 兰彩耘, 宋洪元. 超量表达 *DWF4* 基因对芥菜生长发育的影响 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2021, 43(12): 26-37.
- [25] 陈晨. 油菜素内酯对提高‘红阳’猕猴桃耐盐性的调控 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2024.

责任编辑 王新娟