

番茄 OSCA 家族成员的敲除突变体构建及抗旱性研究

王 菲, 王 焱, 杨伟光, 代世文, 熊 程, 邹学校, 裴真明, 裴宋雨*, 远 方*

湖南农业大学园艺学院, 湖南长沙 410125

摘 要: 干旱是陆地植物面临的严重非生物胁迫之一, 干旱环境会造成植物水分缺失从而产生高渗胁迫, OSCA1 是植物中第一个被鉴定的渗透感受器, OSCA 基因在不同物种中广泛存在。植物对干旱胁迫的感受和响应对其生长发育至关重要, 番茄作为经济作物和模式植物在蔬菜研究中具有重要作用, 番茄抗旱性研究是保障蔬菜产量的重要途径, 因此, 研究番茄 SIOSCA 基因家族在番茄应对干旱胁迫过程中的生理功能方面具有重要意义。本研究以反向遗传学为基础, 通过 SIOSCA 基因家族在叶片中的表达量分析, 选定 *SIOSCA1.1/1.2/1.6/2.3/3.1* 共 5 个基因作为番茄抗旱研究的目标基因, 利用 CRISPR/Cas9 定点基因编辑技术构建番茄 *slosca* 突变体, 以探索番茄 SIOSCA 蛋白家族成员在番茄响应渗透胁迫过程中的作用。研究结果显示, 番茄 *slosca3.1/1.1* 突变体在细胞水平对渗透胁迫的响应减弱, *SIOSCA3.1/1.1* 参与了番茄保卫细胞对渗透胁迫的响应过程; 番茄 *slosca1.6/1.2/2.3* 突变体整株水平对渗透胁迫的响应能力减弱, *SIOSCA1.6/1.2/2.3* 参与了番茄对 PEG 渗透胁迫以及土壤干旱胁迫的响应过程, 再次证明 OSCA 蛋白家族成员之间存在功能冗余。本研究通过构建 *slosca* 突变体, 研究 *slosca* 突变体的生理表型, 揭示 SIOSCA 蛋白家族成员协调作用于番茄抗旱过程, 为后续解析 OSCA 基因家族成员在不同胁迫条件和不同生理过程中的生物学功能提供参考。

关键词: OSCA 基因家族; 干旱胁迫; 基因编辑; 番茄

中图分类号: S641.2

文献标志码: A

Establishment of Knockout Mutants for OSCA Family Members and Drought Tolerance Research in Tomato

WANG Fei, WANG Yan, YANG Weiguang, DAI Shiwen, XIONG Cheng, ZOU Xuexiao, PEI Zhenming, PEI Songyu*, YUAN Fang*

College of Horticulture, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410125, China

Abstract: Drought is one of the most serious abiotic stresses to land plants. Environmental water deficiency triggers an osmotic stress signaling cascade. OSCA1 was described as a hyperosmolarity-gated calcium-permeable channel and its function in osmosensing in plants, homologues of OSCA genes are found throughout eukaryotes. Water is crucial to plant growth and development. As one of the primary horticulture commodities, tomato plays an important role in vegetable research. To enhance the survival and yield of tomatoes in drought conditions, it is essential to thoroughly study the function of SIOSCA genes and their drought-resistant mechanisms. Based on reverse genetics, we selected *SIOSCA1.1/1.2/1.6/2.3/3.1* as our target genes through bioinformatics analysis, the *slosca* mutant of tomato was made by CRISPR/cas9-mediated gene editing directly in AC (Ailsa Craig). To explore the role of tomato SIOSCA protein family members in the response to osmotic stress. Here, we found impaired guard cell osmotic stress signaling and attenuated plant responses to osmotic stress in *slosca3.1/1.1* plants, impaired osmotic stress signaling and attenuated plant responses to osmotic stress in *slosca1.6/1.2/2.3* plants, the *slosca1.6/1.2/2.3* plants showed lower water use efficiency and poorer drought resistance, there is genetic redundancy in OSCA. In this study, *slosca* mutants were constructed and then the physiological phenotypes of the mutants were investigated, which revealed that multiple genes of the SIOSCA family cooperatively regulate responses to osmotic stress, this study provides a reference for subsequent analysis of the

收稿日期 2024-10-30; 接受日期 2024-11-20

基金项目 国家“十四五”重点研发计划项目 (No. 2023YFF1001200)。

作者简介 王 菲 (1998—), 女, 硕士, 研究方向: 蔬菜作物抗逆性。*通信作者 (Corresponding author): 远 方 (YUAN Fang), E-mail: yuanfang800@yahoo.com; 裴宋雨 (PEI Songyu), E-mail: peisongyu1004@163.com。

biological functions of OSCA gene family under different stress conditions and different physiological processes.

Keywords: OSCA family; drought stress; gene editing; tomato

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2025.03.006

植物作为固着生物, 整个生长发育周期需要应对持续变化的环境。环境中常见的非生物胁迫包括干旱、高温、低温、涝害以及高盐和重金属等。干旱环境会对植物造成渗透胁迫, 影响植物地理分布并限制农业作物生长发育^[1-2]。为了减少干旱胁迫引起的损害, 植物进化出了不同的抵抗机制^[3]。

植物应对渗透胁迫的信号传导途径包括胁迫感知、信号传导和对胁迫做出应答 3 个阶段^[4-6]。首先, 植物通过细胞膜上特定的受体感受器感知渗透胁迫。植物感知到渗透胁迫后, 胞外 Ca^{2+} 快速通过钙离子通道进入细胞内, 引起胞内 Ca^{2+} 浓度的变化^[1]。胞浆内 Ca^{2+} 浓度变化引发植物渗透胁迫信号级联反应, 从而导致植物体内活性氧和脱落酸的积累^[7]。最后, 这些胁迫产生的物质有助于调节植物适应不利环境。迄今为止, 植物遭受渗透胁迫时的信号传导过程已被深入研究, 渗透胁迫响应途径主要包含 ABA 依赖和非 ABA 依赖^[8], 但植物感知渗透胁迫的分子机制尚不清晰。

在拟南芥中, OSCA1 是一种高渗透门控钙离子通道, 定位在细胞质膜上第一个被发现的植物渗透感受器, 其功能缺失的 *osca1* 突变体表现为高渗条件下对 Ca^{2+} 的调节能力减弱, 从而导致植株根系生长减少和叶片蒸腾作用下降^[7]。拟南芥中 OSCA1 包含 15 个 OSCA 家族成员, AtOSCA1.2 和 AtOSCA1.1 具有高同源性, 是渗透诱导激活的钙离子通道蛋白^[9]; AtOSCA1.3 和 AtOSCA1.7 的作用已在病原体相关分子模式 (PAMP) 触发的气孔免疫中确立^[10-11]; AtOSCA2.1 和 AtOSCA2.2 属于低渗传感器^[12]。OSCA1 作为第一个报道的渗透感受器, 已在多种植物中鉴定出 OSCA 基因, 如籼稻和短梗稻 (11 个基因)、光稈稻 (12 个基因)、梨 (16 个基因)、绿豆 (13 个基因)、玉米 (12 个基因)、陆地棉 (35 个基因)、植物棉 (21 个基因) 和瑞蒙棉 (22 个基因) 等^[13-18]。研究表明 OSCA 基因家族在植物不同物种的发育和应激反应中发挥作用, 如玉米 12 个 OSCA 成员中的 *ZmOSCA4.1* 对干旱胁迫有反应^[16], 但是只有少数的 OSCA 家族成员的功能得到验证。此外, 目前还没有关于番茄 OSCA 家族成员生理功能的

研究。

番茄是一种重要的经济作物, 其生长发育过程易受渗透胁迫影响, 导致其产量和品质下降。因此, 研究番茄如何响应渗透胁迫具有重要意义。OSCA 在植物响应逆境胁迫的信号通路中发挥着重要作用, 且 OSCA 蛋白家族成员之间存在功能冗余。通过番茄多基因敲除手段, 可以较大程度降低 SIOSCA 功能类似蛋白成员共同发挥的生理作用。为了探索番茄 SIOSCA 家族成员是否响应渗透胁迫, 本研究通过预测番茄 SIOSCA 在叶片中的表达量, 利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术设计番茄 SIOSCA3.1/1.1/1.6/1.2/2.3 多基因敲除, 并通过对突变体进行细胞水平和整株水平的渗透胁迫处理, 验证番茄叶片表达的 SIOSCA3.1/1.1 和 SIOSCA1.6/1.2/2.3 基因是否参与番茄对渗透胁迫的响应过程。本研究为后续深入研究番茄 SIOSCA 家族的生物学功能奠定基础, 为通过基因工程和分子育种提高番茄抗旱性研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 本研究所用野生型番茄 Ailsa Craig (AC) 由湖南农业大学熊程老师课题组提供, 本实验室繁殖育种。番茄植株在光照 16 h/黑暗 8 h, 白天 26 °C/夜间 18 °C, 相对湿度 50%~60% 的人工控温生长室中生长。

1.1.2 菌株、载体及试剂耗材 大肠杆菌 DH5 α 、农杆菌 GV3101、KOD 高保真酶等购自诺唯赞生物科技股份有限公司; PGR 菌液、pTX041 载体质粒和 Gate8 质粒由湖南农业大学熊程老师实验室提供; Bsa I 和 T4 DNA ligase 等购自纽英伦生物技术 (北京) 有限公司; 山梨醇、MES、CaCl₂、KCl、C₄H₁₁NO₃、PEG 6000、Trizma、蔗糖和琼脂等购自默克生命科学股份有限公司; MS 盐、84 消毒液、IBA、玉米素、卡那霉素、特美汀、肌醇、盐酸硫胺素、2,4-D、氯仿、异戊醇、异丙醇、乙醇等购自国产试剂公司。

1.2 方法

1.2.1 番茄 OSCA 基因家族的生物信息学分析 在植物膜蛋白数据库 (<https://aramemnon.botanik>).

uni-koeln.de/index.ep) 的拟南芥 OSCA 基因家族成员与不同物种的 OSCA 基因家族聚类结果中分析获得番茄 OSCA 家族基因。下载番茄 OSCA 蛋白序列和拟南芥 OSCA 蛋白序列, 使用 MEGA 软件进行序列比对, 构建系统发育树, 利用 AI 软件进行颜色标注。通过 https://bar.utoronto.ca/eplant_tomato/ 网站预测番茄 OSCA 家族基因在不同组织部位的表达量, 分析 *SIOSCA* 在 Heinz 和 M82 两个番茄品种叶片中的表达量以及叶片表达量与不同组织总量的比值, 选择叶片表达量高及其与总量比值高的基因作为进一步的研究对象。

1.2.2 *SIOSCA* 基因 CRISPR/Cas9 敲除载体构建 利用 CRISPR/Cas9 构建双基因敲除 (*SIOSCA3.1/1.1*) 和 3 基因敲除 (*SIOSCA1.6/1.2/2.3*) 突变体。在 <http://crispr.hzau.edu.cn/CRISPR2/> 网站上以中靶率大于 50%, 脱靶率小于 50% 为筛选条件在外显子区域选择 *SIOSCA* 基因的靶位点, 每个目标基因选择 2 个靶位点。参照 XIE 等^[19]多基因编辑的方法, 合成双基因敲除和三基因敲除 sgRNA-tRNA 表达盒。通过 Golden-Gate 组装法将 sgRNA-tRNA 表达盒组装到 CRISPR/Cas9 二元载体 pTX041 上^[20]。将敲除载体转入 GV3101 农杆菌后转化 AC 番茄愈伤组织, 待转基因番茄出芽后用卡那霉素进行生根筛选, 获得转基因植株。

1.2.3 *SIOSCA* 基因敲除阳性植株的鉴定 从转基因植株中剪取新鲜叶片, 提取基因组 DNA。根据靶序列位置设计特异性引物, 以叶片 DNA 为模板进行 PCR 扩增, Sanger 测序鉴定靶点位置基因是否被编辑, 靶点被编辑的植株为阳性植株 T₁。T₂ 和 T₃ 代植株使用上述方法鉴定靶点突变类型, 并使用特异性引物 Cas9-F 和 Cas9-R 进行 PCR 扩增, 对照组以野生型 DNA 为模板, 将其 PCR 产物进行核酸电泳, 筛选出不含 Cas9 基因的纯合突变体植株。

1.2.4 保卫细胞渗透胁迫处理及生理表型分析 待番茄幼苗长有 4~6 片真叶时, 取幼苗自下而上的第 2~4 片叶片, 撕取该叶片表皮置于含有气孔打开溶液 (100 $\mu\text{mol/L}$ CaCl₂, 5 mmol/L KCl, 10 mmol/L MES-Tris, pH 6.15) 的微孔室中, 于 250 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 强光照下孵育 2.5 h, 待叶表皮上的气孔完全打开, 使用蔡司倒置荧光显微镜拍摄表皮光学图像。在微孔室中加入 250 mmol/L 山梨醇溶液处理叶片表皮 3 min, 使用蔡司倒置荧光显微镜拍摄处理后的表皮光学图像。使用 Image J 软件测量表皮

光学图像中气孔的宽度。

1.2.5 PEG 渗透胁迫处理及生理表型分析 待番茄幼苗在底部有孔的塑料盆中长至 4 片真叶时, 将地下部分浸入 40% (W/V) PEG-6000 的溶液中, 处理 1 h。拍摄植物 PEG 处理前和处理 1 h 的照片用于进一步的图像分析, 使用 Image J 软件测量植株的叶面积和植株茎秆向下倾斜的角度。

1.2.6 干旱胁迫处理及生理表型分析 待番茄幼苗长有 4~6 片真叶时, 将番茄幼苗分为实验组和对照组进行干旱胁迫实验。干旱胁迫处理前实验组和对照组浇水至土壤含水量的 50%~55%, 用土壤水分仪测量土壤含水量。进行干旱胁迫处理时, 对照组每天上午 9:00 浇水至土壤含水量的 50%~55%, 实验组不浇水。干旱胁迫处理发生 12 d 后, 取实验组和对照组植株自下而上面积相似的叶片, 称量并记录鲜重 (FW), 再将叶片置于 5 mmol/L CaCl₂ 溶液中, 转入黑暗下孵育 8 h, 称量膨胀叶片的重量 (TW), 最后置于 70 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱干燥 48 h 称量干重 (DW)。根据公式 $\text{RWC} = (\text{FW} - \text{DW}) / (\text{TW} - \text{DW}) \times 100\%$ 进行叶片相对含水量的计算。

2 结果与分析

2.1 OSCA 家族系统进化树分析

利用植物膜蛋白数据库 (<https://aramemnon.botanik.uni-koeln.de/index.ep>) 筛选番茄 OSCA 离子通道膜蛋白家族, Cluster 结果显示番茄的同源 OSCA 蛋白家族包含 12 个成员 (图 1), 将 *SIOSCA* 基因分别命名为 *SIOSCA1.1-1.6*、*SIOSCA2.1-2.4*、*SIOSCA3.1* 和 *SIOSCA4.1*。番茄和拟南芥 OSCA 基因家族进化树分析结果如图 2 所示, OSCA 基因家族成员可分为 4 个亚族, 番茄 OSCA 基因家族在 4 个亚族均有分布。

2.2 *SIOSCA* 基因表达分析

通过植物生物学 BAR 数据库 (https://bar.utoronto.ca/eplant_tomato/) 预测番茄 *SIOSCA* 基因家族在番茄不同组织部位的表达量, 叶片是植物整个生长周期中应对干旱胁迫的重要组织部位。基因表达量高、低与其发挥功能之间不是线性关系, 但是基因时空表达水平是其发挥生理作用功能的前提。关于番茄 *SIOSCA* 基因家族参与番茄响应干旱胁迫过程的研究, 在选定目标研究基因时, 优先选择表达量较高的 *SIOSCA* 基因家族成员是常规方法, 而随机选择基因或选择表达量较低的基因都是不恰当的。

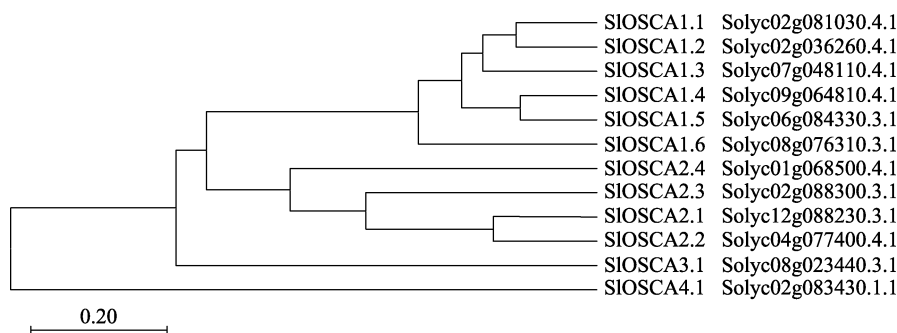


图 1 番茄 SIOSCA 家族进化树
Fig. 1 Phylogeny of SIOSCA family

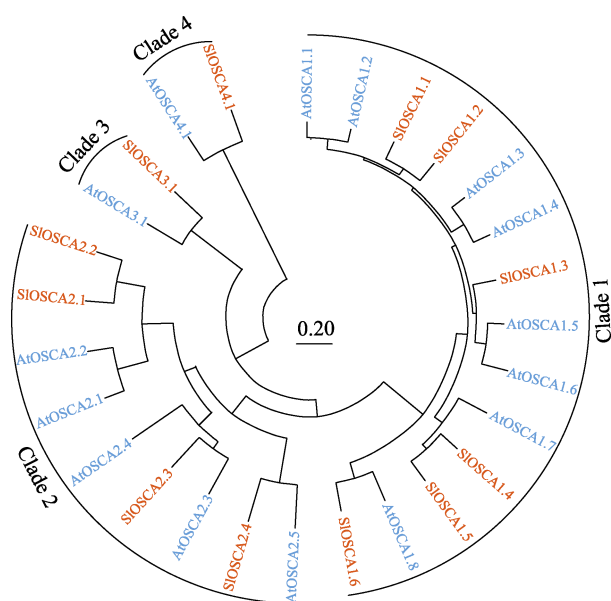


图 2 番茄和拟南芥 OSCA 基因家族系统进化树分析
Fig. 2 Phylogeny of OSCA family across *Solanum lycopersicum* (SIOSCA) and *Arabidopsis thaliana* (AtOSCA)

SIOSCA 基因转录水平结果显示, SIOSCA1.1、SIOSCA1.6、SIOSCA2.3 和 SIOSCA3.1 在番茄品种 Heinz 和 M82 叶片中的表达量均较高 (图 3)。另外, 把 SIOSCA 基因在叶片中的表达量与该基因在不同组织中总表达量的比值定义为叶片相对表达量, SIOSCA1.1 和 SIOSCA1.2 在番茄 Heinz 品种和番茄 M82 品种叶片中的相对表达量均较高 (图 4)。因此, 选择 SIOSCA1.1、SIOSCA1.2、SIOSCA1.6、SIOSCA2.3 和 SIOSCA3.1 作为目标基因以探索番茄 SIOSCA 家族成员在番茄抗旱反应中的作用机理。

2.3 SIOSCA 基因敲除载体构建

根据番茄 SIOSCA 基因家族表达量分析结果, 选定 SIOSCA1.1、SIOSCA1.2、SIOSCA1.6、SIOSCA2.3 和 SIOSCA3.1 作为目标研究基因, 研究 SIOSCA 蛋白家族参与番茄抗旱响应过程。反

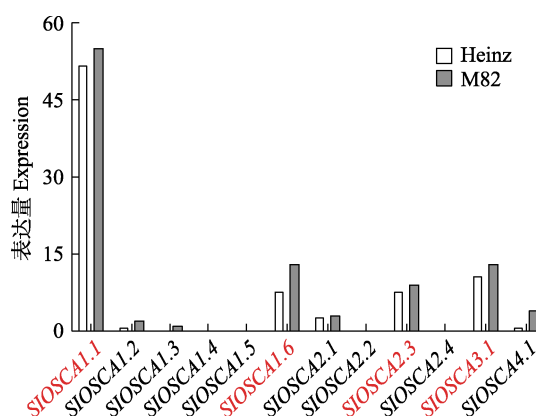


图 3 SIOSCA 基因家族在叶片中的表达量
Fig. 3 Expression of SIOSCA gene family

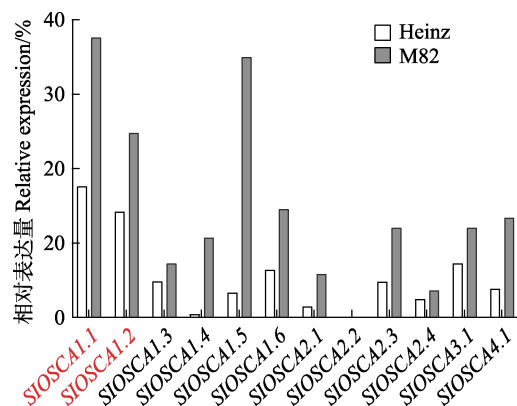


图 4 SIOSCA 基因家族在叶片中的相对表达量
Fig. 4 Relative expression of SIOSCA gene family

向遗传学的研究过程是通过基因工程手段创造突变体, 以突变体表现出来的生理表型来解析基因的功能, CRISPR/Cas9 基因敲除技术常用于反向遗传学研究中。AtOSCA1.1 作为高渗感受器在植物早期响应渗透胁迫的钙信号传导过程中占主要作用, 但是植物在干旱胁迫下的生长调控过程是复杂的, 为了避免 OSCA 蛋白家族的功能冗余问题, 在利用 5 个番茄 SIOSCA 目标研究基因构建单基因敲除突变体 (5 个)、双基因敲除突变体 (10 种组合)、三基因敲除突变体 (10 种组合)、四基

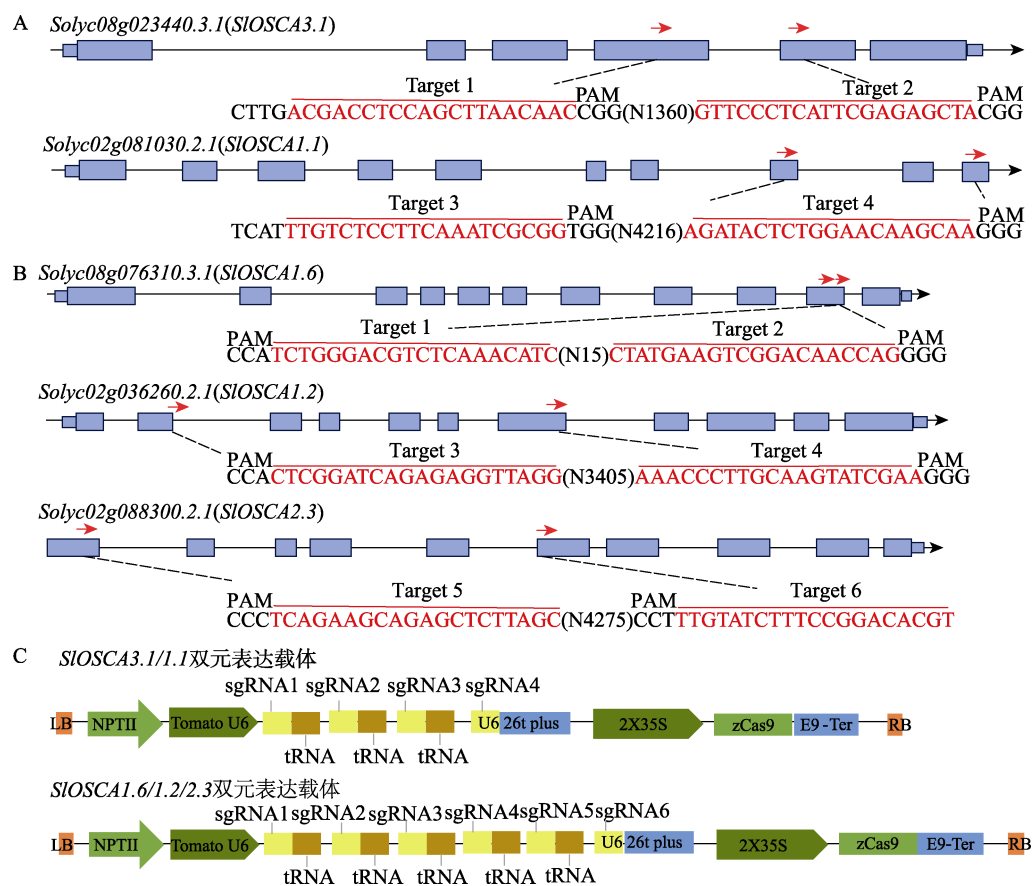
因敲除突变体（5 种组合）以及五基因敲除突变体的众多选择中，优先设计构建多基因敲除突变体以作为番茄 SIOSCA 蛋白家族抗旱生理功能研究的开端。通过番茄 SIOSCA 多基因敲除手段，可以较大程度降低 SIOSCA 功能类似蛋白成员共同发挥的生理作用，有利于敲除突变体表现出较好的生理表型。

拟南芥 AtOSCA1.1^[7]和 AtOSCA3.1^[21]是已知的直接参与植物应对干旱胁迫的响应因子，因此设计番茄 SIOSCA1.1/3.1 双基因敲除，把余下的 3 个目标基因设计 SIOSCA1.2/1.6/2.3 多基因敲除，以开启 SIOSCA 家族成员参与番茄抗旱生理过程的研究。通过网站（<http://crispr.hzau.edu.cn/CRISPR2/>）设计基因编辑靶点，根据 SIOSCA3.1、SIOSCA1.1、SIOSCA1.6、SIOSCA1.2 和 SIOSCA2.3 基因序列信息，在每个目标基因的外显子区域设计 2 个 Target 基因编辑靶点以提高基因编辑效率，成功构建 SIOSCA3.1/1.1 双基因敲除表达载体和 SIOSCA1.6/1.2/2.3 多基因敲除表达载体（图 5）。

2.4 番茄 SIOSCA 基因敲除突变体鉴定

将 SIOSCA3.1/1.1 双基因敲除表达载体和 SIOSCA1.6/1.2/2.3 多基因敲除表达载体转入农杆菌，把包含表达载体的农杆菌转化到番茄愈伤组织中，待转基因番茄出芽后，用 Kana 抗生素进行阳性苗筛选，共获得 30 株 SIOSCA3.1/1.1 番茄转基因植株和 56 株 SIOSCA1.6/1.2/2.3 番茄转基因植株。利用 CTAB 法提取番茄转基因植株叶片的 DNA，PCR 扩增包含基因编辑靶点在内的转基因番茄基因序列，将 PCR 产物进行测序，以检测靶点基因序列是否被成功编辑。

把包含基因编辑靶点在内的转基因番茄基因序列与对应的野生型番茄 SIOSCA 基因序列进行比对分析，成功获得 16 株 *slosca3.1/1.1* 突变植株和 24 株 *slosca1.6/1.2/2.3* 突变植株，所获得突变植株均为杂合子，SIOSCA3.1/1.1 双基因敲除载体和 SIOSCA1.6/1.2/2.3 多基因敲除载体的基因编辑效率分别是 53%和 42%。部分突变植株的基因编辑情况如图 6 所示，*slosca3.1/1.1* 番茄突变植株



A: SIOSCA1.1/3.1 靶点设计; B: SIOSCA1.6/1.2/2.3 靶点设计; C: 载体结构示意图。
A: SIOSCA1.1/3.1 target design; B: SIOSCA1.6/1.2/2.3 target design; C: Schematic diagram of vector structure.

图 5 CRISPR/Cas9 基因编辑靶点设计及表达载体构建
Fig. 5 Target design and CRISPR/Cas9 vector construction



A: *SIOSCA3.1/1.1* 植株突变类型; B: *SIOSCA1.6/1.2/2.3* 植株突变类型; C: Cas9 基因鉴定。

A: Type of target mutation in *SIOSCA3.1/1.1*; B: Type of target mutation in *SIOSCA1.6/1.2/2.3*; C: Cas9 gene identification.

图 6 番茄 *SIOSCA* 基因敲除突变体鉴定

Fig. 6 Identification of tomato knockout mutants

(图 6A) 和 *slosca1.6/1.2/2.3* 番茄突变植株 (图 6B) 中存在碱基突变、缺失和插入, 且存在大片段碱基缺失和插入情况。

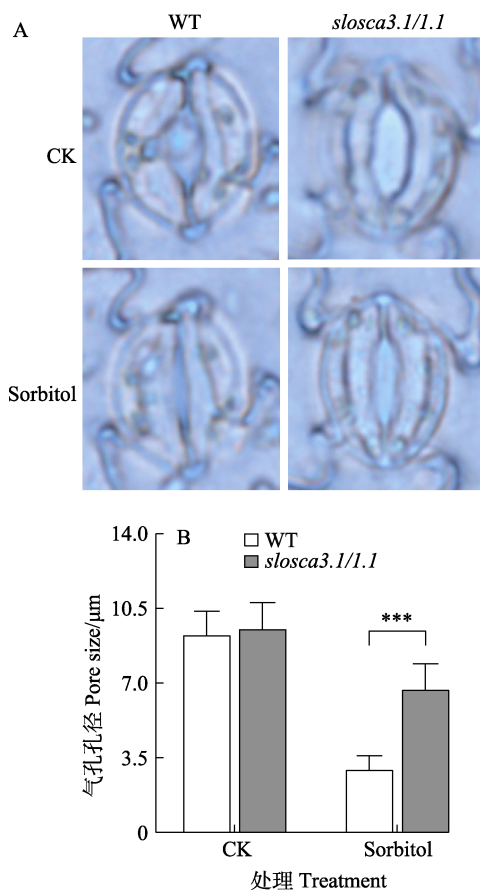
通过繁殖番茄杂合子突变植株, 在发生分离的后代中验证获得 *slosca3.1/1.1* 和 *slosca1.6/1.2/2.3* 纯合子突变植株。为了避免后续繁殖过程中, 番茄纯合子突变植株中 CRISPR/Cas9 系统发生额外的基因编辑事件, 利用 Cas9-F/Cas9-R 引物 PCR 扩增检测 *slosca3.1/1.1* 和 *slosca1.6/1.2/2.3* 纯合子突变株系中是否包含 Cas9 基因, 筛选出不包含 Cas9 基因的纯合子突变植株 (图 6C), 以开展番茄 *slosca3.1/1.1* 和 *slosca1.6/1.2/2.3* 突变植株的生理表型研究。

2.5 番茄 *slosca3.1/1.1* 突变体在渗透胁迫下的生理特性研究

植物作为固着生物, 整个生长周期需要应对持续的环境变化, 其中高渗胁迫会导致植物气孔闭合以及光合作用降低, 从而影响生长发育。使用 250 mmol/L 山梨醇 (sorbitol) 溶液对番茄叶片表皮进行高渗胁迫处理, 在高渗胁迫处理后野生型 (WT) 和 *slosca3.1/1.1* 突变体的气孔均出现闭合情况 (图 7A)。正常条件下, *slosca3.1/1.1* 突变体气孔与野生型气孔的开度不存在差异; 高渗胁迫处理条件下, *slosca3.1/1.1* 突变体气孔比野生型气孔的开度大, 存在显著差异 (图 7B)。结果表明, 番茄 *slosca3.1/1.1* 突变体对渗透胁迫的响应减弱, *SIOSCA3.1/1.1* 参与了番茄对渗透胁迫的响应过程。

2.6 番茄 *slosca1.6/1.2/2.3* 突变体在渗透、干旱胁迫下的生理特性研究

使用 40% (W/V) PEG-6000 溶液对番茄植株的地下部分进行渗透胁迫处理, 在 PEG 处理 1 h 后野生型 (WT) 和 *slosca1.6/1.2/2.3* 突变体植株均出现叶片失水、茎秆倾斜等萎蔫情况, 番茄 *slosca1.6/1.2/2.3* 突变体植株的萎蔫程度较野生型更加明显 (图 8A)。正常条件下, *slosca1.6/1.2/2.3* 突变体与野生型的叶面积不存在差异; 在 PEG 渗透胁迫处理条件下, *slosca1.6/1.2/2.3* 突变体植株失水速率快致使其叶面积明显小于野生型 (图 8B)。在渗透胁迫下, 植物缺少水分导致细胞膨压降低, 植物株型呈萎缩状。用番茄植株主茎干偏离重力方向的倾斜角度作为植物萎蔫的指标, 将植物萎蔫程度数据化, 正常条件下, *slosca1.6/1.2/2.3* 突变体与野生型主茎干的倾斜角



***表示差异极显著 ($P < 0.001$)。

*** indicates extremely significant difference ($P < 0.001$).

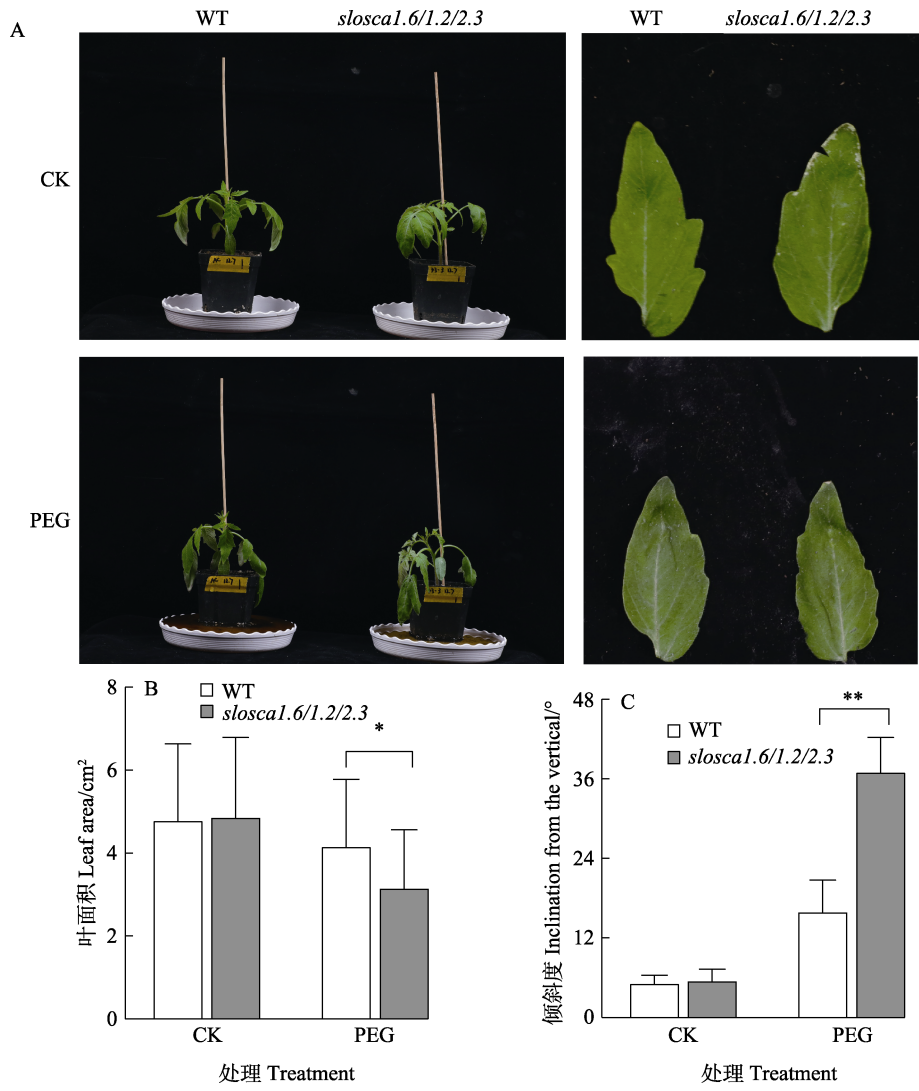
图 7 番茄 *slosca3.1/1.1* 突变体保卫细胞对渗透胁迫的响应

Fig. 7 Impaired guard cell osmotic stress signaling in *slosca3.1/1.1*

度不存在差异; 在 PEG 渗透胁迫处理条件下, *slosca1.6/1.2/2.3* 突变体植株主茎干的倾斜角度明显大于野生型 (图 8C), 表明 *slosca1.6/1.2/2.3* 突变体植株萎蔫程度更严重。

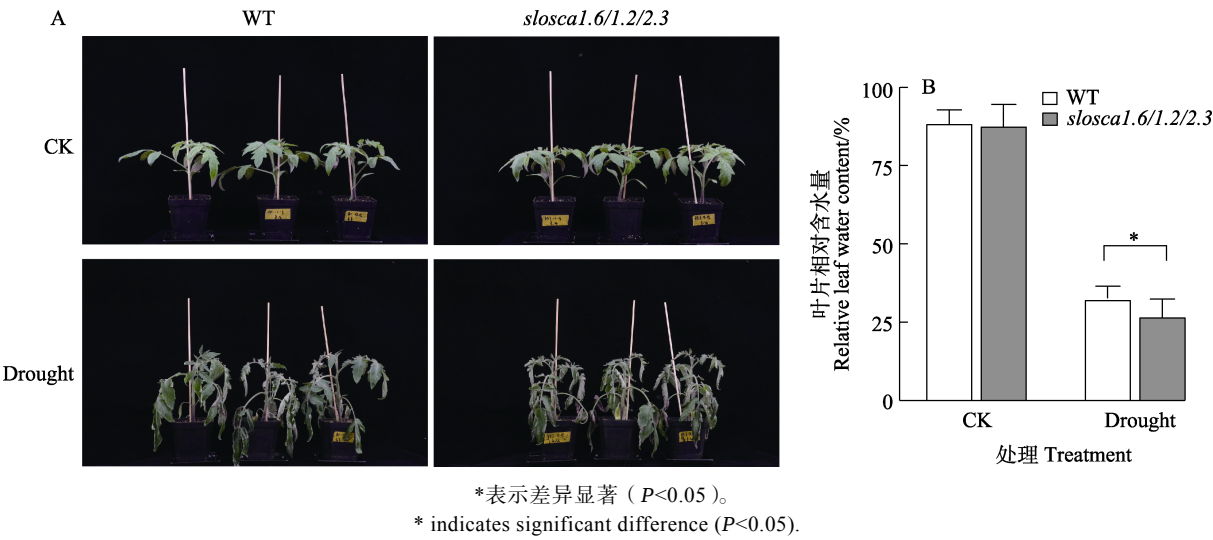
对番茄整株水平进行干旱胁迫处理, 在干旱处理 12 d 后野生型 (WT) 和 *slosca1.6/1.2/2.3* 突变体植株均出现萎蔫情况 (图 9A)。正常条件下, *slosca1.6/1.2/2.3* 突变体与野生型的叶片含水量不存在差异; 在干旱胁迫处理下, *slosca1.6/1.2/2.3* 突变体与野生型的叶片含水量均降低, 其中 *slosca1.6/1.2/2.3* 突变体的叶片含水量显著低于野生型, 说明 *slosca1.6/1.2/2.3* 突变体的水分控制能力更差 (图 9B)。

综上表明, 番茄 *slosca1.6/1.2/2.3* 突变体对渗透胁迫的响应能力减弱, *SIOSCA1.6/1.2/2.3* 参与了番茄对渗透胁迫的响应过程。



*表示差异显著 ($P<0.05$); **表示差异极显著 ($P<0.01$)。
* indicates significant difference ($P<0.05$); ** indicates extremely significant difference ($P<0.01$).

图 8 番茄 *slosca1.6/1.2/2.3* 突变体整株水平对 PEG 渗透胁迫的响应
Fig. 8 Attenuated plant responses to osmotic stress in *slosca1.6/1.2/2.3*



*表示差异显著 ($P<0.05$)。
* indicates significant difference ($P<0.05$).

图 9 番茄 *slosca1.6/1.2/2.3* 突变体整株水平对干旱胁迫的响应
Fig. 9 Attenuated plant responses to drought stress in *slosca1.6/1.2/2.3*

3 讨论

番茄是广泛栽培的蔬菜作物和模式作物,在研究蔬菜品质和生长发育过程中发挥着重要作用。本研究以反向遗传学为基础,通过基因编辑技术,成功获得番茄 *slosca3.1/1.1* 和 *slosca1.6/1.2/2.3* 多基因敲除突变体。对番茄突变体进行细胞水平或整株水平的渗透胁迫处理,发现 *SIOSCA3.1/1.1* 和 *SIOSCA1.6/1.2/2.3* 参与番茄对渗透胁迫的响应过程,表明 OSCA 蛋白家族成员在番茄抗旱过程中发挥着重要作用。

OSCA1 是植物中第一个被鉴定的渗透感受器,拟南芥 AtOSCA 家族成员可分为 4 个亚族,植物膜蛋白数据库信息显示番茄 SIOSCA 家族包含 12 个成员,系统进化树结果显示 SIOSCA 家族同样可分为 4 个亚族,表明 OSCA 家族在遗传上具有保守性。已有研究表明,AtOSCA1.1 和 AtOSCA1.2 参与高渗胁迫信号传导^[7, 9],AtOSCA1.3 是干旱胁迫的早期响应因子^[10],说明 OSCA 家族成员之间存在功能冗余。为了较大程度降低 SIOSCA 功能类似蛋白成员共同发挥的生理作用,本研究利用 CRISPR/Cas9 技术构建 *slosca3.1/1.1* 和 *slosca1.6/1.2/2.3* 多基因敲除突变体,获得了多种突变类型的突变体,不仅有简单的碱基缺失、插入和替换的突变体,而且有大片段缺失和插入的突变体。在敲除突变体获得的过程中,发现多靶点敲除载体可以提高目的基因被编辑的效率,虽然 *SIOSCA3.1/1.1* 敲除载体的靶点 2 编辑效率较低以及 *SIOSCA1.6/1.2/2.3* 敲除载体的靶点 5 完全脱靶,但在其他靶点的加持下成功获得了目的研究基因的敲除突变体,且目标基因 2 个靶点相距近的获得了大片段缺失的突变体。

OSCA 基因家族在多个物种中均有研究,但只有少数植物的 OSCA 基因在功能上得到验证。LIU 等^[1]在大豆基因组中鉴定出 20 个大豆 GmOSCA 家族成员,异源表达 GmOSCA 家族成员进行生物学功能研究,发现 *GmOSCA1.1*、*GmOSCA1.2*、*GmOSCA1.3*、*GmOSCA1.4*、*GmOSCA1.5* 可能为大豆中的钙渗透传感器,过表达 *GmOSCA1.1-1.5*、*GmOSCA3.1* 和 *GmOSCA3.2* 增强了转基因拟南芥的抗旱性。玉米 *ZmOSCA* 家族基因跨膜结构域和系统进化分析表明,12 个成员分为 4 个亚族且都包含 DUF221 结构域,对 12 个家族成员进行 PEG、ABA 和 NaCl 处理,大部分基因响应渗透胁迫,在拟南芥中过表达

ZmOSCA2.4 基因,拟南芥抗旱性显著提高且与抗旱相关基因的表达水平显著上升^[22]。*OsOSCA1.1* 介导水稻根系中的高渗胁迫和盐胁迫诱导的细胞质内钙离子浓度增加,响应高渗胁迫和盐胁迫^[21]。上述研究表明,OSCA 作为渗透敏感钙离子通道蛋白,在植物应对渗透胁迫过程中发挥的功能是保守的。

番茄作为重要的经济蔬菜作物,品质和产量易受到干旱胁迫影响。叶片是植物应对干旱胁迫最重要的组织部位,干旱胁迫发生时植物通过调整叶片的形态结构来减少水分散失,从而降低机械损伤,并提高水分利用率和增强耐旱能力^[23-24]。在本研究中,通过对 *slosca3.1/1.1* 和 *slosca1.6/1.2/2.3* 突变体进行渗透胁迫处理发现,与野生型相比,*slosca3.1/1.1* 植株气孔关闭程度减弱,*slosca1.6/1.2/2.3* 植株表现出叶面积减小,萎蔫程度更加严重,叶片相对含水量更低;*slosca3.1/1.1* 和 *slosca1.6/1.2/2.3* 突变体对渗透胁迫的响应能力减弱,表明番茄 *SIOSCA3.1/1.1* 和 *SIOSCA1.6/1.2/2.3* 基因在番茄干旱胁迫应答中起着重要作用。为了更全面地阐明番茄叶片表达的 SIOSCA 基因在番茄渗透胁迫中的生物学功能,本课题组后续将会从杂合子敲除突变体发生分离的后代中筛选 *slosca1.1*、*slosca1.2*、*slosca1.6*、*slosca2.3* 和 *slosca3.1* 单基因敲除突变体以及 *slosca1.6/1.2*、*slosca1.6/2.3* 和 *slosca1.2/2.3* 双基因敲除突变体,并对其进行保卫细胞渗透胁迫处理、PEG 渗透胁迫处理以及干旱胁迫处理,用 *slosca3.1/1.1* 和 *slosca1.6/1.2/2.3* 突变体对渗透敏感的表型作为参照,研究 *SIOSCA1.1/1.2/1.6/2.3/3.1* 在番茄抗旱过程中发挥作用功能的强弱。

本研究通过构建番茄 *slosca* 突变体,研究 SIOSCA 蛋白在番茄响应渗透胁迫过程中的功能,证明 SIOSCA 蛋白家族成员在番茄抗旱中发挥重要作用,有助于推进 OSCA 基因家族成员在其他蔬菜作物和农作物抗逆生理过程中的功能研究。

参考文献

- [1] LIU C G, WANG H, ZHANG Y, CHENG H J, HU Z L, PEI Z M, LI Q. Systematic characterization of the OSCA family members in soybean and validation of their functions in osmotic stress[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(18): 10570.
- [2] ZHU J K. Abiotic stress signaling and responses in plants[J].

- Cell, 2016, 167(2): 313-324.
- [3] ZHANG H M, ZHU J H, GONG Z Z, ZHU J K. Abiotic stress responses in plants[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2022, 23(2): 104-119.
 - [4] HUANG G T, MA S L, BAI L P, ZHANG L, MA H, JIA P, LIU J, ZHONG M, GUO Z F. Signal transduction during cold, salt, and drought stresses in plants[J]. *Molecular Biology Reports*, 2012, 39(2): 969-987.
 - [5] ZELM V E, ZHANG Y X, TESTERINK C. Salt tolerance mechanisms of plants[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2020, 71(1): 403-433.
 - [6] ZHU J K. Salt and drought stress signal transduction in plants[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2002, 53(1): 247-273.
 - [7] YUAN F, YANG H M, XUE Y, KONG D D, YE R, LI C J, ZHANG J Y, THEPRUNGSIRIKUL L, SHRIFT T, KRICHILSKY B, JOHNSON D M, SWIFT G B, HE Y K, SIEDOW J N, PEI Z M. OSCA1 mediates osmotic-stress-evoked Ca^{2+} increases vital for osmosensing in *Arabidopsis*[J]. *Nature*, 2014, 514(7522): 367-371.
 - [8] YOSHIDA T, MOGAMI J, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. ABA-dependent and ABA-independent signaling in response to osmotic stress in plants[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2014, 21: 133-139.
 - [9] HOU C C, TIAN W, KLEIST T, HE K, GARCIA V, BAI F L, HAO Y L, LUAN S, LI L G. DUF221 proteins are a family of osmosensitive calcium-permeable cation channels conserved across eukaryotes[J]. *Cell Research*, 2014, 24(5): 632-635.
 - [10] THOR K, JIANG S S, MICHARD E, GEORGE J, SCHERZER S, HUANG S G, DINDAS J, DERBYSHIRE P, LEITAO N, DEFALCO T A, KÖSTER P, HUNTER K, KIMURA S, GRONNIER J, STRANSFELD L, KADOTA Y, BÜCHERL C A, CHARPENTIER M, WRZACZEK M, MACLEAN D, OLDROYD G E D, MENKE F L H, ROELFSEMA M R G, HEDRICH R, FEIJÓ J, ZIPFEL C. The calcium-permeable channel OSCA1.3 regulates plant stomatal immunity[J]. *Nature*, 2020, 585(7826): 569-573.
 - [11] YOSHIOKA K, MOEDER W. Calcium channel in plants helps shut the door on intruders[J]. *Nature*, 2020, 585(7826): 507-508.
 - [12] PEI S Y, TAO Q, LI W K, QI G N, WANG B R, WANG Y, DAI S W, SHEN Q J, WANG X, WU X M, XU S J, THEPRUNGSIRIKUL L, ZHANG J Y, LIANG L, LIU Y T, CHEN K A, SHEN Y, CRAWFORD B M, CHENG M J, ZHANG Q, WANG Y Q, LIU H L, YANG B G, KRICHILSKY B, PEI J S C, SONG K R, JOHNSON D M, JIANG Z H, WU F H, SWIFT G B, YANG H H, LIU Z H, ZOU X X, VO-DINH T, LIU F, PEI Z M, YUAN F. Osmo-sensor-mediated control of Ca^{2+} spiking in pollen germination[J]. *Nature*, 2024, 629(8014): 1118-1125.
 - [13] LI Y S, YUAN F, WEN Z H, LI Y H, WANG F, ZHU T, ZHUO W Q, JIN X, WANG Y D, ZHAO H P, PEI Z M, HAN S C. Genome-wide survey and expression analysis of the OSCA gene family in rice[J]. *BMC Plant Biology*, 2015, 15(1): 261.
 - [14] GU X Y, WANG P, LIU Z, WANG L, HUANG Z, ZHANG S L, WU J Y. Genome-wide identification and expression analysis of the OSCA gene family in *Pyrus bretschneideri*[J]. *Canadian Journal of Plant Science*, 2018, 98(4): 918-929.
 - [15] YIN L L, ZHANG M L, WU R G, CHEN X L, LIU F, XING B L. Genome-wide analysis of OSCA gene family members in *Vigna radiata* and their involvement in the osmotic response[J]. *BMC Plant Biology*, 2021, 21(1): 408.
 - [16] DING S C, FENG X, DU H W, WANG H W. Genome-wide analysis of maize OSCA family members and their involvement in drought stress[J]. *PeerJ*, 2019, 7: e6765.
 - [17] YANG X, XU Y C, YANG F F, MAGWANGA R O, CAI X Y, WANG X X, WANG Y H, HOU Y Q, WANG K B, LIU F, ZHOU Z L. Genome-wide identification of OSCA gene family and their potential function in the regulation of dehydration and salt stress in *Gossypium hirsutum*[J]. *Journal of Cotton Research*, 2019, 2(2): 87-104.
 - [18] ZENG H Q, ZHAO B Q, WU H C, ZHU Y Y, CHEN H T. Comprehensive in silico characterization and expression profiling of nine gene families associated with calcium transport in soybean[J]. *Agronomy*, 2020, 10(10): 1359.
 - [19] XIE K B, MINKENBERG B, YANG Y N. Boosting CRISPR/Cas9 multiplex editing capability with the endogenous tRNA-processing system[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(11): 3570-3575.
 - [20] DENG L, WANG H, SUN C L, LI Q, JIANG H L, DU M M, LI C B, LI C Y. Efficient generation of pink-fruited tomatoes using CRISPR/Cas9 system[J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2018, 45(1): 51-54.
 - [21] HAN Y, WANG Y X, ZHAI Y J, WEN Z H, LIU J, XI C, ZHAO H P, WANG Y D, HAN S C. OsOSCA1.1 mediates hyperosmolality and salt stress sensing in *Oryza sativa*[J]. *Biology*, 2022, 11(5): 678.
 - [22] CAO L R, ZHANG P Y, LU X M, WANG G R, WANG Z H, ZHANG Q J, ZHANG X, WEI X, MEI F J, WEI L, WANG T C. Systematic analysis of the Maize OSCA genes revealing ZmOSCA family members involved in osmotic stress and ZmOSCA2.4 confers enhanced drought tolerance in transgenic *Arabidopsis*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(1): 351.
 - [23] 董晓民, 刘伟, 李桂祥, 杨波, 张安宁. 干旱胁迫下两个扁桃品种的叶片解剖结构分析[J]. *黑龙江农业科学*, 2018(12): 54-57.
DONG X M, LIU W, LI G X, YANG B, ZHANG A N. Drought resistance analysis of two almond species[J]. *Heilongjiang Agricultural Sciences*, 2018(12): 54-57. (in Chinese)
 - [24] LI S, HAMANI A K M, ZHANG Y Y, LIANG Y P, GAO Y, DUAN A W. Coordination of leaf hydraulic, anatomical, and economical traits in tomato seedlings acclimation to long-term drought[J]. *BMC Plant Biology*, 2021, 21(1): 536.