

天麻动力相关蛋白 *GeDRP1E* 基因的克隆及功能初探

樊鑫^{1,2,3}, 赵建豪^{2,4}, 陈虞超^{2,3}, 华中一², 刘天睿², 赵玉洋², 袁媛^{1,2*}

(1. 广东药科大学中药学院, 广东 广州 510006; 2. 道地药材品质保障与资源持续利用全国重点实验室, 北京 100700;
3. 宁夏农林科学院农业生物技术研究中心, 宁夏 银川 750002; 4. 江苏大学药学院, 江苏 镇江 212013)

摘要: 基于天麻转录组数据, 设计特异引物, 克隆天麻 *DRP1E* (dynamamin-related protein 1E) 基因, 命名为 *GeDRP1E* (GenBase 登录号为 C_AA018577.1), 借助 ExPASy、ClustalW、MEGA 等软件对基因进行生物信息学分析, 利用拟南芥、马铃薯遗传转化体系获得转基因植株, 并对转基因拟南芥株高、结实率, 转基因马铃薯微型薯的块茎长、宽、重量和淀粉含量等农艺性状进行检测和分析, 初步解析 *GeDRP1E* 基因的功能。结果显示, *GeDRP1E* 基因 ORF 全长 1 899 bp、编码 632 个氨基酸残基, 相对分子质量为 69.90 kDa, 分子式为 $C_{3079}H_{4973}N_{883}O_{933}S_{19}$; 理论等电点为 7.27, 不稳定系数为 43.34, 亲水性平均指数为 -0.259, 预测属于不稳定亲水性蛋白。*GeDRP1E* 不存在跨膜结构, 无信号肽, 定位于细胞质。系统进化树显示, *GeDRP1E* 与其他种类植物 *DRP1E* 蛋白之间具有较高的同源性, 其中与铁皮石斛 *DcDRP1E* (XP_020689662.1) 同源性最高, 为 90.05%。运用双酶切法构建植物表达载体 pCambia1300-35Spro-*GeDRP1E*, 并通过农杆菌介导转化法获得了 *GeDRP1E* 基因的拟南芥互补突变体、马铃薯过表达株系。与拟南芥 *AtDRP1E* 基因突变体相比, *GeDRP1E* 基因互补突变体株高、结实率表型得以恢复。与野生型马铃薯相比, *GeDRP1E* 基因过表达株系微型薯体积、重量显著增大, 淀粉含量显著增高。初步推测 *GeDRP1E* 很可能参与调节线粒体的形态, 从而影响拟南芥植株、马铃薯微型薯的生长发育。上述研究结果为深入阐明天麻块茎生长发育的分子机制奠定了基础。

关键词: 天麻; *DRP1E* 基因; 遗传转化; 功能分析; 块茎发育

中图分类号: R931 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)02-0482-07

Cloning and gene functional analysis study of dynamamin-related protein *GeDRP1E* gene in *Gastrodia elata*

FAN Xin^{1,2,3}, ZHAO Jian-hao^{2,4}, CHEN Yu-chao^{2,3}, HUA Zhong-yi², LIU Tian-rui²,
ZHAO Yu-yang², YUAN Yuan^{1,2*}

(1. School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China;
2. National Key Laboratory for Quality Ensurance and Sustainable Use of Dao-Di Herbs, Beijing 100700, China;
3. Agricultural Biotechnology Centre, Ningxia Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Yinchuan 750002, China;
4. School of Pharmacy, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract: The gene *GeDRP1E* encoding dynamamin-related protein 1E in *Gastrodia elata* was cloned by specific primers which were designed based on the transcriptome data of *G. elata*. Bioinformatics analysis on *GeDRP1E* gene was carried out by using ExPASy, ClustalW, MEGA, etc. Positive transgenic *Arabidopsis* plant and potato minituber were obtained with the genetic transformation system of *Arabidopsis* and potato. The plant height and seed setting rate of transgenic *Arabidopsis*, and agronomic characters, such as size, weight and starch content

收稿日期: 2023-05-08; 修回日期: 2023-08-22.

基金项目: 国家自然科学基金重大项目 (81891013, 81891010); 中国中医科学院科技创新工程重大攻关项目 (CI2021A041); 国家科技性基础资源调查项目 (2018FY100800); 中央本部级重大支减项目 (2060302).

*通讯作者 Tel: 86-10-64087649, E-mail: y-yuan0732@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-0587

of potato minituber of transgenic potato were tested and analyzed. And *GeDRPIE* gene function was preliminarily investigated. The results showed that the open reading frame of *GeDRPIE* gene was 1 899 bp in length and 632 amino acids residues were encoded, with a relative molecular weight of 69.90 kDa and a molecular formula of $C_{3079}H_{4973}N_{883}O_{933}S_{19}$. It was predicted that the theoretical isoelectric point was 7.27, the instability coefficient was 43.34, and the average hydrophilicity index was -0.259 , which was indicative of an unstable hydrophilic protein. *GeDRPIE* has no transmembrane structure and signal peptide, and was localized in the cytoplasm. The phylogenetic tree showed that *GeDRPIE* was highly homologous with *DRPIE* proteins of other plant species, among which *GeDRPIE* had the highest homology with *DcDRPIE* (XP_020689662.1) in *Dendrobium candidum*, reaching 90.05%. *GeDRPIE* plant expression vector pCambia1300-35Spro-*GeDRPIE* was constructed by double digests, and *Arabidopsis* complementary mutant and potato overexpression strain of *GeDRPIE* gene were obtained by *Agrobacterium*-mediated gene transformation. Compared with the *Arabidopsis AtDRPIE* mutant, the height and seed setting rate of the *GeDRPIE* complementation mutant were rescued. The minituber of *GeDRPIE* overexpression potato had larger size, heavier weight and higher starch content, comparing to wild-type potato. It was preliminarily induced that *GeDRPIE* was involved in mitochondrial morphology regulation, which related to the growth and development of *Arabidopsis* plants and potato miniature. The research results laid a foundation for further elucidating the molecular mechanisms underlying the growth and development of *G. elata* tuber development.

Key words: *Gastrodia elata*; *DRPIE* gene; genetic transformation; functional analysis; tuber development

天麻 (*Gastrodia elata*) 又名赤箭、定风草、独摇芝, 是兰科 Orchidaceae 多年生天麻属 *Gastrodia* 寄生异养草本植物, 无根, 不能进行光合作用, 须与伞菌目 Agaricales 真菌蜜环菌 *Armillaria sp.* 形成菌根共生来完成其生命活动^[1-4]。天麻以其干燥块茎入药, 性甘、平, 归肝经, 属于名贵中药材, 具有息风止痉、平抑肝阳、祛风通络等功效, 应用广泛, 市场需求旺盛^[5-8]。传统上认为, “酱瓜形”是天麻药材“优形”重要指标, 而“酱瓜形”与天麻块茎形态建成密切相关^[9-13]。

植物胞质分裂和细胞扩张过程中的膜运输在植物形态发生的过程中发挥重要作用, 其中参与膜运输的蛋白主要包括动力蛋白和动力相关蛋白等^[14-16]。动力相关蛋白种类较多, 参与的生物学过程也较多, 其中, *DRP*等蛋白参与线粒体形态的调节^[17,18]。而其中, *DRP1*亚家族被认为通过依赖蛋白的内吞作用在细胞质分裂、细胞扩张、细胞生长和细胞壁/质膜生物合成中发挥重要作用^[19-22]。*DRP1*基因家族由5个高度相关的成员组成, 即 *DRPIA* 至 *DRPIE*, *DRPIE*是动力蛋白家族的重要组成^[23]。目前, 有关 *DRPIE* 研究报道较少, Kang等^[24]发现 *AtDRPIE* 在胞质分裂过程中与细胞板相关, 在拟南芥不同发育阶段维持质膜和细胞壁完整性的过程中发挥重要作用; Jin等^[25]发现 *AtDRPIE* 基因的 T-DNA 插入突变会导致线粒体的异常伸长, *AtDRPIE* 可能在植物细胞线粒体分裂中起关键作用; Goh等^[26]发现 *AtDRPIE* 拟南芥突变体植株和野生型生长状况及光合活性相似, 表型形态亦无差异, 但 *AtDRPIE* 基因突变会使叶片吸氧量增加; Minami等^[27]发现 *DRPIE* 蛋白在冷驯化过程中多积累在鞘脂和富含甾醇的质膜

结构域中, 起到提升植物耐寒性的作用。

本课题组前期发现天麻线粒体结构及功能与其块茎生长发育密切相关, 但对参与线粒体形态结构调节的 *GeDRPIE* 基因揭示尚不充分。为此, 本文基于天麻基因组及转录组数据, 开展天麻 *GeDRPIE* 基因克隆及其生物信息学分析, 解析基因及其编码蛋白结构特性, 并利用拟南芥、马铃薯遗传转化体系对 *GeDRPIE* 基因的功能进行初步研究, 为深入阐明 *GeDRPIE* 基因功能奠定基础, 也为后期解析道地天麻“优形”形成机制以及分子育种奠定一定基础。

材料与方法

材料与试剂 新鲜天麻全株采自湖北省宜昌市夷陵区雾渡河镇秦家坪村 (31°24'07"N, 111°16'68"E), 由中国中医科学院中药资源中心金艳副研究员鉴定; 马铃薯 (*Solanum tuberosum*) 尤金品种由天津农业科学院许庆芬研究员惠赠; 拟南芥 *drp1e* 纯合突变体购于中国拟南芥突变体服务中心; Trizol (批号 SPR00641) 购于赛默飞世尔科技有限公司; 快速DNA提取检测试剂盒 (批号 KG201101X) 购于北京天根生化科技有限公司; GV3101农杆菌感受态 (批号 AC1001) 购于北京华越洋生物科技有限公司; TransScript II First cDNA Synthesis Super (批号 AM62057A) 反转录试剂盒购于日本 TaKaRa 公司; 丙二醛 (MDA) 活性检测试剂盒 (批号 BC0025)、植物叶绿素活性检测试剂盒 (批号 BC0995)、脯氨酸 (PRO) 活性检测试剂盒 (批号 BC0295)、过氧化氢 (H₂O₂) 含量检测试剂盒 (批号 BC3595) 购于北京索莱宝科技有限公司。

仪器与设备 JA31002 电子天平 (上海精科天美科学仪器有限公司), 伯乐通用型 Powerpac Universal 电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司), Chemidoc MP 凝胶成像仪 (英国 Syngene 公司), Euroklav23VS+ 高压蒸汽灭菌锅 (日本 TOMY 公司), LightCycler 480 实时荧光定量 PCR 仪 (瑞士 Roche 公司), Veriti 96 well Thermal Cycler PCR 仪 (美国 ThermoFisher Scientific 公司), Microfuge 20R 高速冷冻离心机 (德国 Beckman Coulter 公司), DHP-9032 电热恒温培养箱 (武汉市武昌实验仪器厂), JENWAY3510 PH 计 (英国金威公司)。

天麻 *GeDRP1E* 基因的克隆 采用 Trizol 法提取天麻块茎的总 RNA, 分别利用 Nanodrop 微量分光光度计和琼脂糖凝胶电泳测定 RNA 浓度和分析 RNA 完整性, 利用 TransScript II First cDNA Synthesis Super 反转录试剂盒合成 cDNA, 依据天麻转录组中基因 *GeDRP1E* 的 CDS 序列, 利用 Prime5.0 软件设计基因全长扩增引物, 扩增引物: Forward primer: 5'-ATGTCGA CAATGGAGAGCTTGAT-3', Reverse primer: 5'-TCA TCTGGCCCAAGAAACAGCTT-3'。PCR 扩增体系: cDNA 1.5 μ L、rTaq 0.5 μ L、10 \times PCR Buffer 2.5 μ L、dNTP (2.5 mmol·L⁻¹) 1.5 μ L、引物各 (10 μ mol·L⁻¹) 1.0 μ L、ddH₂O 17 μ L, 总体积 25 μ L。PCR 反应程序: 94 $^{\circ}$ C 4 min, 35 个循环: 94 $^{\circ}$ C 20 s、52 $^{\circ}$ C 20 s、72 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 7 min, 12 $^{\circ}$ C 保存。利用 1% 的琼脂糖凝胶电泳对扩增产物进行电泳, 利用凝胶成像仪检测目的条带, 切下含有目的条带的胶块, 利用 DNA 回收试剂盒回收目的片段, 并连接到克隆载体上。将 PCR 扩增存在目的条带的菌液送北京睿博兴科生物技术有限公司测序, 测序正确即得阳性克隆。利用质粒小提试剂盒进行质粒提取, 获得携带目的基因的载体 T-*GeDRP1E*。

天麻 *GeDRP1E* 基因的生物信息学分析 利用 ExPASy (<http://web.expasy.org/protaram/>) 对 *GeDRP1E* 编码氨基酸序列的数目、相对分子质量、理论等电点等系数进行预测。利用 TMHMM server v2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0>) 以及 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 分别对 *GeDRP1E* 编码蛋白跨膜域、信号肽、亚细胞定位进行预测^[28,29]。利用 ClustalW 对天麻 *GeDRP1E* 蛋白氨基酸序列与其同源蛋白进行比对。利用 MEGA 6.0 的 neighbor-joining 法构建系统进化树, bootstrap 值为 1 000。利用 TBtools 分析 *GeDRP1E* 家族保守 motif。利用在线软件 predict-protein (<https://predictprotein.org/>) 预测 *GeDRP1E* 蛋白的二级结构, 利用在线软件 Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>) 进行三维结构建模, 预测 *GeDRP1E* 蛋白质的三级结构。

植物表达载体构建及遗传转化 利用双酶切法将 *GeDRP1E* 基因重组到植物表达载体 pCambia1300 的 *KpnI* 和 *SalI* 克隆位点, 获得阳性克隆载体 pCambia1300-35Spro-*GeDRP1E*。利用冻融法将载体 pCambia1300-35Spro-*GeDRP1E* 转化至农杆菌 GV3101 感受态细胞, -80 $^{\circ}$ C 保存。参考 Yang 等^[30]和 Chen 等^[31]的方法, 分别转化拟南芥突变体、马铃薯, 通过潮霉素 hyg 抗性对转化植株进行初筛; 然后提取初筛植株的 DNA 进行 PCR 鉴定, 筛选出 PCR 鉴定阳性植株; 再提取阳性植株的总 RNA 进行 RT-PCR 鉴定, 获得正常表达的转基因植株。

拟南芥植株表型的调查 按照野生型、*drp1e* 突变体和 *GeDRP1E/drp1e* 互补突变体三个株系进行实验分组, 将不同株系的拟南芥种子点板, 待拟南芥幼苗长出 4 片真叶后, 每组选取长势良好且生长状况一致的 6 株幼苗移苗, 从点板当天开始, 每天对不同组别的拟南芥进行表型的观测和记录。

***GeDRP1E* 转基因马铃薯块茎的农艺性状分析** 利用直尺、天平等测量工具, 进行转基因株系和野生型株系微型薯块茎长、宽和重量等农艺性状指标的测定。利用分光光度法进行微型薯淀粉含量的测定, 具体方法参照淀粉含量检测试剂盒说明书。取 0.03 g 微型薯进行样本处理, 取上清液, 用蒸馏水稀释 4 倍, 按照测定步骤操作, 使用 96 孔板测得计算 $\Delta A' = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$, 以标准管的浓度 ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 为横坐标, 吸光度 ΔA 标准 (ΔA 标准) 为纵坐标, 绘制标准曲线 $y = 2.848 1x + 0.046 5$ ($R^2 = 0.999 4$)。根据标准曲线, 将 $\Delta A'$ 代入方程得到 x ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), 按样本质量计算淀粉含量。

统计学处理 所有处理数据采用 SPSS 26.0 软件进行分析, 以 t -检验检测差异显著性, 显著水平 $P < 0.05$, 以平均值 \pm SD 表示。

结果

1 天麻 *GeDRP1E* 基因克隆

PCR 扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测, 目的条带介于 1 000~2 000 bp, 与预期长度一致, 见图 1。阳性克隆测序结果与转录组数据进行比对, 相似度为 100%, 表明成功克隆 *GeDRP1E* 基因的全长 cDNA 序列。*GeDRP1E* 基因 ORF 全长 1 899 bp, 编码 632 个氨基酸。基因序列已经上传至 GenBase 网站, 登录号为 C_AA018577.1。

2 *GeDRP1E* 蛋白理化性质预测

经 ExPASy 软件分析, 结果发现 *GeDRP1E* 相对分子质量为 69.90 kDa, 分子式为 C₃₀₇₉H₄₉₇₃N₈₈₃O₉₃₃S₁₉; 理论等电点为 7.27, 带负电荷残基 (Asp+Glu) 80 个, 带正电

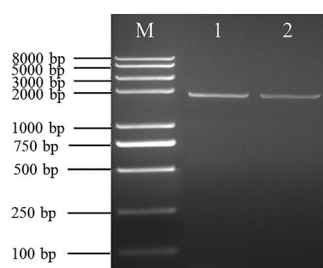


Figure 1 Electrophoresis of product amplified by PCR for *GeDRP1E*. M: 2K Plus DNA Marker; 1, 2: *GeDRP1E* amplification

荷残基 (Arg+Lys) 80 个; 不稳定系数为 43.34, 属于不稳定蛋白; 脂肪系数为 93.73, 亲水性平均指数为 -0.259, 预测属于亲水性蛋白。GeDRP1E 蛋白中丙氨酸含量最高, 为 10.3%, 色氨酸含量最低, 为 0.5%。

3 *GeDRP1E* 蛋白跨膜结构域与信号肽分析

跨膜结构域分析显示, *GeDRP1E* 不存在跨膜结构。亚细胞定位预测显示, *GeDRP1E* 定位于细胞质中。信号肽分析显示, Sec/SPI 值为 0, 预测 *GeDRP1E* 不含信号肽。

4 *GeDRP1E* 蛋白二级结构与三级结构分析

GeDRP1E 的二级结构由 α -螺旋、延伸链和无规则卷曲构成。其中 α -螺旋、无规则卷曲是主要组成元件, 分别占比 59.24% 和 32.54%; 延伸链占比 8.21, 见图 2A。*GeDRP1E* 的三级结构预测结果显示, 其与拟南芥动力相关蛋白序列同源率为 53%, 因此, 以该蛋白 (PDBcode: c3t35A) A 链为模板, 通过同源建模构建 *GeDRP1E* 三级结构, 建模范围为 7~348 位氨基酸, 见图 2B。

5 *GeDRP1E* 系统进化分析

DRP1E 在石榴 (*Punica granatum*)、榴莲 (*Durio. zibethinus*)、甜橙 (*Citrus. sinensis*) 等植物中广泛存在。

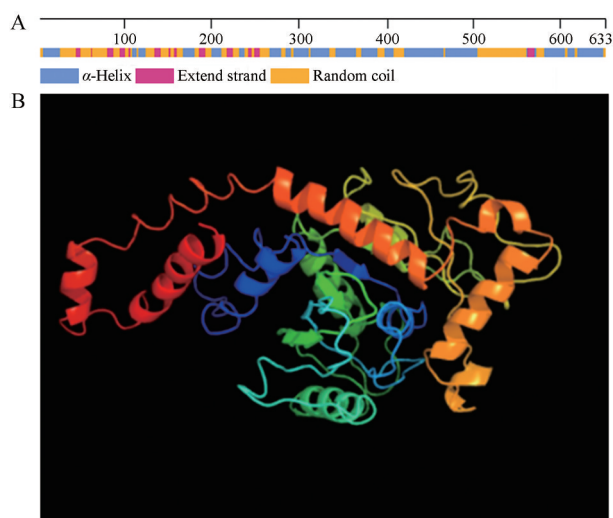


Figure 2 Prediction of secondary structure (A) and tertiary structure (B) of *GeDRP1E* protein

序列对比结果表明, *GeDRP1E* 编码氨基酸序列与其同源基因的氨基酸序列一致性为 82.33%~90.05%。其中与铁皮石斛 *DcDRP1E* (XP_020689662.1) 编码氨基酸同源性最高, 序列一致性为 90.05%; 与胡桃 (*Juglans regia*) *JrDRP1E* (XP_018843514.1) 编码氨基酸序列的同源性最低, 序列一致性为 82.33%。系统进化树分析结果表明, 双子叶植物的 *DRP1E* 同源性较高, 聚为一支; 单子叶之间 *DRP1E* 同源性较高, 聚为另一支; 且同为兰科植物的天麻、铁皮石斛聚为一类, 见图 3。

DRP1E 同源基因的编码氨基酸序列 motif 分析结果表明, 除拟南芥外, 所有物种 *DRP1E* 均含有 9 个保守结构域 motif5、motif3、motif10、motif1、motif6、motif2、motif4、motif8、motif7, 见图 4。

6 利用拟南芥突变体对 *GeDRP1E* 功能进行分析

对拟南芥 *GeDRP1E/drp1e* 基因互补突变体植株进行 PCR 鉴定, PCR 扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测, 与预期长度一致, 表明成功获得拟南芥 *GeDRP1E/drp1e* 基因互补突变体阳性植株。

比较观察不同生长阶段野生型、*drp1e* 突变体、*GeDRP1E/drp1e* 互补突变体拟南芥的株高和结实率, 结果如图 5 所示, 互补突变体与野生型的株高变化情况基本一致, 但二者同期株高要高于突变体; 互补突变体、野生型、突变体的结实率分别为 0.96 ± 0.023 、 0.98 ± 0.023 、 0.51 ± 0.024 , 互补突变体和野生型的结实率无显著差异 ($P > 0.05$), 但二者显著高于突变体 ($P < 0.05$)。上述结果说明, *GeDRP1E* 与其拟南芥同源基因具有相似的功能。

7 过表达 *GeDRP1E* 基因马铃薯阳性植株的鉴定

利用农杆菌介导法将过表达载体 pCambia1300-35Spro-*GeDRP1E* 转化至马铃薯尤金品种, 对筛选得到的具有潮霉素抗性的 8 个转化马铃薯株系进行 PCR 鉴别, 结果发现编号 2、4、9 的三个株系扩增出现目的条带, 表明这三个株系为转基因阳性株系。对这三个株系进行 RT-PCR 鉴定, 结果发现三个株系均扩增出目的条带, 表明这三个转基因株系的 *GeDRP1E* 可正常表达。

8 过表达 *GeDRP1E* 马铃薯植株块茎的表型分析

将过表达 *GeDRP1E* 马铃薯组培苗进行了土培, 4 个月后收获得到了 T1 代转基因微型薯。对微型薯的块茎长、宽和重量等农艺性状进行了测定, 结果发现 *GeDRP1E* 转基因株系微型薯长为 3.09 ± 0.81 cm, 显著高于野生型株系的 1.22 ± 0.05 cm; 宽为 1.23 ± 0.14 cm, 显著高于野生型株系的 0.92 ± 0.05 cm; 重量为 2.31 ± 0.29 g, 显著高于野生型株系的 0.49 ± 0.06 g; 利用分光光度法对 *GeDRP1E* 转基因株系、野生型株系微型薯的

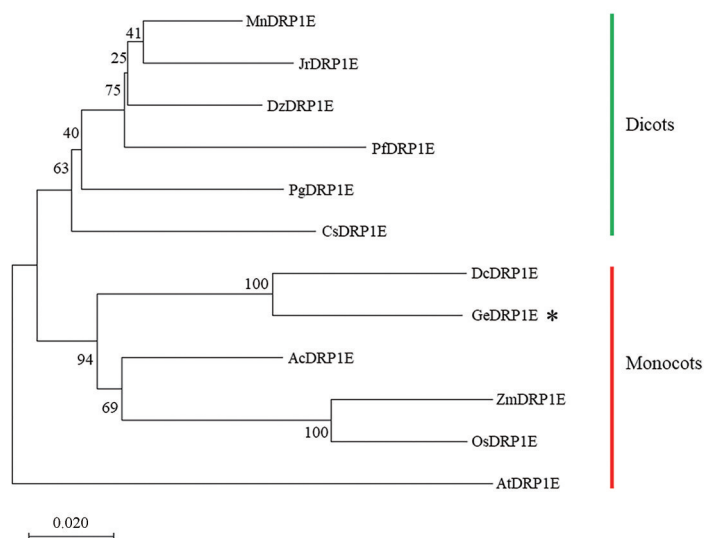


Figure 3 Cluster analysis of *GeDRP1E* amino acid sequences. *DRP1E* homologs and GenBank numbers are from top to bottom: *Morus notabilis*: *MnDRP1E* (EXB 70710.1), *Juglans regia* L.: *JrDRP1E* (XP_018843514.1), *Durio zibethinus* Murr.: *DzDRP1E* (XP_022742859.1), *Paulownia fortunei*: *PfDRP1E* (KAI3449018.1), *Punicagranatum* L.: *PgDRP1E* (XP_031397619.1), *Citrus sinensis*: *CsDRP1E* (KAH9733571.1), *Dendrobium officinale* Kimura & Migo: *DcDRP1E* (XP_020689662.1), *Gastrodia elata* Bl.: *GeDRP1E*, *Ananas comosus*: *AcDRP1E* (OAY71357.1), *Zea mays*: *ZmDRP1E* (XP_008658513.1), *Oryza sativa* L.: *OsDRP1E* (XP_015614939.1), *Arabidopsis thaliana*: *AtDRP1E* (NP_567094.1)

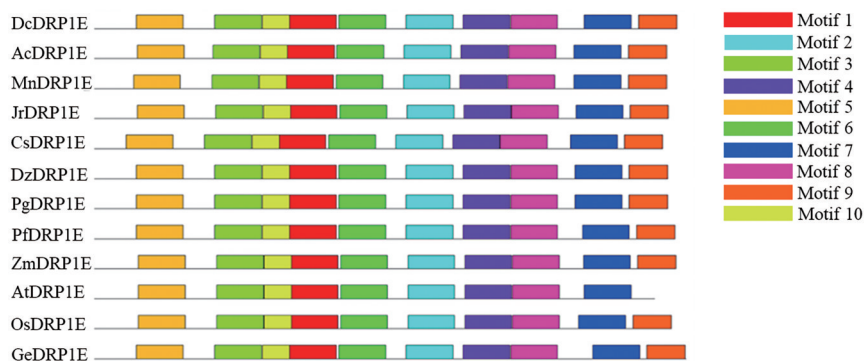


Figure 4 Conservative motif analysis of the amino acid sequence of *GeDRP1E* homologous gene

淀粉含量进行测定, 结果发现转基因株系微型薯的淀粉含量为 $180.77 \pm 1.31 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 显著高于野生型株系的 $163.06 \pm 1.89 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 见图6。实验结果表明, *GeDRP1E* 转基因微型薯的大小、重量和淀粉含量均显著高于野生型株系 ($P < 0.05$)。

讨论

动力相关蛋白 *DRP1E* 基因广泛存在于各类植物中, 结构比较保守。本研究在天麻中首次克隆得到了 *GeDRP1E* 基因, 并分析了该基因及其编码蛋白的基本特征, 发现其编码蛋白 *GeDRP1E* 的氨基酸序列与苔藓植物小粒碗藓、裸子植物红豆杉、被子植物油樟、拟南芥、水稻等植物来源的 *DRP1E* 蛋白的序列一致性均高于 82%, 显示其具有高度保守性, 表明其可能由共同的

祖先进化而来。

DRP1E 基因参与调控多种重要生物学过程。Jin 等^[25]研究发现, 拟南芥动力家族蛋白编码基因 *AtDRP1E* 突变会导致细胞中细胞板组装、细胞壁形成和质膜循环等方面存在缺陷。本研究运用拟南芥遗传转化体系对 *GeDRP1E* 基因的功能进行了初步验证, 结果显示, *GeDRP1E* 可调控植株株高和结实率, 与拟南芥同源基因功能相似。为探究 *GeDRP1E* 对植物块茎发育调控的功能, 本研究进一步对 *GeDRP1E* 转基因马铃薯植株微型薯表型进行了比较观察, 与野生型相比, 转基因株系的微型薯的体积更大、重量更重、淀粉含量更高, 推测 *GeDRP1E* 可能通过参与调节马铃薯块茎细胞中线粒体形态与活性, 从而影响了块茎的生长发育和能量代谢, 进而导致块茎变大、淀粉含量增高。

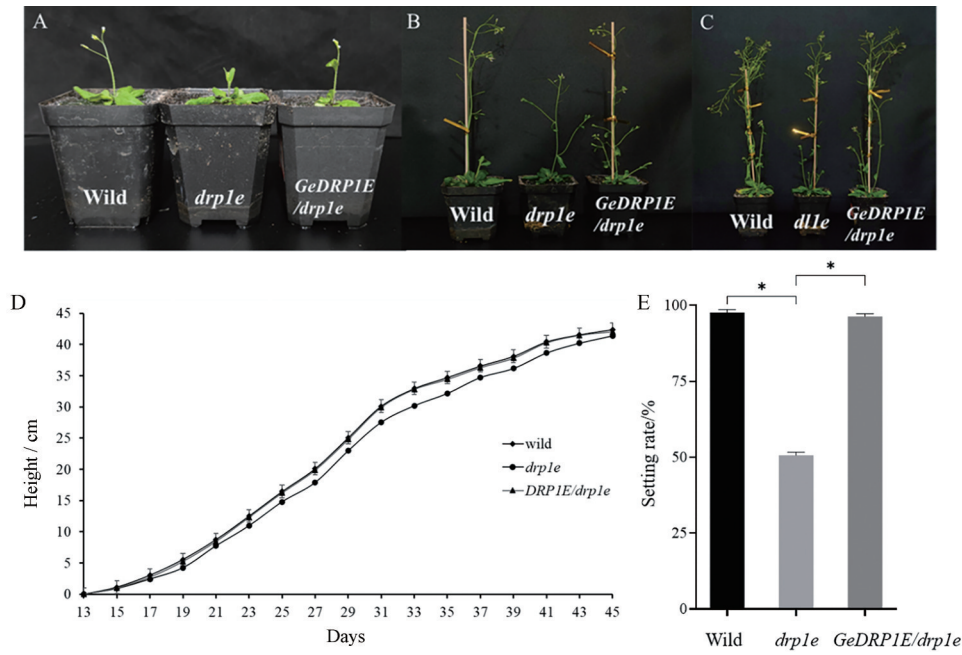


Figure 5 Growth of *Arabidopsis* plants of different strains. Wild: Wild-type of *Arabidopsis*; *drp1e*: Homozygous mutant of *Arabidopsis*; *GeDRPIE/drp1e*: Complementary mutant of *Arabidopsis*. A: 16 days after transplant; B: 24 days after transplant; C: 32 days after transplant; D: Variation in height over time in three strains of *Arabidopsis*; E: Setting rate of three strains of *Arabidopsis*. $n = 6$ (D, E), $\bar{x} \pm \text{SEM}$. * $P < 0.05$

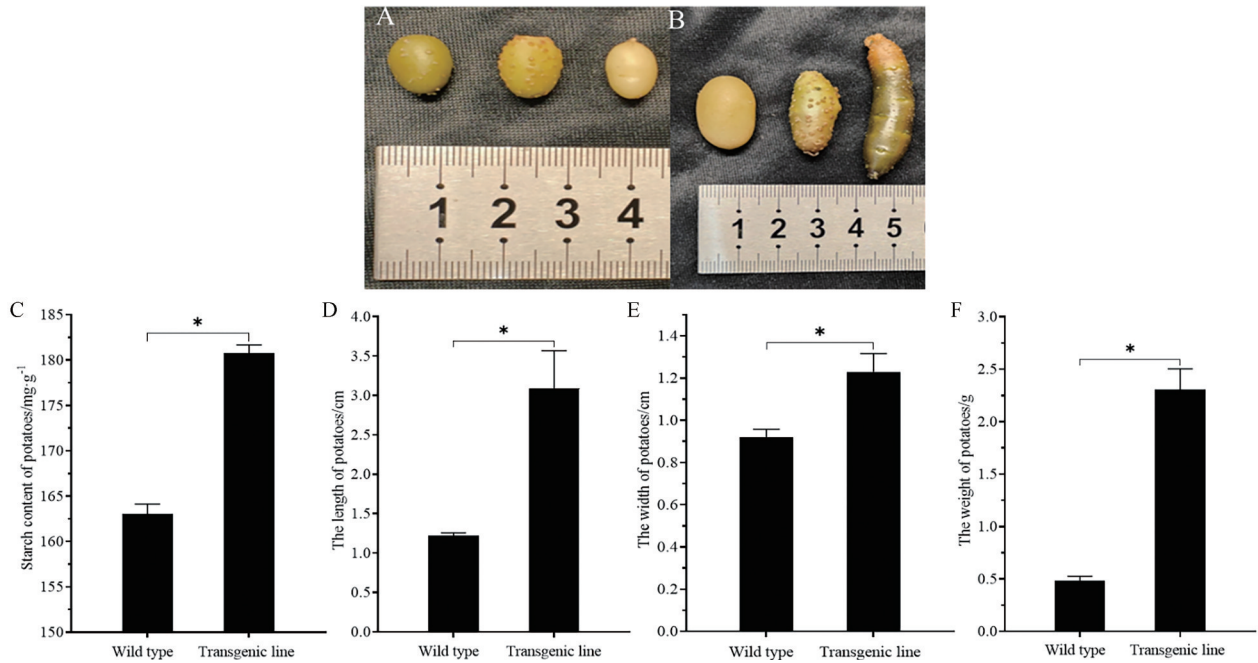


Figure 6 Phenotypic analysis of *GeDRPIE* transgenic and wild-type strains of micro potato. Wild-type: Wild-type of micro potato; Transgenic line: Transgenic line of micro potato. A: Wild-type; B: *GeDRPIE* transgenic line; C, D, E and F are the starch content, length, width and weight of potato tubers of different strains respectively. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$

作为异养植物的天麻, 线粒体在其生长发育中发挥重要作用, 其 *DRPIE* 基因功能可能具有独特性。本研究结果为后续深入解析 *GeDRPIE* 基因对天麻块茎发育的作用机制奠定了基础。

作者贡献: 樊鑫负责文章撰写和数据分析; 赵建豪、陈虞超负责实验设计及文章修改; 华中一、刘天睿、赵玉洋负责数据分析和实验材料收集; 袁媛指导文章撰写并提出修改意见。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Xu JT, Ran YZ, Guo SX. Studies on the life cycle of *Gastrodia elata* [J]. Acta Acad Med Sin (中国医学科学院学报), 1989, 11: 237-241.
- [2] Yuan Y, Jin XH, Liu J, et al. The *Gastrodia elata* genome provides insights into plant adaptation to heterotrophy [J]. Nat Commun, 2018, 9: 1615.
- [3] Li YH, Nan TG, Qian R, et al. Survey on woods species and its relation with yield and quality of *Gastrodia elata* [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2020, 26: 29-34.
- [4] Cao YY, Chen YC, Liu TR, et al. Application of strigolactone analogs in the storage of *Gastrodia elata* [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2023, 48: 3149-3155.
- [5] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [M]. 2020 Ed. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2020: 59.
- [6] Xie Y, Hua ZY, Zhao YY, et al. Rapid screening of *Gastrodia elata* with high purity by PCR-RFLP identification [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2022, 28: 113-118.
- [7] Qian R, Li H, Hua ZY, et al. Quantitative taxonomic study on agronomic traits of cultivated *Gastrodia elata* [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2020, 45: 3085-3090.
- [8] Li H, Qian R, Tian N, et al. Identification of *Gastrodia elata* and its hybrid by polymerase chain reaction [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2020, 45: 3666-3671.
- [9] Cheng R, Liu TR, Li YH, et al. Screening of an *Armillaria gallica* strain for *Gastrodia elata* cultivation [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2023, 48: 374-381.
- [10] Yuan Y, Huang LQ. Molecular pharmacognosy in Daodi herbs [J]. Chin Sci Bull (科学通报), 2020, 65: 1093-1102.
- [11] Jiao HH, Huang LQ, Yuan Y. Progress in study of "excellent shape" of Dao-di *Panax ginseng* and its genetic and environmental interaction mechanism [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2023, 48: 3125-3131.
- [12] Liu TR, Jin Y, Meng HB, et al. Biological research of color and quality evaluation in "quality discrimination by character" of Chinese medicine [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2020, 45: 4545-4554.
- [13] Hu J, Jiao HH, Nan TG, et al. Effects of dimethyl sulfoxide and ethanol on adventitious root growth of *Panax quinquefolium* and ginsenosides [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2021, 27: 141-146.
- [14] Zhao JH, Chen YC, Hua ZY, et al. Cloning and gene function of dicarboxylate tricarboxylate carrier protein in *Gastrodia elata* [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2023, 48: 3140-3148.
- [15] Cao YY, Chen YC, Guo SH, et al. Research progress in strigolactones and application prospect in medicinal plants [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2023, 48: 3132-3139.
- [16] Collings DA, Gebbie LK, Howles PA, et al. *Arabidopsis* dynamin-like protein DRP1A: a null mutant with widespread defects in endocytosis, cellulose synthesis, cytokinesis, and cell expansion [J]. J Exp Bot, 2008, 59: 361-376.
- [17] Arimura S, Tsutsumi N. A dynamin-like protein (ADL2b), rather than FtsZ, is involved in *Arabidopsis* mitochondrial division [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99: 5727-5731.
- [18] Bednarek SY, Backues SK. Plant dynamin-related protein families DRP1 and DRP2 in plant development [J]. Biochem Soc Trans, 2010, 38: 797-806.
- [19] Meier O, Greber UF. Adenovirus endocytosis [J]. J Gene Med, 2004, 6: S152-S163.
- [20] Konopka CA, Schleede JB, Skop AR, et al. Dynamin and cytokinesis [J]. Traffic, 2006, 7: 239-247.
- [21] Hong ZL, Geisler-lee CJ, Zhang ZM, et al. Phragmoplastin dynamics: multiple forms, microtubule association and their roles in cell plate formation in plants [J]. Plant Mol Biol, 2003, 53: 297-312.
- [22] Sawa S, Koizumi K, Naramoto S, et al. DRP1A is responsible for vascular continuity synergistically working with VAN3 in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiol, 2005, 138: 819-826.
- [23] Kaplan RS. Structure and function of mitochondrial anion transport proteins [J]. J Membr Biol, 2001, 179: 165-183.
- [24] Kang BH, Busse JS, Bednarek SY. Members of the *Arabidopsis* dynamin-like gene family, *ADLI*, are essential for plant cytokinesis and polarized cell growth [J]. Plant Cell, 2003, 15: 899-913.
- [25] Jin JB, Bae HJ, Kim SJ, et al. The *Arabidopsis* dynamin-like proteins ADL1C and ADU1E play a critical role in mitochondrial morphogenesis [J]. Plant Cell, 2003, 15: 2357-2369.
- [26] Goh CH, Ko SM, Park YI, et al. Regulation of dark-induced stomatal closure in *Arabidopsis* dynamin-like protein 1E (aDRP1E) mutant leaves [J]. J Plant Biol, 2011, 54: 112-118.
- [27] Minami A, Tominaga Y, Furuto A, et al. *Arabidopsis* dynamin-related protein 1E in sphingolipid-enriched plasma membrane domains is associated with the development of freezing tolerance [J]. Plant J, 2015, 83: 501-514.
- [28] Wang YB, Guan L, Cao XQ, et al. Cloning and functional characterization of isopentenyl diphosphate isomerase genes from *Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus* [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2021, 56: 3362-3369.
- [29] Zhou H, Lu XX, Auo WW, et al. Cloning and analysis of *STR* gene and its promoter from *Uncaria* [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2022, 57: 1526-1536.
- [30] Yang YC, Wang XH, Wang YF, et al. Cloning of *AhWRKY33* from *Asarum heterotropoides* and its genetic transformation in *Arabidopsis* [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2020, 45: 3112-3119.
- [31] Chen XK, Li FF, Wang WB, et al. Construction of RNA interference vector to silence *StMKK1* in potato and development of *StMKK1*-silenced transgenic potato lines [J]. Acta Agric Boreali-Occident Sin (西北农业学报), 2020, 29: 1822-1830.