

高粱 ATP 合成酶 E 亚基基因 (*SbATPase-E*) 的克隆及其抗逆功能研究

张 静^{1,2}, 张登峰², 孙永华², 李永祥², 石云素², 宋燕春², 杜金友¹, 王天宇², 黎 裕²

(¹河北科技师范学院, 秦皇岛 066004; ²中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081)

摘要: 高粱是一种抗旱性较强的禾谷类作物。本研究在高粱中克隆到一个全长为 693 bp 的编码 ATP 合成酶 E 亚基的基因 (*SbATPase-E*)。在高粱幼苗期, *SbATPase-E* 基因受 NaCl 和脱落酸 (ABA) 处理诱导上调表达。该基因在拟南芥中过量表达可提高转基因植株的耐旱性和耐盐性, 在逆境胁迫条件下转基因拟南芥植株较野生型植株根系发达, 可能是转基因植株耐旱性和耐盐性提高的主要原因。在干旱胁迫条件下, 转基因植株中 *DREB2A*、*P5CS1*、*RD29A*、*RAB18* 和 *ABII* 基因的表达量相对于野生型植株中的表达量提高更为显著; 在高盐处理条件下, 转基因植株中 *SOS1* 和 *SOS2* 基因的表达量也较野生型植株中的表达量明显提高。这些抗逆相关基因的上调表达可能是转基因植株抗逆性提高的主要分子机制。

关键词: 高粱; 拟南芥; ATP 合成酶; 耐旱性; 耐盐性

Isolation of ATP Synthase Subunit E Gene in Sorghum (*SbATPase-E*) and Its Functional Analysis Related to Stress Tolerance

ZHANG Jing^{1,2}, ZHANG Deng-feng², SUN Yong-hua², LI Yong-xiang², SHI Yun-su²,
SONG Yan-chun², DU Jin-you¹, WANG Tian-yu², LI Yu²

(¹Hebei Normal University of Science and Technology, Qinhuangdao 066004; ²Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

Abstract: Sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) is a cereal crop with strong drought tolerance. In this study a gene encoding ATP synthase subunit E with 230 amino acids was cloned in sorghum. The *SbATPase-E* gene was induced by NaCl and ABA treatment in seedling stage. Heterologous over-expression of *SbATPase-E* could enhance drought and salt tolerance in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Further study found that the improved drought and salt tolerance in transgenic plants was associated with more larger root systems in transgenic lines compared with the wild type plants. Moreover, the expression levels of *DREB2A*, *P5CS1*, *RD29A*, *RAB18* and *ABII* in the transgenic plants under drought conditions were higher than that in the wild type, and the transcript levels of *SOS1* and *SOS2* in the transgenic plants under high salt treatment were also higher. The up-regulation of these stress response genes may suggest the molecular mechanism of stress resistance of *SbATPase-E* transgenic plants.

Key words: sorghum; *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh; *SbATPase-E*; drought tolerance; salt tolerance

干旱是导致作物减产的重要环境因素之一^[1], 一种有效途径。目前, 通过常规育种手段提高作物提高作物抗旱性是避免干旱条件下作物产量损失的 抗逆性的报道较多, 并且已经取得了一定的进

收稿日期: 2015-11-30 修回日期: 2016-04-07 网络出版日期: 2016-08-12

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20160812.1316.008.html>

基金项目: 农业部转基因专项 (2014ZX08003-004); 国家自然科学基金重点项目 (U1138304); 中国农科院创新工程和河北省自然科学基金项目 (C2012407002)

第一作者研究方向为植物功能基因组学。E-mail: zxjm3018@163.com

通信作者: 张登峰, 研究方向为玉米种质资源。E-mail: zhangdengfeng@caas.cn

杜金友, 研究方向为植物功能基因组学。E-mail: djinyou@126.com

展^[2-3]。然而,常规育种由于存在选育时间长、花费高等缺陷,不能满足提高作物抗逆性的需求。近年来,随着分子生物学的发展,转基因技术在抗逆育种中的作用日益明显^[4]。该技术通过抗逆基因的筛选、克隆以及转基因功能验证,获得携带目标基因的植株,最终实现作物抗旱性的提高^[5-6]。如孟山都公司利用枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)中克隆的 RNA 分子伴侣基因 *CspB*,培育了抗旱转基因玉米新品种 MON87460,在美国中西部地区的种植面积已经达到 300 万亩以上^[7]。

抗逆相关基因可分为两类,一类是功能蛋白基因,这类基因编码逆境胁迫响应过程中直接起保护作用的蛋白质,包括保护细胞免受水分胁迫伤害的功能蛋白,如 LEA 蛋白、抗低温蛋白和离子通道蛋白、渗透调节蛋白和毒性降解酶,如脯氨酸转运蛋白、过氧化物歧化酶(SOD, superoxide dismutase)等^[8-9]。第二类是调控基因,主要编码信号转导过程中的蛋白激酶、蛋白酶以及在信号转导和逆境胁迫响应过程中起调控作用的转录因子等。这些酶类主要包括 CDPK 蛋白激酶(CDPK, calcium-dependent protein kinase)、MAPK 蛋白激酶(MAPK, mitogen-activated protein kinase)、SnRK2 蛋白激酶(SNF-1 related kinase)、磷酸酯酶 A2(phosphatase A2)、磷脂酶 C(phospholipid C)等转录因子主要包括 AP2/EREBP (APETALA2/Ethylene-responsive element binding protein)、NAC (NAM, ATAF1/2 and CUC2)、MYB、bZIP (Basic leucine zipper) 和 WRKY 类转录因子等^[10-12]。大量研究表明,植物对逆境的胁迫响应与能量代谢过程密切相关,外界胁迫会导致植物体内三磷酸腺苷(ATP)的过度消耗^[13],产生大量的活性氧(ROS, reactive oxygen species),从而对植物造成伤害。因此,在逆境胁迫响应中保持植物体内能量代谢平衡对植物体生长发育及存活至关重要。在外界环境胁迫条件下,提高植物的能量利用效率是改善植物抗逆性的有效方式^[14]。例如, M. DeBlock 等^[15]通过化学抑制剂和 RNA 干扰(RNAi, RNA interference)的方法抑制 PARP 酶(聚 ADP 核糖基聚合酶)活性,降低了逆境条件下植物体中 ATP 的过度损耗,提高了植株的抗逆性。

ATP 合酶(ATPase)是 ATP 合成过程中的重要酶类,是一种重要的辅酶和应激响应酶^[16]。该酶分为 3 种类型:储能 F-型、质膜 P-型和液泡 V-型。F-型 ATP 合酶是参与能量代谢的关键酶,通过光合磷酸化或氧化磷酸化合成 ATP。P-型 ATP 酶是

对所有真核生物和很多原核生物来说极其重要的阳离子泵。载体蛋白利用 ATP 使自身磷酸化,通过改变构象来转移质子或其他离子。液泡 V-型 ATP 合酶 V-ATPase 存在于所有真核细胞中,是液泡膜系统中最重要致电性质子泵^[17]。V-ATPase 是多亚基装配,空间结构与 F-ATPase 相似,呈现“球茎”结构。突出膜外的部分称为 V1,膜内部分称为 V0。V1 部分大约有 8 种亚基组成,根据分子量大小分别命名为 A~H^[18];V0 部分大约也是 3 种亚基构成。基于结构预测结果,V-ATPase 的 E 亚基与 F-ATPase 的 γ 亚基作用类似,但是两个亚基之间不具有同源性,因此研究认为 D 亚基和 E 亚基的结合体在 V-ATPase 中构成了 ATP 合酶的中央颈部结构^[19]。E 亚基是一个具有丰富带电残基的亲水性蛋白,在得到完整 V1 的最后组装步骤中起关键作用^[20],该亚基具有一段富含赖氨酸(Lys)残基的结构,对酶与阳离子的接近起调节作用。液泡中的 Na^+/H^+ 利用液泡 ATP 水解释放的能量来转运^[21]。生理生化实验证明在高盐条件下可以诱导液泡 ATP 酶活性的增加^[22-24]。近几年随着 ATPase 亚基序列的积累,对各个亚基功能的研究也越来越多。对冰叶日中花(*Mesembryanthemum crystallinum* L.)盐处理之后发现多个亚基(A、B、C、E、F、G)的表达量增加^[25-26]。高盐处理下小麦中 *ATPase-E* 基因的表达量增加^[27],且小麦 *ATPase-E* 基因的过表达可提高转基因拟南芥的耐盐性,高盐处理下转基因拟南芥种子的萌发率提高,根长增加^[28]。编码苹果液泡 ATPase 的 A 亚基合成酶基因 *MdVHA-A* 可提高转基因烟草幼苗的抗旱性^[29]。另外,最近有研究发现该基因还参与响应了植物的渗透胁迫^[30]。这些研究结果说明 *ATPase-E* 在植物抗逆反应中起着重要作用。

本实验室在前期利用 FOX(Full-length cDNA Over-expressing gene hunting system)技术构建了高粱逆境诱导表达全长 cDNA 过表达文库,通过转化拟南芥得到大量转基因植株^[31]。本研究通过对转基因拟南芥在胁迫环境下进行大规模筛选和鉴定,克隆到高粱液泡 ATP 合成酶 E 亚基基因(*SbATPase-E*),进而对 *SbATPase-E* 进行抗逆功能分析,以期阐明作物抗逆性分子机理提供信息,并为作物的遗传改良提供有益的基因资源。

1 材料与方法

1.1 耐旱转基因株系的筛选

将通过 FOX 技术获得的大量转基因拟南芥 T₁

种子和野生型(Col-0,对照)种子播种于蛭石和营养土 1:1(v/v)的混合基质中,正常生长到 3 周后进行干旱处理,当野生型对照植株全部死亡后开始进行复水处理,收获存活单株种子。将收获的 T₂ 种子经灭菌处理(75% 乙醇 1 min,0.5% 次氯酸钠 10 min)并用蒸馏水冲洗 3~4 遍,播种于含有草丁膦(PPT,phosphinothricin)的 MS 培养基上,4 ℃ 春化 2~3 d 后转移到 16 h 光照/23 ℃,8 h 黑暗/18 ℃,空气相对湿度 50%~60% 的培养室中。1 周后将培养基中长出 2 片绿叶的幼苗移栽至含有蛭石和营养土 1:1(v/v)的混合基质中,正常条件下培养并收获 T₃ 种子。

1.2 NaCl、ABA 对高粱幼苗的处理

将实验室保存的高粱地方品种 XGL-1 种植在含有蛭石和营养土 1:1(v/v)的混合基质中,放在培养间培养,待长到 3 叶 1 心时开始对其进行处理。分别配制含有 200 μmol/L ABA、200 mmol/L NaCl 的 Hoagland 营养液对其进行处理,处理期间对高粱幼苗的根系进行通气以防止植物无氧呼吸受到损伤。在处理的不同时间点(0、1 h、6 h、12 h、24 h)分别取苗的地上部分(5 株混合),迅速放入液氮保存,以备提取 RNA。

1.3 耐旱转基因株系的基因型鉴定

提取转基因株系 DNA,利用表达载体插入片段两端序列设计引物,通过 PCR 反应扩增插入的基因,然后进行测序,将测序结果在 NCBI 中进行比对,预测插入基因的功能。利用 Clustalx 对蛋白序列进行序列比对,利用 MEGA5.1 构建不同物种之间相似基因的系统发育树。

1.4 转基因株系种子萌发率鉴定

将转基因纯合株系和野生型株系的种子进行消毒,分别将其点播在含有不同浓度 NaCl(150 mmol/L、175 mmol/L)和 0.2 μmol/L ABA 的 MS 培养基和正常的 MS 培养基上,每个株系点 35 粒种子,设置 3 个重复,平板上的种子避光放置于 4 ℃ 春化 2~3 d,经过春化的种子放到培养间正常生长条件下萌发,4 d 后开始统计,统计到第 7 天,长有 2 片绿叶的单株作为萌发植株,计算种子萌发率。

1.5 转基因株系的抗逆性鉴定

将转基因纯合株系和野生型对照种子经过春化后分别播种于 MS 平板上,待其生长 1 周后将幼苗移至含有不同浓度的甘露醇(300 mmol/L、350 mmol/L、400 mmol/L)和 NaCl(175 mmol/L、150 mmol/L、125 mmol/L)的 MS 培养基上,垂直培养,每个处理 3 次重复,鉴定转基因株系和对照材料的生长情况。

1.6 逆境胁迫应答相关基因的表达分析

利用 primer premier5.0 设计基因特异性引物(表 1),通过定量 PCR 反应检测转基因植株在逆境条件下胁迫应答相关基因在叶片中表达量的变化。拟南芥相关基因表达量的鉴定选择 *Actin* 基因作为内参基因,高粱相关基因表达量的鉴定选择 18S rRNA 基因作为内参基因。20 μL PCR 扩增体系含:10 μL SYBR Premix Ex Taq(TaKaRa,大连),0.4 μL ROX,正反向引物各 0.5 μmol/L 和模板 cDNA 50~100 ng。每个样品 3 次重复。PCR 程序为 95 ℃ 30 s;95 ℃ 5 s,60 ℃ 34 s,72 ℃ 20 s,共 40 个循环。采用专用 96 孔板(Axygen,美国)和高透光率封口膜(Axygen,美国),荧光定量 PCR 仪 ABI7500(ABI Prism,美国)进行 qRT-PCR 实验。

表 1 实验中所用的实时荧光定量 PCR 引物列表

Table 1 Sequences of primers for RT-PCR used in this study

引物 Primer	序列 Sequence(5'→3')
ATPase-E-F	CCGAGGAGGAATTCAACATTGAG
ATPase-E-R	AGAAGGAGTTCCTTCATAGCATCGT
P5CS1-F	GAACATACCAGAAGCACGGTCA
P5CS1-R	CAATGCAGTCTGTGTGCTCACT
RD29A-F	ATCACTTGGCTCCACTGTTGTTT
RD29A-R	ACAAAACACACATAAACATCCAAAGT
DREB2A-F	GTGGACTGGAGCCGATGTATTG
DREB2A-R	GAATCCTGCTGTTGTTGCTGAC
ABH1-F	CGTCTCACATCTTCGTCGCT
ABH1-R	TCAATCCTCGCAGCTTCATC
RAB18-F	TCGCTCGTTGTATTGTGCTT
RAB18-R	CCAGATGCTCATTACACACTCATG
SOS1-F	CTTGCGGTGAGGCACATATAATC
SOS1-R	CAACAAGCCAACCTTCTCGAG
SOS2-F	CGTCGTTTCCTTGATCGAATTTAT
SOS2-R	ATCTGATCCATTGACCACAAGCT
SOS3-F	AGTCACGGTAGAAGAAGTGGAGG
SOS3-R	CCTAATTGCTGTCTACATATGGACC
18SrRNA-F	GGCTCGAAGACGATCAGATACC
18SrRNA-R	GTGCCCTTCGCTCAATTCCT
Actin-F	GGTAACATTTGCTCAGTGCTGG
Actin-R	AACGACCTTAATCTTCATGCTGC

2 结果与分析

2.1 耐旱单株的鉴定

本实验室在前期利用 FOX 技术获得了大量转基因拟南芥 T₁ 种子。本研究对 4500 株转基因拟南芥植株进行高强度干旱处理,在野生型植株 100% 死亡的情况下,共得到 26 个耐旱转基因株系(图 1A),分别提取各个转基因株系的 DNA,利用表达载体两端序列所设计的引物,通过对插入基因进行鉴定,发现 FOX30.4 和 FOX30.3 这 2 个株系插入的基因为 *ATPase-E* 基因。如图 1B 所

示,PCR 扩增得到一条 1500 bp 左右的条带,测序发现该段序列包括 693 bp 的目的基因,400 bp 的非翻译区(UTR)序列和 400 bp 载体序列(vector sequence)。通过与高粱数据库进行比对,发现该基因与 *SbATPase-E*(基因编号:Sobic. 003G244200.1)基因序列一致。该基因编码的蛋白含有一个液泡 ATP synthase(E/31kDa) subunit 功能域。通过 RT-PCR 的方法研究显示,在转录水平上,*ATPase-E* 在转基因植株 FOX30.4 和 FOX30.3 株系中可以表达,而在野生型中没有表达(图 1C)。

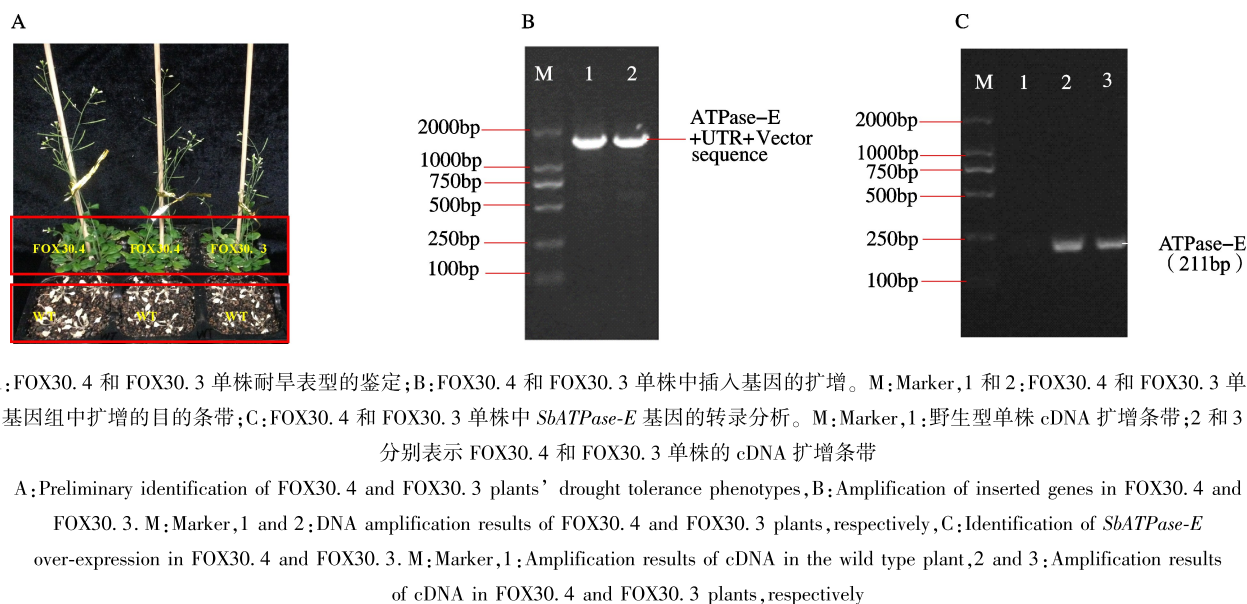


图 1 FOX30.4 和 FOX30.3 单株的鉴定
Fig. 1 Identification of FOX30.4 and FOX30.3 lines

2.2 *SbATPase-E* 基因的序列分析

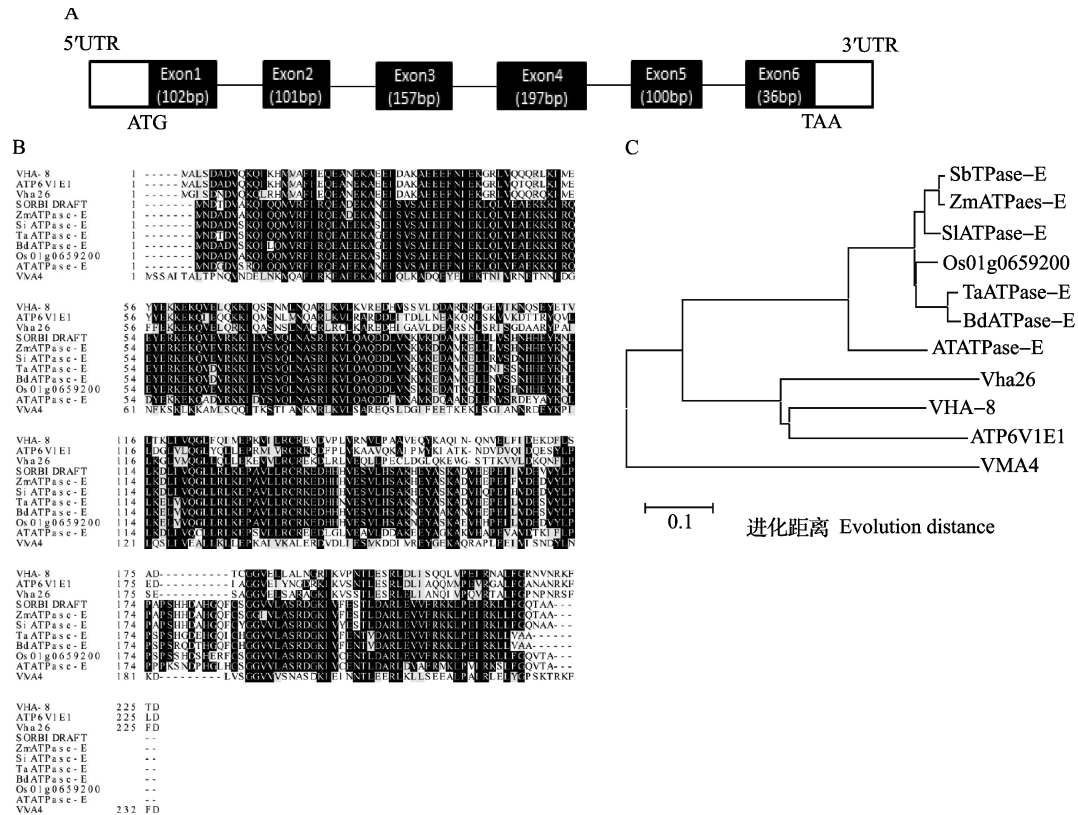
通过与高粱基因组(<http://www.phytozome.net/>)进行序列比对,结果显示,*SbATPase-E* 基因位于高粱 3 号染色体,包含 6 个外显子和 5 个内含子(图 2A)。编码区全长 693 bp,编码蛋白质含 230 个氨基酸,其中含量最高氨基酸分别是谷氨酸 Glu(10.9%)和赖氨酸 Lys(10.4%),亲水系数 -0.561,是一种亲水性蛋白。

根据数据库比对发现,*ATPase-E* 基因存在于所有已知的真核生物中。通过 Clustalx 软件对不同物种 *ATPase-E* 基因编码的蛋白质进行同源性比对发现,不同物种的 *ATPase-E* 蛋白质同源性较高,在 16~225aa 之间存在一个 ATP synthase(E/31kDa) subunit 结构域(图 2B)。通过 MEGA5.1 软件进行系统发育树分析发现高粱 *ATPase-E* 蛋白与禾本科作物的 *ATPase-E* 蛋白同源性较高,与动物的同源蛋

白亲缘关系较远。其中高粱 *ATPase-E* 蛋白与玉米同源蛋白亲缘关系最近,与酵母的同源蛋白亲缘关系最远(图 2C)。

2.3 *SbATPase-E* 在逆境条件下的表达特性分析

SbATPase-E 的过量表达可以提高转基因拟南芥植株的抗逆性。因此,该基因可能参与了高粱的逆境胁迫响应过程,并在高粱逆境胁迫响应过程中发挥作用。以高粱 3 叶期幼苗为材料,进行 NaCl 和 ABA 胁迫处理,通过定量 PCR 实验研究该基因的诱导表达特性。研究结果显示:与正常生长的对照相比,NaCl 处理 24 h 时 *SbATPase-E* 的表达量显著增加,达到对照的 3.1 倍(图 3)。与正常生长的对照相比,*SbATPase-E* 表达量在 ABA 处理 24 h 表达量达到对照的 2.9 倍(图 3)。*SbATPase-E* 基因受到高盐和 ABA 的诱导表达,说明该基因可能在逆境胁迫过程中具有重要作用。



A: *SbATPase-E* 基因结构示意图; B: 不同物种 ATPase-E 蛋白序列同源比对结果; C: 不同物种 ATPase-E 蛋白的系统进化树

A: Schematic diagram of *SbATPase-E* gene; B: Alignment comparison of sorghum ATPase-E protein sequence with other species' homologous; C:

Phylogenetic tree of plant ATPase-Es, *SbATPase-E* (XM_002456035) from *Sorghum bicolor*, *ZmATPase-E* (ACG31413.1) from *Zea mays*, *SiATPase-E* (XP_004969367.1) from *Setaria italica*, *Os01g0659200* (NP_001043767.1) from *Oryza sativa* Japonica Group, *TaATPase-E* (ABC70183.1) from *Triticum aestivum*, *BdATPase-E* (XP_003569489.1) from *Brachypodium distachyon*, *ATATPase-E* (NP_192853.1) from *Arabidopsis thaliana*, *VHA-8* (NM_068639.5) from *Caenorhabditis elegans*, *Vha26* (NM_001300253.1) from *Drosophila melanogaster*, *ATP6V1E1* (NM_001696.3) from *Homo sapiens*, *VMA4* (NM_001183752.3) from *Saccharomyces cerevisiae* S288c

图 2 *SbATPase-E* 基因及蛋白序列分析

Fig. 2 Sequence analysis of *SbATPase-E* gene and protein

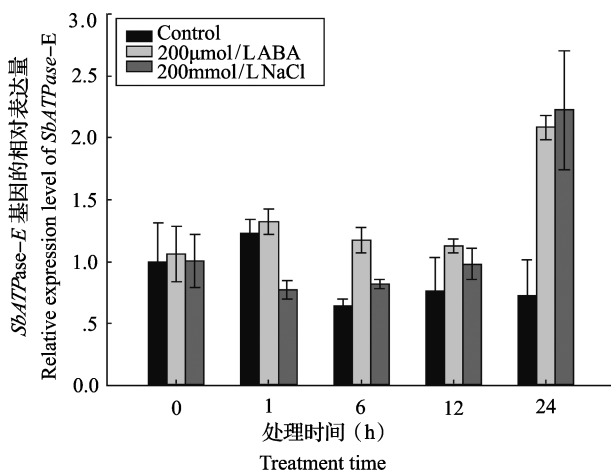


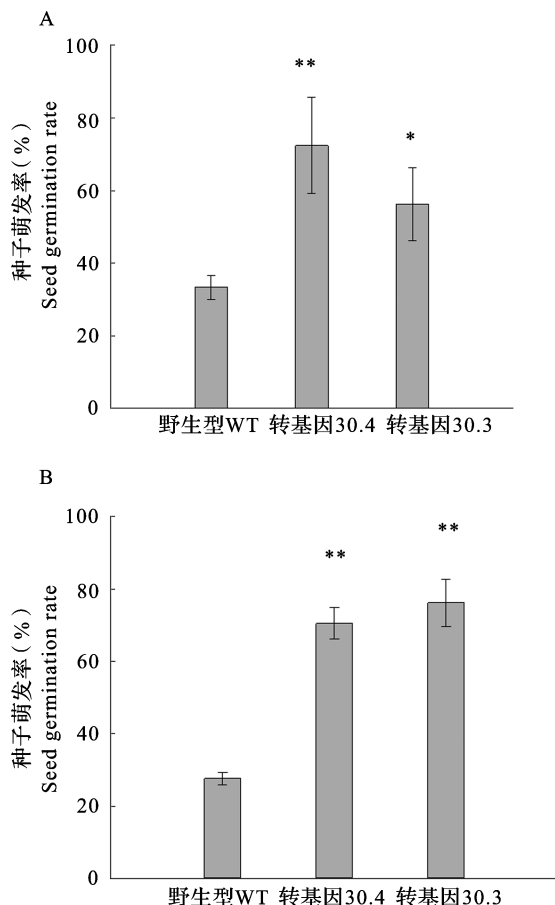
图 3 ABA 和盐处理下高粱 *SbATPase-E* 基因的转录分析

Fig. 3 Differential expression of *SbATPase-E* under ABA and NaCl treatments in sorghum

2.4 逆境胁迫对转基因拟南芥种子萌发的影响

为确认 *SbATPase-E* 在逆境胁迫反应过程中的作用,对转基因拟南芥种子在 NaCl 和 ABA 处理下的萌发情况进行了研究。在正常 MS 平板培养基上培养 7 d 后统计种子的萌发情况,发现野生型与转基因株系种子萌发情况无显著差异,野生型种子的萌发率为 100%, FOX30.3 和 FOX30.4 转基因株系分别为 100% 和 98%。在含有 150 mmol/L NaCl 的 MS 平板培养基上进行培养,7 d 后统计种子的萌发情况,发现 NaCl 处理对拟南芥种子的萌发具有较大的影响,野生型种子萌发率只有 33% (图 4A),显著低于正常 MS 培养基上的萌发率;两个转基因株系的种子萌发率分别达到 72% 和 56%,显著高于野生型种子的萌发率(图 4A);同样,在含有 175 mmol/L NaCl 的 MS 平板培养基上进行培养,7 d 后统计种子

萌发情况,野生型拟南芥萌发率为 2.7%,转基因种子萌发率分别达到 25.7% 和 20%,显著高于野生型种子的萌发率。另外,在含有 0.2 $\mu\text{mol/L}$ ABA 的 MS 培养基上进行培养,7 d 后统计萌发率,野生型种子萌发率为 28%,而转基因株系的种子萌发率分别达到 70% 和 76% (图 4B)。



A: 150 mmol/L NaCl 处理下,转基因与野生型拟南芥种子的萌发率统计;B: 0.2 $\mu\text{mol/L}$ ABA 处理下,转基因与野生型拟南芥种子的萌发率统计。* 和 ** 代表显著性差异

$P < 0.05$ 和 $P < 0.01$, t 检验

A: Germination rate in the presence of 150mmol/L NaCl in the transgenic and the wild type plants, B: Germination rate in the presence of 0.2 $\mu\text{mol/L}$ ABA in the transgenic and the wild type plants. * and ** represent significant differences at $P < 0.05$ and $P < 0.01$ level, respectively, as determined by Student's t test

图 4 *SbATPase-E* 过表达转基因株系和野生型株系在 NaCl 和 ABA 条件下种子萌发分析

Fig. 4 Germination assays in the presence of 150 mmol/L NaCl and 0.2 $\mu\text{mol/L}$ ABA in the transgenic and the wild type plants

2.5 转基因拟南芥植株的耐盐性及耐旱性鉴定

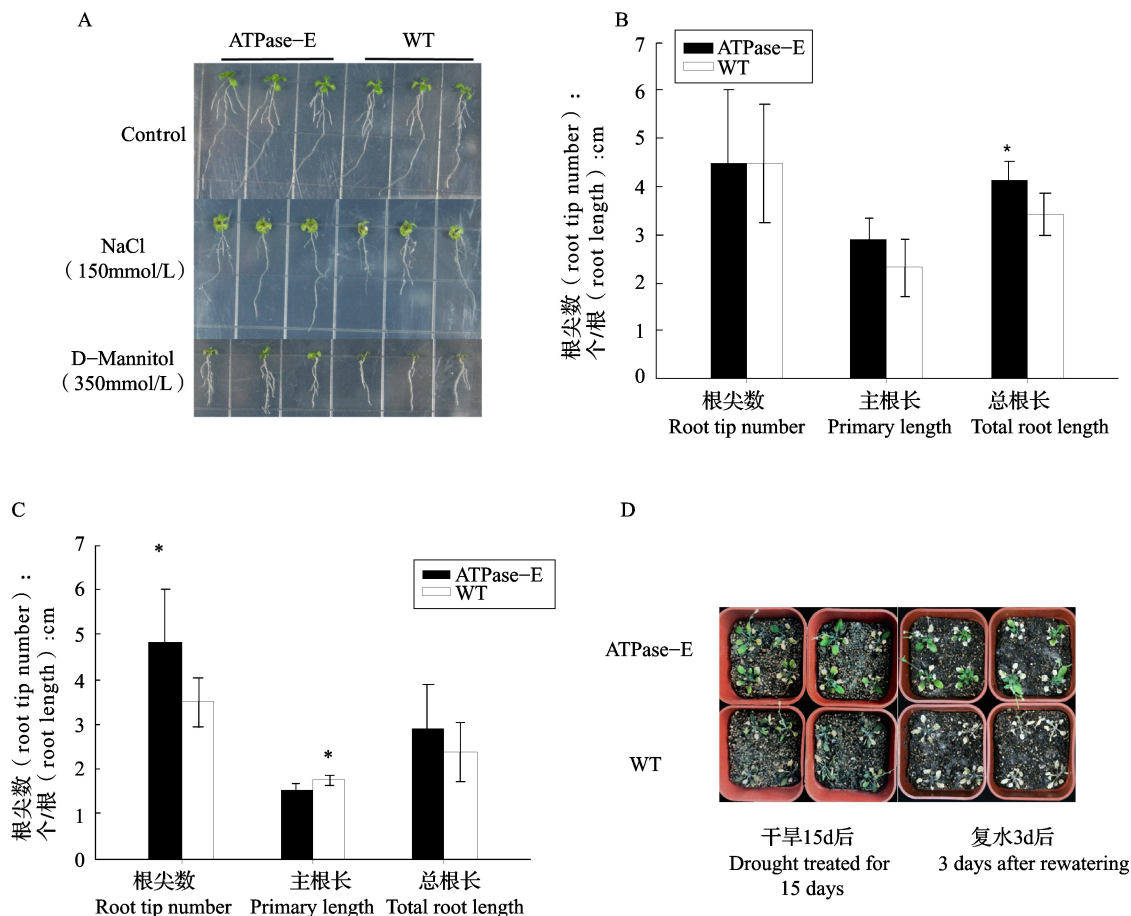
为进一步确定转 *SbATPase-E* 基因植株的抗逆性,将正常 MS 条件下培养 10 d 的转基因和野生型

拟南芥幼苗分别转移到含有 150 mmol/L 的 NaCl 和 350 mmol/L 甘露醇的 MS 平板上,垂直培养,生长 1 周后观察表型。在正常 MS 培养基上,野生型(WT)和转基因株系(ATPase-E)在叶片大小、根系长度、侧根数目等表型性状上没有明显差异,而在含有 150 mmol/L NaCl 的 MS 培养基上,转基因和野生型株系的生长均受到明显抑制。与转基因株系相比,NaCl 对野生型植株的影响更大,野生型植株叶片较小、根系较短,并且转基因株系和野生型株系总根长存在显著差异,转基因株系为 4.2 cm,野生型株系的只有 3.4 cm(图 5A、5B)。在含有 350 mmol/L 甘露醇的 MS 培养基上生长 1 周后,转基因株系和野生型株系的生长均受到明显抑制,其中野生型株系受到的抑制更加明显,转基因株系较野生型植株更加健壮,转基因株系叶片仍然为绿色,而野生型植株叶片已经发生褐化,转基因株系根系较野生型株系更加发达、根尖数目显著增加,每株转基因株系平均根尖数为 4.8,而野生型株系平均根尖数为 3.5(图 5A、5C)。

另外,对转基因植株进行了苗期耐旱性鉴定,对正常生长到 4 周的转基因植株和野生型对照进行了干旱处理,在停止浇水 15 d 后,转基因株系具有相对较好的叶片持绿性,而野生株系叶片和花序严重失绿、萎蔫。复水 3 d 后,野生型植株表现为全部死亡,而转基因植株仍然存活(图 5D)。因此,*SbATPase-E* 基因的过量表达可以提高转基因拟南芥植株的耐盐性和耐旱性。

2.6 过表达植株中抗逆相关基因的表达分析

为进一步研究 *SbATPase-E* 转基因植株耐旱性、耐盐性提高的分子机制,对正常条件和干旱处理条件下 *P5CS1*、*DREB2A*、*RAB18*、*ABI*、*RD29A* 等 5 个抗旱相关基因在叶片中的表达进行了分析。通过定量 PCR 分析发现,正常生长条件下转基因植株和野生型植株叶片中这 5 个基因表达量无显著差异。随着干旱胁迫时间的延长,*P5CS*、*ABI1* 基因在野生型植株中的表达量表现为先上升后下降,而在转基因植株中的表达量表现为一直上升的趋势。野生型植株在干旱胁迫 10 d 时,*DREB2A* 基因表达量较未处理对照表达量显著升高,而转基因植株在受到干旱胁迫 7 d 时,*DREB2A* 基因的表达量就较未处理对照的表达量显著升高。*RAB18* 基因在野生型植株受到干旱胁迫时表达模式表现为上升-下降-上升的趋势,而在转基因植株受到干旱胁迫时表达模式表现为一直上升的趋势。*RD29A* 基因在野生型植株和



A: *SbATPase-E* 过表达株系与野生型对照在 NaCl 和甘露醇处理下的表现; B: 转基因株系和野生型对照在含 150 mmol/L NaCl 的 MS 培养基上培养 1 周后根系生长比较; C: 转基因株系和野生型对照在含有 350 mmol/L 甘露醇的 MS 平板上根系生长比较;

D: *SbATPase-E* 过表达株系和对照在干旱 15 d 及复水 3 d 后的表现; * 代表显著性差异 $P < 0.05$

A: Characterization of ATPase-E-overexpressing plants and wild type plants after treated with mannitol and NaCl, B: Root growth statistics in 150 mmol/L NaCl, C: Root growth statistics in 350 mmol/L mannitol, D: Characterization of ATPase-E-overexpressing plants and wild type plants after treated with drought 15 days and after rewatering 3 days, * represent significant differences from the WT at values of $P < 0.05$

图 5 *SbATPase-E* 过表达转基因株系和野生型株系耐盐性和耐旱性表型鉴定

Fig. 5 The performance of *SbATPase-E*-overexpressing transgenic and WT plants under salt and drought stresses

转基因植株中的表达模式均表现为上升-下降-上升的趋势。另外,除了在受到干旱胁迫 5 d 时, *RAB18* 基因在转基因植株中的表达量低于野生型对照外,在干旱胁迫的不同阶段 *P5CS1*、*DREB2A*、*RAB18*、*ABI*、*RD29A* 这 5 个基因在转基因株系中的表达量均明显高于在野生型植株中的表达量(表 2)。这一结果说明在转基因株系中, *SbATPase-E* 基因的过量表达可能促进了这 5 个抗旱相关基因的表达,提高了转基因株系的抗旱性。

另外, *SbATPase-E* 基因的过量表达可以提高转基因拟南芥植株的耐盐性,这可能与 *SOS1*、*SOS2* 和 *SOS3* 等基因密切相关。对正常生长条件下和 150 mmol/L NaCl 处理 1 周后的转基因株系和野生型株系叶片中 *SOS1*、*SOS2* 和 *SOS3* 基因的表达量进行

了研究,其中,在正常生长条件下,转基因植株中 *SOS1* 和 *SOS2* 基因的表达量分别是野生型中表达量的 2.8 倍和 2.43 倍。在 150 mmol/L NaCl 处理条件下,野生型株系中 *SOS1* 和 *SOS2* 基因的表达量较未处理对照中的表达量下降,而转基因株系中 *SOS1* 和 *SOS2* 基因的表达量较未处理对照中的表达量上升。在未处理对照中, *SOS3* 基因在转基因植株和野生型植株中的表达量差异不显著,同样在 150 mmol/L NaCl 胁迫条件下,转基因植株和野生型植株中 *SOS3* 基因的表达量较未处理对照明显上升,但是转基因植株和野生型对照间表达量差异不显著。因此,在 NaCl 胁迫条件下, *SOS1* 和 *SOS2* 基因在转基因植株和野生型植株间表达量的变化可能是转基因植株较野生型植株耐盐性提高的主要原因(表 3)。

表 2 干旱胁迫下转基因株系中逆境相应基因的转录分析

Table 2 Relative expression levels of stress-responsive genes in transgenic plants after treated with drought condition

基因名称 Gene name	株系 Line	停止浇水时间 Days after water withholding			
		1 (control)	5	7	10
<i>P5CS1</i>	WT	1.00 ± 0.15	7.85 ± 0.88	2.89 ± 0.29	0.82 ± 0.05
	FOX30.4	0.94 ± 0.40	8.77 ± 0.54	44.40 ± 9.95	74.07 ± 9.33
<i>DREB2A</i>	WT	1.00 ± 0.11	0.66 ± 0.19	0.60 ± 0.09	2.58 ± 0.19
	FOX30.4	1.48 ± 0.13	1.13 ± 0.20	2.03 ± 0.23	4.73 ± 0.47
<i>RAB18</i>	WT	1.00 ± 0.13	2.77 ± 0.27	1.70 ± 0.11	4.91 ± 0.48
	FOX30.4	1.20 ± 0.13	2.67 ± 0.26	6.94 ± 0.55	31.02 ± 2.03
<i>ABII</i>	WT	1.00 ± 0.10	2.12 ± 0.11	2.61 ± 0.29	1.37 ± 0.34
	FOX30.4	0.86 ± 0.11	2.91 ± 0.24	5.30 ± 0.55	8.97 ± 1.05
<i>RD29A</i>	WT	1.00 ± 0.10	13.58 ± 0.84	11.50 ± 1.76	23.99 ± 0.61
	FOX30.4	1.54 ± 0.15	46.78 ± 6.04	15.58 ± 1.52	35.92 ± 4.59

表 3 NaCl 胁迫下转基因株系中逆境相应基因的转录分析

Table 3 Relative expression levels of stress-responsive genes in transgenic plants after treated with NaCl

基因名称 Gene name	株系 Line	盐处理 NaCl treatment	
		0mmol/L (control)	150mmol/L
<i>SOS1</i>	WT	1.00 ± 0.13	0.62 ± 0.04
	FOX30.4	2.8 ± 0.23	3.43 ± 0.57
<i>SOS2</i>	WT	1.00 ± 0.16	0.48 ± 0.11
	FOX30.4	2.43 ± 0.35	7.89 ± 0.83
<i>SOS3</i>	WT	1.00 ± 0.64	5.19 ± 0.62
	FOX30.4	0.61 ± 0.08	8.13 ± 0.40

3 讨论

三磷酸腺苷 (ATP) 是生物细胞内的主要能量载体, 为生物体的生长发育提供能量。另外, ATP 可以作为核心信号诱导钙响应、激活 MAPK 调控系统, 控制植物对各种逆境条件的应答^[32]。ATP 合酶 (ATPase) 是 ATP 合成过程中的重要酶类, 是一种重要的辅酶和应激响应酶^[16]。ATPase-E 基因编码液泡 ATP 合酶 E 亚基, 在 ATP 合酶完成最后组装的过程中起着重要的作用。ATPase-E 基因存在于动、植物和细菌中, 本研究结果表明, 不同物种的 ATPase-E 蛋白质同源性较高, 且在 16 ~ 225 氨基酸之间均存在一个 ATP synthase (E/31kDa) subunit 结构域, 是一个进化上比较保守的基因, 因此可能在生物的

生长发育和逆境胁迫响应过程中具有比较保守的功能。

在本研究中, 高粱 *ATPase-E* 基因的过量表达使转基因拟南芥在逆境条件下根系更加发达, 植株耐旱性和耐盐性显著提高, 这与小麦等植物中的 *ATPase-E* 过量表达可提高植株抗逆性的结果相似^[28-29]。进一步研究转基因拟南芥抗逆性提高的分子机制, 发现干旱条件下 *P5CS1*、*DREB2A*、*RAB18*、*ABII* 和 *RD29A* 等基因在转基因株系中的表达量显著高于野生型对照中的表达量。因此, 可能是由于高粱 *ATPase-E* 基因的过量表达, 使与逆境胁迫相关转录因子基因如 *DREB2A*、下游抗逆相关功能基因如 *P5CS*、*RAB18* 和 *RD29A* 等表达量提高, 增加了转基因植株体内脯氨酸等渗透调节物质、RAB18 等脱水蛋白的含量, 从而使转基因植株较野生型具有更强的抗逆能力。同样, 在盐处理条件下, 耐盐相关基因 *SOS1* 和 *SOS2* 在转基因株系中的表达量显著高于野生型植株中的表达量, 这可能促进 *SOS1* 基因编码的 Na^+/H^+ 反向转运蛋白将 Na^+ 从细胞质中排出, 维持植物细胞内 K^+ 和 Na^+ 浓度的稳定^[33-34]。同时, *SOS2* 基因表达量的上升, 可能促进 *SOS2* 基因编码的丝氨酸/苏氨酸类蛋白激酶 (CIPK, CBL-interacting protein kinase) 活性的提高, 从而提高转基因植株的耐盐性^[35]。因此, *ATPase-E* 基因编码的蛋白很可能参与植物与盐胁迫响应相关的 Ca^{2+} 信号、蛋白激酶、功能蛋白如质膜 Na^+/H^+ 反向转运蛋白相关基因的表达调控, 在盐胁迫条件下保持植物体中盐离子平衡, 提高植物的耐盐性。类似的研究结果也显示, 当对植物施加外源 ATP 时, 可以激活植物的 Ca^{2+} 信号、MAPK 信号级联系统以及其他抗逆相关基因的表达^[32]。

SbATPase-E 基因在植株中的过量表达, 可能促进了植物体在逆境胁迫条件下抗逆相关基因的表达以及根系的发育, 从而使转基因植株抗逆性得到显著提高。

4 结论

高粱 *SbATPase-E* 基因编码 ATPase-E 亚基。在 NaCl 和 ABA 胁迫处理下, *SbATPase-E* 基因在高粱幼苗叶片中的表达量显著升高。*SbATPase-E* 基因在拟南芥植株中过量表达, 可使转基因植株中 *P5CS1*、*SOS1* 等抗逆相关基因的表达量显著提高, 并促进逆境条件下植株的根系发育, 提高了转基因拟南芥植株的耐旱性和耐盐性。

参考文献

- [1] Nakashima K, Takasaki H, Mizoi J, et al. NAC transcription factors in plant abiotic stress responses[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1819: 97-103
- [2] Valkoun J J. Wheat pre-breeding using wild progenitors[J]. *Euphytica*, 2001, 119: 17-23
- [3] Cash S D, Bruckner P L, Wichman D M. Registration of 'Willow Creek' forage wheat. [J] *Plant Reg*, 2009, 3: 185-190
- [4] de Paiva Rolla A A, de Fatima Correa Carvalho J. Phenotyping soybean plants transformed with *rd29A:AtDREB1A* for drought tolerance in the greenhouse and field[J]. *Transgenic Res*, 2014, 35: 75-87
- [5] Yu L H, Chen X, Wang Z. *Arabidopsis enhanced drought tolerance1/HOMEODOMAIN GLABROUS11* confers drought tolerance in transgenic rice without yield penalty[J]. *Plant Physiol*, 2013, 162: 1378-1391
- [6] Bihani P, Char B, Bhargava S. Transgenic expression of sorghum *DREB2* in rice improves tolerance and yield under water limitation[J]. *Agric Sci*, 2011, 149: 95-101
- [7] Marshall A. Drought-tolerant varieties begin global march[J]. *Nature Biotech*, 2014, 32: 308
- [8] Ingram J, Bartels D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants[J]. *Annu Rev Plant Biol*, 1996, 47: 377-403
- [9] Wise M J. LEA to conclusions: A computational reanalysis of late embryogenesis abundant proteins and their possible roles [J]. *BMC Bioinformatics*, 2003, 29: 52-70
- [10] Seki M, Narusaka M, Ishida J, et al. Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray[J]. *Plant J*, 2002, 31: 279-292
- [11] Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Gene expression and signal transduction in water-stress response [J]. *Plant Physiol*, 1997, 115: 327-334
- [12] Seki M, Narusaka M, Abe H, et al. Monitoring the expression pattern of 1300 *Arabidopsis* genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray[J]. *Plant Cell*, 2001, 13: 61-72
- [13] Dobrotá C. Energy dependant plant stress acclimation[J]. *Rev Environ Sci Biotechnol*, 2006, 5: 243-251
- [14] Zidenga T. Improving stress tolerance through energy homeostasis in plants[R]. ISB News Report, 2005
- [15] De Block M, Verduyn C, De Brouwer D, et al. Poly(ADP-ribose) polymerase in plants affects energy homeostasis, cell death and stress tolerance[J]. *Plant J*, 2005, 41: 95-106
- [16] Ratajczak R. Structure, function and regulation of the plant vacuolar H^+ -translocating ATPase[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1465: 17-36
- [17] 祝雄伟, 王延枝, 王欢. V 型 H^+ -ATPase 结构和调控机制的研究现状[J]. *生物化学与生物物理进展*, 1999, 26(4): 323-327
- [18] Nishi T, Forgac M. The vacuolar (H^+)-ATPases - nature's most versatile proton pumps[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, 3: 94-103
- [19] Tomashek J J, Sonnenburg J L, Artmovich J M, et al. Resolution of subunit interactions and cytoplasmic subcomplexes of the yeast vacuolar proton-translocating ATPase[J]. *Biol Chem*, 1996, 271: 10397-10404
- [20] Nelson N, Klinsky D J. Vacuolar H^+ -ATPase: From mammals to yeast and back[J]. *Experientia*, 1996, 52: 1101-1110
- [21] Chinnusamy V, Zhu J H, Zhu J K. Salt stress signaling and mechanisms of plant salt tolerance[J]. *Genet Eng*, 2006, 27: 141-177
- [22] Reuveni M, Bennett A B, Bressan R A, et al. Enhanced H^+ transport capacity and ATP hydrolysis activity of the tonoplast H^+ -ATPase after NaCl adaptation [J]. *Plant Physiol*, 1990, 94: 524-530
- [23] Matsumoto H, Chung G C. Increase in proton transport activity of tonoplast vesicles as an adaptive response of barley roots to NaCl stress[J]. *Plant Cell Physiol*, 1988, 29: 1133-1140
- [24] Nakamura Y, Kasamo K, Shimamoto N, et al. Stimulation of the extrusion of protons and H^+ -ATPase activities with the decline in pyrophosphatase activity of the tonoplast in intact mung bean roots under high-NaCl stress and its relation to external levels of Ca^{2+} ions[J]. *Plant Cell Physiol*, 1992, 33: 139-149
- [25] Dietz K J, Tavakoli N, Kluge C. Significance of the V-type ATPase for the adaptation to stressful growth conditions and its regulation on the molecular and biochemical level[J]. *Exp Bot*, 2001, 52: 1969-1980
- [26] Golldack D, Dietz K J. Salt-induced expression of the vacuolar H^+ -ATPase in the common ice plant is developmentally controlled and tissue specific [J]. *Plant Physiol*, 2001, 125: 1643-1654
- [27] Zhao Q, Zhao Y J, Zhao B C, et al. Cloning and functional analysis of wheat V- H^+ -ATPase subunit genes [J]. *Plant Mol Biol*, 2009, 69: 33-46
- [28] He X L, Huang X, Shen Y Z, et al. Wheat V- H^+ -ATPase subunit genes significantly affect salt tolerance in *Arabidopsis thaliana* [J]. *PLoS ONE*, 2014, 9(1): e86982
- [29] Dong Q L, Wang C R, Liu D D. MdVHA-A encodes an apple subunit A of vacuolar H^+ -ATPase and enhances drought tolerance in transgenic tobacco seedlings [J]. *Plant Physiol*, 2013, 601-609
- [30] Zhang X H, Li B, Hu Y G, et al. The wheat E subunit of V-Type H^+ -ATPase is involved in the plant response to osmotic stress [J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15: 16196-16210
- [31] 宋仲骞. 高粱全长 cDNA 文库构建和分析及玉米 *AmBIP* 基因的功能鉴定[D]. 北京: 中国农业科学院, 2012
- [32] Choi J, Tanaka K, Cao Y, et al. Identification of a plant receptor for extracellular ATP[J]. *Science*, 2014, 343(6168): 290-294
- [33] Shi H, Quintero F J, Pardo J M, et al. Role of SOS1 as a plasma membrane Na^+/H^+ antiporter that controls long distance Na^+ transport in plant[J]. *Plant Cell*, 2002, 14: 465-477
- [34] Qiu Q S, Guo Y, Dietrich M A, et al. Regulation of SOS1, a plasma membrane Na^+/H^+ exchanger in *Arabidopsis thaliana*, by SOS2 and SOS3 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 8436-8441
- [35] Liu J, Ishitani M, Halfter U, et al. The *Arabidopsis thaliana* SOS2 gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 3730-3734