

大豆 *GmGolS1* 的克隆及转基因烟草耐高温性鉴定

李铭杨¹, 邱爽¹, 何佳琦¹, 于海伟¹, 张军², 翟莹¹

(¹齐齐哈尔大学生命科学与农林学院, 齐齐哈尔 161006; ²黑龙江省农业科学院畜牧兽医分院, 齐齐哈尔 161005)

摘要: 棉子糖系列寡糖 (RFOs, raffinose family oligosaccharides) 是植物体内一种重要的渗透调节物质, 肌醇半乳糖苷合成酶 (GolS, galactinol synthase) 是 RFOs 合成过程中的关键酶。本研究从大豆中克隆了 *GmGolS1* 基因。序列分析结果显示, *GmGolS1* 基因位于大豆 3 号染色体, 基因序列内部有 3 个内含子, 开放阅读框 (ORF, open reading frame) 全长 1020 bp, 编码的多肽含有 339 个氨基酸, 分子量 38.82 kDa, 等电点 5.47。GmGolS1 氨基酸序列具有植物 GolS 蛋白的共同特征: 一个保守的丝氨酸磷酸化位点、一个锰离子结合相关的 DXD 元件和一个羧基末端疏水性五肽。蛋白系统进化分析结果显示, GmGolS1 与沙东青 AmGolS 和蒺藜苜蓿 MtGolS 的亲缘关系较近。实时荧光定量 PCR 结果显示 *GmGolS1* 在大豆幼苗中可以不同程度的应答高温、低温、干旱及高盐胁迫, 且高温胁迫下 *GmGolS1* 的表达量升高最明显。构建 *GmGolS1* 植物表达载体并转化烟草, 获得 4 个转基因烟草株系。GolS 酶活性检测结果显示, 转基因烟草中 *GmGolS1* 转录后的产物发挥了 GolS 的催化活性。高温胁迫下 *GmGolS1* 转基因烟草的植株表型及电解质渗透率、可溶性糖含量和丙二醛含量的检测结果表明, *GmGolS1* 提高了转基因烟草的耐高温性。

关键词: 大豆; 肌醇半乳糖苷合成酶; 非生物胁迫; 耐高温性

Cloning of Soybean *GmGolS1* and Identification of Heat Resistance in Transgenic Tobacco

LI Ming-yang¹, QIU Shuang¹, HE Jia-qi¹, YU Hai-wei¹, ZHANG Jun², ZHAI Ying¹

(¹College of Life Science and Agro-Forestry, Qiqihar University, Qiqihar 161006;

²Branch of Animal Husbandry and Veterinary of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Qiqihar 161005)

Abstract: Raffinose family oligosaccharides (RFOs) are one of important osmoregulatory substance in plants. Galactinol synthase (GolS) is a key enzyme in the synthesis of RFOs. In this study, *GmGolS1* was cloned from soybean based on sequence homology. *GmGolS1* was found on chromosome 3 with three introns. The full length open reading frame (ORF) of *GmGolS1* was 1020 bp, which encodes 339 amino acids with the molecular weight of 38.82 kDa, and the isoelectric point of 5.47. The amino acid sequence GmGolS1 has characteristics that are commonly detected in plant GolS proteins: a conserved serine phosphorylation site, a manganese ion binding associated DXD element, and a carboxy-terminal hydrophobic pentapeptide. The phylogenetic analysis showed that GmGolS1 was closely related to AmGolS and MtGolS. Real-time fluorescence quantitative PCR analysis showed that *GmGolS1* was inducible upon heat, low temperature, drought and salt stresses in different degrees in seedlings, and the most abundant expression was observed under heat stress treatment. By transforming *GmGolS1* was into tobacco, four transgenic lines were identified using genomic DNA PCR and real-time fluorescence quantitative PCR. Test for GolS enzyme activity showed that the transcribed product of *GmGolS1* in transgenic tobacco played the catalytic activity of GolS. Gained from plant phenotype, electrolyte leakage, soluble

收稿日期: 2021-08-23 修回日期: 2021-09-13 网络出版日期: 2021-09-30

URL: <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20210823001>

第一作者研究方向为大豆分子遗传育种, E-mail: 879463529@qq.com; 邱爽为共同第一作者

通信作者: 翟莹, 研究方向为大豆分子遗传育种, E-mail: fairy39809079@126.com

基金项目: 黑龙江省普通本科高等学校青年创新人才培养计划 (UNPYSCT-2017153); 齐齐哈尔大学研究生创新科研项目 (YJSCX2020041)

Foundation projects: Training Plan of Young Creative Talents of Average Four-year College of Heilongjiang (UNPYSCT-2017153), Innovative Research Project for Graduate Students of Qiqihar University (YJSCX2020041)

carbohydrate content and malondialdehyde content of *GmGolS1* transgenic tobacco under heat stress, *GmGolS1* was found correlating with improved heat resistance in transgenic tobacco.

Key words: soybean; galactinol synthase; abiotic stress; heat resistance

植物可以通过增强细胞渗透压来减少极端温度、盐碱和干旱等非生物胁迫带来的影响。棉子糖系列寡糖(RFOs, raffinose family oligosaccharides), 包括棉子糖、水苏糖和毛蕊花糖等可溶性小分子在植物中的积累可以起渗透保护剂的作用, 在非生物胁迫条件下维持植物细胞稳态, 降低氧化性损伤, 确保光合作用的有序进行^[1-3]。在豌豆中首次发现的肌醇半乳糖苷合成酶(GoS, galactinol synthase)可以催化肌醇和UDP-半乳糖反应生成肌醇半乳糖苷, 这是RFOs合成的第一步, 也是最重要的限速(调控)步骤^[4-5]。

GoS作为RFOs合成的关键酶, 植物中的*GoS*基因往往与非生物胁迫相关, 且不同的*GoS*基因在不同非生物胁迫中的作用也不相同。拟南芥中的*AtGoS2*可以提高转基因水稻的抗旱性, 提高干旱胁迫下的作物产量^[6]。小麦中的*TaGoS1*和*TaGoS2*可以应答低温胁迫, 过表达后可以提高转基因水稻的低温胁迫抗性^[7]。过表达花生中的*AdGoS3*的转基因拟南芥植株在干旱和盐胁迫下棉籽糖含量增加, 胁迫症状减轻^[8]。*GoS*基因与高温胁迫关系的研究也在逐渐增加。高温胁迫下, 热激因子*Hsf3*(Heat shock factor 3)调控靶基因*AtGoS1*的表达, 对棉子糖的合成具有促进作用^[9]。葡萄中的*VvGoS1*在高温胁迫下表达量升高缘于热胁迫相关转录因子*VvHsfA2*对其启动子的激活^[10]。在丹参的3个*GoS*基因中, 高温可以诱导*SmGoS1*和*SmGoS2*的表达^[11]。玉米热激转录因子*ZmHsfA2*可以与*ZmGoS2*启动子上的HSE(Heat shock element)元件结合, 使其在热激胁迫下表达量升高^[12]。高温和氧化胁迫可以诱导鹰嘴豆中*CaGoS1*的表达, 将其转化拟南芥后可以提高转基因植物的耐热性^[13]。

大豆(*Glycine max*(L.)Merr.)是世界各地广泛种植的商业作物。由于全球气候变暖导致的高温热害是大豆生长迟缓、产量降低的重要因素之一^[14]。NCBI数据库搜索结果显示, 大豆中存在6个*GoS*基因, *GmGoS1*和*GmGoS2-3*定位于大豆基因组3号染色体, *GmGoS*定位于大豆基因组10号染色体, *GmGoS1-like*和*GmGoS2-1*定位于大豆基因组19号染色体, *GmGoS2-2*定位于大

豆基因组20号染色体。本实验室前期已鉴定*GmGoS2-1*可以提高转基因烟草的耐旱和耐高温性^[15-16]。本研究对大豆*GmGoS1*基因进行克隆, 检测*GmGoS1*在高温、干旱、低温和高盐胁迫下的表达模式, 并对其耐高温性进行鉴定, 为大豆*GoS*基因耐热机制的研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

大豆种子北豆9号、烟草种子NC89、大肠杆菌DH5 α 菌株和根癌农杆菌EHA105菌株均来自齐齐哈尔大学植物分子育种研究室。

1.2 基因克隆及生物信息学分析

从NCBI数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)下载大豆*GmGoS1*的基因及蛋白序列。*GmGoS1*基因PCR扩增引物序列列于表1中, 引物两端添加*Nde*I和*Eco*R I酶切位点。以大豆叶片cDNA为模板, PCR扩增*GmGoS1*基因编码序列, 退火温度均为58℃。PCR产物回收后连接pMD18-T克隆载体(Takara公司), 重组质粒经双酶切验证后送生工生物公司测序验证。

蛋白分子量及等电点的预测使用ExPasy在线软件(https://web.expasy.org/compute_pi/)。亚细胞定位的预测使用PSORT在线软件(<https://www.genscript.com/psort.html>)。蛋白系统进化树的构建使用MEGA5软件。

1.3 基因表达量检测

使用沙土与草炭土(1:1)的混合物种植大豆种子(避光25℃培养), 6d后根长大约5cm时移入Hoagland营养液中水培(自然光下25℃培养), 至幼苗第1片三出复叶完全展开, 进行非生物胁迫处理。将幼苗移至42℃培养箱中进行高温胁迫处理; 移至4℃培养箱中进行低温胁迫处理; 移至20%PEG8000的营养液中进行干旱胁迫处理; 移至150mmol/L NaCl的营养液中进行高盐胁迫处理。分别在未处理(0h)及处理1h、2h、5h、10h和24h进行取样(其中高温处理只取到10h, 因为高温处理24h时大豆幼苗已经死亡), 剪取0.1g第1片三出复叶, 3次重复, 迅速置于液氮中保存备用。

按照说明书提取各时间点样品 RNA (RNAiso Plus, Takara 公司) 并反转录成第一链 cDNA (cDNA 反转录试剂盒, Novoprotein 公司)。以 cDNA 为模板, 大豆 β -*Tubulin* 为内参基因 (GenBank 登录号: GMU12286)^[15], 通过实时荧光定量 RT-PCR (qRT-PCR, real-time fluorescence quantitative

RT-PCR) 检测 *GmGolS1* 基因的表达量 (TB Green Premix Ex *Taq* II, Takara 公司)。qRT-PCR 体系和参数设置参照何佳琦等^[17]。qRT-PCR 引物序列列于表 1 中。所有处理进行 3 次重复, 基因相对表达量依据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算。使用 SPSS 软件和 Excel 软件进行处理数据和图片制作。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences for PCR

引物名称 Name of primer	上游引物 5'-3' Forward primer	下游引物 5'-3' Reverse primer	用途 Use
<i>PmGolS1</i>	CATATGATGGCTCCTGAACTTGTC	GAATTCTTAAGCTGCTGAAGGCGC	PCR 扩增
<i>qGmGolS1</i>	ACTTCAACGCTGGCATGTTTCG	CAGCATGGCGAGGACAAGATTG	qRT-PCR
β - <i>Tubulin</i>	ATGAGAGAGTGCATATCGAT	TTCCTGAAGAAGGTGTTGAA	qRT-PCR
α - <i>Tubulin</i>	ATGAGAGAGTGCATATCGAT	TTCCTGAAGAAGGTGTTGAA	qRT-PCR

1.4 植物表达载体构建及烟草遗传转化

用限制性内切酶 *Nde* I 和 *Eco*R I 将测序后的 pMD18-T-*GmGolS1* 重组质粒双酶切, 酶切产物回收后连接植物表达载体 pRI101 (Takara 公司)。重组质粒经双酶切验证后转化根癌农杆菌 EHA105 感受态细胞。烟草遗传转化方法参照 Hoekema 等^[18]。

提取野生型烟草和 T₀ 代转基因烟草的基因组 DNA (基因组试剂盒, Takara 公司), 以基因组 DNA 为模板进行 *GmGolS1* 基因的 PCR 扩增, 其中野生型烟草基因组 DNA 作为阴性对照, pRI101-*GmGolS1* 重组质粒作为阳性对照。通过 qRT-PCR 对转基因烟草中 *GmGolS1* 的表达量进行检测, 方法参照“1.3 基因表达量检测”, 退火温度改为 54 °C, 内参基因选择烟草 α -*Tubulin* 基因 (GenBank 登录号: AB052822), 引物序列列于表 1 中。转基因烟草 GolS 酶活性检测参照 Qiu 等^[15] 的方法进行, 加入 GolS 的催化底物肌醇和 UDP- 半乳糖, 检测产物肌醇半乳糖苷的合成量。使用 SPSS 软件和 Excel 软件进行处理数据和图片制作。

1.5 转基因烟草高温胁迫及抗性鉴定

将 8 周龄的野生型烟草和 T₁ 代转基因烟草在 42 °C 培养箱中进行高温胁迫处理 (其间保持土壤湿润), 每个株系处理 3 株, 20 h 后取出进行拍照和取样。电解质渗透率检测参照 Qiu 等^[15]; 可溶性糖含量检测参照 Zhai 等^[19]; 脯氨酸含量检测参照 Bates 等^[20]; 丙二醛含量检测参照 Shao 等^[21]。使用 SPSS 软件和 Excel 软件进行处理数据和图片制作。

2 结果与分析

2.1 *GmGolS1* 克隆及序列分析

通过 NCBI 数据库获取功能尚未被鉴定的大豆 *GmGolS1* 基因 (GenBank 登录号: XM003521556)。经 PCR 扩增获得 1020 bp 的 *GmGolS1* 基因编码序列 (图 1), 测序结果与 NCBI 数据库中公布的序列相同。*GmGolS1* 基因定位于大豆 3 号染色体, 含有 3 个内含子, 开放阅读框 (ORF, open reading frame) 全长 1020 bp, 编码的多肽含有 339 个氨基酸, 分子量预测值 38.82 kDa, 等电点预测值 5.47。*GmGolS1* 蛋白的亚细胞定位预测显示其主要位于细胞质中。*GmGolS1* 氨基酸序列具有植物 GolS 蛋白的共同特征: 一个保守的丝氨酸磷酸化位点、一个锰离子结合相关的 DXD 元件和一个羧基末端标志性的疏水性五肽 (图 1)。

2.2 GolS 蛋白系统进化分析

将大豆 GolS 蛋白与拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.)、蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula* Gaertn.)、沙东青 (*Ammopiptanthus mongolicus* (Maxim. ex Kom.) S. H. Cheng)、陆地棉 (*Gossypium hirsutum* L.)、玉米 (*Zea mays* L.)、小麦 (*Triticum aestivum* L.) 等植物中的 19 个 GolS 蛋白构建系统进化树。蛋白系统进化分析结果表明, *GmGolS1* 与沙东青 AmGolS 和蒺藜苜蓿 MtGolS 的亲缘关系较近, 它们均为豆科植物蛋白, 在功能上可能具有相似性 (图 2)。


```

1      ATGGCTCCTGAACTTGTCACCCCGTTGTGAAATCCAGTGCCTGCAGAAACCCGCGACCCCTCCAAGGCGTGCCTACGTGACATTC
1      M A P E L V P T V V K S S A A F T K P A T L P R R A Y V T F
91     CTCGCCGAAACGGTACTACGTGAAAGGGTGGTTGGCTCGCCAAAGGGTTGCGAAAGTAAAACCGGTACCCGTTGGTGGTGGCT
31     L A G N G D Y V K G V V G L A K G L R K V K T A Y P L V V A
181    GTCCTCCCCGATGTCGGGAGGAGCACCGTAAGATCCTGGAGTCTCAGGGCTGCATCGTTCCGGAGATCGAACCCGTTTACCCACCCGAA
61     V L P D V P E E H R K I L E S Q G C I V R E I E P V Y P P E
271    AACCAAACCCAGTTGCCATGGCTTATTACGTCATCAACTACTCCAAGCTCCGTATATGGGAGTTTGTGGAGTACAGCAAGATGATATAC
91     N Q T Q F A M A Y Y V I N Y S K L R I W E F V E Y S K M I Y
361    TTGGACGGAGACATTGAGGTATATGAGAACATAGACCACCTATTTGACCTACCTGATGGTAACTTTTACGCTGTGATGGATTGTTTCTGC
121    L D G D I E V Y E N I D H L F D L P D G N F Y A V M D C F C
451    GAGAAGACATGGAGTACACCCCTCAGTACAAGTGGTGTACTGCCAGCAATGCCCGGAGAAGGTGCGGTGCCACCAGCAATTGGGTCAG
151    E K T W S H T P Q Y K V G Y C Q Q C P E K V R W P T E L G Q
541    CCCCCTTCTCTTACTTCAACGCTGGCATGTTGTTGTTGCAACCAACATCGCCACCTATCATGACCTATTGAAAACGGTGCAAGTACC
181    P P S L Y F N A G M F V F E P N I A T Y H D L L K T V Q V T
631    ACTCCACCTCGTTCGCTGAACAAGATTCTTGAACATGACTTCAAGGACATTTACAAGCCAATCCCTTTAAATTACAATCTTGTCTC
211    T P T S F A E Q D F L N M Y F K D I Y K P I P L N Y N L V L
721    GCCATGCTGTGGCCACCCGAAAACGTTAAATTAGACCAAGTCAAGTTGTTCACTATTGCGCAGCGGGTCCAAGCCATGGAGATAT
241    A M L W R H P E N V K L D Q V K V V H Y C A A G S K P W R Y
811    ACGGGAAGGAAGAGAATATGCAGAGGGAGGACATAAAGATGCTGGTGAAGAAATGGTGGGATATCTACAATGATGCTTCGCTTGACTAC
271    T G K E E N M Q R E D I K M L V K K W W D I Y N D A S L D Y
901    AAGCCATTGATGAATGCAAGTGAAGCTCCAGCAGCGGATGGTGTGACATTGAACAATTCGTGCAGGCTCTATCAGAGTTGGTCATGTT
301    K P L M N A S E A P A A D G V D I E Q F V Q A L S E V G H V
991    CAATATGTCACCGCCTTCAGCAGCTTAA
331    Q Y V T A P S A A ×

```

方框代表保守的丝氨酸磷酸化位点;阴影部分代表锰离子结合相关的 DXD 元件;下划线代表羧基末端疏水性五肽;× 代表终止密码子
The conserved serine phosphorylation site is in the box, the DXD element associated with manganese ion binding is in shadow, the carboxy-terminal hydrophobic pentapeptides (APSAA) is underlined, × represents the termination codon

图 1 *GmGolS1* 核酸及氨基酸序列

Fig.1 Nucleic acid and amino acid sequence of *GmGolS1*

2.3 *GmGolS1* 非生物胁迫诱导表达分析

qRT-PCR 结果显示(图 3), 高温胁迫下, *GmGolS1* 的表达量迅速升高, 在处理 2 h 达到最大值, 达到未处理对照的 74.4 倍, 最低值出现在处理后 5 h, 达到未处理对照的 26.3 倍。低温、干旱和高盐胁迫下, *GmGolS1* 的表达量也有不同程度升高, 但表达量变化均未超过未处理对照的 12 倍, 与高温胁迫处理相比表达量变化不明显。以上结果表明 *GmGolS1* 在大豆幼苗中可以不同程度的应答高温、低温、干旱及高盐胁迫, 且高温胁迫下 *GmGolS1* 的表达量升高最明显。

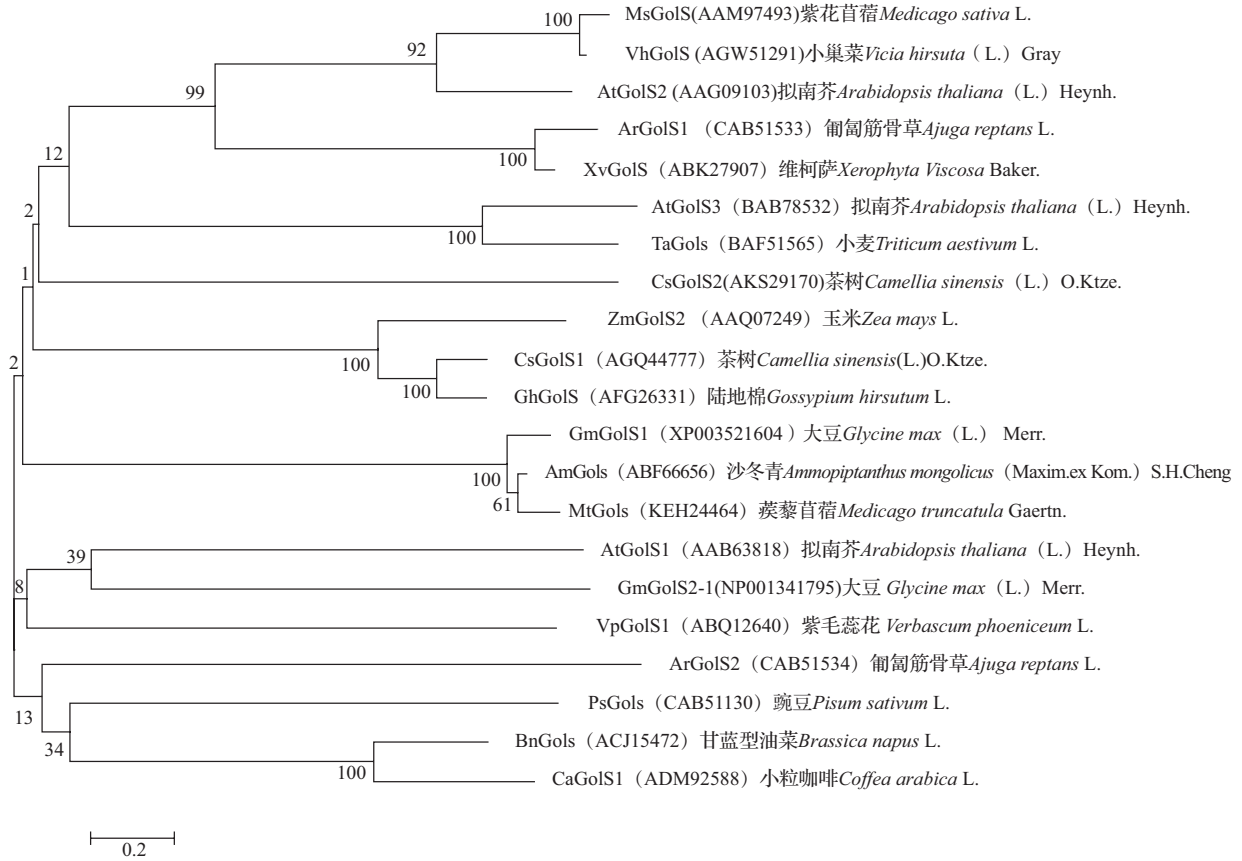
2.4 *GmGolS1* 转基因烟草鉴定

基因组 DNA PCR 检测结果显示, 共获得 4 个 *GmGolS1* 过表达转基因烟草株系, 分别命名为

OE1~OE4(图 4A)。 *GmGolS1* 在 4 株转基因烟草株系中的表达量如图 4B 所示, OE2 中 *GmGolS1* 的表达量最高, 其次为 OE3, 因此后续选择 OE2 和 OE3 对 *GmGolS1* 基因进行功能鉴定。烟草 GolS 酶活性检测结果显示(图 4C), OE2 和 OE3 中 GolS 酶活性显著高于野生型烟草, 表明在转基因烟草中 *GmGolS1* 转录后的产物发挥了 GolS 的催化活性。

2.5 *GmGolS1* 转基因烟草耐高温性鉴定

GmGolS1 对高温胁迫的应答最明显, 因此对 *GmGolS1* 转基因烟草的耐高温性进行鉴定。高温胁迫处理 20 h 后的烟草表现如图 5 所示, 野生型烟草植株脱水严重, 植株萎蔫, 而 *GmGolS1* 转基因烟草植株表型变化不大, 植株的生长没有受到明显影响。

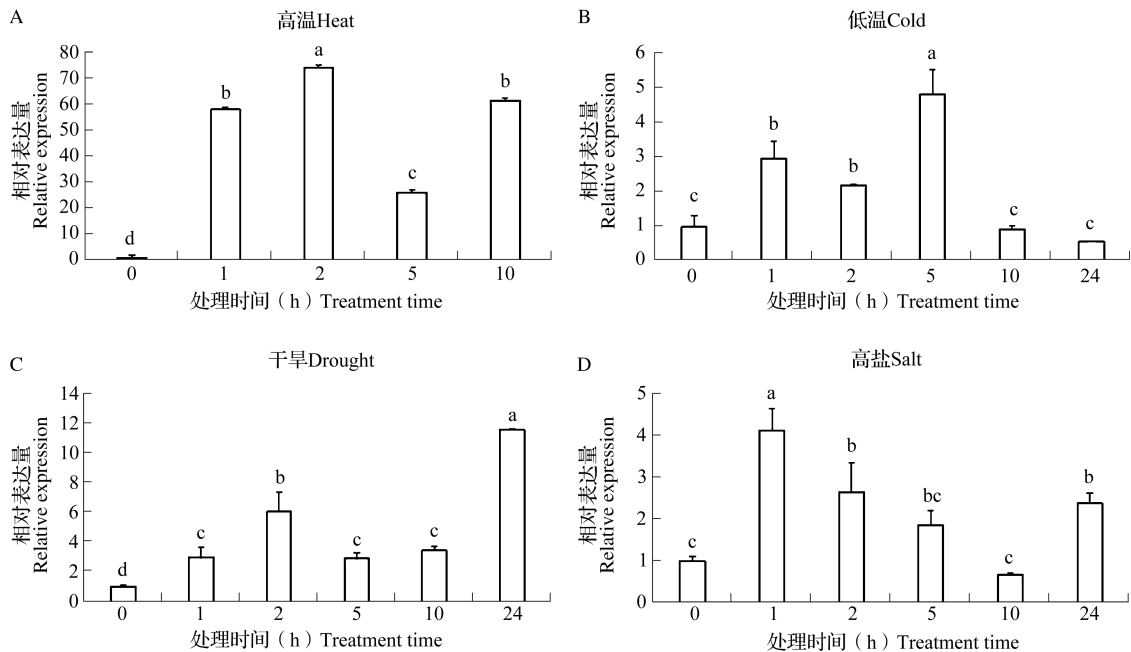


括号里列出的是 GenBank 登录号

GenBank accession numbers are listed in parentheses

图 2 植物 GolS 蛋白系统进化树

Fig.2 Phylogenetic tree of plant GolS proteins

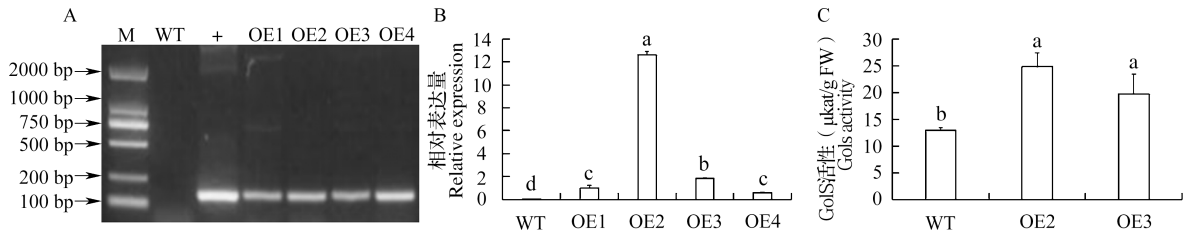


字母 (abc) 表示显著性水平, 采用单因素方差分析 ($P \leq 0.05$), 下同

Letters (abc) represents the level of significance according to one-way ANOVA with post hoc Duncan's test ($P \leq 0.05$), the same as below

图 3 *GmGolS1* 在非生物胁迫下的表达

Fig.3 Expression of *GmGolS1* under abiotic stresses



A: 烟草基因组 DNA PCR 检测; B: *GmGolS1* 在转基因烟草株系中的表达量; C: 转基因烟草 GolS 酶活性; M: DL2000 分子量标记物; WT: 野生型烟草; +: pRI101-*GmGolS1* 阳性质粒; OE1~OE4: 转基因烟草, 下同

A: Genomic DNA PCR detection of tobacco, B: Expression levels of *GmGolS1* in transgenic tobacco lines, C: GolS enzyme activity in transgenic tobacco lines, M: DL2000 marker, WT: Wild type tobacco, +: pRI101-*GmGolS1* positive plasmid, OE1-OE4: Transgenic tobacco, the same as below

图 4 *GmGolS1* 转基因烟草鉴定
Fig.4 Identification of *GmGolS1* transgenic tobacco

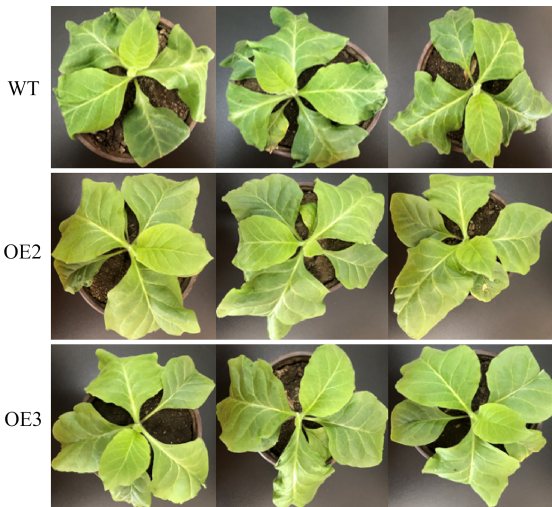
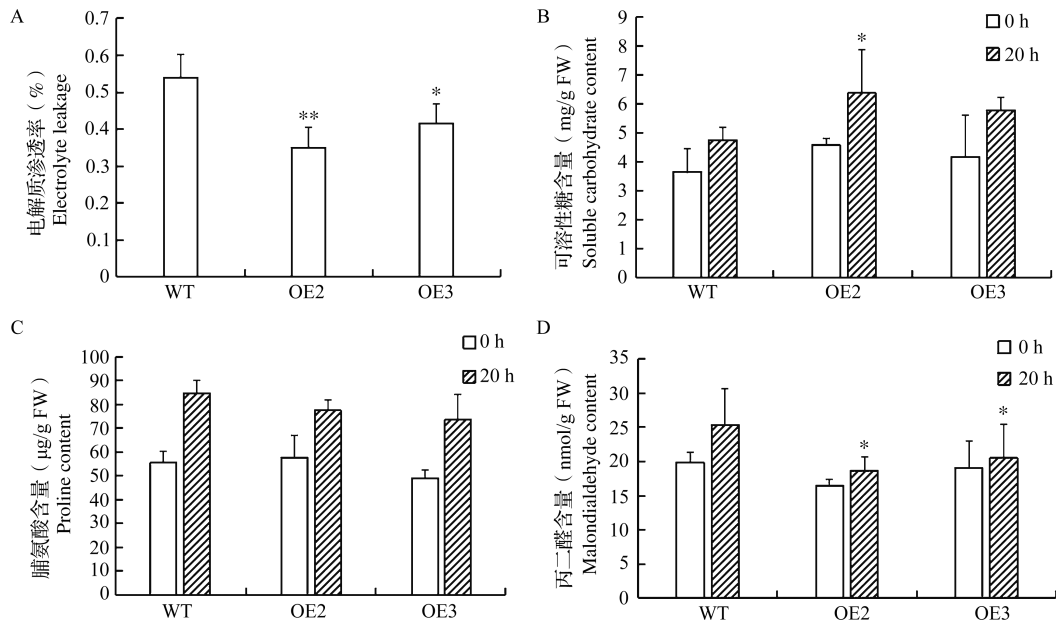


图 5 野生型烟草与 *GmGolS1* 转基因烟草高温胁迫下的表型
Fig.5 The phenotype of wild type tobacco and *GmGolS1* transgenic tobacco under heat stress

对高温胁迫处理下野生型烟草和 *GmGolS1* 转基因烟草叶片的电解质渗透率、可溶性糖、脯氨酸及丙二醛含量进行检测。高温胁迫处理 20 h 后, OE2 和 OE3 叶片的电解质渗透率显著低于野生型烟草(图 6A); 野生型烟草和转基因烟草中可溶性糖含量在高温胁迫后均升高, 且转基因烟草中可溶性糖含量高于野生型烟草(图 6B); 野生型烟草和转基因烟草中脯氨酸含量在高温胁迫处理后均升高, 但转基因烟草与野生型烟草之间脯氨酸含量的差异不显著(图 6C); 高温胁迫后, 野生型烟草和转基因烟草中丙二醛含量均升高, 但转基因烟草中丙二醛含量显著低于野生型烟草(图 6D)。以上结果表明, 高温胁迫下, *GmGolS1* 转基因烟草株系能够积累更多的可溶性糖, 拥有更强的过氧化物清除能力, 叶片细胞受损害的程度低于野生型烟草。*GmGolS1* 提高了转基因烟草的耐高温胁迫能力。



** 和 * 分别表示差异显著 ($P < 0.05$) 和差异极显著 ($P < 0.01$)
** and * indicate significant differences at $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively

图 6 *GmGolS1* 转基因烟草高温胁迫下生理指标检测

Fig.6 Detection of physiological indexes of *GmGolS1* transgenic tobacco under heat stress

3 讨论

高温严重阻碍作物的生长发育,是致使作物减产的一个重要因素。受全球气候变暖的影响,农作物受高温胁迫侵害的比重激增,给农业生产造成了巨大损失。调查显示,全球平均气温每升高 1 °C,大豆平均减产 3.1%^[22]。RFOs 是植物中广泛存在的一类水溶性碳水化合物,在植物遭受非生物胁迫时可以大量积累,提高植物对各种非生物胁迫的抵抗力。*GolS* 基因在其他植物中的抗性研究开展较早,但在大豆的 6 个 *GolS* 基因中只有 *GmGolS2-1* 的功能得到了鉴定^[15]。

GmGolS1 的基因序列内存在 3 个内含子,这与拟南芥 *AtGolS1* 及大豆 *GmGolS2-1* 和 *GmGolS2-2* 序列中的内含子数目一致^[15]。在 *GmGolS1* 氨基酸序列中含有 1 个保守的丝氨酸磷酸化位点、1 个锰离子结合相关的 DXD 元件和 1 个羧基末端疏水性五肽,这些都是植物 *GolS* 蛋白的标志性特征^[15,23]。后续的研究也证明在转基因烟草中 *GmGolS1* 编码产物具有 *GolS* 的催化活性,转基因烟草中 *GolS* 酶活性显著高于野生型烟草,同样转基因中可溶性糖含量也高于野生型烟草。

植物中往往存在多个 *GolS* 基因成员,不同 *GolS* 基因对不同非生物胁迫的应答差异较大。例如,拟南芥中的 *AtGolS1* 和 *AtGolS2* 应答干旱和高盐胁迫,而 *AtGolS3* 则应答低温胁迫^[24]。在大豆中, *GmGolS1* 主要应答高温胁迫,而 *GmGolS2-1* 和 *GmGolS2-2* 则主要应答干旱胁迫^[15]。应答高温胁迫的 *GolS* 基因也越来越多的被人们发现,例如葡萄中的 *VvGOIS1*^[10]、鹰嘴豆中的 *CaGolS1*^[13] 及丹参中的 *SmGolS1* 和 *SmGolS2* 等^[11]。由此预见植物中的部分 *GolS* 基因应该在植物抵御高温胁迫时发挥重要作用。前人研究表明, *GolS* 基因之所以能够应答高温胁迫是因为它们的启动子中含有 HSE 顺式作用元件,可以被热激转录因子 HSF 调控^[9-10,12]。而 *GmGolS1* 的启动子序列中没有 HSE 元件(数据未列出),推测 *GmGolS1* 可能通过其他途径来应答高温胁迫。

与明显应答高温胁迫相反, *GmGolS1* 对低温、干旱和高盐胁迫的应答并不明显,这也可能是本研究选取的胁迫处理方法导致的。本研究只对转基因植物的耐高温性进行了鉴定。植物遭受高温胁迫时首先会脱水,进而影响植物体内自由基产生和消除的平衡,产生过氧化作用,破坏细胞膜的完整

性^[25]。高温胁迫处理后 *GmGolS1* 转基因烟草在植株表现、电解质渗透率、可溶性糖含量及丙二醛含量方面的表现均好于野生型烟草。综合来看, OE2 株系在高温胁迫下的表现好于 OE3 株系,这应该与 OE2 株系中 *GmGolS1* 的表达量高于 OE3 株系相关,且 *GolS* 活性检测结果也显示 OE2 株系高于 OE3 株系。但转基因烟草与野生型烟草之间脯氨酸含量的差异不显著,由此推测 *GmGolS1* 转基因烟草的耐高温胁迫能力的提高可能主要是可溶性糖等渗透调节物质含量提高的结果。以上结果表明, *GmGolS1* 提高了转基因烟草的耐高温性,且转基因烟草耐高温能力的提高与 *GmGolS1* 的表达量呈正相关,这与 Qiu 等^[15]的研究结果相符。

参考文献

- [1] Peters S, Mundree S G, Thomson J A, Farrant J M, Keller F. Protection mechanisms in the resurrection plant *Xerophyta viscosa* (Baker): both sucrose and raffinose family oligosaccharides (RFOs) accumulate in leaves in response to water deficit. *Journal of Experimental Botany*, 2007, 58(8): 1947-1956
- [2] Lahuta L B, Górecki R J. Raffinose in seedlings of winter vetch (*Vicia villosa* Roth.) under osmotic stress and followed by recovery. *Acta Physiologica Plantarum*, 2011, 33(3): 725-733
- [3] Nishizawa A, Yabuta Y, Shigeoka S. Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. *Plant Physiology*, 2008, 147(3): 1251-1263
- [4] Frydman R B, Neufeld E F. Synthesis of galactosylinositol by extracts from peas. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1963, 12(2): 121-125
- [5] Thomas P, Andreas R. Biochemistry and physiology of raffinose family oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seeds. *Seed Science Research*, 2001, 11(3): 185-197
- [6] Selvaraj M G, Ishizaki T, Valencia M, Ogawa S, Dedicova B, Ogata T, Yoshiwara K, Maruyama K, Kusano M, Saito K, Takahashi F, Shinozaki K, Nakashima K, Ishitani M. Overexpression of an *Arabidopsis thaliana* galactinol synthase gene improves drought tolerance in transgenic rice and increased grain yield in the field. *Plant Biotechnology Journal*, 2007, 15(11): 1465-1477
- [7] Shimosaka E, Ozawa K. Overexpression of cold-inducible wheat galactinol synthase confers tolerance to chilling stress in transgenic rice. *Breeding Science*, 2015, 65(5): 363-371
- [8] Vinson C C, Mota A P, Porto B N, Oliveira T N, Sampaio I, Lacerda A L, Danchin E G J, Guimaraes P M, Williams T C R, Brasileiro A C M. Characterization of raffinose metabolism genes uncovers a wild *Arachis* galactinol synthase conferring tolerance to abiotic stresses. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 15258
- [9] Panikulangara T J, Eggers S G, Wunderlich M, Stransky H, Schöffl F. *Galactinol synthase1* a novel heat shock factor target gene responsible for heat-induced synthesis of raffinose family oligosaccharides in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 2004, 136

- (2): 3148-3158
- [10] Pillet J, Egert A, Pieri P, Lecourieux F, Kappel C, Charon J, Gomès E, Keller F, Delrot S, Lecourieux D. VvGOLS1 and VvHsfA2 are involved in the heat stress responses in grapevine berries. *Plant and Cell Physiology*, 2012, 53 (10): 1776-1792
- [11] Wang D H, Yao W, Song Y, Liu W C, Wang Z Z. Molecular characterization and expression of three galactinol synthase genes that confer stress tolerance in *Salvia miltiorrhiza*. *Journal of Plant Physiology*, 2012, 169 (18): 1838-1848
- [12] 谷雷. 玉米肌醇半乳糖苷合成酶 2 基因 (*ZmGolS2*) 启动子上响应热激的顺式作用元件鉴定. 西安: 西北农林科技大学, 2014
- Gu L. Identification of the heat response Cis-acting elements of the *ZmGolS2* gene promoter. Xi'an: Northwest A&F University, 2014
- [13] Salvi P, Kamble N U, Majee M. Stress-inducible galactinol synthase of chickpea (*CaGolS*) is implicated in heat and oxidative stress tolerance through reducing stress-induced excessive reactive oxygen species accumulation. *Plant and Cell Physiology*, 2018, 59 (1): 155-166
- [14] 汪明华, 李李佳, 陆少奇, 邵文韬, 程安东, 张文明, 王晓波, 邱丽娟. 大豆品种耐高温特性的评价方法及耐高温种质筛选与鉴定. *植物遗传资源学报*, 2019, 20 (4): 891-902
- Wang M H, Li J J, Lu S Q, Shao W T, Cheng A D, Zhang W M, Wang X B, Qiu L J. Construction of evaluation standard for tolerance to high-temperature and screening of heat-tolerant germplasm resources in soybean. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2019, 20 (4): 891-902
- [15] Qiu S, Zhang J, He J Q, Sha W, Li M Y, Zhao Y, Zhai Y. Overexpression of *GmGolS2-1*, a soybean galactinol synthase gene, enhances transgenic tobacco drought tolerance. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 2020, 143 (3): 507-516
- [16] 邱爽, 张军, 何佳琦, 李铭杨, 周雨明, 邬长乐, 袁洪森, 刘嘉仪, 翟莹. 大豆 *GmGolS2-1* 基因高温胁迫诱导表达及转基因烟草鉴定. *江苏农业学报*, 2021, 37 (1): 38-43
- Qiu S, Zhang J, He J Q, Li M Y, Zhou Y M, Wu C L, Yuan H M, Liu J Y, Zhai Y. Expression of soybean *GmGolS2-1* induced by heat stress and identification of *GmGolS2-1* transgenic tobacco. *Jiangsu Journal of Agricultural Science*, 2021, 37 (1): 38-43
- [17] 何佳琦, 翟莹, 张军, 邱爽, 李铭杨, 赵艳, 张梅娟, 马天意. 大豆转录因子 *GmDofl.5* 的克隆与非生物胁迫诱导表达. *浙江农业学报*, 2021, 33 (1): 1-7
- He J Q, Zhai Y, Zhang J, Qiu S, Li M Y, Zhao Y, Zhang M J, Ma T Y. Cloning and expression analysis of *GmDofl.5* in soybean under abiotic stress. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2021, 33 (1): 1-7
- [18] Hoekema A, Hirsch P R, Hooykaas P J J, Schilperoort R A. A binary plant vector strategy based on separation of *vir*- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature*, 1983, 303 (5913): 179-180
- [19] Zhai Y, Wang Y, Li Y J, Lei T T, Yan F, Su L T, Li X W, Zhao Y, Sun X, Li J W, Wang Q Y. Isolation and molecular characterization of *GmERF7*, a soybean ethylene-response factor that increases salt stress tolerance in tobacco. *Gene*, 2013, 513 (1): 174-183
- [20] Bates L S, Waldren R P, Teare I D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 1973, 39 (1): 205-207
- [21] Shao H B, Liang Z S, Shao M A. Osmotic regulation of 10 wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes at soil water deficits. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 2006, 47 (2): 132-139
- [22] Zhao C, Liu B, Piao S, Wang X, Lobell D B, Huang Y, Huang M, Yao Y, Bassu S, Ciaia P, Durand J L, Elliott J, Ewert F, Janssens I A, Li T, Lin E, Liu Q, Martre P, Müller C, Peng S, Peñuelas J, Ruane A C, Wallach D, Wang T, Wu D, Liu Z, Zhu Y, Zhu Z, Asseng S. Temperature increase reduces global yields of major crops in four independent estimates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114 (35): 9326-9331
- [23] dos Santos T B, Budzinski I G, Marur C J, Petkowicz C L, Pereira L F, Vieira L G. Expression of three *galactinol synthase* isoforms in *Coffea arabica* L. and accumulation of raffinose and stachyose in response to abiotic stresses. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2011, 49 (4): 441-448
- [24] Taji T, Ohsumi C, Iuchi S, Seki M, Kasuga M, Kobayashi M, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 2002, 29 (4): 417-426
- [25] Cakmak I, Horst W J. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycinemax*). *Physiologia Plantarum*, 1991, 83 (3): 463-468