

马铃薯基因 *StAVPI* 提高拟南芥抗旱性的功能鉴定

杨文静^{1,2}, 刘璇^{1,2}, 崔勇³, 聂峰杰^{1,2}, 张丽^{1,2}, 张玉^{1,2}, 巩楠⁴

(¹宁夏农林科学院农业生物技术研究中心, 银川 750002; ²宁夏农业生物技术重点实验室, 银川 750002;

³宁夏农业技术推广总站, 银川 750002; ⁴宁夏农林科学院固原分院, 固原 756009)

摘要: 马铃薯 (*Solanum tuberosum* L.) 是全球第四大粮食作物, 挖掘鉴定抗旱基因, 是培育抗旱马铃薯新品种的重要途径。马铃薯 *StAVPI* 基因参与跨液泡膜物质运输, 在植物应对物质运输和非生物胁迫中发挥重要作用。本研究从马铃薯品种大西洋的叶片中克隆得到编码区全长 2301 bp 的 *StAVPI* 基因, 生物信息学分析表明, 其包含典型的 H⁺-焦磷酸酶结构域和 13 个跨膜结构域, 与近缘物种的 AVPI 蛋白具有较高的序列相似性, 预测定位于液泡膜上。组织表达模式分析显示, *StAVPI* 基因在花中表达量最高, 块茎中表达量最低。*StAVPI* 过表达拟南芥株系的生物量和根长显著高于野生型, 干旱胁迫后, 过表达 *StAVPI* 拟南芥株系叶丙二醛含量显著低于野生型, 超氧化物歧化酶、过氧化物酶和脯氨酸含量显著高于野生型。*DREB* 等逆境应答基因表达量显著上调。CoIP 试验结果显示, *StAVPI* 与 *StRAB* 发生直接互作, 且干旱胁迫下 *StAVPI* 过表达拟南芥株系中 *AtRAB* 基因表达量也显著上调。本研究通过生物信息分析、异源表达表型、生理、基因表达方面功能验证、互作蛋白分析, 表明马铃薯 *StAVPI* 基因是马铃薯遗传改良的重要基因来源。

关键词: 马铃薯; 干旱胁迫; *StAVPI*; 表达分析; RAB

Functional Identification of Potato Gene *StAVPI* to Enhance Drought Resistance of *Arabidopsis thaliana*

YANG Wenjing^{1,2}, LIU Xuan^{1,2}, CUI Yong³, NIE Fengjie^{1,2}, ZHANG Li^{1,2}, ZHANG Yu^{1,2}, Gong Lei⁴

(¹Agricultural Biotechnology Research Center, Ningxia Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Yinchuan 750002; ²Ningxia

Key Laboratory of Agricultural Biotechnology, Yinchuan 750002; ³Ningxia Agricultural Technology Extension Station, Yinchuan

750002; ⁴Guyuan Branch, Ningxia Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Guyuan 756009)

Abstract: Potato (*Solanum tuberosum* L.) is the fourth largest food crop in the world. To explore and identify the biological basis of drought resistance genes is an important way to cultivate new varieties of drought-resistant potato. Potato *StAVPI* gene is involved in material transport across the vacuolar membrane and plays an important role in plant response to material transport and abiotic stress. In this study, the *StAVPI* gene with the full length of 2301 bp coding region was cloned from the leaves of 'Atlantic' potato. Bioinformatics analysis showed that the *StAVPI* gene contained typical H⁺-pyrophosphatase domain and 13 transmembrane domains, which had high sequence similarity with AVPI protein of related species, and was predicted to be located on the vesicular membrane. Tissue expression pattern analysis showed that *StAVPI* gene expression was the highest in flowers and the lowest in tubers. The biomass and root length of *Arabidopsis thaliana* plants overexpressed in *StAVPI* were significantly higher than those of wild type, and the contents of malondialdehyde in leaves of

收稿日期: 2024-01-02 网络出版日期: 2024-08-07

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20240102004>

第一作者研究方向为植物分子生物育种, E-mail: 429625104@qq.com

通信作者: 巩楠, 研究方向为植物分子生物育种, E-mail: tea_gl@126.com

基金项目: 宁夏自然科学基金(2022AAC03431, 2021AAC05015, 2022AAC03429); 国家自然科学基金(32260504); 宁夏回族自治区农业科技自主创新专项科技创新引导项目(NKYG-22-02); 宁夏回族自治区农业育种专项(2019NYYZ01)

Foundation projects: Natural Science Foundation Project of Ningxia (2022AAC03431, 2021AAC05015, 2022AAC03429); National Natural Science Foundation of China (32260504); Agricultural Science and Technology Independent Innovation Special Scientific and Technological Innovation Guidance Project of Ningxia (NKYG-22-02); Agricultural Breeding Project of Ningxia (2019NYYZ01)

Arabidopsis thaliana plants overexpressed in *StAVPI* were significantly lower than those of wild type under drought stress, while the contents of superoxide dismutase, peroxidase and proline were significantly higher than those of wild type. Stress response genes such as *DREB* were significantly up-regulated. The results of CoIP test showed that *StAVPI* directly interacted with *StRAB*, and *AtRAB* gene expression was significantly up-regulated in *Arabidopsis thaliana* strains overexpressed in *StAVPI* under drought stress. In this study, through biological information analysis, heterologous expression phenotype, physiological, functional verification of gene expression, protein interaction analysis, potato *StAVPI* gene is an important gene source for potato genetic improvement.

Key words: potatoes; drought stress; *StAVPI*; expression analysis; RAB

马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)是仅次于玉米、小麦和水稻的全球第四大粮食作物,在确保全球粮食和营养安全方面发挥着重要作用^[1]。干旱胁迫是限制马铃薯块茎产量和质量的重要因素之一^[2],苗期是马铃薯生长发育的关键时期,缺水将影响整个生育期生长及最终产量。挖掘验证干旱胁迫应答关键基因,揭示其生理和分子调节机制,对加快培育马铃薯抗旱新品种和保障干旱缺水下粮食安全具有重要意义^[3]。液泡膜H⁺-焦磷酸酶编码基因*AVPI*(*Arabidopsis Vacuolar Proton-pump 1*)通过水解焦磷酸盐(PPi)产生的自由能可为H⁺由胞质向液泡运输及溶质分子(金属离子和糖类)的跨液泡膜主动运输提供驱动力^[4],在植物形态建成、应对非生物胁迫和物质转运等方面发挥重要作用。在杨树(*Populus* L.)^[5]、小麦(*Triticum aestivum* L.)^[6]、染色茜草(*Rubia tinctorum* L.)^[7]、拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)^[8]和草坪草(*Agrostis stolonifera* L.)^[9]中发现,过表达*AVPI*植株较野生型有更强的抗旱性、耐盐性。甘蔗(*Saccharum officinarum* L.)中过表达*AVPI*能显著增加根长和根系生物量,表现出更高的盐和干旱胁迫耐受性^[10]。过表达拟南芥基因*AtAVPI*的番茄(*Solanum lycopersicum* L.)根的生物量增加并通过将Na⁺隔离到液泡中减弱Na⁺积累的毒性作用,提高了番茄的抗旱耐盐能力^[11]。在大麦中鉴定到了与盐、旱耐受相关的*AVPI*位点^[12]。在盐碱地,表达*AVPI*的转基因大麦(*Hordeum vulgare* L.)表现为茎部生物量增加,单株产量更高^[13]。Zhang等^[14]研究结果显示,AVPI介导的棉花抗逆性增强的分子机制一方面可能是过表达*AVPI*刺激生长素的极性运输,进而刺激根的发育,较大的根系使*AVPI*过表达植株在干旱和盐碱条件下更有效地吸收水分,从而提高了抗逆性和产量;另一方面可能是由于液泡焦磷酸酶质子泵的活性增强,生成一个高跨液泡膜质子电化学梯度,导致液泡内低水势

和更高的二次运输活动,防止细胞质内积累有毒离子。拟南芥中亚细胞定位分析表明,AtAVP1和拟南芥受体样蛋白激酶(AtRLK, receptor-like kinase)位于质膜上,酵母双杂交和荧光素酶互补成像试验表明,AtRLK与AtAVP1相互作用,低氮胁迫下,拟南芥突变体*rlk*和*avp1-1*具有相同表型表明,AtAVP1通过与AtRLK相互作用调控低氮胁迫反应^[15]。有报道以拟南芥AVP1为诱饵,采用膜蛋白酵母双杂交系统筛选拟南芥cDNA文库,获得一个与AVP1互作的小GTP结合蛋白AtRAB(Small GTP-binding protein)^[16]。已有的研究集中在*AVPI*基因通过多种途径提高植株的耐盐性方面,而对茄科植物,尤其是对水分、盐分敏感的马铃薯而言,*StAVPI*是否可以提高植物的耐旱性,与其应答干旱胁迫的生理、分子应答机制等问题尚未报道。本研究构建了用于探究*StAVPI*功能的拟南芥转基因株系,通过组织表达分析、互作蛋白鉴定,结合表型和生理数据分析*StAVPI*应答干旱胁迫的分子机制,为创制抗旱马铃薯新品种提供基因资源和理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以马铃薯品种大西洋为试验材料,野生型拟南芥为Columbia(以下简称Col)。农杆菌GV3101,植物表达载体PCambia1300-35S-GFP、pCambia1301S为宁夏农林科学院农业生物技术研究中心实验室长期保存的材料。大肠杆菌菌株DH5 α 、限制性内切酶购自Sigma,克隆载体pMD20-T购自TaKaRa,DNA提取试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司。

载体构建参考孔佑宾等^[17]的方法,将双酶切产物通过T4 DNA连接酶连接,使*StAVPI*全长构建到PCambia1300-35S-GFP表达载体的BamH I和Sal I酶切位点之间,重组后的表达载体转化大肠杆菌

DH5 α 并依次在含卡那霉素(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的 LB 固体平板上和 LB 液体培养基中培养,提取质粒后将经过 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切鉴定正确的重组表达载体命名为 StAVP1-GFP。

1.2 StAVP1 基因克隆及序列分析

以马铃薯叶片 cDNA 序列为模板,采用 Primer Premier 6.0 设计引物,扩增全长 *StAVP1* 基因。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测并回收目的片段,将目的基因连接克隆载体,转化大肠杆菌,筛选阳性单克隆进行测序与验证^[18]。

利用 TMHMM Server v 2.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)在线分析跨膜结构域,GS-DS 网站(<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>)在线分析基因结构,利用 LocTREE 3 (<https://roslab.org/services/loctree3/>)在线预测蛋白亚细胞定位,SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>)预测蛋白质三维结构,WebLogo (<http://weblogo.berkeley.edu/>)分析蛋白保守序列,Mega X 软件分析蛋白系统进化关系^[19-21]。

1.3 拟南芥转化及干旱胁迫处理

重组表达载体 StAVP1-GFP 转化农杆菌 GV3101,再通过花侵法转化拟南芥,采收 T₀代种子在含有潮霉素(25 $\mu\text{g}/\text{ml}$)的 MS 固体培养基上筛选阳性株系。移栽穴盘培养并经 PCR 特异性鉴定,筛选阳性株系连续自交获得 T₃代 StAVP-GFP 拟南芥株系,用于后续功能分析。

转基因阳性株系和野生型拟南芥种子经 75%

乙醇消毒 1 min,10% NaClO 和 0.01% Triton 混合液消毒 5 min,接着用无菌水清洗 4 次,每次 1 min。将消毒后的种子平铺到 1/2 MS 培养基上于 4 $^{\circ}\text{C}$ 春化 2 d,后置于人工气候箱培养,光照/黑暗时间为 16 h/8 h,温度 22 $^{\circ}\text{C}$,相对湿度 80% \pm 5%^[22]。

培养皿垂直放置,培养 7 d 后,测定根长;培养 10 d 后选择长势大小一致的幼苗移栽至含有灭菌基质的穴盘,3 d 补水 1 次,基质配比为营养土:蛭石:珍珠岩=6:3:1。

转基因拟南芥移栽基质后生长 21 d 后,正常条件组定期补水 7 d,干旱胁迫组倒空穴盘中剩余水,停止补水 7 d,取叶片以备后续试验分析^[16],每个处理 3 个生物学重复。

1.4 基因表达分析

取野生型和不同过表达株系分别提取总 RNA (RNAprep Pure 植物总 RNA 提取试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司),反转录合成 cDNA (HiScript IV 1st Strand cDNA Synthesis Kit(+gDNA wiper),南京诺唯赞生物科技股份有限公司)。根据不同基因设计实时荧光定量 PCR 特异引物(表 1),以 *AtEF1 α* 作为内参基因。采用 SYBR 染料法进行 qRT-PCR 并应用 2^{- $\Delta\Delta\text{CT}$} 法计算各基因相对表达量,每个样本重复 3 次,采用 student *t* 检验^[23]。扩增体系包含模板 cDNA 1 μL ,上下游引物各 1 μL ,PCR reaction mix 10 μL ,ddH₂O 补足至 20 μL ;扩增程序为 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 10 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,40 个循环。

表 1 试验所用引物序列

Table 1 Primer sequence used in this study

基因名称 Gene name	上游引物序列(5'-3') Forward primer sequence(5'-3')	下游引物序列(5'-3') Reverse primer sequence(5'-3')	用途 Purpose
<i>AtEF1α</i>	TACGCATTGAAGACCCTCCAC	TGGCCACACTTGCTTAGACAA	内参基因
<i>StAVP1</i>	GGATCCATGGGGTCGGCGTTGTTG	GTCGACAAAGATCTTGAAAAGGATAC	扩增 <i>StAVP1</i> 基因全长
<i>qStAVP1</i>	TCCTGCTGTGATTGCTGATAA	ACAAGAGCAGCACAAAGATGAT	qRT-PCR 检测基因表达量
<i>qAtDREB</i>	TAAACCAGCTCACCAATCCC	CGGTCTTGGGGAGTCTGATC	
<i>qAtNCED1</i>	TGTCCTGTCTGAAATCCGCC	CCCTGCTTCGAGGTTGACTT	
<i>qAtP5CS1</i>	GCAGGCAAAGGCTTCGTTATC	AGCACAAGCCTTCCCATCAA	
<i>qAtRD22A</i>	GACCTTAACTCTCCCGCTA	GGAAGAGAGAAAACCTCGTA	
<i>qAtLEA</i>	CGAAGGATACGGGACAGGAAC	GTGAAGCATTCTCCCAAGCC	
<i>qAtRAB</i>	CGTCAGATTCTCGTTGAGGGA	TCCAGGTAAGAATCATCAGCAA	

1.5 生理指标检测

取野生型与不同过表达株系叶片检测超氧化物歧化酶(SOD, superoxide dismutase)、过氧化物

酶(POD, peroxidase)活性,丙二醛(MDA, malondialdehyde)、脯氨酸(Pro, proline)含量采用南京建成生物工程研究所试剂盒测定,每个样本重

复3次^[24]。

1.6 互作蛋白验证(Co-IP)

分别全基因合成 *StAVPI-GST* 和 *StRAB-GFP* 融合基因,将 *Kpn* I 和 *Sal* I 双酶切后产物通过 T4 DNA 连接酶连接,使融合基因构建到 pCambia1301S 表达载体的 *Kpn* I 和 *Sal* I 酶切位点之间,重组后的表达载体转化大肠杆菌 DH5 α 并依次在含卡那霉素 (100 μ g/mL) 的 LB 固体平板上和 LB 液体培养基中培养,提取质粒后将经过双酶切鉴定正确的重组表达载体命名为 p1301S-GST-*StAVPI* 和 p1301S-GFP-*StRAB*。单克隆菌落用 10 mmol/L MgCl₂ 悬浮液 (含 120 μ mol/L AS) 重悬菌体,注射合适大小的烟草叶片并标记对应区域,之后用保鲜膜封闭,黑暗培养 2 d,再转入光下培养 2~3 d,荧光显微镜观察表达情况。取标记的烟草叶片提取总蛋白,置于 4 $^{\circ}$ C 备用^[25]。

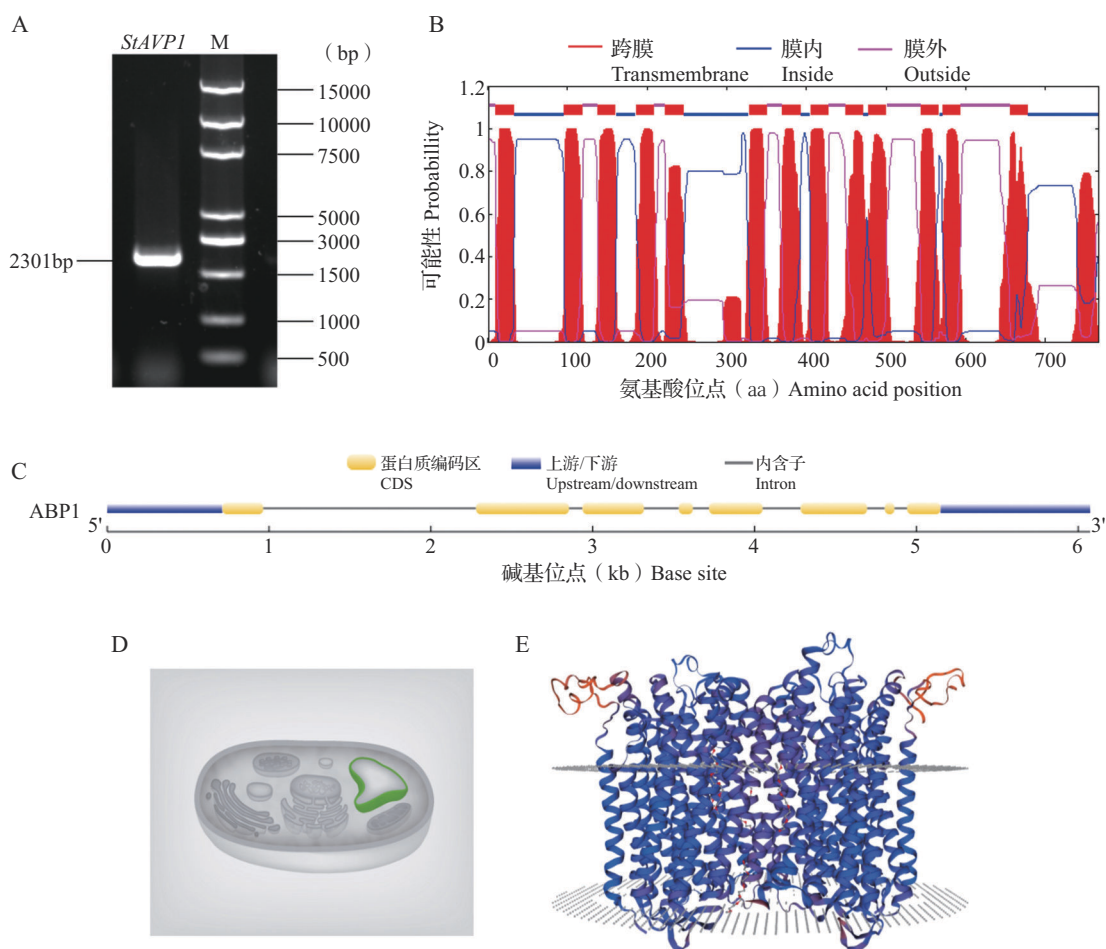
参考 MCE Protein A/G Magnetic Beads (MedChem

Express, 美国)说明书,用洗涤缓冲液预处理磁珠,消除非特异性结合;将 anti-GFP 和 anti-GST 抗体分别加入处理后磁珠,孵育形成抗体-磁珠复合体;重复洗涤,加入 400~600 μ g 总蛋白,充分混悬,孵育形成抗原-抗体-磁珠复合体;重复洗涤,在复合物中加入 25~50 μ L 1 \times SDS-PAGE loading buffer 混合均匀,95 $^{\circ}$ C 加热 5 mins。分离磁珠,收集上清,进行 SDS-PAGE 和 Western Blot 检测^[21]。

2 结果与分析

2.1 *StAVPI* 基因克隆及序列分析

以马铃薯叶片 cDNA 为模板,PCR 扩增 *StAVPI* 全长编码区,预期大小为 2301 bp,数据来自网站 Ensembl Genomes (<https://ensemblgenomes.org/>, PGSC0003DMG400014208)。凝胶电泳检测显示,PCR 产物条带单一清晰,与预期大小一致(图 1A)。



A: *StAVPI* 基因克隆; B: *StAVPI* 蛋白跨膜结构域分析; C: *StAVPI* 基因结构分析; D: *StAVPI* 蛋白亚细胞定位预测; E: *StAVPI* 蛋白三维结构预测
A: *StAVPI* gene cloning; B: *StAVPI* protein transmembrane domain analysis; C: *StAVPI* gene structure analysis; D: *StAVPI* prediction of protein subcellular localization; E: *StAVPI* prediction of protein three-dimensional structure

图1 *StAVPI* 基因克隆和生物信息分析

Fig.1 *StAVPI* gene cloning and bioinformatics analysis

通过生物信息学软件分析预测, *StAVP1* 蛋白在 20~752 位氨基酸之间有 13 个跨膜结构域(图 1B)。*StAVP1* 基因编码 767 个氨基酸, 包含 8 个外显子(图 1C), 预测蛋白质的理论分子量为 80.68 kD, 等电点(pI)为 5.10。亚细胞定位预测结果显示, *StAVP1* 蛋白定位于液泡膜(图 1D), *StAVP1* 蛋白三维结构预测多为螺旋结构(图 1E)。

利用邻接法构建系统发育树, 对马铃薯 *StAVP1* 蛋白及番茄 (*Solanum lycopersicum* L.)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* H.)、大豆 (*Glycine max* M.) 等 14 种植物 AVP1 氨基酸序列进行亲缘关系分析, 发现茄科番茄与马铃薯 *StAVP1* 蛋白序列亲缘关系最近, 与单子叶植物粳稻和豆科苜蓿的亲缘关系最远(图 2)。

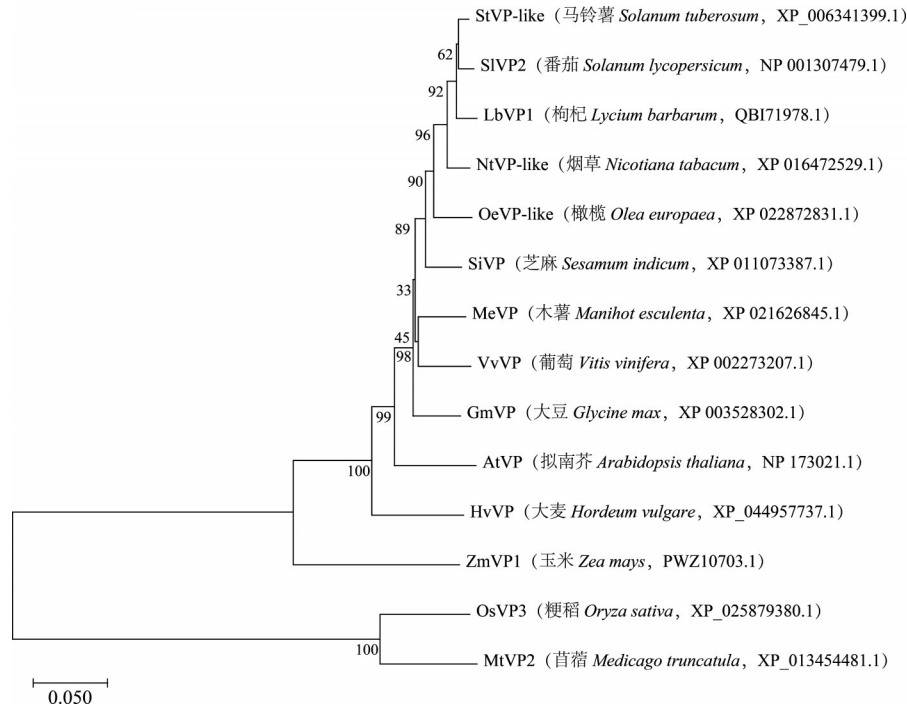


图 2 *StAVP1* 蛋白系统进化分析

Fig.2 *StAVP1* phylogenetic analysis of proteins

2.2 *StAVP1* 表达特异性分析

为了研究 *StAVP1* 基因在不同器官中的表达模式, 提取马铃薯根、茎、叶、块茎、全花、花瓣和雄蕊的总 RNA, 反转录合成 cDNA, 利用荧光实时定量 PCR 检测 *StAVP1* 的组织表达特异性。qRT-PCR 结果显示, *StAVP1* 基因在全花中表达量最高, 为叶片的 4 倍; 根、雄蕊和花瓣中的表达量次之, 分别为叶片的 2.5 倍、2.3 倍和 1.4 倍; 在块茎中的表达量最低, 仅为叶片中的 0.3 倍(图 3)。

2.3 过表达 *StAVP1* 拟南芥响应干旱胁迫的表型及生理指标分析

为明确拟南芥中异源表达 *StAVP1* 是否会影响植株的生长发育, 选取 *StAVP1* 表达量最高的 3 个 T_3 代转基因拟南芥株系, 以野生型拟南芥为对照, 对比同时期表型。同时, 在干旱胁迫组的莲座叶时期对转基因和野生型株系停止补水 7 d。结果发现, 正

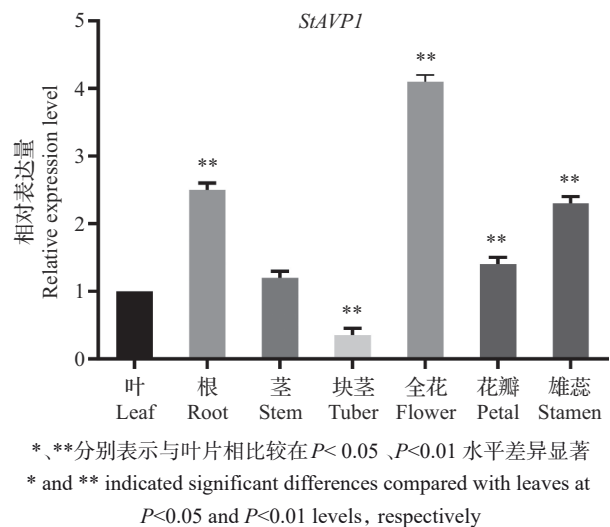


图 3 *StAVP1* 在不同器官中的表达特异性

Fig.3 *StAVP1* tissue expression specificity

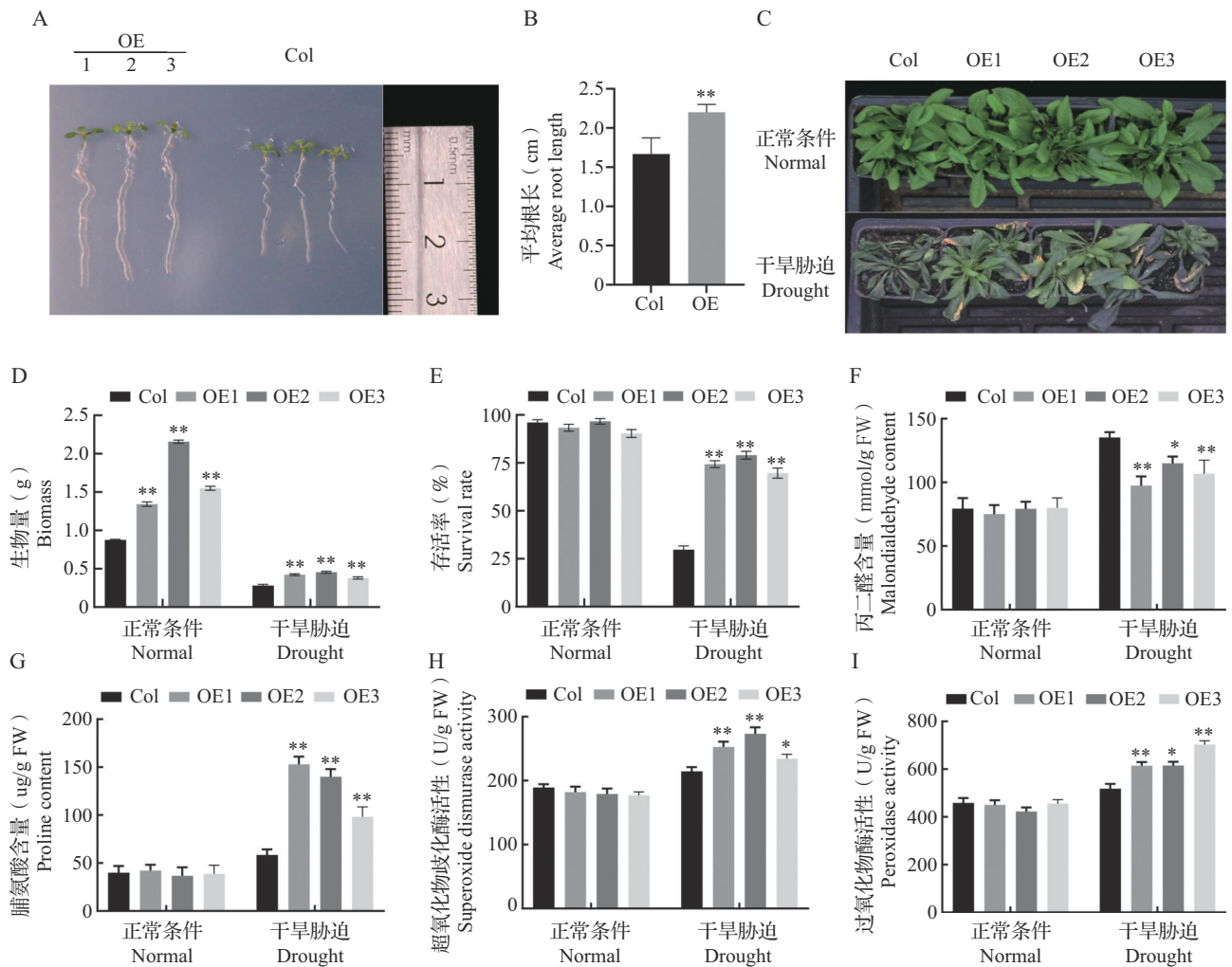
常生长条件下,种子萌发阶段,3个过表达株系的平均根长显著高于野生型(图4A、B)。异源过表达 *StAVP1* 拟南芥幼苗的生物量显著优于野生型(图4C、D);而不同株系间存活率(图4E)、丙二醛、脯氨酸含量和超氧化物歧化酶、过氧化物酶活性没有显著差异(图4F~I),说明异源表达 *StAVP1* 促进了拟南芥的营养生长,并未影响其生理指标。

干旱胁迫下,各株系均表现出叶片萎蔫失水表型(图4C),但过表达 *StAVP1* 株系的生物量和存活率显著高于野生型(图4D、E);同时,叶片丙二醛含量显著降低,脯氨酸含量显著增多,超氧化物歧化酶和过氧化物酶活性显著增强(图4F~I),说明过表

达株系的细胞膜脂过氧化的程度更低,膜透性相对完整,细胞所遭受的氧化损伤更小,清除过氧化氢和活性氧自由基的能力更强,合成了更多的渗透调节物质应对干旱胁迫。

2.4 过表达 *StAVP1* 拟南芥响应干旱胁迫的基因表达分析

为了进一步研究 *StAVP1* 基因响应干旱胁迫的分子机制,通过 qRT-PCR 分析了 *DREB*、*NCED1*、*P5CS1*、*RD22A*、*LEA* 胁迫应答相关基因表达水平。结果显示(图5),在正常水分条件下,与野生型相比,过表达 *StAVP1* 植株中 *DREB* 基因表达水平较野生型极显著增加,*RD22A*、*NCED1*、*LEA*、*P5CS1* 基因



A: 正常条件下拟南芥种子萌发情况;B: 正常条件下野生型与3个转基因株系(OE1、OE2、OE3)平均根长比较;C~E: 正常和干旱胁迫下拟南芥生长情况;F~I: 正常和干旱胁迫下拟南芥生理指标变化; *、** 分别表示在同等条件下与野生型相比较在 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 水平差异显著,下同

A: Seed germination of *Arabidopsis thaliana* under normal conditions; B: The average root length of 3 transgenic lines (OE1, OE2, OE3) was compared with that of wild type under normal conditions; C-E: Growth of *Arabidopsis thaliana* under normal and drought stress conditions; F-I: Changes of physiological indexes of *Arabidopsis thaliana* under normal and drought stress conditions; * and ** indicated that there were significant differences at $P < 0.05$ and $P < 0.01$ levels compared with wild type under the same conditions, respectively; The same as below

图4 异源表达 *StAVP1* 对拟南芥生长和生理指标影响

Fig.4 Effects of *StAVP1* on growth and physiological indexes of *Arabidopsis thaliana*

有不同程度表达上调。干旱胁迫条件下,野生型 *AVP1* 基因表达水平较正常水分条件有所上调, *DREB*、*NCED1*、*P5CS1*、*RD22A* 和 *LEA* 基因表达水平亦较正常条件有所上调。而在干旱胁迫条件下过表达 *StAVP1* 基因植株相较于野生型, *AVP1*、

DREB、*RD22A*、*NCED1*、*LEA*、*P5CS1* 基因表达水平均极显著上调,表明 *StAVP1* 基因可能通过在干旱胁迫条件下调控 ABA 合成(*NCED1*)、脯氨酸合成(*P5CS1*)等干旱响应重要基因的表达量上调,进而提高转基因植株的抗旱性。

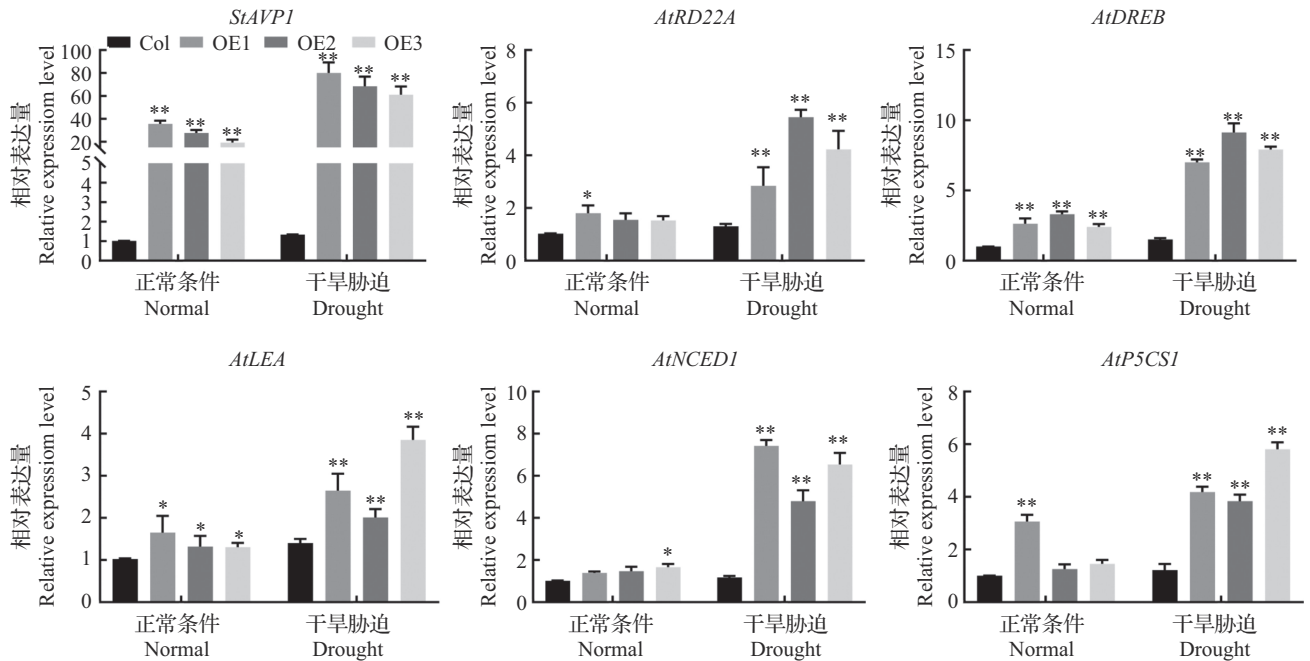


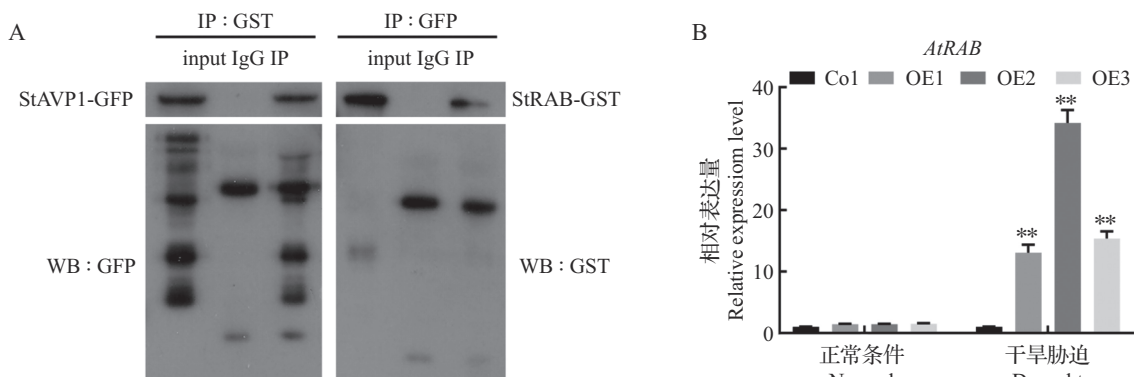
图5 水分胁迫条件下转基因植株胁迫应答相关基因表达

Fig.5 Expression of stress-related genes in transgenic plants under water stress

2.5 *StAVP1* 互作蛋白的鉴定与验证

为明确 *StAVP1* 与 RAB 的互作关系,本研究在马铃薯数据库中比对到 *AtRAB* 的同源蛋白,构建 p1301S-*StAVP1*-GFP 和 p1301S-RAB-GST 载体并分别转化农杆菌,混合 2 种菌液侵染烟草叶片,提取总蛋白利用 GST 和 GFP 抗体进行蛋白杂交试验,通过 Western Blot 验证互作关系,已知融合蛋白 *StAVP1*-

GFP 和 *StRAB*-GST 分子量大小分别为 107 kD 和 120 kD。结果表明,对照蛋白 IgG 与全蛋白没有杂交目的条带,而用 anti-GFP 和 anti-GST 磁珠分别进行总蛋白的免疫沉淀,目标位置有杂交条带,说明 *StAVP1* 和 *StRAB* 在植物细胞内存在相互作用(图 6A)。同时,qRT-PCR 结果表明,干旱胁迫条件下,过表达 *StAVP1* 拟南芥株系的 *AtRAB* 表达水平极



A: Co-IP 蛋白互作验证; B: *AtRAB* 基因表达水平

A: Co-IP verificate protein interaction; B: *AtRAB* gene relative expression level

图6 *StAVP1* 和 *StRAB* 蛋白互作关系验证

Fig.6 Verification of the interaction between *StAVP1* and *StRAB* proteins

显著高于野生型(图6B),说明干旱胁迫下 *StAVPI* 影响了 *AtRAB* 的转录表达。

3 讨论

前人研究表明,AVPI 蛋白在应答非生物胁迫中发挥着重要调节作用,但马铃薯 *AVPI* 应答干旱胁迫的生理和分子机制尚不清楚。本研究在马铃薯中克隆了 *StAVPI* 基因,以拟南芥为材料通过基因表达分析和蛋白互作验证等方法探究了该基因响应干旱胁迫的调控机制。

马铃薯 *StAVPI* 蛋白与其他物种中 AVPI 蛋白的多序列比对和系统进化分析显示,在多种植物中克隆得到的 *AVPI* 基因大小相似,氨基酸序列在多种植物中高度保守,包含 H⁺-焦磷酸酶结构域和跨膜结构域(图1B、E),表明马铃薯 *StAVPI* 基因提高植物抗旱性具有结构基础。

已有研究结果表明, *AVPI* 通过增加根系生物量、提高株系存活率等方式提高植物的抗旱耐盐性^[26]。干旱胁迫条件下,过表达 *AVPI* 甜菜丙二醛和游离脯氨酸含量增加^[27];在拟南芥中通过 CRISPR/Cas9 激活系统,提高了 *AVPI* 基因的表达量,植株表现出叶片数增加,对干旱胁迫的耐受性更强^[28]。与已有结果类似,本研究中,过表达马铃薯 *StAVPI* 拟南芥的根长显著高于野生型;干旱胁迫后,过表达株系叶丙二醛含量显著低于野生型;渗透调节物脯氨酸含量,超氧化物歧化酶和过氧化物酶活性显著高于野生型(图4G~I),说明过表达 *StAVPI* 株系的叶片细胞膜脂过氧化程度更低,并通过提高渗透调节物质的含量和提高过氧化物还原酶活性来减轻或消除干旱胁迫诱发自由基对植株的伤害^[29]。

非生物胁迫会引起转录因子或功能基因的表达以促使植株从多个代谢途径应答逆境^[30]。如对藜麦(*Chenopodium quinoa* Willd.)干旱胁迫下的转录组分析表明, *DREB* 家族基因在根和叶中对干旱胁迫有响应^[31];转 *PCST1* 基因株系 NaCl 和甘露醇处理后,植株通过调控脯氨酸、甜菜碱合成以及 *SOS*、*NCED1*、*CIPK* 等关键基因的表达来响应干旱胁迫^[32];对山葡萄(*Vitis amurensis* Rupr.)干旱 21 d 后,转 *VyUSPA3* 基因株系长势更好, *RD22A* 等基因表达量高于 RNAi 株系和野生型^[33]; *CiLEA4* 基因表达量较高的菊苣(*Cichorium intybus* L.)品种有更强的干旱胁迫耐受性^[34]。本研究中,干旱胁迫下过表达 *StAVPI* 株系中 *DREB*、*NCED1*、*P5CSI*、*RD22A* 和

LEA 等逆境应答关键基因表达水平上调,极显著高于野生型。与胁迫下生理指标变化相对应,过表达株系中 *NCED1*、*P5CSI*、*LEA* 等渗透调节物合成关键基因表达量较野生型上调了近 3~10 倍,这也为脯氨酸、ABA 等胁迫应答调节物的含量变化提供了基因转录水平的支持证据。

RAB 蛋白是小分子 GTP 结合蛋白,也是根据细胞需要将不同分子通过囊泡运输移动到特定区域的关键调节因子^[35]。过表达 *RabA2b* 拟南芥表现出了惊人的抗旱性,蛋白质组学分析表明,转基因植株中含有丰富的抗胁迫蛋白和细胞壁/角质层修饰因子^[36]。转 *OsRab7* 基因水稻(*Oryza sativa* L.)表现出抗旱性增强,且成活率、叶绿素含量、可溶性蛋白含量、可溶性糖含量、脯氨酸含量以及抗氧化酶(CAT、SOD、APX、POD)活性均显著高于野生型^[37]。有研究表明,拟南芥 RAB 同源蛋白 *AtARA6* 参与了大豆小泡转运途径中跨膜蛋白家族复合物的调控,这可能直接增强了大豆的耐盐性;同时,盐处理后转基因大豆中 3 个盐响应性负调控转录因子表达量显著下调^[38]。结合前人研究结果和本课题验证的 *StAVPI* 和 *StRAB* 蛋白存在互作关系,推测 *StAVPI* 可能是通过与 *StRAB* 蛋白相互作用,激活抗旱相关基因表达,并参与脯氨酸等渗透调节物质的跨膜运输,及提高抗氧化酶活性(SOD、POD)来提高拟南芥的抗旱性。

参考文献

- [1] Tang D, Jia Y, Zhang J, Li H, Cheng L, Wang P, Bao Z, Liu Z, Feng S, Zhu X, Li D, Zhu G, Wang H, Zhou Y, Zhou Y, Bryan G J, Buell C R, Zhang C, Huang S. Genome evolution and diversity of wild and cultivated potatoes. *Nature*, 2022, 606(7914): 535-541
- [2] Zhu X, Zhang N, Liu X, Li S, Yang J, Hong X, Wang F, Si H. Mitogen-activated protein kinase 11 (*MAPK11*) maintains growth and photosynthesis of potato plant under drought condition. *Plant Cell Reports*, 2021, 40(3): 491-506
- [3] Wang D, Song J, Lin T, Yin Y, Mu J, Liu S, Wang Y, Kong D, Zhang Z. Identification of potato lipid transfer protein gene family and expression verification of drought genes *StLTP1* and *StLTP7*. *Plant Direct*, 2023, 7(3): e491
- [4] Jiang Y T, Tang R J, Zhang Y J, Xue H W, Ferjani A, Luan S, Lin W H. Two tonoplast proton pumps function in *Arabidopsis* embryo development. *New Phytologist*, 2020, 225(4): 1606-1617
- [5] Yang Y, Tang R J, Li B, Wang H H, Jin Y L, Jiang C M, Bao Y, Su H Y, Zhao N, Ma X J, Yang L, Chen S L, Cheng X H, Zhang H X. Overexpression of a *Populus trichocarpa* H⁺-

- pyrophosphatase gene *PtVPL1* confers salt tolerance on transgenic poplar. *Tree Physiology*, 2015, 35(6): 663-677
- [6] Brini F, Gaxiola R A, Berkowitz G A, Masmoudi K. Cloning and characterization of a wheat vacuolar cation/proton antiporter and pyrophosphatase proton pump. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2005, 43(4): 347-354
- [7] Toranj S, Aliabad K K, Abbaspour H, Saeedpour A. Effect of salt stress on the genes expression of the vacuolar H⁺-pyrophosphatase and Na⁺/H⁺ antiporter in *Rubia tinctorum*. *Molecular Biology Reports*, 2020, 47(1): 235-245
- [8] Wijewardene I, Mishra N, Sun L, Smith J, Zhu X, Payton P, Shen G, Zhang H. Improving drought-, salinity-, and heat-tolerance in transgenic plants by co-overexpressing *Arabidopsis* vacuolar pyrophosphatase gene *AVP1* and *Larrea* Rubisco activase gene *RCA*. *Plant Science*, 2020, 296: 110499
- [9] Li Z, Zhou M, Hu Q, Reighard S, Yuan S, Yuan N, San B, Li D, Jia H, Luo H. Manipulating expression of tonoplast transporters. *Methods in Molecular Biology*, 2012, 913: 359-369
- [10] Bhatti F, Asad S, Khan Q M, Mobeen A, Iqbal M J, Asif M. Risk assessment of genetically modified sugarcane expressing *AVP1* gene. *Food and Chemical Toxicology*, 2019, 130: 267-275
- [11] Park S, Li J, Pittman J K, Berkowitz G A, Yang H, Undurraga S, Morris J, Hirschi K D, Gaxiola R A. Up-regulation of a H⁺-pyrophosphatase (H⁺-PPase) as a strategy to engineer drought-resistant crop plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(52): 18830-18835
- [12] Wehner G, Balko C, Humbeck K, Zyprian E, Ordon F. Expression profiling of genes involved in drought stress and leaf senescence in juvenile barley. *BMC Plant Biology*, 2016, 16: 3
- [13] Schilling R K, Marschner P, Shavrukov Y, Berger B, Tester M, Roy S J, Plett D C. Expression of the *Arabidopsis* vacuolar H⁺-pyrophosphatase gene (*AVP1*) improves the shoot biomass of transgenic barley and increases grain yield in a saline field. *Plant Biotechnology Journal*, 2014, 12(3): 378-386
- [14] Zhang H, Shen G, Kuppu S, Gaxiola R, Payton P. Creating drought- and salt-tolerant cotton by overexpressing a vacuolar pyrophosphatase gene. *Plant Signaling & Behavior*, 2011, 6(6): 861-863
- [15] Zhang H, Chen M, Xu C, Liu R, Tang W, Chen K, Zhou Y, Xu Z, Chen J, Ma Y, Chen W, Sun D, Fan H. H⁺-pyrophosphatases enhance low nitrogen stress tolerance in transgenic *Arabidopsis* and wheat by interacting with a receptor-like protein kinase. *Frontiers in Plant Science*, 2023, 14: 1096091
- [16] 刘荣榜, 陈明, 郭萌萌, 司青林, 高世庆, 徐兆师, 李连成, 马有志, 尹钧. 拟南芥 H⁺-焦磷酸化酶 AVP1 互作小 GTP 结合蛋白 AtRAB 的特性鉴定与功能分析. *作物学报*, 2014, 40(10): 1756-1766
- Liu R B, Chen M, Guo M M, Si Q L, Gao S Q, Xu Z S, Li L C, Ma Y Z, Yin J. Characterization and functional analysis of a small GTP-binding protein AtRAB interacting with H⁺-pyrophosphatase AVP1 in *Arabidopsis thaliana*. *Acta Agronomica Sinica*, 2014, 40(10): 1756-1766
- [17] 孔佑宾, 李喜焕, 张彩英. 大豆紫色酸性磷酸酶基因 *GmPAP4* 启动子结构与活性分析. *中国农业科学*, 2017, 50(3): 582-590
- Kong Y B, Li H X, Zhang C Y. Construction and activity analysis of the promoter of purple acid phosphatase gene *GmPAP4* in soybean. *Scientia Agricultura Sinica*, 2017, 50(3): 582-590
- [18] 李光胜, 卢翔, 刘洋, 张凯旋, 王海华, 唐新科, 周美亮. 苦荞 *FtEIN3* 基因的克隆及其抗立枯病功能分析. *植物遗传资源学报*, 2023, 24(5): 1389-1400
- Li G S, Lu X, Liu Y, Zhang K X, Wang H H, Tang X K, Zhou M L. Cloning and functional analysis of the *FtEIN3* gene in *Tartary Buckwheat* against bacterial blight. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2023, 24(5): 1389-1400
- [19] 张涛, 黄华梅, 徐玲, 吴晓媚, 袁长春, 蒋边, 刘锴栋. 基于转录组的番木瓜 *MYB* 基因家族的生物信息学分析. *分子植物育种*, 2020, 18(15): 4908-4917
- Zhang T, Huang H M, Xu L, Wu X M, Yuan C C, Jiang B, Liu K D. Bioinformatics analysis of *MYB* transcription factor family genes based on the transcriptome of papaya (*Carica papaya* L.). *Molecular Plant Breeding*, 2020, 18(15): 4908-4917
- [20] Zhang L, Wan X, Xu Y, Niyitanga S, Qi J, Zhang L. De novo assembly of transcriptome and genome-wide identification reveal GA3 stress-responsive WRKY transcription factors involved in fiber formation in jute (*Corchorus capsularis*). *BMC Plant Biology*, 2020, 20(1): 403
- [21] 王娟, 陈皓宁, 石大川, 于天一, 闫彩霞, 孙全喜, 苑翠玲, 赵小波, 牟艺菲, 王奇, 李春娟, 单世华. 花生高亲和硝酸盐转运蛋白基因 *AhNRT2.7a* 响应低氮胁迫的功能研究. *中国农业科学*, 2022, 55(22): 4356-4372
- Wang J, Chen H N, Shi D C, Yu T Y, Yan C X, Sun Q X, Yuan C L, Zhao X B, Mou Y F, Wang Q, Li C J, Shan S H. Functional analysis of *AhNRT2.7a* in response to low-nitrogen in peanut. *Scientia Agricultura Sinica*, 2020, 53(22): 4537-4549
- [22] 陈小晶, 王东梅, 关红辉, 郭剑, 沙小茜, 李永祥, 张登峰, 刘旭洋, 何冠华, 石云素, 宋燕春, 王天宇, 黎裕, 刘颖慧, 李春辉. 玉米 *CIPK* 基因家族的鉴定及 *ZmCIPK3* 的抗旱性功能研究. *植物遗传资源学报*, 2022, 23(4): 1064-1075
- Chen X J, Wang D M, Guan H H, Guo J, Sha X Q, Li Y X, Zhang D F, Liu X Y, He G H, Shi Y S, Song Y C, Wang T Y, Li Y, Liu Y H, Li C H. Identification of *CIPK* gene family members and investigation of the drought tolerance of *ZmCIPK3* in maize. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2022, 23(4): 1064-1075

- [23] Yu H, Wang Q, Zhang Z, Wu T, Yang X, Zhu X, Ye Y, Leng J, Yang S, Feng X. Genetic mapping of the *Gmpgl3* mutant reveals the function of *GmTic110a* in soybean chloroplast development. *Frontiers In Plant Science*, 2022, 13: 892077
- [24] Holness S, Bechtold U, Mullineaux P, Serino G, Vittorioso P. Highlight induced transcriptional priming against a subsequent drought stress in *Arabidopsis thaliana*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(7): 6608
- [25] 孟钰玉, 魏春茹, 范润侨, 于秀梅, 王逍冬, 赵伟全, 魏新燕, 康振生, 刘大群. 小麦 *TaPP2-A13* 基因的表达响应逆境胁迫并与 SCF 复合体接头蛋白 TaSKP1 相互作用. *作物学报*, 2021, 47(2): 224-236.
Meng Y Y, Wei C R, Fan R Q, Yu X M, Wang X D, Zhao W Q, Wei X Y, Kang Z S, Liu D Q. *TaPP2-A13* gene ghows induced expression pattern in wheat responses to stresses and interacts with adaptor protein SKP1 from SCF complex. *Scientia Agricultura Sinica*, 2021, 47(2): 224-236
- [26] Zhang H, Chen M, Xu C, Liu R, Tang W, Chen K, Zhou Y, Xu Z, Chen J, Ma Y, Chen W, Sun D, Fan H. H⁺-pyrophosphatases enhance low nitrogen stress tolerance in transgenic *Arabidopsis* and wheat by interacting with a receptor-like protein kinase. *Frontiers in Plant Science*, 2023, 14: 1096091
- [27] 刘雪. 转 *AVPI* 基因甜菜的分子检测和功能鉴定. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2015
Liu X. Molecular detection and functional identification of *AVPI* transgenic sugar beets (*Beta vulgaris* L.). Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2015
- [28] Park J J, Dempewolf E, Zhang W, Wang Z Y. RNA-guided transcriptional activation via CRISPR/dCas9 mimics overexpression phenotypes in *Arabidopsis*. *PLoS ONE*, 2017, 12(6): e179410
- [29] Wang Q, Zhao X, Sun Q, Mou Y, Wang J, Yan C, Yuan C, Li C, Shan S. Genome-wide identification of the *LRR-RLK* gene family in peanut and functional characterization of *AhLRR-RLK265* in salt and drought stresses. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 254 (2) : 127829
- [30] Anwar K, Joshi R, Dhankher O P, Singla-Pareek S L, Pareek A. Elucidating the response of crop plants towards individual, combined and sequentially occurring abiotic stresses. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22 (11) : 6119
- [31] Zhu X, Wang B, Liu W, Wei X, Wang X, Du X, Liu H. Genome-wide analysis of *AP2/ERF* gene and functional analysis of *CqERF24* gene in drought stress in quinoa. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 253 (8): 127582
- [32] Zhang H, Zhang K, Liu T, Zhang Y, Tang Z, Dong J, Wang F. The characterization and expression analysis under stress conditions of *PCST1* in *Arabidopsis*. *Plant Signaling & Behavior*, 2022, 17(1): 2134675
- [33] Cui X, Zhang P, Chen C, Zhang J. *VjUSPA3*, a universal stress protein from the Chinese wild grape *Vitis yeshanensis*, confers drought tolerance to transgenic *V. vinifera*. *Plant Cell Reports*, 2023, 42(1): 181-196
- [34] De Caroli M, Rampino P, Curci L M, Pecatelli G, Carrozzo S, Piro G. *CiXTH29* and *CiLEA4* role in water stress tolerance in *Cichorium intybus* varieties. *Biology (Basel)*, 2023, 12 (3): 444
- [35] Khatoon U, Prasad V, Sawant S V. Expression dynamics and a loss-of-function of *Arabidopsis RabC1* GTPase unveil its role in plant growth and seed development. *Planta*, 2023, 257 (5): 89
- [36] Ambastha V, Matityahu I, Tidhar D, Leshem Y. *RabA2b* overexpression alters the plasma-membrane proteome and improves drought tolerance in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 738694
- [37] El-Esawi M A, Alayafi A A. Overexpression of rice *Rab7* gene improves drought and heat tolerance and increases grain yield in rice (*Oryza sativa* L.). *Genes (Basel)*, 2019, 10(1): 56
- [38] Hong Z, Li Y, Zhao Y, Yang M, Zhang X, Teng Y, Jing L, Kong D, Liu T, Li S, Meng F, Wang Q, Zhang L. Heterologous expression of *Arabidopsis AtARA6* in soybean enhances salt tolerance. *Frontiers in Genetics*, 2022, 13: 849357