

大豆 E3 泛素连接酶基因 *GmAIRP1* 的同源克隆及在烟草中的功能鉴定

张雅文¹, 沈祥娟¹, 张 静¹, 朱美娇¹, 张海玲², 王全伟¹

(¹ 哈尔滨师范大学生命科学与技术学院 / 黑龙江省分子细胞遗传与遗传育种重点实验室, 哈尔滨 150025;

² 黑龙江省农业科学院草业研究所, 哈尔滨 150086)

摘要: E3 泛素连接酶在植物抵御高盐及干旱等非生物胁迫过程中发挥重要作用。本研究克隆获得大豆 E3 泛素连接酶基因 *GmAIRP1*, 该基因 cDNA 全长为 642 bp, 编码 213 个氨基酸。蛋白结构域分析表明, *GmAIRP1* 具有典型的 RING-finger 结构域。系统进化树分析表明, *GmAIRP1* 与蕨类苜蓿 *MtAIRP1* 同源性最高, 亲缘关系最近。表达分析显示, *GmAIRP1* 可被高盐、干旱和 ABA 诱导表达, 并在胁迫 1 h 或 3 h 时表达量达到最大。抗逆表型分析表明, *GmAIRP1* 转基因烟草在高盐和干旱胁迫 21 d 后, 生长状态优于野生型, 提高了植株对高盐和干旱胁迫的耐受性。生理指标测定结果显示, 在高盐和干旱胁迫下, *GmAIRP1* 转基因烟草的 POD 和 CAT 活性提高, 整体高于对照, MDA 含量始终低于对照。以上研究结果表明, *GmAIRP1* 能够通过激活抗氧化酶活性、提高渗透调节物质的积累来增强植物抵御高盐和干旱胁迫的能力, 在植物响应高盐和干旱胁迫中发挥正调控作用。

关键词: 大豆; E3 泛素连接酶; *GmAIRP1*; 表达分析; 功能鉴定

Homologous Cloning of Soybean E3 Ubiquitin Ligase Gene *GmAIRP1* and Its Functional Identification in Tobacco

ZHANG Ya-wen¹, SHEN Xiang-juan¹, ZHANG Jing¹, ZHU Mei-jiao¹, ZHANG Hai-ling², WANG Quan-wei¹

(¹ College of Life Science and Technology, Harbin Normal University/Key Laboratory of Molecular Cytogenetics and Genetic

Breeding of Heilongjiang Province, Harbin 150025; ² Institute of Grass Research,

Heilongjiang Academy of Agriculture Sciences, Harbin 150086)

Abstract: Plant E3 ubiquitin ligase plays an important role against abiotic stresses such as high salt and drought. In this study, we isolated soybean E3 ubiquitin ligase gene *GmAIRP1*, which contained a full length coding sequence of 642 bp, encoding for 213 amino acids. Protein domain analysis indicated that *GmAIRP1* carried a typical RING-finger domain. By phylogenetic tree analysis, *GmAIRP1* was found to be closely related with *MtAIRP1*. The expression of *GmAIRP1* turned to be elevated under salt, drought or ABA stresses, particularly at 1 h or 3 h post treatments. By transforming *GmAIRP1* into tobacco, the transgenic tobacco grew better than the wild type after 21 days of high salt and drought stress, implying an elevated stress tolerance. Furthermore, we analyzed the physiological indicators, including POD and CAT activities that were elevated in transgenic plants than that of the control, and the MDA content that was constantly lower in transgenic plants. Taken together,

收稿日期: 2018-11-14 修回日期: 2019-01-09 网络出版日期: 2019-02-12

URL: <http://www.doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20181114003>

第一作者研究方向为分子遗传学, E-mail: 806151769@qq.com

通信作者: 王全伟, 研究方向为分子遗传学, E-mail: wqw125@126.com

基金项目: 哈尔滨市科技创新人才研究专项 (RC2013 QN002103); 黑龙江省博士后资助项目 (LBH-Z13185); 黑龙江省教育厅科学技术研究项目 (12511154); 哈尔滨师范大学博士科研启动基金 (KGB200903)

Foundation project: Harbin Science and Technology Innovation Talent Research Project (RC2013 QN002103), Heilongjiang Provincial Postdoctoral Funding Project (LBH-Z13185), Heilongjiang Provincial Department of Education Science and Technology Research Project (12511154), Harbin Normal University Doctoral Research Fund (KGB200903)

these results indicated that *GmAIRP1* acts as a positive regulator in plant responding to high salt and drought stress, possibly by activating antioxidant enzyme activity and increasing accumulation of osmotic adjustment substances.

Key words: soybean; E3 ubiquitin ligase; *GmAIRP1*; expression analysis; functional identification

干旱、盐碱等非生物胁迫影响植物的生长发育,是造成作物产量减少的重要因素^[1-2],大豆是我国重要的经济作物和粮食作物,不利的自然环境导致其产量和品质大大下降,已成为当前人口增长下实现其可持续发展的一项重大挑战^[3]。研究大豆对非生物胁迫的抗性和挖掘相关调控基因的功能和机制将有助于促进大豆抗性育种。

逆境会诱发植物体内基因表达模式的改变,进而改变相关代谢途径,产生适应胁迫的生理变化。泛素介导的 26S 蛋白酶体途径通过蛋白的翻译后修饰来调节基因表达,是植物响应逆境的最重要的表观调控机制之一。在泛素化过程中主要涉及 3 种酶:泛素活化酶(E1, Ubiquitin-activating enzyme)、泛素结合酶(E2, Ubiquitin-conjugating enzyme)和泛素连接酶(E3, Ubiquitin-ligating enzyme),通过 3 种酶的协同作用将泛素分子连接到靶蛋白上,最终由 26 S 蛋白酶体催化靶蛋白的降解。其中,E3 泛素连接酶在特异性识别目标靶蛋白中起决定性作用。植物中已经知道的 E3 主要包括单亚基类型如 HECT 型、Ring 型、U-box 型以及多亚基类型如 SCF 复合体两大类,它们在植物的生长发育及其对逆境胁迫的应答中起着重要作用^[4]。大量研究表明,E3 泛素连接酶在多种非生物胁迫中均有响应^[5]。Liu 等^[6]发现,在烟草中异源过表达水稻 RING 型 E3 泛素连接酶基因 *OsBIRF1*,能够显著增强植株对干旱的耐受性。Gao 等^[7]在水稻中发现 RING 型 E3 泛素连接酶 *OsSDIR1* 能够在干旱胁迫下增加气孔关闭的数量,从而减少叶片的失水率,使植物获得抗旱性。Ning 等^[8]从水稻中分离出 RING 型 E3 泛素连接酶 *OsDIS1*,该基因的过表达使得转基因水稻植株的耐旱性下降,而通过 RNA 干扰沉默该基因增强了耐旱性。进一步研究发现 *OsDIS1* 可以与 *OsNek6* 互作,且能够在体外通过泛素化降解 *OsNek6*,*OsNek6* 受干旱和盐胁迫上调,因此推测 *OsDIS1* 可能通过泛素化修饰 *OsNek6* 负调控了水稻对干旱胁迫的应答^[9]。Lim 等^[10]研究发现定位于叶绿体的 RING-finger 型 E3 连接酶 *OsCTR1* 可以正向调节水稻的抗旱性。受低温和高温诱导的 *OsHCII* 过表达植株具有耐高温特性^[11]。Sharma 等^[12]证明水稻

OsSAP7 有 E3 泛素连接酶活性,且是 ABA 应激信号的负调控因子。方慧敏^[13]研究发现,水稻 E3 泛素连接酶基因 *ZFIP1* 过表达的转基因植株盐胁迫敏感性提高,相反,RNAi 干涉的转基因植株盐胁迫敏感性降低。范锡麟等^[14]研究发现水稻 RING 型 E3 基因 *OsRING6* 可能是盐胁迫早期响应的重要调控基因,其调节依赖于 ABA 信号通路,同时参与干旱胁迫的应答。冷欢^[15]在黑果枸杞中研究发现,E3 泛素连接酶基因 *LrMCIP8-like* 的过表达能使种子萌发期对盐胁迫抗性得以提高。李龙^[16]研究了拟南芥 E3 泛素连接酶基因 *PUB30* 与 *PUB31* 耐盐功能,结果表明,在萌发过程中 *AtPUB30* 对盐胁迫有负调控作用,相反,*AtPUB31* 正调控耐盐性。Du 等^[17]从大豆中获得了一个 RING 型 E3 泛素连接酶基因 *GmRFPI*,该基因受 ABA 和盐胁迫的上调,并受到寒冷和干旱的下调。吴学闯等^[18]利用核蛋白筛选系统(NTT)筛选大豆干旱处理 5 h 的 cDNA 文库,获得了一个 C3 HC4-type RING 锌指蛋白基因 *GmRZFPI*,该基因受干旱、高盐、高温、低温、乙稀和 ABA 等胁迫诱导表达,表明该蛋白涉及多种胁迫相关的信号途径。张孝廉等^[19]根据耐铝毒 QTL 定位和候选基因功能预测的 E3 连接酶基因序列,克隆得到两个基因 *GmARI1* 和 *GmAIR2*,Real-time PCR 结果显示,这两个基因在 Al^{3+} 、 Na^{+} 、IAA 的处理下表达量均有所增加,且 *GmARI1* 基因在各处理下的表达量都比 *GmAIR2* 要高,说明 *GmARI1* 基因的过量表达能够提高植物的耐铝性。

AIRP[abscisic acid(ABA)-insensitive RING protein]是由 ABA 和多种胁迫处理诱导的 RING 型 E3 泛素连接酶。近年来,在拟南芥中发现了 4 个成员,分别是 *AtAIRP1/2/3/4*,它们都属于 RING 型 E3 泛素连接酶基因。2011 年,Cho 等^[20]在拟南芥中分离出了 *AtAIRP1* 基因,研究表明,*AtAIRP1* 能够正调控植物对盐和干旱胁迫的响应。Oh 等^[21]从拟南芥中获得 *AtAIRP2*,正调节 ABA 参与的生理过程,如种子萌芽、气孔关闭以及耐旱性。2016 年,Liang 等^[22]研究发现当拟南芥中缺乏 *AtAIRP4* 基因时,植株的表现是根会伸长,当基因过表达时,发现种子萌发对盐胁迫高度敏感,相反对抗干旱的作

用增强,说明 *AtAIRP4* 基因可能是干旱途径的正向调节因子,盐途径的负向调节因子。Kim 等^[23]证明 *AtAIRP1/2/3/4* 及 *RHA2a/2b* 都是 ABA 信号通路的正调控因子,同时,在植物中过表达这些蛋白的基因,可以降低 ABA 介导的气孔开放程度,增强植物的抗旱表型。而对于大豆 *GmAIRP1* 的功能研究未见报道。本研究以合丰 45 为材料,克隆大豆 E3 泛素连接酶基因 *GmAIRP1* 的 cDNA 全长序列,进行生物信息学及 ABA 和逆境诱导下的表达特性分析,并对转基因烟草进行表型和生理生化分析,以明确 *GmAIRP1* 在大豆响应高盐、干旱胁迫中的作用,为进一步研究 *GmAIRP1* 在大豆抵御逆境胁迫中的作用机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 植物材料与处理方法

所用大豆种子为合丰 45。将大豆种子播种于蛭石中,在温度为 24~28 °C 的温室中培养,当幼苗长至第 1 片三出复叶时,取其嫩叶,液氮速冻后置于 -80 °C 冰箱保存,用于基因克隆。然后将幼苗移栽到 Hoagland 营养液中,当幼苗长至第 3 片三出复叶时,在干燥的蛭石中分别浇入含 200 mmol/L NaCl、20% PEG6000、100 μmol/L ABA 的 Hoagland 溶液,进行盐胁迫、干旱胁迫和 ABA 胁迫处理,分别提取处理 0.5 h、1 h、1.5 h、3 h、6 h、12 h 和 24 h 的幼苗嫩叶的总 RNA,反转录成 cDNA 第一链,通过半定量 RT-PCR 分析 *GmAIRP1* 基因的表达模式。

1.2 *GmAIRP1* 的克隆、蛋白结构域分析和系统进化分析

根据拟南芥 *AtAIRP1* (NM-118474) 氨基酸序列,在大豆基因组数据库 (www.phytozome.com/soybean) 中进行同源检索,根据检索到的序列设计引物,并分别在引物 5' 端引入 *Bam*HI 和 *Sac*I 识别位点,引物序列如下(下划线表示酶切位点):

GmAIRP1-F: 5' CGGGATCCATGGGCGGTTGCTGTTGT 3'

GmAIRP1-R: 5' GGAGCTCTTATTCAATGGGAGGGTCG 3'

以大豆 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,反应条件为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 54 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 40 s, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后胶回收目的片段,然后将其与 pMD19-T 载体连接并转化大肠杆菌感受态,挑选阳性克隆进行测序。用 <http://www>.

ncbi.nlm.nih.gov/cdd/ 分析基因编码蛋白的保守结构域,用 MEGA5.0 进行 neighbor-joining 系统进化树分析。

1.3 *GmAIRP1* 在逆境诱导下的表达分析

利用天根生物科技有限公司的总 RNA 提取试剂盒 RNAPrep pure Plant Kit 提取不同胁迫处理的大豆总 RNA,然后利用东洋纺生物有限公司的反转录试剂盒 First Strand cDNA Synthesis Kit 合成 cDNA,以大豆 *GmActin* (GenBank accession number V00450) 为内参基因进行 *GmAIRP1* 基因的半定量 RT-PCR 分析。*GmActin* 引物序列如下:

GmActin-F: GTTCTCTCCTTGTATGCAAGTG

GmActin-R: CCAGACTCATCATATTCACTTTA

1.4 *GmAIRP1* 植物表达载体的构建、对烟草的遗传转化及分子鉴定

用 *Bam*HI 和 *Sac*I 分别酶切表达载体 pBI121 和中间质粒 pMD-*GmAIRP1*,回收目的产物,于 16 °C 连接过夜后转化 *E.coli* DH5 α 感受态细胞,通过酶切鉴定阳性克隆,获得植物表达载体 pBI-*GmAIRP1*。

通过三亲杂交法将 pBI-*GmAIRP1* 转化至农杆菌 EHA105 中。然后用其菌液侵染烟草叶片,经过暗培养、芽诱导、生根阶段培养后获得卡那抗性再生苗,待根长到 6~7 cm 时进行移栽。提取再生苗 DNA 和 RNA,进行 PCR 和 RT-PCR 鉴定。

1.5 转 *GmAIRP1* 烟草的抗逆表型分析

选取 PCR 鉴定的阳性烟草植株的幼叶叶片进行组织培养,对无性扩繁获得的再生苗进一步进行 PCR 鉴定。待阳性幼苗长出 2~3 片幼叶时,选取长势一致的转基因幼苗,置于分别含有 200 mmol/L NaCl、200 mmol/L 甘露醇的 1/2 MS 培养基中进行盐和干旱胁迫处理,3 株为 1 组,以野生型幼苗为对照,胁迫 21 d 后观察幼苗生长状态。

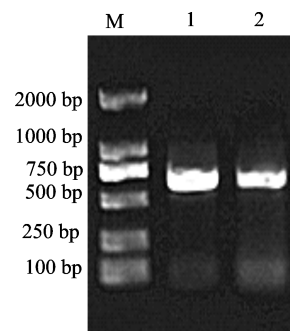
1.6 转 *GmAIRP1* 烟草的逆境相关生理指标测定

选取无性扩繁获得的长势一致的转基因幼苗,每 3 株为 1 组栽种于蛭石中,用 Hoagland 溶液浇灌培养 1 个月后,将植株移入 Hoagland 溶液中培养 2 d,然后用含有 200 mmol/L NaCl、20% PEG6000 的 Hoagland 溶液分别进行盐胁迫和干旱胁迫处理。在处理 1 d、2 d、3 d 时取材,测定植株叶片的过氧化物酶 (POD) 和过氧化氢酶 (CAT) 活性、丙二醛 (MDA) 含量、游离脯氨酸含量等生理指标^[24]。实验重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 *GmAIRP1* 的克隆、蛋白结构域分析和系统进化分析

以 cDNA 为模板,通过 RT-PCR 扩增获得一条约 640 bp 的目的条带(图 1)。测序结果表明,该基因片段全长为 642 bp,为一个完整的开放读码框,编码 213 个氨基酸,命名为 *GmAIRP1*。*GmAIRP1* 编码蛋白的结构域分析表明,该蛋白序列具有典型的 RING-finger 结构域,位于第 162~202 位氨基酸之间(图 2),是一个 RING-H2 (C3 H2 C3) 型蛋白。RING-finger 结构域是该基因的主要功能区域,决定了 E3 泛素连接酶的活性。



1~2: *GmAIRP1* 基因的 RT-PCR 扩增产物; M: DL2000 DNA 分子量
1-2: RT-PCR products of *GmAIRP1* gene; M: DL2000 DNA marker

图 1 *GmAIRP1* 基因的 RT-PCR 扩增产物电泳

Fig.1 Electrophoresis of RT-PCR products of *GmAIRP1* gene

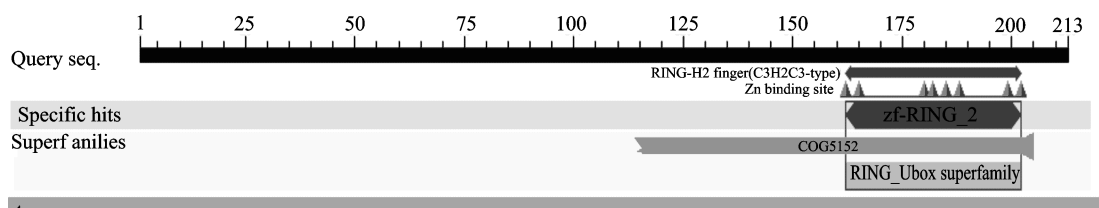


图 2 *GmAIRP1* 蛋白的功能结构域分析

Fig.2 Functional domain analysis of *GmAIRP1* protein

从 NCBI 上获得蒺藜苜蓿、拟南芥、棉花、白菜、黄瓜等 12 种植物的 AIRP1 蛋白序列,与大豆 *GmAIRP1* 的蛋白序列构建系统进化树,结果表明,

大豆 *GmAIRP1* 与蒺藜苜蓿 MtAIRP1 (KEH21097.1) 的亲缘关系最近,同源性最高(图 3)。

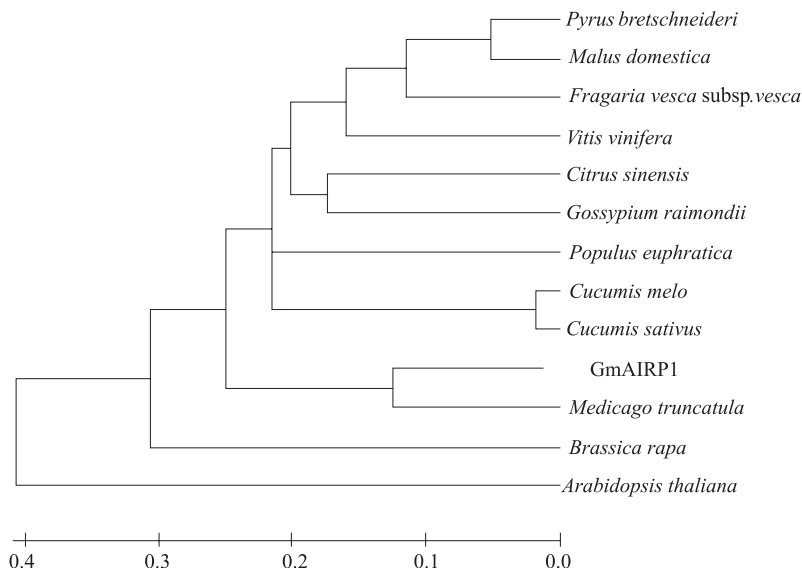


图 3 *GmAIRP1* 蛋白的系统进化关系

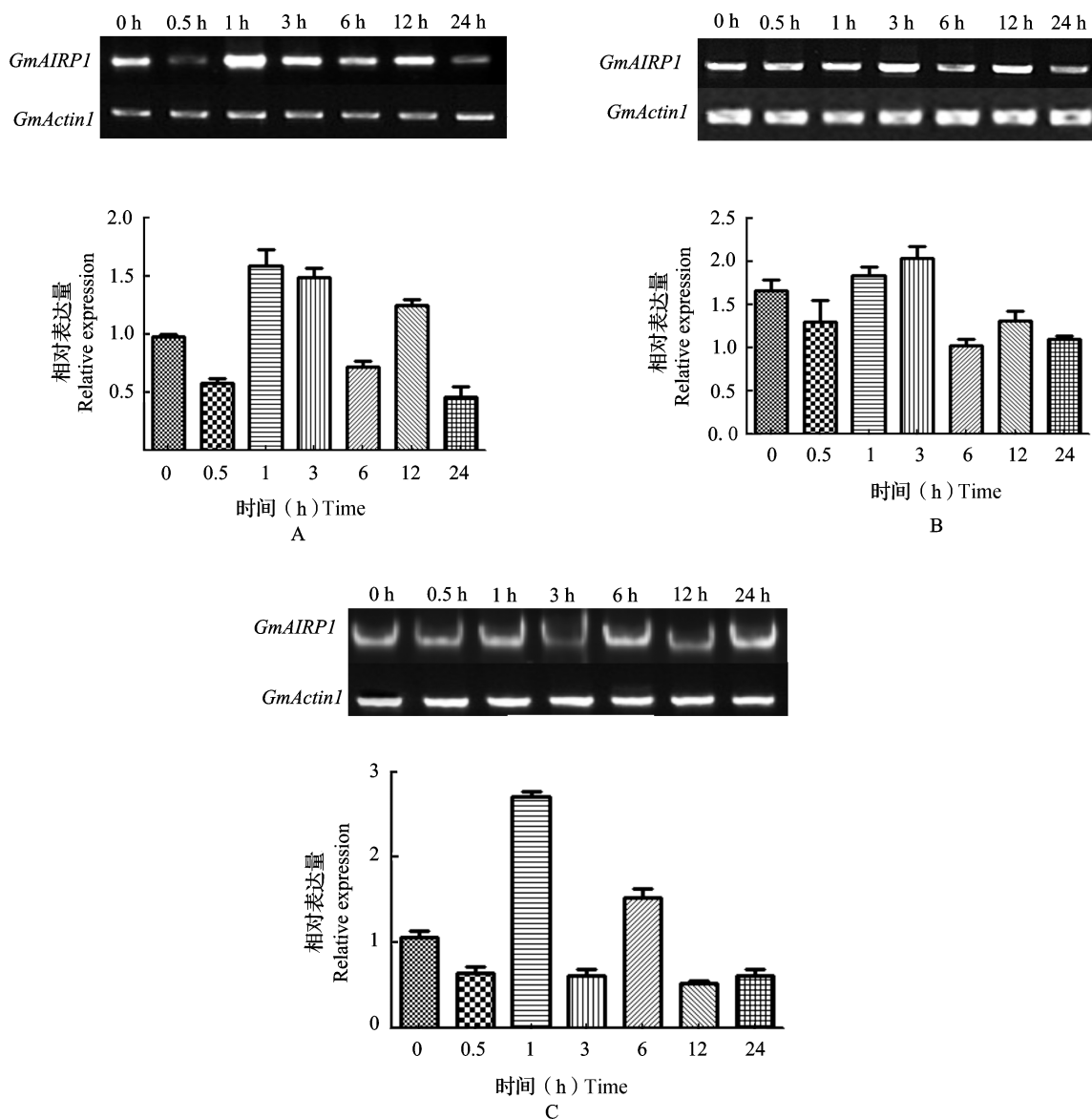
Fig.3 Phylogenetic relationships of *GmAIRP1* protein

Pyrusbretschneideri Rehder: 梨 XP_009375014.1, *Malus domestica* (Suckow) Borkh.: 苹果 XP_008392592.1, *Fragaria vesca* L. subsp. vesca: 野草莓 XP_011463907.1, *Vitis vinifera* L.: 葡萄 XP_002280000.1, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck: 橙子 XP_006476531.1, *Gossypium raimondii* Ulbr.: 棉花 KJB20630.1, *Populus euphratica* Olivier: 胡杨 XP_011029314.1, *Cucumis melo* L.: 甜瓜 XP_008437308.1, *Cucumis sativus* L.: 黄瓜 XP_004143894.1, *Medicago truncatula* Gaertn.: 蒺藜苜蓿 KEH21097.1, *Brassica rapa* L.: 白菜 XP_009140086.1, *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.: 拟南芥 NM_118474

2.2 *GmAIRP1* 在逆境胁迫下的表达分析

为研究 *GmAIRP1* 在大豆响应逆境胁迫中的功能, 利用半定量 RT-PCR 检测了 *GmAIRP1* 在高盐、干旱和 ABA 诱导下的表达模式, 结果显示, 在高盐处理初期 (0.5 h), *GmAIRP1* 基因的表达量有所下降, 在处理 1 h 时表达量达到最大值, 是对照的 1.6 倍, 并且在 1 h 和 3 h 时维持一个比较高的表达水平, 之后

呈现出先下降后升高又下降的趋势 (图 4A)。在 20% PEG6000 模拟干旱处理后, *GmAIRP1* 基因的表达趋势在 3 h 内与盐胁迫类似, 在胁迫 3 h 时表达量达到最大值, 之后迅速下降并一直低于对照水平 (图 4B)。在 ABA 处理后, 0.5 h 时表达量下降, 1 h 时迅速上升至最大值, 是对照的 2.7 倍, 之后表达量下降, 12 h 后表达量趋于平稳, 且一直低于对照 (图 4C)。



A: NaCl 胁迫; B: 干旱胁迫; C: ABA 诱导

A: NaCl stress, B: Drought stress, C: ABA induction

图 4 *GmAIRP1* 在逆境胁迫下的表达模式

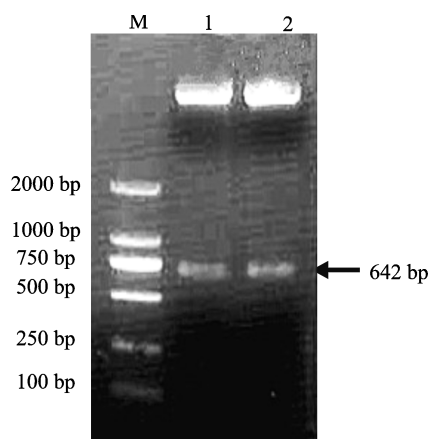
Fig.4 Expression patterns of *GmAIRP1* under different stress

综上所述, 在处理初期 (0.5 h) 3 种胁迫均引起 *GmAIRP1* 表达下调, 之后在 1 h 或 3 h 表达量达到峰值, 说明短时间内 3 种胁迫均可诱导该基因的上调表达。

2.3 *GmAIRP1* 植物表达载体的构建及转基因植株鉴定

用 *Bam*HI 和 *Sac*I 分别酶切 pMD-*GmAIRP1* 质粒与 pBI121 载体质粒, 回收去 *gus* 的 pBI121 和目

的基因 *GmAIRP1*, 通过 T_4 DNA 连接酶连接并转化 *E.coli*, 重组质粒双酶切获得 642 bp 的目的基因片段 (图 5), 证明 pBI-*GmAIRP1* 载体构建成功。将 pBI-*GmAIRP1* 导入农杆菌 EHA105 后侵染烟草, 得到卡那抗性再生植株, 从 PCR 鉴定的阳性植株中随机选取 3 株提取总 RNA, 用目的基因引物进行 RT-PCR 检测, 结果均为阳性 (图 6)。

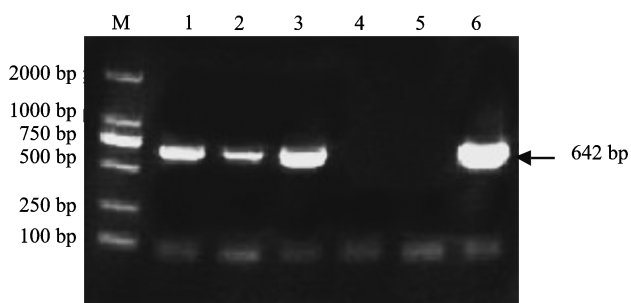


1~2: 重组质粒酶切产物

1-2: recombinant plasmid pases

图 5 重组质粒 pBI-*GmAIRP1* 的双酶切鉴定

Fig.5 Double enzyme digestion of recombination plasmid pBI-*GmAIRP1*



1~3: 转基因植株; 4: 野生型植株; 5: 水; 6: pBI-*GmAIRP1*

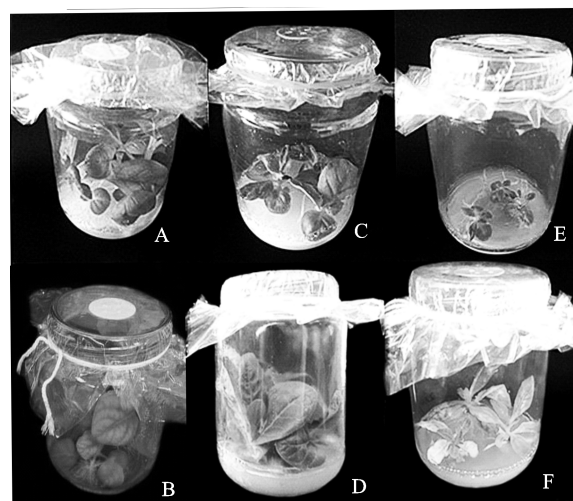
1-3: Transgenic plants, 4: Wild type, 5: Water, 6: pBI-*GmAIRP1*

图 6 转基因植株的 RT-PCR 鉴定

Fig.6 RT-PCR identification of transgenic plants

2.4 转 *GmAIRP1* 烟草的抗逆表型分析

在正常生长条件下野生型植株和转基因植株生长发育正常, 茎叶健壮 (图 7A、B); 经 200 mmol/L NaCl 盐胁迫和 200 mmol/L 甘露醇模拟干旱胁迫处理 21 d 后, 野生型植株和转基因植株的生长发育都受到了抑制, 茎叶矮小, 其中干旱处理对生长的抑制作用更大。但相同胁迫条件下, 转基因植株的长势明显优于野生型 (图 7C、D、E、F), 可见, 转 *GmAIRP1* 基因能够提高烟草的耐盐性和抗旱性。



正常条件 200 mmol/L NaCl 200 mmol/L 甘露醇

A、C、E: 野生型植株; B、D、F: 转基因植株

A、C、E: Wild plants, B、D、F: Transgenic plants

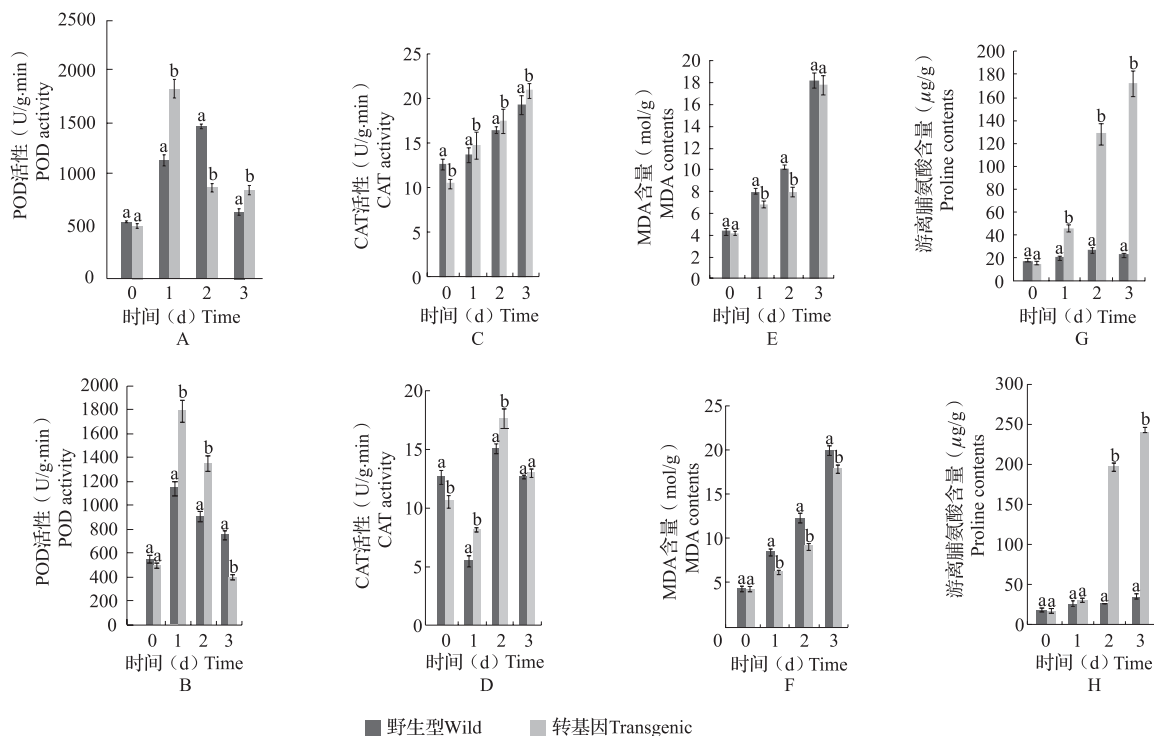
图 7 转基因烟草的抗逆表型分析

Fig.7 Phenotypic analysis of transgenic tobacco under stress

2.5 转 *GmAIRP1* 烟草的逆境相关生理指标测定

从图 8A-B 可知, 在盐胁迫和干旱胁迫前野生型烟草和转基因烟草 POD 活性差异不大, 胁迫后 POD 活性均迅速升高, 大致呈现出先升高后降低的趋势。胁迫第 1 天, 两种胁迫下转基因植株的 POD 活性均达到最大峰值, 明显高于野生型。随着胁迫时间延长, 野生型和转基因植株 POD 活性均下降, 可能是随着胁迫时间的增长, 植株的抗氧化酶系统遭到一定程度的破坏所致。从图 8C-D 可知, 盐胁迫下转基因植株和野生型植株的 CAT 活性均呈现逐渐上升的趋势; 干旱胁迫下两组植株的 CAT 活性变化大致呈现先下降后上升最后下降的趋势, 在胁迫第 2 天达到峰值。不论在何种胁迫处理下, 转基因植株的 CAT 活性均高于野生型。从图 8E-F 可知, 盐和干旱胁迫下, 转基因植株与野生型植株的 MDA 含量都不断累积, 但转基因植株 MDA 含量均低于野生型植株, 表明膜质过氧化程度低于野生型植株。从图 8G-H 可知, 盐和干旱胁迫下, 转基因植株的游离脯氨酸含量随着胁迫天数的增加呈迅猛上升趋势, 虽然野生植株的游离脯氨酸含量也有所上升, 但是上升幅度小, 显著低于转基因植株的游离脯氨酸含量。

综上所述, 高盐和干旱胁迫下, *GmAIRP1* 基因的表达能更有效地启动植株的抗氧化酶系统, 提高抗氧化酶活性, 以降低胁迫对膜的损伤程度, 同时能通过提高脯氨酸含量来增强植株的渗透调节能力, 从而增强植株抵御逆境的能力。



A、C、E、G: 200 mmol/L NaCl 胁迫处理; B、D、F、H: 20% PEG6000 胁迫处理;

不同字母表示在 0.05 水平上差异显著

A、C、E、G: 200 mmol/L NaCl stress, B、D、F、H: 20% PEG6000 stress,

By a different letter are significantly different at 5% probability level

图 8 盐和干旱胁迫下转基因烟草和野生型烟草的生理指标分析

Fig.8 Physiological analysis of transgenic and wild tobacco under salt and drought stress

3 讨论

在植物生长发育过程中,会受到许多逆境胁迫的影响,盐碱和干旱是限制植物生长、降低作物产量的最主要因素。在长期进化过程中,植物体内形成了多种应答逆境胁迫的防御机制,涉及的基因表达的调节发生在转录、转录后水平和翻译及翻译后水平多个层面上,其中泛素化修饰是蛋白翻译后修饰的重要手段,也是植物应答胁迫的一个重要调控机制。泛素化的作用机理一方面是通过传导逆境信号引起细胞内相应基因表达的调节以抵御逆境;另一方面通过 26 S 蛋白酶体系统降解泛素化标记的由逆境造成损伤的蛋白质,从而维持细胞的稳态和正常的生理功能。E3 泛素连接酶作为泛素化过程中的主要成员,对特异性识别底物有着关键性作用,参与了盐、干旱胁迫应答、ABA 信号转导等过程^[25]。

大量的研究证明 E3 泛素连接酶在拟南芥^[26]、水稻^[27-28]、番茄^[29]、大豆^[30]等植物响应非生物胁迫中发挥重要作用。拟南芥 *AtAIRP1* 是在筛选 ABA 不敏感突变体过程中鉴定出来的。*AtAIRP1* 转基因植物与野生型相比,对 ABA 更为敏感以及对干

旱有着很高的耐受性;ABA 处理后,明显提高了 *AtAIRP1* 转基因植物中与干旱胁迫有关的一些基因以及与 ABA 有关的 bZIP 转录因子的表达,说明 *AtAIRP1* 通过依赖 ABA 信号通路,对干旱胁迫起着正调控作用^[31]。*AtAIRP3/LOG2* 是拟南芥中的一个 RING-finger 型泛素连接酶 E3,对其突变体 *atairp3/log2-2* 的研究表明,在干旱和高盐条件下,植株敏感性显著提高,气孔关闭程度降低,这表明 *AtAIRP3/LOG2* 对植物干旱和盐胁迫起着正向调节作用^[32]。拟南芥中的 *AtSAP5* 能够增强植物对干旱的耐受性,可能是通过 ABA 依赖性和 ABA 非依赖性的交叉作用来调节对干旱的响应^[33]。Liang 等^[22]在拟南芥中过表达了 RING 型 E3 基因 *AtAIRP4*,发现种子在萌发过程中对渗透压非常敏感,并且提高了与 ABA 和干旱相关标记基因的表达, *AtAIRP4* 对干旱胁迫有积极响应作用,可能是通过调节 ABA 信号通路控制气孔运动的途径来实现的。本研究从大豆中克隆了一个与拟南芥 *AtAIRP1* 同源的基因 *GmAIRP1*,并对大豆幼苗在不同处理下 *GmAIRP1* 基因的表达模式进行了测定与分析,结果表明, *GmAIRP1* 基因对高盐、干旱和 ABA 诱导均有响应,

在 1 h 或 3 h 时表达量达到峰值,大致都呈现先下降再升高最后又下降的趋势,说明 *GmAIRP1* 可能是大豆响应干旱、高盐胁迫的重要调控因子,且其调节过程与 ABA 有关。

通过农杆菌介导的叶盘法,将 *GmAIRP1* 基因转入野生烟草中,获得转基因烟草,当植株处于高盐和干旱胁迫条件下,转基因植株的生长状态明显优于野生型植株,与 Ryu 等^[31]报道的过表达拟南芥 *AtAIRP1* 提高植物耐旱性的结果一致,因此说明 *GmAIRP1* 基因对盐胁迫和干旱胁迫具有正向调控作用。我们进一步测定了转基因烟草在逆境胁迫下的相关生理指标,结果表明,转基因烟草中脯氨酸的积累和抗氧化酶的活性总体上高于野生型对照,MDA 的含量则低于对照,说明 *GmAIRP1* 能够通过提高脯氨酸的含量以维持细胞的渗透平衡,同时能够迅速激活抗氧化防御系统以减轻自由基对机体的氧化损伤,从而保护了膜脂的稳定性,推测 *GmAIRP1* 能够传导逆境信号激活渗透胁迫和抗氧化酶系相关基因的表达,这可能是转基因烟草的耐盐和耐旱性提高的重要原因。但 *GmAIRP1* 调控的相关基因及其泛素化的靶蛋白有待进一步鉴定,以深入揭示其抗逆机理。

本研究克隆获得 *GmAIRP1*,该基因全长 642 bp,编码 213 个氨基酸。*GmAIRP1* 蛋白序列具有典型的 RING-finger 结构域,位于第 162~202 位氨基酸之间,是一个 RING-H2 (C3 H2 C3) 型蛋白;进化树分析显示 *GmAIRP1* 与蒺藜苜蓿 *MtAIRP1* 同源性最高。*GmAIRP1* 在 200 mmol/L NaCl、20% PEG6000 和 100 μmol/L ABA 胁迫条件下均能表达,并在短时间内表达量显著提高;*GmAIRP1* 转基因植株在高盐、干旱胁迫条件长势优于野生型植株,并且转基因植株清除自由基和调节渗透压的能力总体高于野生植株,说明 *GmAIRP1* 参与了植物的抗逆调控过程,但具体作用机制和其他参与蛋白还不清楚,需要进一步的研究。

参考文献

- [1] Luo L J. Breeding for water-saving and drought resistance rice (WDR) in China. *Journal of Experimental Botany*, 2010, 61: 3509-3517
- [2] Yang S J, Vanderbeld B, Wan J X, Huang Y F. Narrowing down the targets: towards successful genetic engineering of drought-tolerant crops. *Molecular Plant*, 2010, 3: 469-490
- [3] Ahuja I, de Vos RCH, Bones A M, Hall R D. Plant molecular stress responses face climate change. *Trends Plant Science*, 2010, 15: 664-674
- [4] 戴阳朔,董铮,李魏,戴良英. 水稻 E3 泛素连接酶研究进展. *作物研究*, 2013, 27(3): 279-283
Dai Y S, Dong Z, Li W, Dai L Y. Research advance on ubiquitin ligase E3 in rice. *Journal of Crop Research*, 2013, 27(3): 279-283
- [5] 宋素胜,谢道昕. 泛素蛋白酶体途径及其对植物生长发育的调控. *植物学通报*, 2006, 23(5): 564-577
Song S S, Xie D X. The ubiquitin-proteasome pathway and plant development. *Botanical Bulletin*, 2006, 23(5): 564-577
- [6] Liu H Z, Zhang H J, Yang Y Y, Li G J, Yang Y X, Wang X E, Basnayake B M, Li D Y, Song F M. Functional analysis reveals pleiotropic effects of rice RING-H2 finger protein gene *OsBIRF1* on regulation of growth and defense responses against abiotic and biotic stresses. *Plant Molecular Biology*, 2008, 68(1): 17-30
- [7] Gao T, Wu W R, Zhang Y Y, Liu L J, Ning Y S, Wang D J, Tong H N, Chen S Y, Chu C C, Xie Q. *OsSDIR1* overexpression greatly improves drought tolerance in transgenic rice. *Plant Molecular Biology*, 2011, 76(1): 145-156
- [8] Ning Y S, Jantasuriyarat C, Zhao Q Z, Zhang H W, Chen S B, Liu J L, Liu L J, Tang S Y, Park C H, Wang X J, Liu X L, Dai L Y, Xie Q, Wang G L. The SINA E3 ligase *OsDIS1* negatively regulates drought response in rice. *Plant Physiology*, 2011, 157(1): 242-255
- [9] Ning Y S, Xie Q, Wang G L. *OsDIS1*-mediated stress response pathway in rice. *Plant Signaling & Behavior*, 2011, 6(11): 1684-1686
- [10] Lim S D, Lee C, Jang C S. The rice RING E3 ligase, *OsCTR1*, inhibits trafficking to the chloroplasts of *OsCPI2* and *OsRP1*, and its overexpression confers drought tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ*, 2014, 37(5): 1097-1113
- [11] Lim S D, Cho H Y, Park Y C, Ham D J, Lee J K, Jang C S. The rice RING finger E3 ligase, *OsHC11*, drives nuclear export of multiple substrate proteins and its heterogeneous overexpression enhances acquired thermotolerance. *Journal of Experimental Botany*, 2013, 64(10): 2899-2914
- [12] Sharma G, Giri J, Tyagi A K. Rice *OsiSAP7* negatively regulates ABA stress signalling and imparts sensitivity to water deficit stress in *Arabidopsis*. *Plant Science*, 2015, 237: 80-92
- [13] 方慧敏. 两个 E3 泛素连接酶基因在水稻耐非生物逆境胁迫中的作用研究. 南京: 南京农业大学, 2014
Fang H M. Functional analysis of two E3 ligases genes in rice (*Oryza sativa* L.) tolerant to abiotic stresses. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2014
- [14] 范锡麟,杜强,杨珍珍,何艳冰,王国梁,王志龙. 水稻泛素连接酶基因 *OsRING6* 的克隆及表达分析. *植物遗传资源学报*, 2016, 17(2): 337-343
Fan X L, Du Q, Yang Z Z, He Y B, Wang G L, Wang Z L. Cloning and expression analysis of the rice ubiquitin ligase gene *OsRING6*. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2016, 17(2): 337-343
- [15] 冷欢. 黑果枸杞泛素 E3 连接酶 *ArMCIP8-like* 基因克隆及功能研究. 兰州: 兰州大学, 2014
Leng H. Cloning and functional analysis of a ubiquitin ligase E3 *LrMCIP8-like* gene from *Lycium ruthenicum murr.* Lanzhou: Lanzhou University, 2014
- [16] 李龙. 拟南芥 E3 泛素连接酶 PUB30 与 PUB31 耐盐功能

- 分析及互作的 14-3-3 蛋白的筛选. 沈阳: 沈阳农业大学, 2016
- Li L. The salt tolerance analysis of *Arabidopsis thaliana* E3 ubiquitin ligase PUB30 and PUB31 and screening their interacting 14-3-3 proteins. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2016
- [17] Du Q L, Cui W Z, Zhang C H, Yu D Y. *GmRFP1* encodes a previously unknown RING-type E3 ubiquitin ligase in soybean (*Glycine max*). Molecular Biology Reports, 2010, 37: 685-693
- [18] 吴学闯, 曹新有, 陈明, 张晓科, 刘阳娜, 徐兆师, 李连城, 马有志. 大豆 C3 HC4 型 RING 锌指蛋白基因 *GmRZFP1* 克隆与表达分析. 植物遗传资源学报, 2010, 11 (3): 343-348
- Wu X C, Cao X Y, Chen M, Zhang X K, Liu Y N, Xu Z S, Li L C, Ma Y Z. Isolation and expression pattern assay of a C3 HC4-type RING zinc finger protein gene *GmRZFP1* in *Glycine max* (L.). Journal of Plant Genetic Resources, 2010, 11 (3): 343-348
- [19] 张孝廉. 大豆 E3 泛素连接酶基因 *GmARI* 的克隆与功能验证. 南京: 南京农业大学, 2012
- Zhang X L. Cloning and functional study of a soybean E3 ubiquitin ligase gene *GmARI*. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2012
- [20] Cho S K, Ryu M Y, Seo D H, Kang B G, Kim W T. The *Arabidopsis* RING E3 ubiquitin ligase *AtAIRP2* plays combinatory roles with *AtAIRP1* in abscisic acid-mediated drought stress responses. Plant Physiology, 2011, 157: 2240-2257
- [21] Oh T R, Kim J H, Cho S K, Ryu M Y, Yang S W, Kim W T. *AtAIRP2* E3 Ligase affects ABA and high salinity responses by stimulating its ATP1/SDIRIP1 substrate turnover. Plant Physiology, 2017, 174: 2515-2531
- [22] Liang Y, Liu Q H, Liu Z B, Yang H, Wang J M, Li X F, Yang Y. *Arabidopsis* C3 HC4-RING finger E3 ubiquitin ligase *AtAIRP4* positively regulates stress-responsive abscisic acid signaling. Journal of Integrative Plant Biology, 2016, 58 (1): 67-80
- [23] Kim J H, Kim W T. The *Arabidopsis* RING E3 ubiquitin ligase *AtAIRP3/LOG2* participates in positive regulation of high-salt and drought stress responses. Plant Physiology, 2013, 162 (3): 1733-1749
- [24] 张志良, 瞿伟菁. 植物生理学实验指导. 3 版. 北京: 高等教育出版社, 2003: 70-73
- Zhang Z L, Qu W J. Plant physiology experiment guide. third edition. Beijing: Higher Education Press, 2003: 70-73
- [25] Li H M, Jiang H L, Bu Q Y, Zhao Q Z, Sun J Q, Xie Q, Li C Y. The *Arabidopsis* RING finger E3 ligase RHA2 b acts additively with RHA2 a in regulating abscisic acid signaling and drought response. Plant Physiology, 2011, 156 (2): 550-563
- [26] Tian M L, Lou L J, Liu L J, Yu F F, Zhao Q Z, Zhang H W, Wu Y Y, Tang S Y, Xia R, Zhu B G, Serino G, Xie Q. The RING finger E3 ligase *STRF1* is involved in membrane trafficking and modulates salt-stress response in *Arabidopsis thaliana*. The Plant Journal, 2015, 82: 81-92
- [27] Hwang S G, Park H M, Han A R, Jang C S. Molecular characterization of *Oryza sativa* arsenic-induced RING E3 ligase 1 (*OsAIR1*): Expression patterns, localization, functional interaction, and heterogeneous overexpression. Journal of Plant Physiology, 2016, 191: 140-148
- [28] Liu J P, Zhang C C, Wei C C, Liu X, Wang M G, Yu F F, Xie Q, Tu J M. The RING finger ubiquitin E3 ligase *OsHTAS* enhances heat tolerance by promoting H₂O₂-induced stomatal closure in rice. Plant Physiology, 2016, 170: 429-443
- [29] Qi S L, Lin Q F, Zhu H S, Zhang W H, Hua X J. The RING finger E3 ligase *SpRing* is a positive regulator of salt stress signaling in salt-tolerant wild tomato species. Plant and Cell Physiology, 2016, 57: 528-539
- [30] Zhang X L, Wang N, Chen P, Gao M M, Liu J G, Wang Y F, Zhao T J, Li Y, Gai J Y. Overexpression of a soybean ariadne like ubiquitin ligase gene *GmARI1* enhances aluminum tolerance in *Arabidopsis*. PLoS One, 2014, 9: 1-11
- [31] Ryu M Y, Cho S K, Kim W T. The *Arabidopsis* C3 H2 C3-type RING E3 ubiquitin ligase *AtAIRP1* is a positive regulator of an abscisic acid-dependent response to drought stress. Plant Physiology, 2010, 154: 1983-1997
- [32] Bae H, Kim S K, Cho S K, Kang B G, Kim W T. Overexpression of *OsRDCP1*, a rice RING domain-containing E3 ubiquitin ligase, increased tolerance to drought stress in rice (*Oryza sativa* L.). Plant Science, 2011, 180: 775-782
- [33] Kang M Y, Fokar M, Abdelmageed H, Allen R D. *Arabidopsis* *SAP5* functions as a positive regulator of stress responses and exhibits E3 ubiquitin ligase activity. Plant Molecular Biology, 2011, 75: 451-466