

马尾松谷胱甘肽过氧化物酶 *PmGPX6* 基因 cDNA 克隆及转化拟南芥耐旱性初步研究

蔡琼^{1,2}, 丁贵杰^{1,2*}, 文晓鹏³

(1. 贵州省森林资源与环境研究中心, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州大学林学院, 贵州 贵阳 550025;
3. 贵州省农业生物工程重点实验室, 贵州 贵阳 550025)

摘要: [目的] 克隆马尾松谷胱甘肽过氧化物酶基因, 并对其进行功能研究。[方法] 采用 RACE 技术克隆基因 cDNA 序列, 实时荧光定量 PCR 检测基因在马尾松干旱胁迫下的表达模式, 花序浸泡法转化拟南芥, 并对转基因与野生型拟南芥的生长表型和根系生长进行分析。利用荧光显微镜技术对转基因拟南芥不定根进行 GFP 荧光检测。[结果] 克隆到 1 个 871 bp 的 *GPX* 基因全长 cDNA 序列, 命名为 *PmGPX6*。*PmGPX6* 包括 513 bp 的完整开放阅读框, 编码 170 个氨基酸残基。*PmGPX6* 蛋白与油松 PtGPX 蛋白同源性达 95%。*PmGPX6* 在马尾松根中高表达, 茎、叶中表达量低。在干旱胁迫下, *PmGPX6* 在根、茎、叶中的表达量均在第 15 天达到最大, 随后出现下降趋势。过表达 *PmGPX6* 与野生型拟南芥植株在正常水分条件下表型与根长差异不大, 但在干旱胁迫下, 转基因植株根系更长。转基因拟南芥根在蓝色光激发下能发出强烈的绿色荧光, 表明 *PmGPX6* 基因能高效表达。[结论] 推测 *PmGPX6* 可能参与马尾松干旱胁迫应答。

关键词: 马尾松; 谷胱甘肽过氧化物酶; 转基因拟南芥; 抗旱性

中图分类号: S791.248

文献标识码: A

Cloning of Glutathione Peroxidase *PmGPX6* Gene from *Pinus massoniana* and the Study on Drought Tolerance of Transgenic *Arabidopsis thaliana*

CAI Qiong^{1,2}, DING Gui-jie^{1,2}, WEN Xiao-peng³

(1. Guizhou Institute for Forest Resources & Environment, Guizhou University, Guiyang 550025, Guizhou, China;

2. College of Forestry, Guizhou University, Guiyang 550025, Guizhou, China;

3. Guizhou Key Laboratory of Agricultural Bioengineering, Guizhou University, Guiyang 550025, Guizhou, China)

Abstract: [Objective] To clone the glutathione peroxidase gene from *Pinus massoniana* and evaluate its gene functions. [Methods] The gene was cloned using RACE methods. Quantitative real-time PCR was used to analyze the gene expression in *P. massoniana* under drought stress. Transgenic *Arabidopsis thaliana* lines were obtained by dipping flowering plants. The phenotypes and root developments of wild-type and transgenic *A. thaliana* were evaluated. The activity of green fluorescence protein on root in transgenic *A. thaliana* plants was studied using fluorescence microscopy. [Results] The designated *PmGPX6* was 871 bp in length with an open reading frame (513 bp), capable of encoding a predicted protein of 170 amino acids. The sequencing analysis indicated that the deduced amino acids shared 95% of identity with PtCBL from *Pinus tabulaeformis*. The expression levels of *PmGPX6* were higher in roots than in stems and leaves, and the *PmGPX6* expression increased in the initial 15 days, and then de-

收稿日期: 2015-09-29

基金项目: 国家自然科学基金(31260183); 国家 863 课题(2011AA10020301); 贵州省重大专项(黔科合重大专项字[2012]6001 号); 国家科技支撑课题(2015BAD09B0102)。

作者简介: 蔡琼(1980—), 男, 山西晋城人, 博士研究生, 主要从事森林培育研究, E-mail: dukecq@sina.com.

* 通讯作者: 丁贵杰(1960—), 男, 教授, 博导, 主要从事森林培育和人工林稳定性方面研究。

creased under drought stress. No differences in the phenotypes and root lengths were observed between the wild-type and transgenic *A. thaliana* under normal conditions containing 0% PEG 6000. Nevertheless, the root lengths of transgenic *A. thaliana* were longer than those of the wild-type lines under drought stress. Bright green fluorescence was observed in transgenic *A. thaliana* under fluorescence microscopy, indicating that *PmGPX6* is expressed efficiently. [Conclusion] These findings indicate that the *PmGPX6* gene may play an important role under drought stress.

Keywords: *Pinus massoniana*; glutathione peroxidase; transgenic *Arabidopsis thaliana*; drought tolerance

干旱、低温、高盐等非生物胁迫是影响林木正常生长的重要因素。研究认为逆境胁迫下植物产生的大量活性氧(Reactive oxygen species, ROS)将会对其造成一定的伤害^[1]。为了防御氧化胁迫,植物产生了一套酶促和非酶促的ROS清除机制来抗ROS胁迫^[2]。其中谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GPXs)是酶促清除机制中的关键酶,通过催化还原型谷胱甘肽(GSH)与过氧化氢反应生成氧化型谷胱甘肽(GSSG)及水,从而阻止OH·自由基的产生,避免由其引发质膜的过氧化,进而保护细胞膜结构和功能的完整性^[3]。模式植物拟南芥有8个编码谷胱甘肽过氧化物酶的基因(*AtGPX 1~8*),这些基因响应不同的非生物胁迫^[4-5],其中,*AtGPX3*在植物响应ABA和干旱胁迫反应中具有重要作用^[6]。降低拟南芥叶绿体中*AtGPX1*与*AtGPX7*的表达,转基因植株的抗光氧化胁迫能力显著降低^[5]。马尾松(*Pinus massoniana* Lamb.)是我国南方最主要用材树种之一^[7],苗木质量的好坏,特别是耐旱能力的强弱,关系到马尾松造林的成败^[8-9],因此,开展马尾松抗旱分子机理研究对我国林业可持续发展具有重要意义。截至目前,马尾松谷胱甘肽过氧化物酶基因克隆和功能分析至今未见公开报道。本研究试图探索谷胱甘肽过氧化物酶基因的生物学功能以及在马尾松中的抗逆作用,以期为马尾松基因遗传改良提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料与试剂

选用高抗旱马尾松优良家系83号(广西)1年生幼苗为供试材料^[10-12]。植株平均高度为17.2 cm。培养容器为塑料盆(27 cm × 18 cm × 25 cm),基质黄壤和干净河砂按V(黄壤):V(河砂)=9:2混合构成。设对照(土壤相对含水量为70% ± 5%)和中度胁迫(土壤相对含水量为40% ± 5%)2个处理。干旱胁迫实施1、5、10、15、20、25 d分根、茎、叶

取试材,液氮冷冻,保存于-80℃,作为实时荧光定量聚合酶链式反应(RT-qPCR)的试验材料。拟南芥为生态型Columbia(Col-0),4℃春化48 h后于23℃、光照12 h·d⁻¹条件下在光照培养箱中培养。

Trizol Reagent、Plant RNA Reagent、5'-RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends等购自Invitrogen公司,大肠杆菌DH5α感受态细胞等购自天根生化科技(北京)有限公司。3'-Full RACE Core Set with PrimeScript™ RTase、pMD-18T Vector等购自TaKaRa公司,PEG 6000等为国产试剂。引物合成由上海捷瑞生物工程有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 总核糖核酸(RNA)的提取及cDNA合成
总RNA的提取参照Trizol Reagent与Plant RNA Reagent试剂盒的方法进行。cDNA第一链的反转录合成使用TaKaRa公司试剂盒(Reverse Transcriptase M-MLV),按试剂盒说明进行操作。

1.2.2 目的基因克隆 以反转录的马尾松针叶互补脱氧核糖核酸(cDNA)为模板,M1与M2(表1)为引物,进行聚合酶链式反应(PCR)扩增,获得*PmGPX6*基因中间片段。反应体系为25.0 μL:cDNA模板1.5 μL,引物各1.0 μL,MasterMix 12.0 μL,重蒸水9.5 μL。PCR反应条件:94℃预变性5 min;94℃变性30 s,47.4℃退火30 s,72℃延伸1 min,共进行35个循环;最后72℃延伸10 min。以GSP1、GSP2和GSP3(表1)为引物,参照5'-RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends说明,扩增目的基因5'端序列。以M3与M4(表1)为引物,参照3'-Full RACE Core Set with PrimeScript™ RTase说明,扩增目的基因3'端序列。北京诺赛基因组研究中心有限公司完成测序。

1.2.3 序列分析 采用DNASar进行基因序列拼接,并在NCBI数据库中进行局部序列比对基本检索工具(BLAST)比对;利用ProtScale软件分析蛋白亲水/疏水性;ExPASy ProtParam tool计算蛋白的等

电点和分子量;DNAMAN 软件进行蛋白质序列的多重比对并构建基因的系统进化树。

1.2.4 马尾松干旱胁迫下 *PmGPX6* 表达分析 特异引物 M5 和 M6(表 1)作为 RT-qPCR 引物,马尾松 18S(表 1)为内标基因^[13]。提取马尾松根、茎、叶总 RNA,反转录成 cDNA,分析 *PmGPX6* 在不同组织的基因表达。参照 SuperReal PreMix Plus(SYBR Green)试剂盒进行 RT-qPCR 反应,每个反应重复 3 次·反应⁻¹。基因相对表达量的计算采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法^[14]。

1.2.5 *PmGPX6* 过表达载体的构建及拟南芥的转化 设计包含酶切位点的引物(M7 和 M8)扩增基因 ORF。反应体系为 25.0 μ L:cDNA 模板 1.5 μ L,引物各 1.0 μ L,MasterMix 12.0 μ L,重蒸水 9.5 μ L。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,53.6 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,共进行 35 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物回收并加 A 后连接到 pMD18-T 载体上,命名为 pMD18-*PmGPX6*,获得的重组子经 PCR 和酶切检测后测序。提取 pMD18-*PmGPX6* 质粒,然后分别对 pMD18-*PmGPX6* 质粒和 pBI121 载体进行 *Bam*H I、*Xba* I 双酶切,用 DNA Ligase kit 将回收的目的基因和载体进行 16 $^{\circ}$ C 过夜连接。将重组质粒 pBI121-*PmGPX6* 进行 PCR 和酶切检测并测序。用冻融法^[15]将构建好的重组质粒 pBI121-*PmGPX6* 转入农杆菌 LBA4404,得到转化菌株。采用花序浸泡法转化拟南芥^[16],收获 PCR 检测为阳性的 T₁ 代种子。将 T₁ 代种子(转基因株系 G1、G2、G4)铺于含 0% 和 3% PEG 6000 的 MS 培养基三角瓶中,于 16 d 观察野生型和转基因拟南芥的表型与根系差异。

1.2.6 转基因拟南芥不定根 GFP 荧光检测 用上海长方光学仪器有限公司倒置荧光显微镜(型号:CFM-500)在蓝色激发光下对转基因拟南芥不定根

表 1 *PmGPX6* 基因克隆、表达及转化使用的引物

引物	引物序列(5'→3')	作用
M1	GAATHCTNGCTTTYCCATGCAATC	扩增保守片段
M2	CCRTCYYTGTGTCNACCARAAACTT	
GSP1	TGTCGACCAAAAACCTTAGT	5'-RACE 扩增 5'末端序列
GSP2	TGTGCATTATCACCTGGTTCTCTG	
GSP3	CTGATTGCATGGAAAAGCGAG	
M3	GAATTCTCGCTTTTCCATGCAATC	3'-RACE 扩增 3'末端序列
M4	CTAAGTTTTTGGTCGACAAAGATGG	
18S-F	TTAGCCATGGAGGTTTGTAG	扩增内标
18S-R	GAGTTGATGACACGCCGCTTA	
M5	TTCACAGTCAAGGACATCAGGGGTAA	荧光引物
M6	CACGGGAAAGCCAGTATTCTTAAC	
M7	GGGTCTAGAATGACTGGGACCT	Adapter 引物
M8	CTTGGATCCAGCAACTCCTAAC	

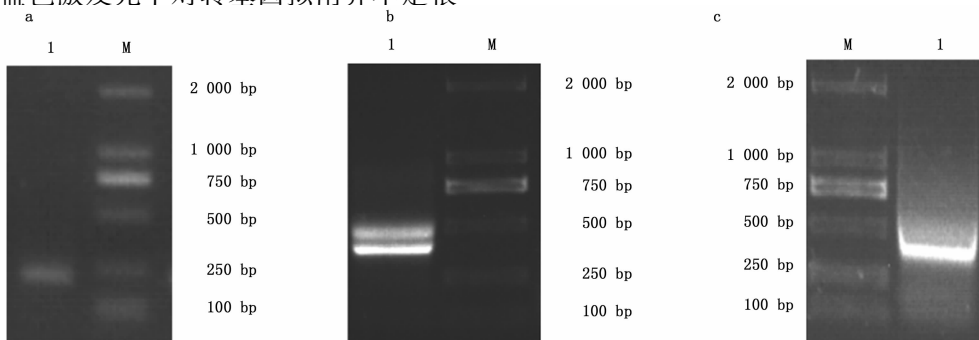
进行荧光检测,用其配套的佳能数码相机(A3300)进行拍照记录。

1.2.7 数据统计分析 采用 SPSS16.0 软件进行数据统计分析,用 ANOVA 模块分析差异显著性;制图用 ORIGIN(v8.0)软件。

2 结果与分析

2.1 马尾松 *PmGPX6* 基因 cDNA 全长克隆及理化性质分析

以马尾松针叶 cDNA 为模板,*PmGPX6* 基因 cDNA 全长克隆过程如图 1 所示。*PmGPX6* 基因全长 cDNA 为 871 bp,含 1 个完整开放阅读框 513 bp,5'末端非翻译区 123 bp,3'末端非翻译区 235 bp,在第 124 bp 处发现起始密码子 ATG,在 634 bp 处发现终止密码子 UGA,编码 170 个氨基酸。ProtParam 分析表明 *PmGPX6* 蛋白相对分子量为 18.72 kDa,理论等电点 PI 为 5.88。根据 ProtScale 分析表明 *PmGPX6* 为亲水蛋白。此基因已登录 GenBank,登录号为 KF910088。



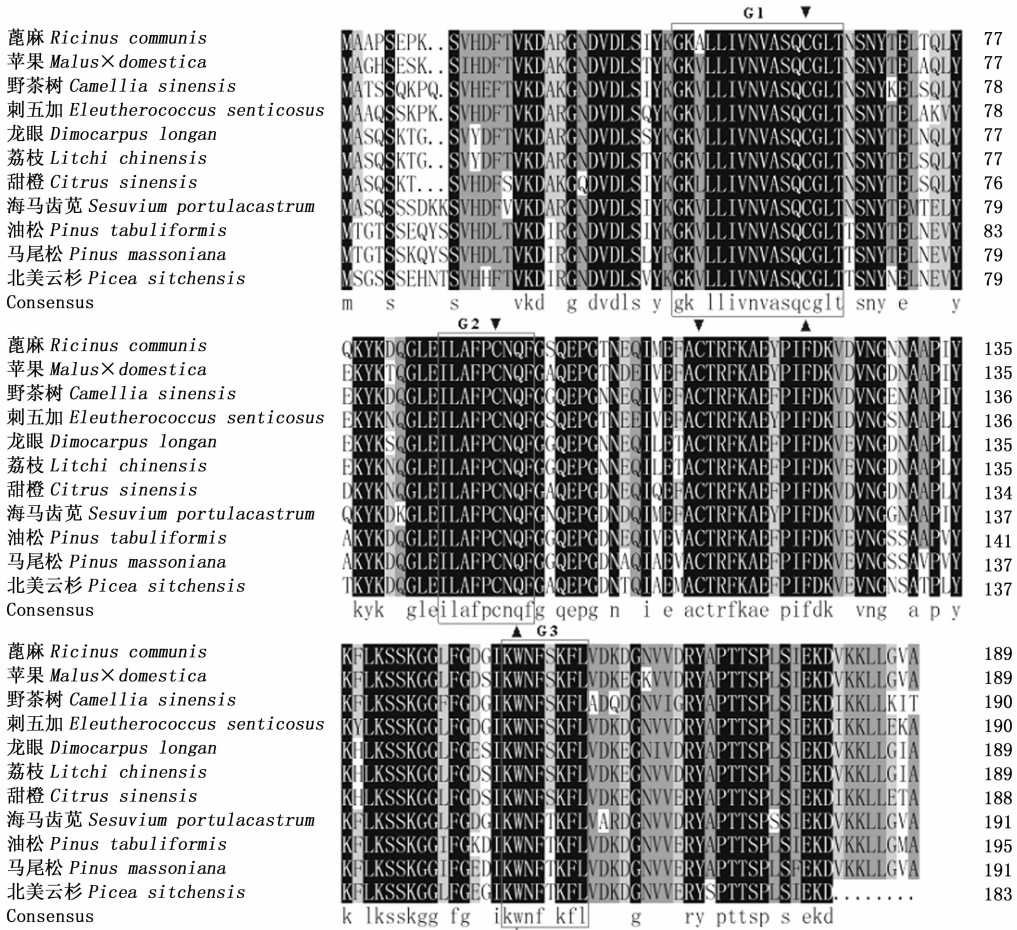
a. 中间片段 M: DL2000; 1: 中间片段电泳图 b. 5'-RACE 电泳图 M: DL2000; 1: 5'-RACE 产物
c. 3'-RACE 电泳图 M: DL2000; 1: 3'-RACE 产物

图 1 琼脂糖凝胶电泳结果

2.2 序列比较与功能预测分析

利用 BLAST 对 PmGPX6 进行蛋白保守区预测, 结果表明 PmGPX6 有 1 个 GSH_Peroxidase 保守结构域, 据此推断 PmGPX6 是 GPXs 家族的一员。与已知植物的 GPX 基因相比, 在核酸水平 PmGPX6 与油松 (*Pinus tabuliformis* Carrière) (KF032617) *PtGPX*、北美云杉 (*Picea sitchensis* (Bong) Carrière) (EF677323) *PsGPX* 编码区的一致性分别为 91%、89%。氨基酸序列多重比对结果显示, *PmGPX6* 编码的氨基酸序列与其他植物 GPX 酶蛋白氨基酸序列在 3 个特征性结构域 G1、G2、G3 高度保守, 且具

有构成 GPX 催化三联体的 3 个氨基酸 (Cys⁴⁴、Gln⁷⁵、Trp¹³³) 和具有植物 GPX 蛋白活性中心的 3 个保守 Cys 残基 (Cys⁴⁴、Cys⁷³、Cys⁹²) (图 2)。同时, *PmGPX6* 与油松同源性达 95%, 与北美云杉、蓖麻 (*Ricinus communis*)、龙眼 (*Dimocarpus longan*)、荔枝 (*Litchi chinensis*)、刺五加 (*Eleutherococcus senticosus*)、海马齿苋 (*Sesuvium portulacastrum*)、苹果 (*Malus × domestica*)、甜橙 (*Citrus sinensis*)、野茶树 (*Camellia sinensis*) 等植物的同源性达 77%~88%。由此可以看出: GPXs 基因家族编码蛋白氨基酸序列的保守性非常强, 不同植物的 GPX 序列具有高度的同源性。



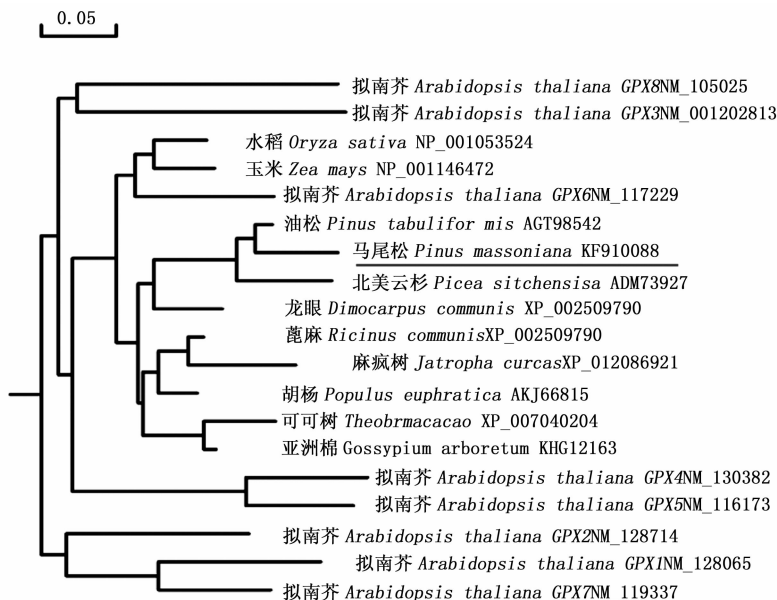
注: GPX 基因的来源和 GenBank 登录号: Ricinus communis(蓖麻, XM_002509744); Malus x domestica(苹果, AF403707); Camellia sinensis(野茶树, JQ247186); Eleutherococcus senticosus(刺五加, KC542392); Dimocarpus longan(龙眼, EU364813); Litchi chinensis(荔枝, FJ172343); Citrus sinensis(甜橙, AJ582678); Sesuvium portulacastrum(海马齿苋, GU479913); Pinus tabuliformis(油松, AGT98542); Picea sitchensis(北美云杉, HM204111); 方框表示高度保守的特征性结构域(G1、G2、G3);

构成催化三联体的 3 个氨基酸 Cys⁴⁴、Gln⁷⁵、Trp¹³³用正三角形标注; 3 个保守 Cys 残基 Cys⁴⁴、Cys⁷³、Cys⁹²用倒三角形标注。

图 2 PmGPX6 氨基酸序列与其他植物 GPX 基因的氨基酸序列多重比对

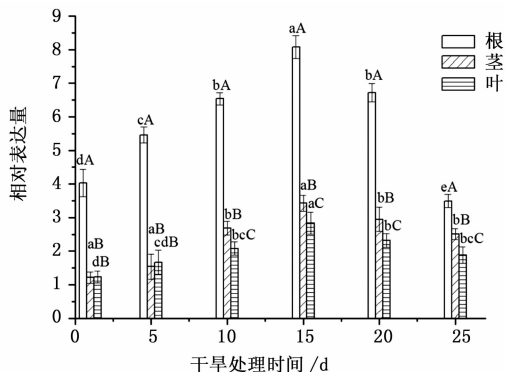
将 PmGPX6 氨基酸与 GenBank 数据库中已登录的其他植物 GPX 氨基酸序列进行比对并绘制系统进化树(图 3)。结果显示 PmGPX6 与油松亲缘关系最近, 表明松科类植物在蛋白进化上是非常保守的,

并且与模式植物拟南芥 8 种编码 GPX 酶中的 AtGPX6 同源性较高(76%), 因此推测 PmGPX6 蛋白功能可能与 AtGPX6 功能相近。

图3 *PmGPX6* 蛋白的系统进化分析

2.3 *PmGPX6* 基因组织特异性及干旱胁迫下的表达分析

为明确干旱胁迫对 *PmGPX6* 基因表达的影响,使用 RT-qPCR 技术对马尾松根、茎和叶进行表达模式研究(图 4)。结果表明,*PmGPX6* 在根、茎、叶中均有表达,其中根表达量最高,茎和叶次之。在干旱胁迫不同时间处理下,*PmGPX6* 基因在根、茎、叶中表达量逐步升高,在第 15 天表达程度最为强烈,而后开始降低,*PmGPX6* 随处理时间不同表达差异显著($P < 0.05$)。在马尾松根、茎、叶组织间,*PmGPX6* 表达量在第 1、5 天,根与茎、叶间差异显著($P < 0.05$),茎与叶间差异不显著($P > 0.05$),第 10、15、20、25 天,根、茎、叶组织间均呈现为差异显著($P < 0.05$)。上述结果暗示,*PmGPX6* 基因的表达与干旱胁迫相关。

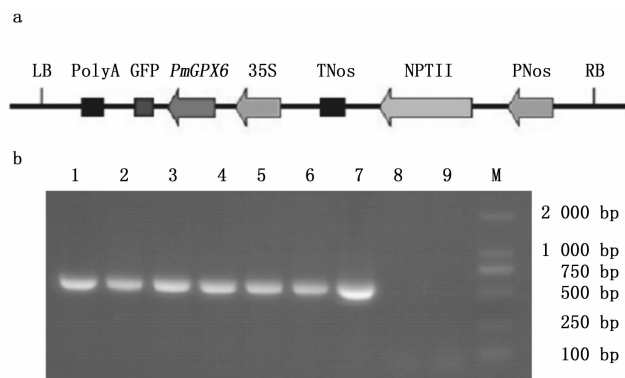


注:以 18S 为内标 *PmGPX6* 基因的相对表达量分析。小写字母、大写字母分别表示干旱处理不同时间、不同组织间基因表达的差异显著性($P < 0.05$)

图4 *PmGPX6* 基因的相对表达量分析

2.4 植物表达载体的构建与检测

植物表达载体 pBI121-*PmGPX6* 构建图谱如图 5a 所示。以 M7 和 M8 为引物进行 *PmGPX6* 基因扩增,将目的条带连接到 pMD18-T 载体上测序,包含了 *PmGPX6* 基因的完整编码区(513 bp)和酶切位点(12 bp)。选用 *Bam*H I/*Xba* I 对 pMD18-*PmGPX6* 与 pBI121 植物表达载体同时进行双酶切并连接,成功构建 pBI121-*PmGPX6* 植物表达载体。



a. 植物表达载体 pBI121-*PmGPX6* 构建图谱; b. 转 *PmGPX6* 拟南芥的 PCR 检测。M: DL2000; 1-6:转基因拟南芥 7:重组质粒 pBI121-*PmGPX6* 8:野生型拟南芥 9:重蒸水
图5 植物表达载体 pBI121-*PmGPX6* 构建图谱与转 *PmGPX6* 拟南芥的 PCR 检测

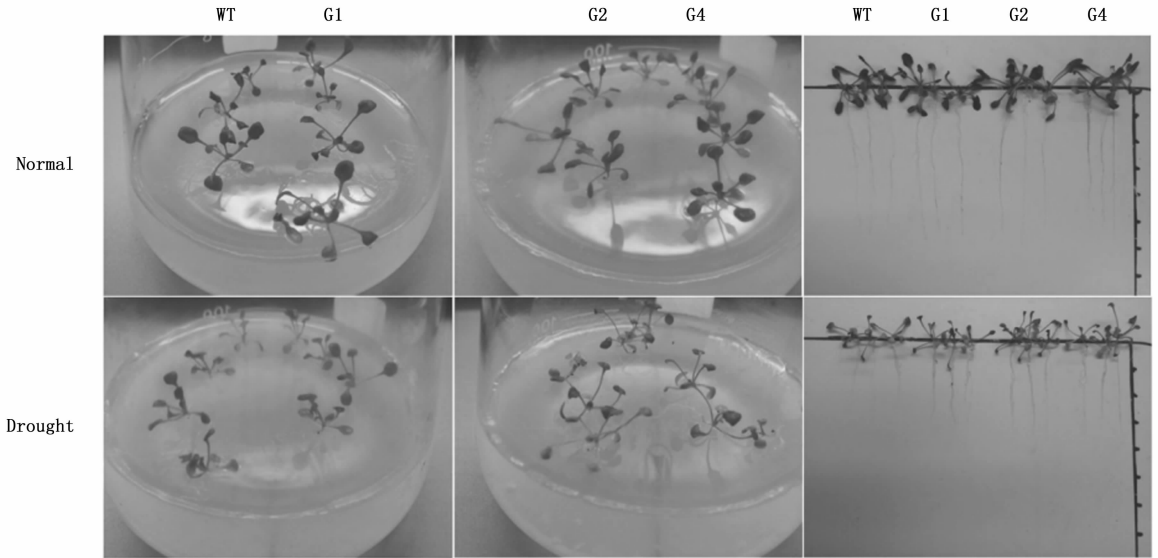
2.5 拟南芥转化与表型分析

经卡那霉素抗性筛选已转化的拟南芥种子,得到 6 个抗性株系的植株。PCR 检测结果表明:野生型拟南芥和重蒸水均无特异性条带,而转 *PmGPX6* 基因的植株约在 0.5 kb 都有一明显的特征条带(图

5b), 证明 *PmGPX6* 基因已经转入拟南芥。

将转 *PmGPX6* (株系 G1、G2、G4) 和野生型拟南芥种子播于含 0% 和 3% PEG 6000 的 MS 培养基的三角瓶中进行培养。经 16 天培养后, 发现在含 0% PEG 6000 的条件下, 转基因拟南芥与野生型拟南芥的表型差异不大(图 6), 且根长未达到差异显著水平 ($P > 0.05$), 其中株系 G1、G2、G4 转基因拟南芥与野生型拟南芥的平均根长分别为 5.41、5.32、5.36 和 5.05 cm(图 7)。在含 3% 的 PEG 6000 的条件下, 两者表型差异不大, 但野生型拟南芥根生长受到明显抑制, 根的生长量明显降低, 而转基因拟南芥根

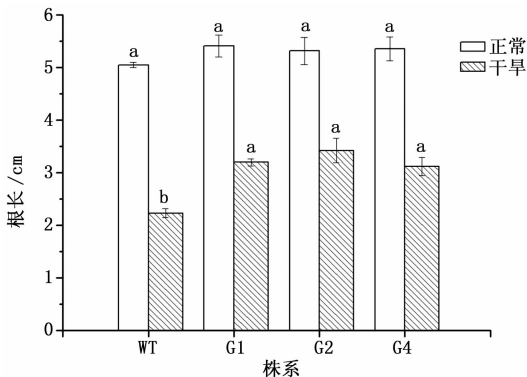
系生长虽也受到干旱胁迫的抑制, 但转基因拟南芥株系表现的干旱敏感程度明显要比野生型拟南芥低, 其根系远长于野生型拟南芥(图 6)。转基因拟南芥(株系 G1、G2、G4)的平均根长分别为 3.20、3.42、3.13 cm, 野生型拟南芥的平均根长为 2.23 cm, 两者间差异达到显著水平 ($P < 0.05$) (图 7)。以上结果表明在干旱胁迫下, 转基因拟南芥和野生型拟南芥植株发育均受到明显抑制, 但转基因拟南芥根系发育状况明显优于野生型拟南芥, 暗示 *PmGPX6* 可能参与马尾松干旱胁迫应答。



Normal: 在含 0% PEG 6000 的三角瓶中野生型与转基因拟南芥 16 天的表型与根系状况

Drought: 在含 3% PEG 6000 的三角瓶中野生型与转基因拟南芥 16 天的表型与根系状况

图 6 过表达 *PmGPX6* 与野生型拟南芥在 16 天的表型与根系状况



注: 小写字母表示不同条件下基因表达的差异显著性 ($P < 0.05$)。

图 7 野生型与转基因拟南芥 (G1、G2、G4) 在正常 (0% PEG 6000) 与干旱 (3% PEG 6000) 下根长统计

2.6 转基因拟南芥根 GFP 荧光表达

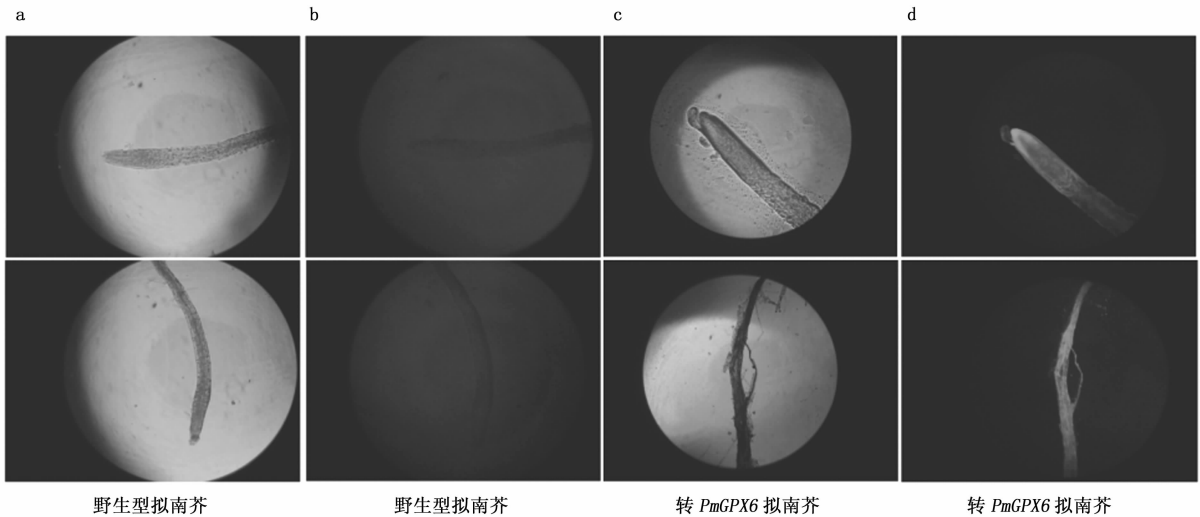
利用倒置荧光显微镜观察, 转基因拟南芥不定根在蓝色光激发下, 发出强烈的绿色荧光(图 8)。

表明 *PmGPX6* 基因在转基因拟南芥根中实现了高效表达。

3 讨论

谷胱甘肽过氧化物酶能减少 H_2O_2 、有机和脂质氢过氧化物来保护植物细胞免受氧化胁迫^[17]。过量表达 *GPXs* 可促进其转录水平在不同环境胁迫下稳步上升。水稻 (*Oryza Sativa* L.) *OsPHGPx* 基因在氧化胁迫下其表达水平显著升高^[18]。香蕉 (*Musa acuminata*) *MaGPX* 在 NaCl 和干旱胁迫处理后, 呈现出先增长后降低的趋势^[19]。在超表达 *GPXs* 的转基因植株中, 谷胱甘肽过氧化物酶在植物氧化信号转导过程中起着重要作用。

本研究从马尾松中克隆了 1 个 *PmGPX6* 基因, *PmGPX6* 蛋白序列具有典型的 GSH_Peroxidase 保守



a, c. 可见光下拍摄的图片 b, d. 荧光下拍摄的图片

图8 不定根的荧光检测

结构域、构成 GPX 催化三联体的 3 个氨基酸 (Cys⁴⁴、Gln⁷⁵、Trp¹³³) 和植物 GPX 蛋白活性中心的 3 个保守 Cys 残基, 说明该基因属于 GPXs 家族。进化树分析表明 *PmGPX6* 与油松 *PtGPX* 同源性最高, 达 95%, 与拟南芥 8 种编码 GPX 酶中的 *AtGPX6* 最相似。*AtGPX6* 属于磷脂氢谷胱甘肽过氧化物酶 (PHGPX), 在胁迫应答时能起到保护生物膜功能不受损伤的作用^[4]。推测 *PmGPX6* 基因在响应干旱胁迫过程中可能具有与 *AtGPX6* 相似功能的作用。

GPXs 基因作为植物清除 ROS 的调控因子之一, 参与清除 ROS, 具有重要的作用。植物体内 GPXs 中每个家族在不同环境条件、不同树种、不同组织中表现不同的表达模式和水平^[20-21]。周立敬等^[22]对拟南芥中 8 种编码 GPX 酶进行分析, 其中 1、3、5、6 亚组的 GPX 受渗透胁迫诱导, 且 *AtGPX1* 和 *AtGPX6* 在受盐、干旱、金属、ABA 等胁迫处理后可上调表达。另有研究发现, 盐芥 (*Thellungiella halophila*) 谷胱甘肽过氧化物酶基因 (*ThGPX6*) 在叶片和根中表达, 其表达受 NaCl 诱导, 显示了 *ThGPX6* 在植物响应盐胁迫中发挥作用^[23]。本研究只对干旱胁迫下 *PmGPX6* 的时空表达进行了检测, 结果显示该基因在根、茎、叶中均表达, 且根中表达量最高。在干旱胁迫下, *PmGPX6* 基因在 15 天内表达上调, 随后有下降趋势, 这种现象可能与 *PmGPX6* 无法再适应干旱的加剧有关。该结果与拟南芥枣树 *ZjGPX*^[24] 表达上调结果类似。由此推测 *PmGPX6* 是马尾松抗旱性的一个正调控因子。

为进一步研究该基因的功能, 构建了 pBI121-*PmGPX6* 植物表达载体并成功转化拟南芥。过表达

PmGPX6 拟南芥耐旱性实验表明, 干旱胁迫下转基因植株能更好地适应胁迫环境, 促进植株根系生长。Wang 等^[25]人发现耐盐性的胡杨根组织能迅速感知盐胁迫, 并上调抗氧化酶活性, 而不耐盐的群众杨根组织不能快速提高抗氧化酶活性。王菲菲等^[26]研究表明转 *PeGPX* 基因烟草在 NaCl 胁迫下能长根, 而野生型烟草不长根。这些类似的研究结果暗示本实验过表达 *PmGPX6* 转基因植株能更有效地降低干旱诱导的活性氧的积累, 防止质膜受到氧化损伤, 保证细胞的正常生理功能, 促进根系更好地生长, 从而达到对干旱胁迫的调节与适应。

4 结论

本研究克隆到 1 个马尾松 *PmGPX6* 基因, 并受干旱胁迫诱导表达; 获得了过表达 *PmGPX6* 转基因拟南芥植株, 干旱胁迫下该基因能高效表达, 并促进转基因植株根系生长。这为马尾松抗旱基因工程和遗传改良提供了可利用的基因资源, 也为进一步揭示马尾松抗旱分子调控网络机制奠定了基础。

参考文献:

- [1] Bela K, Horváth E, Gallé Á, et al. Plant glutathione peroxidases: e-emerging role of the antioxidant enzymes in plant development and stress responses [J]. J Plant Physiol, 2015, 176 (1): 192-201.
- [2] Ahmad P, Jaleel C A, Salem M A, et al. Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress [J]. Crit Rev Biotechnol, 2010, 30 (3): 161-175.
- [3] Bérczi A, Moller I M. Redox enzymes in the plant plasma membrane and their possible roles [J]. Plant Cell Environ, 2000, 23 (12): 1287-1302.

- [4] Rodriguez Milla M A, Maurer A, Rodriguez Huete A, *et al.* Glutathione peroxidase genes in *Arabidopsis* are ubiquitous and regulated by abiotic stresses through diverse signaling pathways [J]. *Plant J*, 2003, 36 (5): 602 – 615.
- [5] Chang C C, Slesak I, Jordá L, *et al.* *Arabidopsis* chloroplastic glutathione peroxidases play a role in cross talk between photooxidative stress and immune responses [J]. *Plant Physiol*, 2009, 150 (2): 670 – 683.
- [6] Miao Y C, Lv D, Wang P C, *et al.* An *Arabidopsis* glutathione peroxidase functions as both a redox-transducer and a scavenger in abscisic acid and drought stress responses [J]. *The Plant Cell*, 2006, 18 (10): 2749 – 2766.
- [7] 丁贵杰, 周志春, 王章荣, 等. 马尾松纸浆用材林培育与利用 [M]. 北京: 中国林业出版社. 2006.
- [8] 韩文萍, 丁贵杰, 鲍 斌. 不同种源马尾松对于旱胁迫的生理生态响应 [J]. 中南林业科技大学学报, 2012, 32(5): 25 – 29.
- [9] 胡晓健, 欧阳猷, 喻方圆. 干旱胁迫对不同种源马尾松苗木生长及生物量的影响 [J]. 江西农业大学学报, 2010, 32(3): 510 – 516.
- [10] 施积炎, 丁贵杰, 袁小凤. 不同家系马尾松苗木水分参数的研究 [J]. 林业科学, 2004, 40 (3): 51 – 55.
- [11] 施积炎, 丁贵杰, 袁小凤. 不同家系马尾松维持水分平衡能力及综合评价 [J]. 上海交通大学学报: 农业科学版, 2004, 22 (2): 143 – 148.
- [12] 袁小凤, 丁贵杰, 施积炎. 土壤干旱胁迫对不同品系马尾松水分利用效率的影响 [J]. 浙江师范大学学报: 自然科学版, 2008, 31 (3): 328 – 331.
- [13] Fan F H, Cui B W, Zhang T, *et al.* The temporal transcriptomic response of *Pinus massoniana* seedlings to phosphorus deficiency [J]. *PLoS ONE*, 2014, 9: e105068. doi:10.1371/journal.pone.0105068.
- [14] Pfaffl M W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR [J]. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29 (9): 2002 – 2007.
- [15] 崔 武, 刘 炜, 郑海燕. 将外源 DNA 直接导入根瘤土壤农杆菌的新方法 [J]. 植物生理学通讯, 1995, 31(1): 48 – 49.
- [16] Clough S J, Bent A F. Floral dip: a simplified method for agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* [J]. *The Plant Journal*, 1998, 16 (6): 735 – 743.
- [17] Noctor G, Gomez L, Vanacker H, *et al.* Interactions between biosynthesis, compartmentation, and transport in the control of glutathione homeostasis and signaling [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2002, 53 (372): 1283 – 1304.
- [18] Li T, Yang X D, Liu J Y. Tissue and induction expression profiles of rice phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase at protein level [J]. *Prog Biochem Biophys*, 2009, 36 (1): 77 – 82.
- [19] 张丽丽, 徐碧玉, 刘菊华, 等. 香蕉谷胱甘肽过氧化物酶基因 MaGPX 的克隆和表达分析 [J]. 园艺学报, 2012, 39 (8): 1471 – 1481.
- [20] Nahar K, Hasanuzzaman M, Alam M M, *et al.* Glutathione-induced drought stress tolerance in mung bean: coordinated roles of the antioxidant defence and methylglyoxal detoxification systems [J]. *AoB Plants*, 2015, 7 (1). pii: plv069. doi: 10.1093/aob-pla/plv069.
- [21] Passaia G, Margis-Pinheiro M. Glutathione peroxidases as redox sensor proteins in plant cells [J]. *Plant Sci*, 2015, 234: 22 – 26. doi: 10.1016/j.plantsci.2015.01.017. Epub 2015 Feb 7.
- [22] 周立敬, 周宜君, 高 飞, 等. 拟南芥谷胱甘肽过氧化物酶的生物信息学分析 [J]. 中央民族大学学报: 自然科学版, 2010, 19 (2): 11 – 17.
- [23] 马亭亭, 周宜君, 高 飞, 等. 盐芥谷胱甘肽过氧化物酶基因 (THGPX6) 的克隆及表达分析 [J]. 植物遗传资源学报, 2012, 13 (2): 252 – 258.
- [24] 肖 蓉, 罗慧珍, 张小娟, 等. 干旱和盐胁迫条件下枣树谷胱甘肽过氧化物酶基因 (ZjGPX) 的差异表达及功能分析 [J]. 中国农业科学, 2015, 48 (14): 2806 – 2817.
- [25] Wang R G, Chen S L, Zhou X Y, *et al.* Ionic homeostasis and reactive oxygen species control in leaves and xylem sap of two poplars subjected to NaCl stress [J]. *Tree Physiol*, 2008, 28 (6): 947 – 957.
- [26] 王菲菲, 丁明全, 邓澍荣, 等. 胡杨谷胱甘肽过氧化物酶 PeGPX 基因的克隆及转化植株耐盐性分析 [J]. 基因组学与应用生物学, 2012, 31 (3): 231 – 239.

(责任编辑: 张 研)