

中山杉 407 *ThP5CS* 和 *Th δ -OAT* 的克隆及干旱胁迫下的表达分析

王芝权^{1,2}, 喻方圆², 施 钦¹, 殷云龙^{1,2}, 宣 磊¹, 范文才¹, 华建峰^{1*}

(1. 江苏省中国科学院植物研究所, 江苏 南京 210014; 2. 南京林业大学林学院, 江苏 南京 210037)

摘要: [目的] 探究中山杉 407 (*Taxodium mucronatum* ♀ × *T. distichum* ♂) (*T. hybrid* ‘Zhongshanshan 407’) 的 *ThP5CS* 和 *Th δ -OAT* 基因与植物耐旱性的关系, 为落羽杉属植物抗性育种提供新的基因资源。 [方法] 利用 RACE 技术从中山杉 407 中分别克隆 *ThP5CS* 和 *Th δ -OAT* 基因 cDNA 全长, 通过生物信息学手段分析预测其编码蛋白的结构和功能。基于干旱-复水试验, 采用半定量和实时荧光定量技术研究中山杉 407 *ThP5CS* 和 *Th δ -OAT* 的表达特性。 [结果] 从中山杉 407 中克隆了编码 P5CS 和 δ -OAT 蛋白的基因, 分别命名为 *ThP5CS* 和 *Th δ -OAT*, 其中, *Th δ -OAT* 包含 1 个长度为 1 494 bp 的 ORF, 编码 497 个氨基酸, 与樟子松 (*Pinus sylvestris* L.) δ -OAT 蛋白的序列相似性高达 92%; *ThP5CS* 包含 1 个长度为 1 545 bp 的 ORF, 编码 514 个氨基酸, 与花烛属植物 (*Anthurium amnicola*) *P5CS* 蛋白的序列相似性为 87%。半定量与定量 PCR 结果一致, 在自然干旱和复水环境下, *ThP5CS* 在中山杉 407 及其父本落羽杉 (*T. distichum*)、母本墨杉 (*T. mucronatum*) 中均表现为先上调再下调的趋势, 而 *Th δ -OAT* 在中山杉 407 及其父母本中相对表达量则存在差异。 [结论] 干旱胁迫下, *Th δ -OAT* 和 *ThP5CS* 基因的正反方向调节是中山杉 407 及其亲本在干旱胁迫与恢复状态下控制脯氨酸水平的关键机制, 其中, *ThP5CS* 在中山杉 407 及其亲本脯氨酸的合成过程中起重要作用。

关键词: 中山杉; 干旱胁迫; 基因表达分析

中图分类号: S718.46

文献标识码: A

文章编号: 1001-1498(2018)04-0126-09

Cloning and Expression Analysis of *ThP5CS* and *Th δ -OAT* Gene in *Taxodium* Hybrid ‘Zhongshanshan 407’ under Drought Stress

WANG Zhi-quan^{1,2}, YU Fang-yuan², SHI Qin¹, YIN Yun-long^{1,2}, XUAN Lei¹, FAN Wen-cai¹, HUA Jian-feng¹

(1. Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, Jiangsu, China;

2. College of Forestry, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China)

Abstract: [Objective] To study the function of *ThP5CS* and *Th δ -OAT* in *T. hybrid* ‘Zhongshanshan 407’ (*Taxodium mucronatum* ♀ × *T. distichum* ♂), and to explore the relationships between the genes and drought resistance of *T. hybrid* ‘Zhongshanshan 407’. This research would provide candidate gene resources for resistance breeding in *Taxodium*. [Method] Rapid-amplification of cDNA ends (RACE) was applied to clone the full-length complementary DNA (cDNA) sequences of *P5CS* and δ -*OAT* in *T. hybrid* ‘Zhongshanshan 407’. And then, the structures and functions were predicted with bioinformatics analysis. Finally, a natural drought and rewatering experiment was conducted to investigate the expression patterns of *ThP5CS* and *Th δ -OAT* by semi-quantitative RT-PCR (sRT-PCR) and quantitative real-time PCR (qRT-PCR). [Result] The cDNA sequences of *P5CS* and δ -*OAT* in *T. hybrid*

收稿日期: 2017-06-07

基金项目: 江苏省农业科技自主创新资金项目(CX(16)1005); 江苏省创新能力建设计划项目(BM2015019); 中国科学院战略生物资源服务网络计划植物种质资源创新(ZSZC-009)。

作者简介: 王芝权, 女, 博士研究生。主要研究方向: 分子生物学。E-mail: zhiquanjiemie@163.com

* 通讯作者: 华建峰, 男, 副研究员。主要研究方向: 植物资源与环境。E-mail: jfhua2009@gmail.com

‘Zhongshanshan 407’ were isolated and then were named as *ThP5CS* and *Th δ -OAT*. The full-length sequence of *Th δ -OAT* and *ThP5CS* contained open reading frames (ORF) of 1 494 bp and 1 545 bp respectively, and encoded polypeptides of 497 and 514 amino acids residues. The protein sequences of *Th δ -OAT* exhibited 92% sequence identities with *Pinus sylvestris* L., and the protein sequences of *ThP5CS* exhibited 87% sequence identities with *Anthurium amnicola*. sRT-PCR and qRT-PCR analysis showed that in *T. hybrid* ‘Zhongshanshan 407’ and its parents, *ThP5CS* showed an increasing expression pattern and then decreasing in the period of drought and recovery. While the relative expression of *Th δ -OAT* showed differentiations in *T. hybrid* ‘Zhongshanshan 407’, *T. distichum*, and *T. mucronatum*. [Conclusion] *ThP5CS* might be important in response of *Taxodium* to drought and could play a leading role in proline synthesis.

Keywords: *Taxodium hybrid* ‘Zhongshanshan’; drought stress; gene expression analysis;

干旱是一种最普遍的环境胁迫。干旱导致水分分配出现异常,对植物造成原生质脱水,光合作用和遗传物质的合成能力减弱等伤害,而且缺水引起的渗透胁迫会造成植株不可逆的损伤,最终导致植株死亡^[1]。当植物处于渗透胁迫环境中,它们会通过积累渗透调节物质来降低胁迫所带来的损伤^[2]。大量研究表明,脯氨酸的积累和代谢与植物的耐旱性密切相关^[3-4]。作为一种小分子有机渗透调节物质,脯氨酸可以提高植物细胞的保水能力,维持细胞膨压,并保护相关酶活性等^[3]。在干旱胁迫停止而开始复水的条件下,积累的脯氨酸又可以作为碳、氮源为植物的恢复提供能量物质^[5-6]。赵宏伟等^[7]在研究水稻(*Oryza sativa* L.)耐旱机制时发现,耐旱品种东农 425 的脯氨酸含量显著高于干旱敏感型品种松粳 6 号,且复水后恢复能力更强。

脯氨酸的合成途径有 2 条,分别是谷氨酸途径和鸟氨酸途径。 $\Delta 1$ -吡咯啉-5-羧酸合成酶(P5CS)和鸟氨酸氨基转移酶(δ -OAT)分别是这两个途径中的关键酶。研究发现,过表达 P5CS 的转基因植株在胁迫环境下的脯氨酸含量明显高于对照植株,且抗性较对照植株也有所增强^[8]。王伟东等^[9]将拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)的 δ -OAT 基因转化到烟草(*Nicotiana tabacum* L.)和水稻中,转基因烟草和水稻的脯氨酸含量增加,抗性也显著加强。此外,这 2 条途径在不同条件下对脯氨酸积累的贡献大小也有所不同,如在甘蓝型油菜(*Brassica napus* L.)中,P5CS 和 OAT 基因在干旱胁迫下共同控制脯氨酸的合成,但 P5CS 基因占主导地位^[10]。

中山杉(*Taxodium hybrid* ‘Zhongshanshan’)是江苏省中国科学院植物研究所通过落羽杉属(*Taxodium*)种间杂交选育出来的优良无性系的总称。中山杉保持了亲本的优良性状,并表现出良好的适应

性与抗逆性,目前已经广泛应用于城市绿化和沿海防护林建设等方面,获得了较好的生态和社会效益^[11-12]。作为中山杉的亲本之一,墨杉(*T. mucronatum*)原产于墨西哥高原地带,对干旱胁迫具有一定的耐受能力^[13]。中山杉遗传了亲本墨杉的耐旱性,在重庆三峡库区造林的过程中,当水库处于低水位时,中山杉长期生长在裸露缺水的黄棕壤中,仍然可以生存,并保持较高的存活率^[14]。室内试验表明,中山杉杂种优势明显,耐旱性较强^[15-16],其主动积累脯氨酸以抵御胁迫伤害;在复水后,脯氨酸含量迅速下降到正常水平^[15]。

本研究利用 cDNA 末端快速克隆技术(rapid-amplification of cDNA ends, RACE)从中山杉中克隆 2 个编码 P5CS 和 δ -OAT 的基因,并利用生物信息学预测其结构和功能,最终分别命名为 *ThP5CS* 和 *Th δ -OAT*。采用半定量技术(sRT-PCR)和实时荧光定量技术(qRT-PCR)分析了中山杉及其亲本在干旱及复水的条件下,其 *ThP5CS* 和 *Th δ -OAT* 基因相对表达量的变化,以探索 *ThP5CS* 和 *Th δ -OAT* 与脯氨酸积累以及植物耐旱性的关系,为落羽杉属植物抗逆基因工程提供候选基因资源,同时为中山杉在干旱和半干旱地区的推广应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料和设计

试验在江苏省中国科学院植物研究所(118°49' E, 32°30' N)的苗圃进行。供试品种为中山杉 407 (*Taxodium mucronatum* ♀ × *T. distichum* ♂) (*T. hybrid* ‘Zhongshanshan 407’)、落羽杉(*T. distichum*)和墨杉(*T. mucronatum*)。选取 2 年生植株移入塑料盆(口径为 23 cm,底径为 15 cm,高为 22 cm)中,每盆种植 1 株植株。栽培基质为黄土、泥炭土和珍

珠岩,体积比为3:1:1,最大田间持水量为28.7%。将移植后的植株放置在自然环境中适应3个月,每周充分灌溉2次。

选取18株长势一致的植株移入温室中,用于干旱试验。试验设计如下:设置对照(CK)和干旱-复水(S)2个处理,每个处理9株植株,随机区组排列。在整个试验期间保持每天18:00为CK组的植株补充足够的水分,使其土壤相对含水量(含水量/最大田间持水量)保持在75%~80%的水平。对于S组的植株,干旱过程为连续模拟自然干旱8d;复水过程为干旱处理结束后的9d,每天18:00补充水分,使土壤的相对含水量达到75%~80%的水平。分别在干旱胁迫处理0d(胁迫前,S0),连续干旱8d(S组所有植株表现出明显的萎蔫现象,干旱阶段,S1),以及复水9d(复水阶段,S2)对CK和S组的叶片进行取样。每组3个重复,每个重复包含3株植株的叶片样品,取样后立即投入液氮中速冻,然后保存于-80℃冰箱中备用。

1.2 RNA的提取及cDNA的合成

采用天根DP441多糖多酚植物总RNA提取试剂盒(天根生化科技有限公司)提取叶片RNA。利用DNA酶(天根生化科技有限公司)处理提取的RNA,使其纯化。利用2%的琼脂糖凝胶电泳检测RNA的完整性,并用紫外分光光度计在260nm和

280nm下检测RNA的浓度与纯度。以1μgRNA为模板,利用Clontech公司的SMARTer™ PCR cDNA Synthesis Kit和AdvantageR 2 PCR Kit试剂盒进行反转录,合成第1链cDNA,存于-20℃冰箱备用。

1.3 *ThP5CS*和*Thδ-OAT*基因全长的克隆

通过对中山杉转录组数据的分析,获得所需基因片段的序列信息。根据获得的序列信息,利用Oligo 6.0软件设计引物扩增基因的3'RACE和5'RACE,其中,3'RACE的PCR反应体系参照3'-Full RACE Core Set Kit试剂盒(TaKaRa)的说明书;5'RACE的反应体系参考Clontech公司的SMARTer RACE 5'/3'Kit试剂盒的说明书。使用1%的琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物并用QIAquick Gel Extraction Kit试剂盒(QIAGEN)进行回收。将回收产物连接到pMD19-T Vector载体(TaKaRa)上,并转化大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5α感受态细胞,再将筛选到的阳性克隆菌液送至英潍捷基(上海)贸易有限公司测序。根据3'RACE和5'RACE的测序结果,利用软件BioXM 2.6进行比对拼接,获得基因全长序列。利用ORFfinder工具(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)预测ORF开放阅读框序列,并设计引物,以cDNA为模板进行ORF序列扩增加以验证。引物序列见表1。

表1 引物序列

Table 1 Sequences of primers

引物名称 Prime-ID	正向引物 Forward PCR Primer(5'-3')	反向引物 Reverse PCR Primer(5'-3')
Thδ-OAT_3OUTER	TGATTGCTGATGAAATACAACTGG	TACCGTCGTTCCACTAGTGATTT
Thδ-OAT_3INNER	GGGCTGTGAGATGGGACAAGTCTTTAG	CGCGGATCCTCCACTAGTGATTTCACTATAGG
Thδ-OAT_5OUTER	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	AATGGGTTCAAAGAGAAATCCAGCA
Thδ-OAT_5INNER	CTAATACGACTCACTATAGGGC	AGTATTCATTGGAAGCACCATGTCATAG
Thδ-OAT_ORF	ATGAACAACATGACAATGGCGAT	TGCCTGCAGGTCGACGATTGTA
Thδ-OAT_sRT-PCR	ATGAACAAGAGTACAGTGCTCA	AACAATAATTCCTCATTTTTT
Thδ-OAT_qRT-PCR	ACTGGAGCAGAGGGTGTGGAA	AGTTGACCAGGGAGGAACGG
ThP5CS_3OUTER	TGCTCAAGCTGGATGATGTTATAGA	TACCGTCGTTCCACTAGTGATTT
ThP5CS_3INNER	TGTCAGATTGTATGCTGGCACAAAGGCA	CGCGGATCCTCCACTAGTGATTTCACTATAGG
ThP5CS_5OUTER	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	CCTTCAACGTCACTCAGGAGAATCAG
ThP5CS_5INNER	CTAATACGACTCACTATAGGGC	CATTATCAGTTACAAGAAGTTGGGATGA
ThP5CS_ORF	ATGACAGCTAAAGTTAAAGCTGCT	GGTTTTCAAATCACAAACCATT
ThP5CS_sRT-PCR	GCTGATTTCCTGTTGTTATTA	ATCTTCCAGGTTTTTAACATTA
ThP5CS_qRT-PCR	GACCTCCAGAAGCCACAGGT	GAACCACGCGCAACTCTAGC
18S_sRT-PCR	TAAAAGAAGAAGAAGAAGCAAA	TGAAAATGAGAGGTGAAGAGAT
GAPDH_qRT-PCR	CCATCGGAGCCCATATCAG	ACTATGTTCAACGCCGCTGC

1.4 *ThP5CS* 和 *Thδ-OAT* 基因的序列分析

利用 BLASTsoftware (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 和拟南芥信息资源网站 (TAIR) (<http://www.arabidopsis.org/Blast/index.jsp>) 在线分析基因序列和氨基酸序列;利用 ExPASyProtParam 工具 (<http://web.expasy.org/protparam/>) 在线预测蛋白质的分子量大小、等电点等;利用 GOR4 软件预测蛋白的二级结构 (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_gor4.html);利用 InterPro 网站预测基因的结构域,并利用 NCBI 数据库中的 Protein BLAST 和 MEGA 5.1 软件的 Clustal W 程序进行同源序列比对;使用 MEGA 5.1 软件并选择最大似然法 (Maximum Likelihood method) 进行系统发育树的构建^[17]。

1.5 *ThP5CS* 和 *Thδ-OAT* 基因的表达分析

利用软件 Oligo 6.0 设计参照基因 18S rRNA 和 2 个目的基因 (*ThP5CS* 和 *Thδ-OAT*) sRT-PCR 的特异引物 (表 1)。sRT-PCR 扩增体系为 20 μL:1 μL Taq 酶,2 μL 10 × PCR Buffer (Mg²⁺ Free),1.5 μL Mg²⁺ (25 mmol · L⁻¹),1.3 μL dNTP mixture (2.5 mmol · L⁻¹ each),各 1 μL 5'端和 3'端引物 (10 pmol · μL⁻¹),1 μL cDNA (cDNA 浓度大约是 1 000 ng · μL⁻¹),11.2 μL ddH₂O。PCR 条件为:94℃、4 min;94℃、30 s,55℃、30 s,72℃、30 s,25 个循环;72℃、10 min;4℃终止反应。使用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物^[18]。利用软件 Oligo 6.0 设计内参基因 *GAPDH* (Glyceraldehyde-3-phosphate) 和 2 个目的基因的 qRT-PCR 引物 (表 1)。利用 Analytik Jena qTOWER2.2 (德国) 系统进行 qRT-PCR。按照 SYBR Green 试剂盒 (Rox) 说明书操作,扩增程序为:55℃ 2 min,95℃ 10 min,95℃ 15 s,60℃ 1 min,进行 40 个循环。随后设置 60℃ 至 95℃,生成融解曲线。

每个样品进行 3 个技术性重复,20 μL 的反应体系中包含:2 μL 稀释后的 cDNA (稀释比例为 1:3,稀释后的 cDNA 浓度大约是 350 ng · μL⁻¹),10 μL Fast-Start Universal SYBR Green Master (Rox),6 pmol 上游引物,6 pmol 下游引物以及 6.8 μL ddH₂O。基因的相对表达量按照 2^{-ΔΔCt} 方法进行计算^[19];试验数据经 SPSS 19.0 软件统计分析并绘图;数据采用 Duncan 法 ($P < 0.05$) 进行单因素方差分析。

2 结果与分析

2.1 *Thδ-OAT* 和 *ThP5CS* 基因的克隆

利用 3'RACE 扩增技术获得 2 个编码中山杉 *δ-OAT* 和 *P5CS* 基因长度分别为 229 bp 和 242 bp 的 3'端序列,利用 5'RACE 扩增技术获得编码中山杉 *δ-OAT* 和 *P5CS* 基因长度分别为 95 bp 和 763 bp 的 5'端序列 (表 2)。经过序列比对分析,得到编码中山杉 *δ-OAT* 和 *P5CS* 基因的全长,长度分别是 1 818 bp 和 2 550 bp (表 2)。编码中山杉 *δ-OAT* 的基因包含 1 个长度为 1 494 bp 的 ORF 开放阅读框,共编码 497 个氨基酸;编码中山杉 *P5CS* 的基因包含 1 个长度为 1 545 bp 的 ORF 开放阅读框,共编码 514 个氨基酸 (表 2)。

2.2 *Thδ-OAT* 和 *ThP5CS* 基因的序列分析

利用 TAIR 网站,将编码中山杉 *δ-OAT* 和 *P5CS* 基因序列分别与拟南芥 AT5G46180.1;AT3G55610.1 基因序列进行比对,其序列相似性分别为 82% 和 86%;将 2 个基因的蛋白质氨基酸序列在 GenBank 中进行 Blast 搜索,发现编码 *OAT* 的基因与樟子松 (*Pinus sylvestris* L. CAJ76070.1) 的蛋白序列相似性为 92%;编码 *P5CS* 的基因与花烛属植物 (*Anthurium amnicola* JAT40271.1) 的蛋白序列相似性为 87%,将 2 个基因命名为 *Thδ-OAT* 和 *ThP5CS*。

表 2 *Thδ-OAT* 和 *ThP5CS* 的序列分析

Table 2 Features of the *Thδ-OAT* and *ThP5CS*

Gene_ID	Full-length cDNA/bp	5'UTR /bp	3'UTR/bp	ORF/bp	预测多肽 Predicted peptide			二级结构预测 Secondary structure prediction			
					MW/kDa	PI	GRAVY	Hh/%	Ee/%	Tl/%	Cc/%
<i>Thδ-OAT</i>	1 818	95	229	1 494	55.11	6.26	-0.174	44.06	11.47	0.00	44.47
<i>ThP5CS</i>	2 550	763	242	1 545	55.32	6.35	0.036	36.19	18.09	0.00	45.72

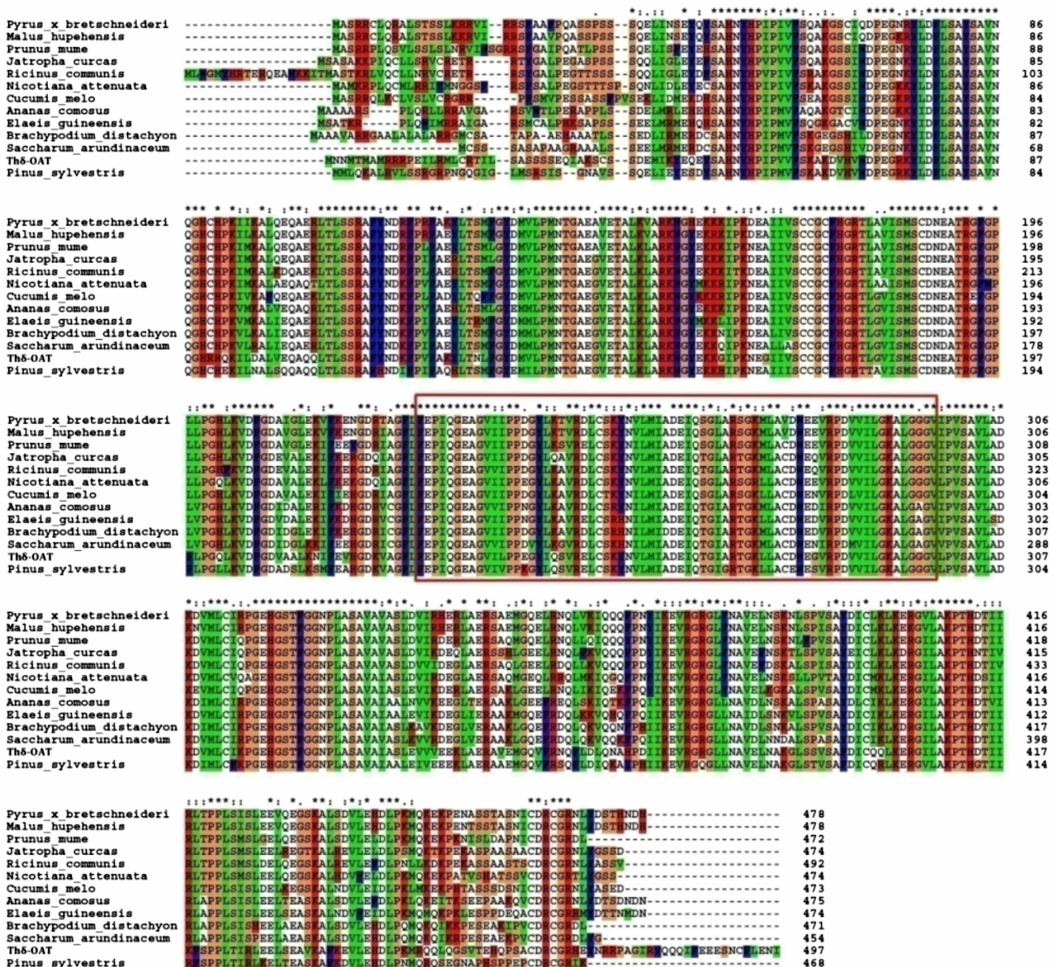
利用 ExPASyProtParam 工具对 *Thδ-OAT* 和 *ThP5CS* 序列进行在线分析,推测 *Thδ-OAT* 蛋白质的分子量为 55.11 KD,理论等电点为 6.26,平均亲水系数为 -0.174,为亲水性蛋白;*ThP5CS* 蛋白质的预测分子量为 55.32 KD,理论等电点为 6.35,平均

亲水系数为 0.036,为疏水性蛋白。利用 GOR4 软件预测蛋白二级结构,结果显示:*Thδ-OAT* 蛋白由 3 种结构模块组成,分别是 44.06% 的 α-螺旋,11.47% 的延伸链和 44.47% 的随机卷曲;而 *ThP5CS* 蛋白是由 36.19% 的 α-螺旋,18.09% 的延伸链和 45.72%

的随机卷曲组成的。

使用 MEGA 5.1 软件并选择最大似然法(Maximum Likelihood method)进行系统发育树的构建,bootstrap 自检值设为 1 000。选择其他物种:樟子松(Pinus sylvestris L. CAJ76070.1)、梅(Prunus mume Sieb. et Zucc XP_008225506.1)、菠萝(Ananas comosus L. XP_020092479.1)、油棕(Elaeis guineensis Jacq. XP_010940988.1)、桐油树(Jatropha curcas L. AKH80292.1)、烟草植物(Nicotiana attenuata XP_019259981.1)、蓖麻(Ricinus communis L. XP_002519647.2)、白梨(Pyrus x bretschneideri Rehd. XP_009360915.1)、甜瓜(Cucumis melo L. XP_008444491.1)、平邑甜茶(Malus hupehensis Rehd. AE051063.1)、二穗短柄草(Brachypodium distachyon L. XP_003561949.1)、斑茅(Saccharum arundinaceum L. ABV03818.1)参与 Thδ-OAT 多重序列比对和系统进化树的构建。选择其他

物种:油棕(Elaeis guineensis L. XP_010931200.1)、菠萝(Ananas comosus L. XP_020114091.1)、甜瓜(Cucumis melo L. XP_008441400.1)、海枣(Phoenix dactylifera L. XP_008777668.1)、可可树(Theobroma cacao L. XP_017976980.1)、荷花(Nelumbo nucifera Gertn. XP_010263774.1)、巨桉(Eucalyptus grandis L. XP_010067456.1)、花烛属植物(Anthurium amnicola JAT40271.1)、胡桃(Juglans regia L. XP_018809084.1)、毛果杨(Populus trichocarpa EEF01373.1)、棉花(Gossypium arboreum L. ACI62865.1)、枣(Ziziphus jujuba Mill. XP_015897148.1)参与 ThP5CS 多重序列比对和系统进化树的构建。多重序列比对结果显示:Thδ-OAT、ThP5CS 分别与其他物种基因的同源性都较高(图 1、图 2)。系统进化树构建结果显示:中山杉 Thδ-OAT 与樟子松亲缘关系较近,中山杉 ThP5CS 与花烛属植物亲缘关系较近,聚为一个分支(图 3,4)。

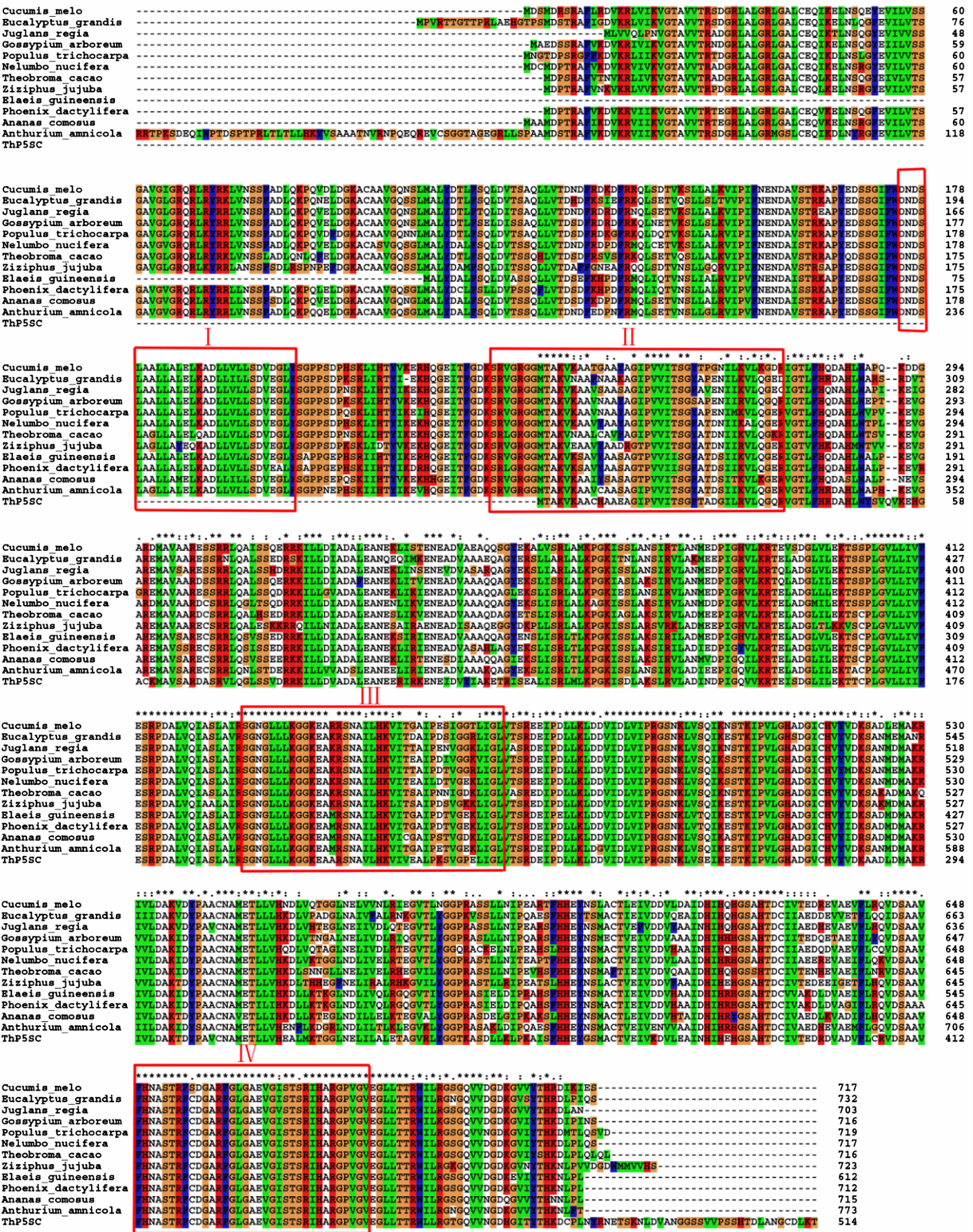


注:Thδ-OAT 氨基酸序列包括完整的鸟氨酸转氨酶功能区。

Note: Sequence contains a complete set of rocD (ornithine-oxo-acidtransferase)

图 1 Thδ-OAT 氨基酸序列与其他物种氨基酸序列的多重序列比对

Fig.1 Multialignment of amino acid sequences of Thδ-OAT and other δ-OATs



注:P5CS氨基酸序列中具有4个保守域,I,亮氨酸保守域;II,谷氨酸激酶保守域;III,NADPH结合保守域;IV,谷氨酸半醛脱氢酶保守域。

Note:Sequence contains four conserved domains, I, leucine; II, glutamyl kinase; III, NADPH-binding domain, and IV, glutamate-5-semialdehyde dehydrogenase.

图2 ThP5CS氨基酸序列与其他物种氨基酸序列的多重序列比对

Fig.2 Multialignment of amino acid sequences of ThP5CS and other P5CSs

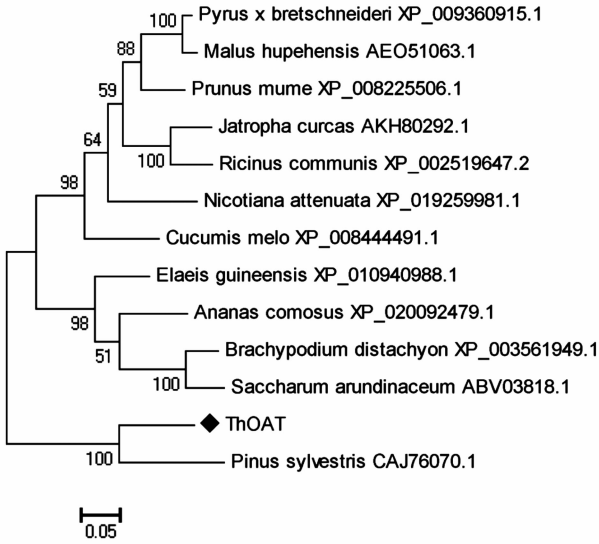


图3 中山杉 Thδ-OAT 蛋白的进化树
Fig. 3 Phylogenetic tree of the Thδ-OAT

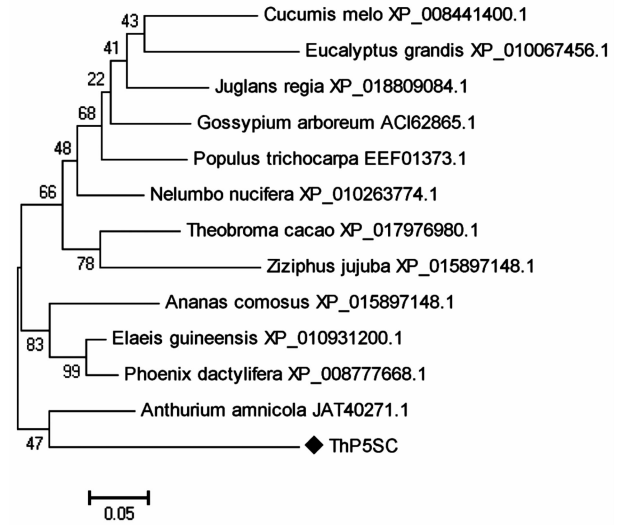
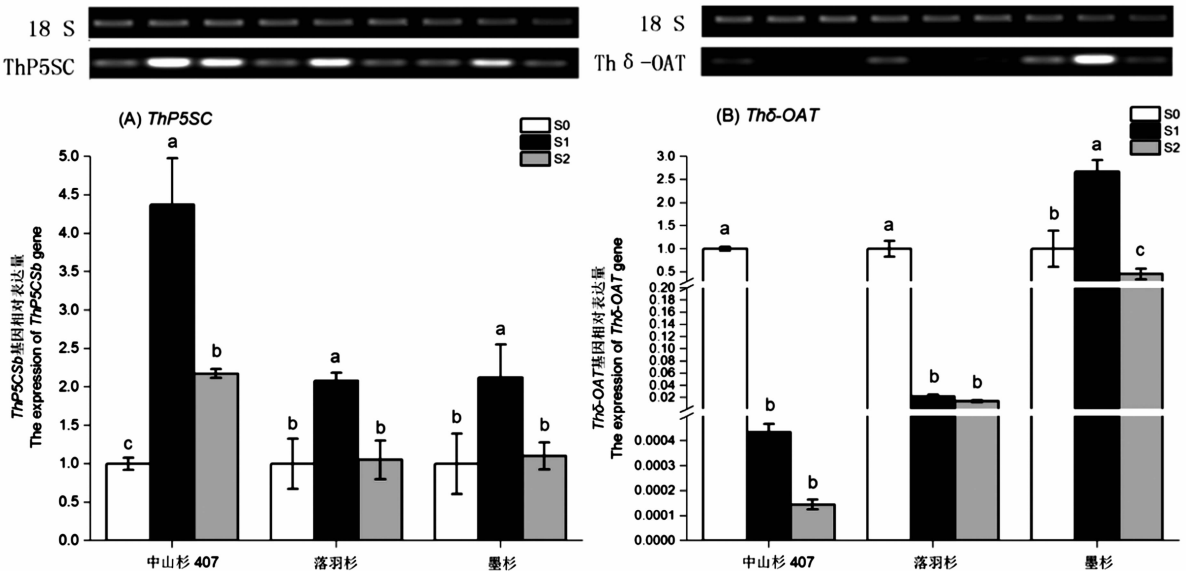


图4 中山杉 ThP5CS 蛋白的进化树
Fig. 4 Phylogenetic tree of the ThP5CS

2.3 Thδ-OAT 和 ThP5CS 基因表达分析

分别以干旱胁迫处理 0 d (S0), 连续干旱 8 d (S1), 以及复水 9 d (S2) 的 cDNA 为模板, 通过半定量与定量 PCR 技术对 Thδ-OAT 和 ThP5CS 基因的表达特性进行分析。与前期获得的脯氨酸含量变化趋势相一致^[15], 干旱处理后, ThP5CS 的表达量在中山杉 407 及其父母本中均显著上调 ($P < 0.05$) (图 5), 其中, 中山杉 407 ThP5CS 的

表达量是对照的 4.38 倍; 落羽杉和墨杉 ThP5CS 表达量分别为对照的 2.08 倍和 2.13 倍。复水后, ThP5CS 的表达量均呈下降的趋势。Thδ-OAT 基因在中山杉 407 及落羽杉中表达量均显著低于对照 ($P < 0.05$), 复水后表达量变化不明显; 而在母本墨杉中, 干旱环境使得 Thδ-OAT 表达量显著上调 ($P < 0.05$), 达到对照的 2.67 倍, 复水后, 基因表达量显著下降 ($P < 0.05$)。



注: 不同字母表示基因的相对表达量差异显著 ($P < 0.05$)。Note: Different letters mean significant difference at the $P < 0.05$ level.

图5 干旱及复水情况下 Thδ-OAT 和 ThP5CS 基因的表达情况

Fig. 5 The expression of Thδ-OAT and ThP5CS under drought stress and rewatering

3 讨论

植物在干旱环境下会主动积累渗透调节物质,维持细胞的膨压以抵御胁迫损害^[20]。脯氨酸是植物细胞最重要的渗透调节物质之一,它以游离状态存在于细胞中,在逆境环境下大量积累,以维持细胞的结构与功能,在胁迫结束的恢复阶段,脯氨酸又作为营养物质为细胞的新陈代谢活动提供能量^[5, 21]。前期的研究表明,在自然干旱胁迫下,中山杉及其亲本会大量积累脯氨酸,复水后,脯氨酸含量下降接近正常水平^[15]。

本研究从中山杉 407 中克隆编码合成脯氨酸关键酶的基因,根据多重序列比对、保守结构域分析以及系统进化分析,确定获得 2 个全长基因,编码中山杉 407 *P5CS* 和 δ -OAT 的合成,分别命名为 *ThP5CS* 和 *Th δ -OAT*。

中山杉 407 及其亲本在模拟自然干旱的环境下,其 *ThP5CS* 基因的表达量显著上调,这种变化趋势与刘静静等^[22]关于大蒜芥 (*Sisymbrium altissimum* L.) 在干旱胁迫下的 *SaP5CS1* 基因的表达研究结果相似。而在干旱结束后的复水环境下, *ThP5CS* 表达水平呈降低的趋势,这可能是一种补偿机制,植物通过降解脯氨酸为细胞恢复提供能量保障^[23]。在整个干旱-复水过程中, *ThP5CS* 在所有供试植物中的表达趋势与前期获得的脯氨酸含量变化趋势表现一致^[15],这说明对于中山杉 407 及其亲本, *ThP5CS* 基因的诱导表达,在植物处于正常和胁迫条件下脯氨酸的水平的调控中起着重要作用。杨成民等^[24]通过转基因技术在黑麦草 (*Lolium perenne* L.) 体内过表达 *P5CS* 基因,使转基因植株较对照植株积累更多的脯氨酸,增强了黑麦草对干旱胁迫的耐受能力。同时,Wei 等^[25]对百合属 (*Lilium*) 植物的研究中也发现 *P5CS* 基因在脯氨酸积累和耐非生物胁迫特性方面扮演了重要角色。综合表明, *P5CS* 基因与植物耐旱性有重要的联系。

δ -OAT 作为鸟氨酸途径的限速酶,在植物应激反应中也起到很重要的作用^[26]。干旱环境下,斑茅 δ -OAT 基因受到诱导表达上调^[9]。本研究中,墨杉 *Th δ -OAT* 在干旱胁迫下表达量显著上调,但在中山杉及落羽杉中的表达显著下调,且复水后表达量变化不明显。这种差异的原因可能是植株体内的氮元素含量有所不同。研究发现,在渗透胁迫条件下, δ -OAT 和 *P5CS* 的表达与植物体内的氮素水平有

关^[10]。在氮元素含量较低的情况下,谷氨酸途径在脯氨酸合成中占主要地位^[27]。由于鸟氨酸途径的限速酶是 δ -OAT,所以在氮元素含量较低时该酶的活性较低,进而调控该酶表达的 δ -OAT 基因也相应下调^[27]。可见,干旱胁迫下中山杉及亲本脯氨酸累积主要是通过谷氨酸途径, *P5CS* 基因的过量表达可以在一定程度上增加落羽杉属植物的耐旱性^[28]。

4 结论

干旱胁迫下 *Th δ -OAT* 和 *ThP5CS* 基因的正反方向调节是中山杉 407 及其亲本在干旱胁迫与恢复状态下控制脯氨酸水平的关键机制, *Th δ -OAT* 和 *ThP5CS* 基因的过量表达在一定程度上可以增加落羽杉属植物的耐旱性。此外, *ThP5CS* 的表达量明显高于 *Th δ -OAT*,说明干旱胁迫下,中山杉 407 及其亲本脯氨酸的积累主要依靠 *ThP5CS* 的调控。

参考文献:

- [1] 王顺才. 两种苹果砧木对干旱的响应机理及抗性基因表达分析研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2011.
- [2] Hadiarto T, Tran L-S P. Progress studies of drought-responsive genes in rice[J]. Plant cell reports, 2011, 30(3): 297-310.
- [3] 邵艳军, 山 仑. 植物耐旱机制研究进展[J]. 中国生态农业学报, 2006, 14(4): 16-20.
- [4] Bhaskara G B, T H Yang, P E Verslues. Dynamic proline metabolism: importance and regulation in water limited environments[J]. Frontiers in plant science, 2015, 6(6): 789-791.
- [5] Kishor P B K, Sangam S, Amrutha R, et al. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance[J]. Current Science, 2005, 88(3): 424-438.
- [6] Ribarits A, Abdullaev A, Tashpulatov A, et al. Two tobacco proline dehydrogenases are differentially regulated and play a role in early plant development[J]. Planta, 2007, 225(5): 1313-1324.
- [7] 赵宏伟, 王新鹏, 于美芳, 等. 分蘖期干旱胁迫及复水对水稻抗氧化系统及脯氨酸影响[J]. 东北农业大学学报, 2016, 47(2): 1-7.
- [8] Ahmed A A, Roosens N, Dewaele E, et al. Overexpression of a novel feedback-desensitized $\Delta 1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline accumulation and confers salt tolerance in transgenic *Nicotiana glauca* [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2015, 122(2): 383-393.
- [9] 王伟东, 疏再发, 杜昱林, 等. 茶树鸟氨酸转氨酶基因 *Cs δ -OAT* 克隆与表达分析[J]. 园艺学报, 2014, 41(12): 2465-2473.
- [10] 张 喆, 白 鹏, 肖 通, 等. 甘蓝型油菜 *P5CSb* 和 *OAT* 基因在干旱胁迫下的表达分析[J]. 西北农业学报, 2013, 22(9): 65-73.
- [11] 於朝广, 殷云龙, 徐建华. 落羽杉属 4 个新品种[J]. 林业科学,

- 2011,47(5):181-182.
- [12] 殷云龙,於朝广. 中山杉:落羽杉属树木杂交选育[M]. 北京:中国林业出版社,2005.
- [13] Creech D,Zhou L J,Yin Y L,*et al.* Can *Taxodium* be improved [J]. *Arnoldia*,2011,69(2):11-20.
- [14] 殷云龙,於朝广,华建峰,等. 重庆万州三峡库区消落带中山杉造林试验[J]. *林业科技开发*,2014,28(2):110-114.
- [15] 施 钦,殷云龙,王芝权,等. 中山杉及其父母本幼苗对干旱胁迫和复水的响应[J]. *应用生态学报*,2016,27(11):3435-3443.
- [16] Shi Q,Yin Y L,Wang Z Q,*et al.* Physiological Acclimation of *Taxodium* Hybrid 'Zhongshanshan 118' Plants to Short-term Drought Stress and Recovery[J]. *HortScience*,2016,51(9):1159-1166.
- [17] Tamura K,Peterson D,Peterson N,*et al.* MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. *Molecular biology and evolution*,2011,28(10):2731-2739.
- [18] Xuan L,Xu M,Chen C,*et al.* Identification and characterization of three *PeSHRs* and one *PeSCR* involved in adventitious root development of *Populus*[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*,2014,117(2):253-264.
- [19] Xu M,Zhang B,Su X H,*et al.* Reference gene selection for quantitative real-time polymerase chain reaction in *Populus* [J]. *Analytical biochemistry*,2011,408(2):337-339.
- [20] Hare P D,Cress W A,Staden J V. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress[J]. *Plant, cell & environment*,1998,21(6):535-553.
- [21] Szabados L,Savoure A. Proline: a multifunctional amino acid[J]. *Trends in plant science*,2010,15(2):89-97.
- [22] 刘静静,曲延英,姚正培,等. 大蒜芥 Δ' -吡咯啉-5-羧酸合成酶基因 (*P5CS*) 的克隆及表达分析[J]. *草业科学*,2015,32(2):210-216.
- [23] Zhao L Y,Deng X P,Shan L. Effects of progressive drying and re-watering on physiological and biochemical indicators in maize seedlings[J]. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*,2004,3:15.
- [24] 杨成民,王宏芝,孙振元,等. 利用基因枪共转化法获得转 *bar* 与 *P5CS* 基因黑麦草[J]. *草地学报*,2005,13(1):34-38.
- [25] Wei C,Cui Q,Zhang X Q,*et al.* Three *P5CS* genes including a novel one from *Lilium regale* play distinct roles in osmotic, drought and salt stress tolerance [J]. *Journal of Plant Biology*,2016,59(5):456-466.
- [26] Armengaud P,Thiery L,Buhot N,*et al.* Transcriptional regulation of proline biosynthesis in *Medicago truncatula* reveals developmental and environmental specific features [J]. *Physiologia plantarum*,2004,120(3):442-450.
- [27] 李 伟. 斑茅脯氨酸代谢关键基因 *Ea- δ -OAT* 和 *Ea-P5CS* 克隆及功能分析[D]. 福州,福建农林大学,2008.
- [28] Su M,Li X F,Ma X Y,*et al.* Cloning two *P5CS* genes from bioenergy sorghum and their expression profiles under abiotic stresses and MeJA treatment[J]. *Plant science*,2011,181(6):652-659.

(责任编辑:张 研)