



长叶红砂*RtVAMP2-2*基因克隆及功能验证

张健 王彩霞 王迎春 郑琳琳

Cloning and functional validation of *RtVAMP2-2* gene of *Reaumuria trigyna*

ZHANG Jian, WANG Caixia, WANG Yingchun, ZHENG Linlin

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2021-0423>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

长叶红砂*RtMYB1*基因的克隆及表达

Cloning and expression analysis of *RtMYB1* gene from *Reaumuria trigyna*

草业科学. 2018, 12(6): 1416 <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2017-0354>

盐生植物四翅滨藜*Actin*基因片段的克隆及表达分析

Cloning and expression analysis of an *Actin* gene fragment from the halophyte *Atriplex canescens*

草业科学. 2017, 11(3): 515 <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2016-0157>

四翅滨藜*AcDREB2*转录因子编码基因的克隆及其表达

Cloning and expression of the *AcDREB2* transcription-factor gene in *Atriplex canescens*

草业科学. 2021, 38(3): 523 <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2020-0559>

日本结缕草*ZjNAC3*基因在盐胁迫中的功能

Functional characterization of *Zoysia japonica ZjNAC3* gene in response to salt stress

草业科学. 2021, 38(9): 1706 <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2021-0102>

柱花草*SgSTOP1*和*SgSTOP2*基因的克隆与表达分析

Cloning and expression analysis of *SgSTOP1* and *SgSTOP2* in *Stylosanthes guianensis*

草业科学. 2019, 36(3): 704 <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2018-0497>

重度盐胁迫下12个地被草种萌发期的耐盐性比较

Comparison of salt tolerance during the germination period of 12 grass species under severe salt stress

草业科学. 2019, 36(11): 2806 <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2019-0002>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

DOI: 10.11829/j.issn.1001-0629.2021-0423

张健, 王彩霞, 王迎春, 郑琳琳. 长叶红砂 *RtVAMP2-2* 基因克隆及功能验证. 草业科学, 2021, 38(12): 2363-2371.

ZHANG J, WANG C X, WANG Y C, ZHENG L L. Cloning and functional validation of *RtVAMP2-2* gene of *Reaumuria trigyna*. Pratacultural Science, 2021, 38(12): 2363-2371.

长叶红砂 *RtVAMP2-2* 基因克隆及功能验证

张 健, 王彩霞, 王迎春, 郑琳琳

(内蒙古大学生命科学学院, 内蒙古 呼和浩特 010000)

摘要: 长叶红砂 (*Reaumuria trigyna*) 是一种珍稀泌盐盐生植物, 其特有的盐腺结构是长叶红砂适应盐渍荒漠环境的关键, 膜泡运输参与该植物的盐腺分泌过程。本研究基于盐胁迫下长叶红砂的转录组数据, 克隆获得膜泡运输相关基因 *RtVAMP2-2*。生物信息学分析发现, *RtVAMP2-2* 基因的开放阅读框为 1 074 bp, 编码 357 个氨基酸; 亚细胞定位和表达特性分析表明, 该基因定位于细胞质膜, 其表达受盐胁迫诱导; 构建植物表达载体, 将 *RtVAMP2-2* 基因转入拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中进行功能鉴定, 结果显示, 转基因拟南芥呈现盐敏感的表型, 推测 *RtVAMP2-2* 基因可能在植物耐盐中发挥负调控作用。

关键词: 转基因; 盐腺; 膜泡运输; 盐胁迫; VAMP; 泌盐盐生植物; 长叶红砂

文献标志码: A 文章编号: 1001-0629(2021)12-2363-09

Cloning and functional validation of *RtVAMP2-2* gene of *Reaumuria trigyna*

ZHANG Jian, WANG Caixia, WANG Yingchun, ZHENG Linlin

(College of Life Sciences, Inner Mongolia University, Hohhot 010000, Inner Mongolia, China)

Abstract: *Reaumuria trigyna* is a rare recretohalophyte. Its unique salt-gland structure plays a key role in its adaptation to saline desert environment, and vesicular trafficking is involved in the salt secretion process of the plant. In this study, *RtVAMP2-2* gene involved in membrane vesicle trafficking was cloned based on the analysis of transcriptome data of *R. trigyna* under salt stress. The ORF of *RtVAMP2-2* was 1 074 bp and encoded 357 amino acids. *RtVAMP2-2* was localized to the plasma membrane, and its expression was induced by saline stress. Then *RtVAMP2-2* was transferred into *Arabidopsis thaliana* for functional validation. The results showed that the transgenic *Arabidopsis thaliana* showed a salt-sensitive phenotype, and was speculated that the *RtVAMP2-2* may have a negative regulatory effect on plant salt tolerance.

Keywords: transgenesis; salt-gland; vesicular trafficking; salt tolerance; VAMP; recretohalophyte; *Reaumuria trigyna*

Corresponding author: ZHENG Linlin E-mail: 13856265@qq.com

长叶红砂 (*Reaumuria trigyna*) 又被称为黄花红砂或黄花琵琶柴, 柽柳科 (Tamariceae) 琵琶柴属 (*Reaumuria*), 是一种强旱生泌盐小灌木, 主要分布于东阿拉善-西鄂尔多斯地区, 是内蒙古自治区和国家重点保护植物之一^[1]。由于其生境具有干旱、高盐和低温等特点, 在长期的自然选择下, 长叶红

砂进化出了一种泌盐结构——盐腺, 该结构在长叶红砂适应盐渍环境中发挥至关重要的功能^[2]。此外, 该植物还具有一定的药用价值, 其枝、叶及果实均可入药, 用于治疗湿疹和皮炎等^[3]。近年来, 已先后对长叶红砂的形态结构、耐盐机制、转录组数据等进行了颇为深入的研究, 为开发利用这种珍贵的

收稿日期: 2021-07-07 接受日期: 2021-12-25

基金项目: 国家自然科学基金 (31860669); 内蒙古自治区高等学校“青年科技英才支持计划”(NJYT-19-B04)

第一作者: 张健 (1997-), 男, 内蒙古扎赉特旗人, 硕士, 主要从事植物生理生化及分子生物学方面的研究。E-mail: 1121090279@qq.com

通信作者: 郑琳琳 (1983-), 女, 内蒙古扎兰屯人, 副教授, 博士, 主要从事植物抗逆生理及分子生物学研究。E-mail: 13856265@qq.com

植物资源提供了科学依据^[4-6]。

在植物中,定向膜泡运输是维持细胞稳态、极性、生长和发育的基础^[7],该过程涉及可溶性 N-乙基马来酰胺敏感因子连接复合体(soluble N-ethyl-maleimide-sensitive factor protein attachment protein receptor, SNARE)的参与,它通过在水环境中将囊泡和目标膜表面结合在一起介导双层融合^[8]。有研究表明,膜泡结合膜蛋白(vesicle-associated membrane protein, VAMP)可能参与了含盐囊泡的排出过程,该蛋白属于 R-SNAREs,在植物中以蛋白家族形式存在,如拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)基因组中含有 14 个 VAMP 家族成员^[9]。VAMPs 在植物物质运输、生长发育及抵抗生物和非生物胁迫方面均发挥着重要作用^[10-13]。AtSYP121、AtVAMP721/722 和 AtSNAP33 能够组成三元复合体,在拟南芥免疫应答过程执行重要功能,AtVAMP721/722 的缺失将削弱拟南芥对剧毒卵菌以及宿主特异性和非特异性霉菌感染的防御能力^[14]; Sugano 等^[15]研究证实,定位于叶绿体和液泡膜上的 *OsVAMP714* 的过量表达可以增强水稻(*Oryza sativa*)对稻瘟病的抗性,同时促进叶鞘伸长;Ebine 等^[16]报道了一种植物特有的 R-SNARE 蛋白,将其命名为 VAMP727,主要用于介导由胞内体向细胞质膜方向的运输,该蛋白在拟南芥响应盐胁迫过程中发挥重要作用。

本研究基于长叶红砂耐盐转录组数据分析^[6],结合 RT-qPCR 结果发现, *RtVAMP2-2* 基因(Genbank 登录号 MZ852768)在盐胁迫诱导下表达量显著升高($P < 0.05$),表明 *RtVAMP2-2* 基因可能在长叶红砂应对盐胁迫中发挥一定的功能。因此,本研究克隆获得膜泡运输相关基因 *RtVAMP2-2*,对其进行生物信息学、亚细胞定位和表达特性进行分析,并将该基因转入拟南芥中进行进一步的功能鉴定,以期为长叶红砂盐腺泌盐机理的阐明和开发该植物优异抗逆基因资源提供科学依据。

1 材料与amp;方法

1.1 植物材料、菌株和载体

长叶红砂种子于 2017 年 10 月采摘自内蒙古乌海市郊,野生型拟南芥(Columbia-0)、本式烟草(*Nicotiana tabacum*)为牧草与特色作物生物技术教育部重点实验室保存;Trans-T1 感受态细胞(全式

金)、pMD19-T (TaKaRa);农杆菌 GV3101、pPZP221 表达载体、pCAMBIA-1300 亚细胞表达载体也为牧草与特色作物生物技术教育部重点实验室保存。

1.2 引物设计

RtVAMP2-2 基因的序列筛选自前期已经获得的长叶红砂耐盐转录组数据,序列的总长度为 1 960 bp。使用在线工具 ORF Finder,发现 *RtVAMP2-2* 基因的 ORF 为 1 074 bp。利用 Primer 5.0 软件,针对不同的用途,分别设计了不同的引物:设计一对引物用于 *RtVAMP2-2* 基因的克隆,分别在上下游引物 5'末端插入了 *Bam*H I 和 *Kpn* I 酶切位点;设计一对引物用于 *RtVAMP2-2* 基因亚细胞定位分析,去掉终止密码子,分别在上下游引物 5'末端插入了 *Kpn* I 和 *Xba* I 酶切位点;设计一对引物用于 *RtVAMP2-2* 基因的 RT-qPCR;设计一对引物用于内参基因 *RtActin* 的 RT-qPCR (表 1)。

1.3 *RtVAMP2-2* 基因的克隆

长叶红砂总 RNA 按照 Eastep Super 说明书(Promega)提取;按照反转录试剂盒 PrimeScript™ II 1st strand cDNA synthesis kit (TaKaRa)的说明书以 RNA 为模板合成 cDNA 第一链,再通过 oligo (dT) 合成 cDNA 第二链。以 cDNA 为模板,使用上述用于 pMD19T-*RtVAMP2-2* 载体构建的引物,用 Trans start Taq 酶(全式金)扩增 *RtVAMP2-2* 基因编码序列。PCR 结束后产物回收,与 pMD19-T 载体连接,将连接的产物转化至感受态细胞 Trans-T1 中。之后将菌落 PCR 验证呈阳性的菌株送至北京生工生物公司测序。

1.4 *RtVAMP2-2* 基因生物信息学分析

利用 DANMAN 6.0 软件分析蛋白的理论分子量和等电点;利用 NCBI 网站识别 ORF 并翻译出氨基酸序列;利用在线工具 Pfam 分析功能结构域;利用 DANMAN 6.0 软件进行氨基酸序列的比对。

1.5 *RtVAMP2-2* 基因的亚细胞定位分析

使用上述构建亚细胞定位载体的引物,PCR 扩增去掉终止密码子的 ORF,连接到 pMD19-T 载体中,转入大肠杆菌进行克隆。按照质粒提取试剂盒 EasyPure Plasmid MiniPrep Kit (全式金)的说明书提取重组质粒与亚细胞定位载体 pCAMBIA-1 300 一起进行双酶切,将酶切产物用 T4 DNA 连接酶(SIGMA)

表 1 植物表达载体的构建及 RT-qPCR 所需的引物序列
Table 1 Primers sequences used in plant vector construction and RT-qPCR

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')	用途 Purpose
RtVAMP2-2- <i>Bam</i> H I-F	CGGGATCCCGATGAGCTCTCAACTATTGGAGATTC	pMD19T-RtVAMP2-2载体构建 Construction of pMD19T-RtVAMP2-2 vector
RtVAMP2-2- <i>Kpn</i> I-R	GGGGTACCCCTACCGGTGCATGGAATAACC	pMD19T-RtVAMP2-2载体构建 Construction of pMD19T-RtVAMP2-2 vector
RtVAMP2-2- <i>Kpn</i> I -F	GGGGTACCATGAGCTCTCAACTATT	亚细胞定位载体的构建 Construction of subcellular localization vectors
RtVAMP2-2- <i>Xba</i> I -R	GCTCTAGACCGGTGCATGGAATAA	亚细胞定位载体的构建 Construction of subcellular localization vectors
RtVAMP2-2-RT-F	GAGAACCTGCTCCAAATCACG	RT-qPCR
RtVAMP2-2-RT-R	TCCTTCGGGTGTTCACTACTGG	RT-qPCR
RtActin-RT-F	GGAATCCACGAGACCACCTACA	对照 Control
RtActin-RT-R	GATTGATCCTCCGATCCAGACA	对照 Control

连接得到亚细胞定位重组载体,电转到农杆菌中,之后用无针头注射器注射到烟草中,待 3~5 d 后利用激光扫描共聚焦显微镜进行观察。

1.6 *RtVAMP2-2* 基因的表达特性分析

将长叶红砂种子剪去绒毛,放入 10% NaCl 溶液中,浸泡过夜,再用 10% NaClO 浸泡 10~15 min,期间不断用玻璃棒搅拌,放到超净台用灭菌水反复冲洗 3~5 次,播种于固体 MS 培养基中,暗培养 2~3 d 后,置于温度 25 °C、湿度 70%、16 h/8 h (光照/黑暗)的人工气候室中培养 20~30 d,选择长势较好的幼苗移入装有 Hoagland 营养液的无菌大试管中,以相同的条件再培养 15~20 d,选择生长到 10 cm 左右的长叶红砂幼苗,进行盐胁迫。将不同浓度 (100、200、300、400、500 mmol·L⁻¹) 的 NaCl 加入到 Hoagland 营养液中处理 6 h,不加 NaCl 为对照组,其余浓度 (Hoagland + NaCl) 为试验组;使用 300 mmol·L⁻¹ NaCl 进行不同时间 (3、6、12、24 h) 的处理,NaCl 处理时间 0 时即为对照组,其余处理时间为试验组,收获叶片用液氮处理,-80 °C 保存备用。提取处理后的长叶红砂叶片 RNA,反转录成 cDNA,使用上述用于 RT-qPCR 的引物,按照 TransStart Tip Green qPCR SuperMix 试剂盒说明书 (全式金),进行 RT-qPCR。不同处理各 3 个重复。

1.7 拟南芥的遗传转化及转 *RtVAMP2-2* 基因植株的筛选和鉴定

利用上述带 *Kpn* I 和 *Bam*H I 酶切位点的引物

扩增 *RtVAMP2-2* 的 ORF,将扩增产物同 pPZP221 载体连接,将连接的产物转化大肠杆菌,之后进行蓝白斑筛选,将白色菌落提取质粒进行 PCR 和双酶切验证,并将验证结果正确的菌株送至北京生工生物公司测序。利用电转法将构建成功的表达载体转化到农杆菌中,再通过花序浸染法侵染拟南芥,在 Gent 抗性培养基中筛选至 T3 代纯合体植株。通过基因组 PCR、RT-qPCR 等技术对转基因拟南芥进行鉴定,最终筛选出 3 个转基因株系。

1.8 转 *RtVAMP2-2* 基因拟南芥的耐盐性分析

将野生型 (Columbia-0) 和 3 个转基因株系拟南芥种子播种到 1/2 MS 固体培养基中进行培养,待生长至 7 d 后,将幼苗分别移到含有 0、75、100 mmol·L⁻¹ NaCl 的胁迫培养基中,继续生长 7 d 后测量根长,14 d 后测量鲜重和叶绿素含量。按照 DAB 和 BCIP/NBT 显色试剂盒说明书 (Coolaber 北京) 进行操作,对转基因拟南芥叶片进行 DAB 和 NBT 染色。

2 结果

2.1 *RtVAMP2-2* 基因的克隆

在转录组数据中找到一段注释为 *VAMP* 的基因序列,根据该序列设计引物,通过 PCR 扩增克隆获得基因编码序列 (coding sequences, CDS) 1 074 bp (图 1A)。将该 CDS 序列连接 pMD19-T 载体,转化到大肠杆菌中,菌液 PCR 验证与预期大小一致 (图 1B)。

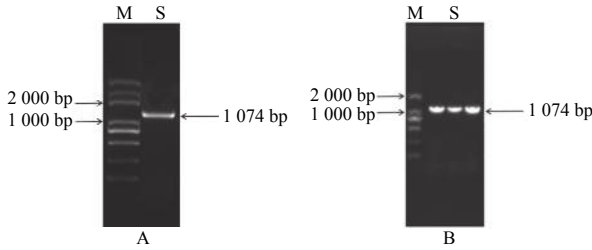


图 1 PCR 扩增 *RtVAMP2-2* 基因的 ORF
Figure 1 Amplification of the ORF of *RtVAMP2-2* gene by PCR

A: 反转录 PCR; B: 菌落 PCR; M: DNA 分子量标准; S: *RtVAMP2-2* 基因的 ORF。

A: RT-PCR; B: Colony PCR; M: 2K DNA Marker; S: The ORF of *RtVAMP2-2* gene.

经氨基酸序列比对,结果显示其与 NCBI 数据库中多种植物 *VAMP2-2* 基因具有高度的同源性,因此命名为 *RtVAMP2-2*。

2.2 *RtVAMP2-2* 基因的生物信息学分析

通过在线工具 ORF Finder 分析发现, *VAMP2-2* 基因的开放阅读框 (open reading frame, ORF) 为 1 074 bp, 编码氨基酸的数量为 357。利用 NCBI blast 对 *VAMP2-2* 氨基酸序列进行同源比对,发现 *VAMP2-2* 蛋白与葡萄 (*Vitis riparia*, XP_034706841.1) 的相似度最高,为 51%;与番木瓜 (*Carica papaya*, XP_021891213.1) 的相似度为 50%;与陆地棉 (*Gossypium*

hirsutum, XP_016672432.1) 的相似度为 50%;与菠菜 (*Spinacia oleracea*, XP_021835062.1) 的相似度为 49%;与茶树 (*Camellia sinensis*, XP_028098258.1) 的相似度为 49%。利用在线工具 Pfam 分析发现, *VAMP2-2* 的 N 端有主要精子蛋白 (major sperm protein, MSP) 结构域,此结构域是 VAMP 蛋白家族的保守结构域,在动物体中参与精子的运动^[17]。用 DNAMAN 软件比对上述不同植物 VAMP 蛋白的氨基酸序列,比对结果如图 2 所示,划线处为 MSP 结构域。

2.3 *RtVAMP2-2* 基因的亚细胞定位分析

为进一步了解 *RtVAMP2-2* 基因的功能,本研究分析了该基因的亚细胞定位情况。通过农杆菌转化法,在烟草表皮细胞中,瞬时表达 CaMV35S 启动子驱动的 *RtVAMP2-2*-GFP 融合蛋白。以 pCAMBIA-1300 载体作为阴性对照,以质膜定位的拟南芥 PM-mCherry 蛋白作为阳性对照。利用激光扫描共聚焦显微镜观察,发现阴性对照中绿色荧光分布于整个细胞中 (图 3A),而 PM-mCherry 蛋白的红色荧光与 *RtVAMP2-2* 蛋白的绿色荧光于细胞质膜上完全重合 (图 3 B-D),说明 *RtVAMP2-2* 蛋白定位于细胞质膜。

2.4 *RtVAMP2-2* 基因的表达特性分析

采用 RT-qPCR 技术分析 *RtVAMP2-2* 基因在不同组织的表达特性。结果显示,该基因的表达量茎 >

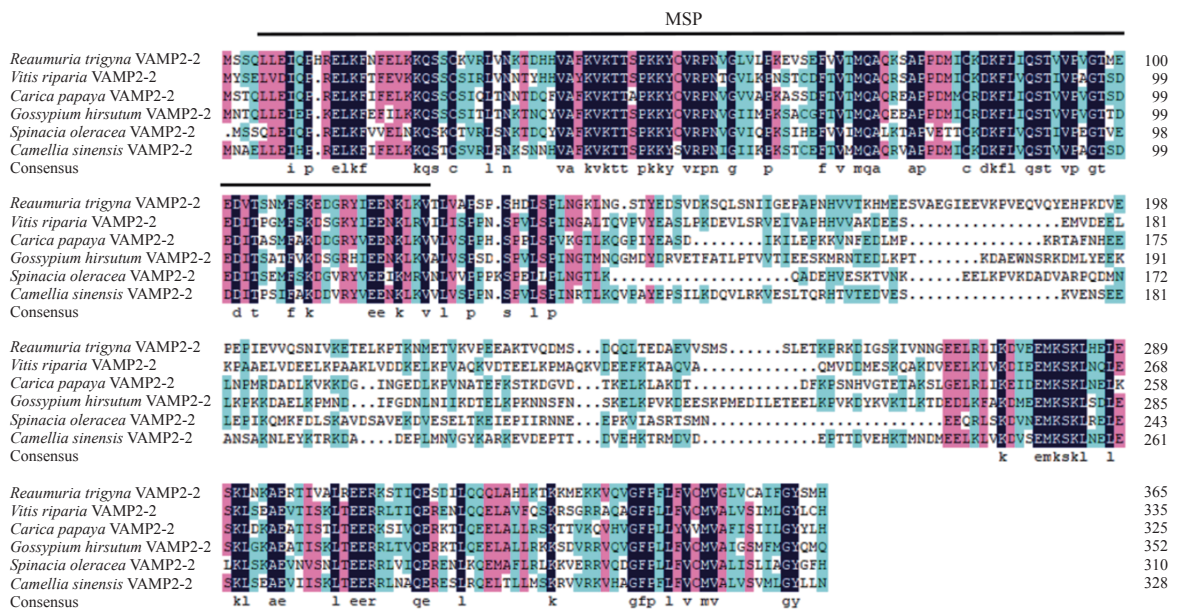


图 2 VAMPs 的氨基酸序列比对

Figure 2 Amino acid sequence alignment of VAMPs

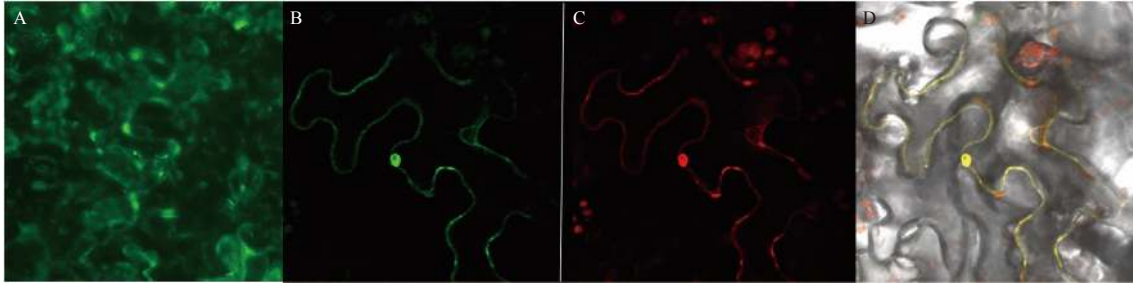


图 3 *RtVAMP2-2* 蛋白的亚细胞定位

Figure 3 Subcellular localization of *RtVAMP2-2*

A 代表 pCAMBIA-GFP 载体的亚细胞定位; B、C、D 分别代表烟草叶片细胞中 *RtVAMP2-2*, mCherry 及二者融合图像的亚细胞定位。

A represent the subcellular localization of pCAMBIA-GFP; B, C, and D represent the subcellular localization of *RtVAMP2-2*, mCherry and their fusion images in tobacco leaf cells, respectively.

根 > 叶 (图 4)。

为了分析 *RtVAMP2-2* 基因在盐胁迫下的表达特性,本研究检测了 *RtVAMP2-2* 基因在盐胁迫下的表达量。结果显示,除 200 mmol·L⁻¹ NaCl 处理外,其余浓度 NaCl 处理下, *RtVAMP2-2* 基因的表达量与对照组相比均显著增加 ($P < 0.05$),在 100 mmol·L⁻¹ NaCl 时,该基因的表达量最高,达到了对照组的 2.76 倍 (图 5A);之后分别利用 300 mmol·L⁻¹ NaCl 进行不同时间梯度的胁迫,发现在 300 mmol·L⁻¹ NaCl 的处理下,基因的表达量随处理时间的增加呈现平缓上升的趋势,12 h 时达到顶峰 (图 5B)。上述结果说明, *RtVAMP2-2* 基因可以被盐胁迫所诱导。

2.5 *RtVAMP2-2* 转基因拟南芥的筛选

利用电转法将真核表达载体转化到农杆菌中,再通过花序浸染法侵染拟南芥,在 Gent 抗性培养基中筛选获得了 T1 代转基因拟南芥 (图 6A),收种子

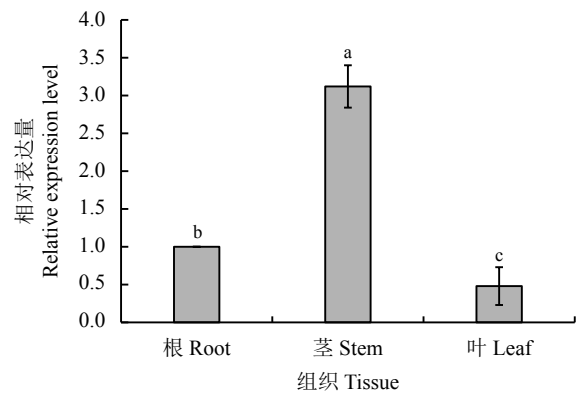


图 4 长叶红砂不同组织中 *RtVAMP2-2* 基因相对表达量

Figure 4 The relative expression of *RtVAMP2-2* gene in different tissues of *Reaumuria trigyna*

不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$); 下同。

Different lowercase letters indicate significant differences at the 0.05 level. This is applicable for the following figures as well.

后再用相同的方式筛选,获得纯合体 T3 代植株 (图 6B)。提取 DNA 进行 PCR 扩增,发现转基因拟南芥 OE1、

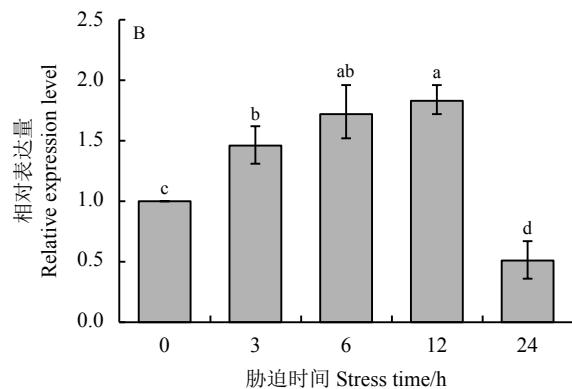
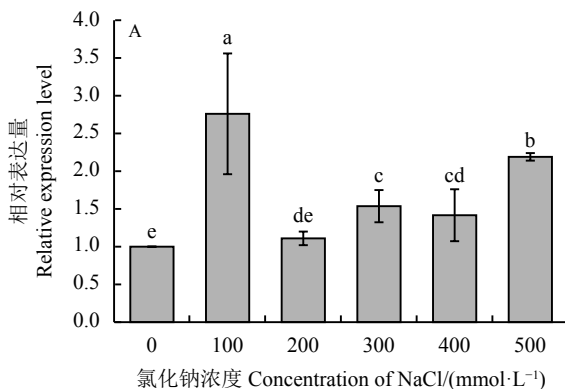


图 5 长叶红砂在 NaCl 处理下 *RtVAMP2-2* 基因的表达水平

Figure 5 Expression level of *RtVAMP2-2* gene under NaCl stress in *Reaumuria trigyna*

A: 不同浓度 NaCl 处理 6 h; B: 300 mmol·L⁻¹ 氯化钠处理。

A: Different concentrations of NaCl stress for 6 hours; B: Stress with 300 mmol·L⁻¹ NaCl.

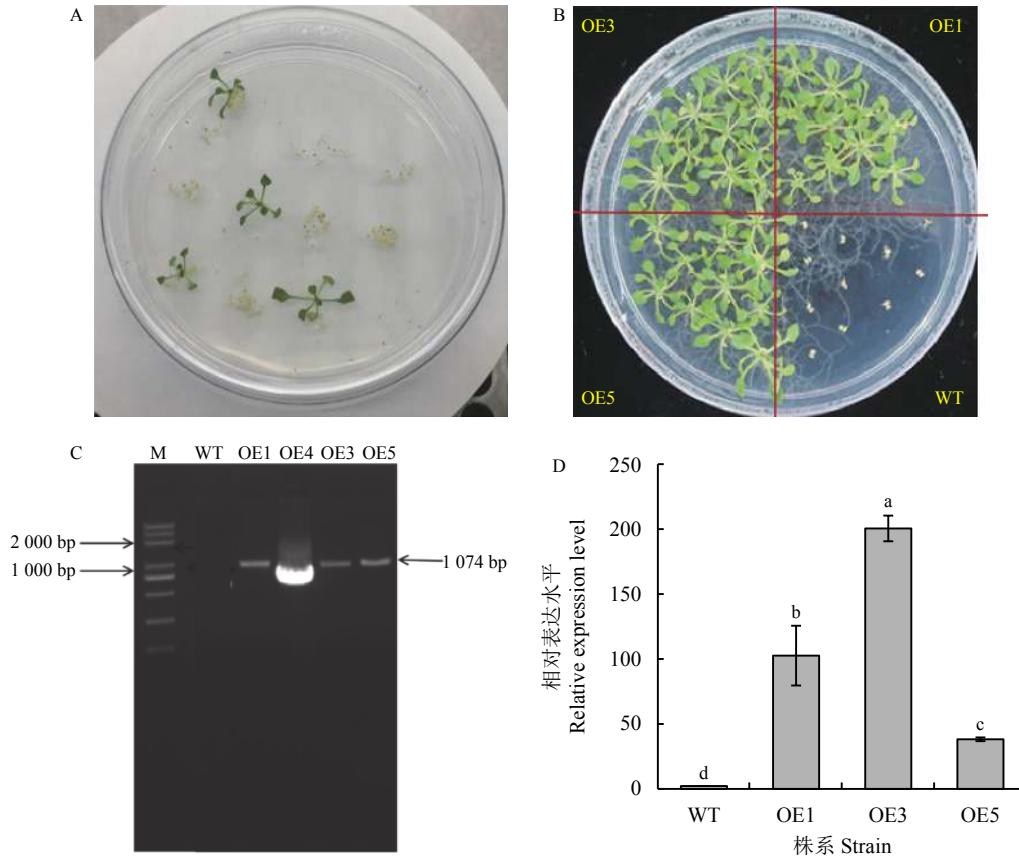


图 6 *RtVAMP2-2* 转基因拟南芥的筛选与鉴定

Figure 6 Screening and identification of *RtVAMP2-2* transgenic *Arabidopsis*

A: T1 代转基因拟南芥; B: T3 代拟南芥, WT 代表野生型拟南芥, OE1, OE3 和 OE5 代表 3 个转基因株系; C: 转基因拟南芥的基因组 PCR 检测; D: 转基因拟南芥 RT-qPCR 分析; 下同。

A: T1 generation transgenic *Arabidopsis*; B: T3 generation *Arabidopsis*, WT represent wild-type *Arabidopsis*, OE1, OE3 and OE5 represent the three *RtVAMP2-2* transgenic *Arabidopsis*; C: PCR identification of transgenic *Arabidopsis*; D: RT-qPCR analysis of transgenic *Arabidopsis*; this is applicable for the following figures as well.

OE3、OE5 均可扩增出 *RtVAMP2-2* 基因的特异性片段, 而野生型无条带 (图 6C); 将 3 个转基因株系提取 RNA 进行 RT-qPCR 检测, 3 个转基因株系中均扩增出特异性条带 (图 6D), 上述结果显示目的基因已成功转入拟南芥基因组中并进行稳定表达。

2.6 盐胁迫条件下 *RtVAMP2-2* 转基因拟南芥的耐受性分析

为了分析 *RtVAMP2-2* 基因在植物应对盐胁迫中发挥的作用, 本研究对比了野生型拟南芥和转基因株系的生长表型, 并对根长、鲜重、叶绿素含量进行了测定。结果显示, 在对照组中, 野生型和转基因拟南芥长势良好, 并无明显差异, 但在不同浓度的盐胁迫下, 野生型和转基因拟南芥的根长、鲜重、叶绿素含量均下降, 且随着 NaCl 浓度的增加, 生长受

到抑制的程度愈发严重 (图 7), 但野生型的生长状况和相关指标一直优于转基因植株, 反映出转基因植株具有盐敏感性。

对野生型和转基因拟南芥幼苗的叶片进行 DAB 和 NBT 染色。结果如图 8 所示, 胁迫处理后转基因植株叶片中积累了更多的蓝色和褐色沉淀物, 说明在盐胁迫下, 与野生型相比, 转基因株系积累了更多的 ROS, 氧化损伤程度更高。

3 讨论与结论

VAMP 作为膜泡运输相关基因, 已经在动物和模式植物拟南芥中进行了广泛研究, 但是在泌盐盐生植物中却鲜有报道。事实上, 膜泡运输已被证实 在盐腺泌盐中发挥着关键作用^[18], 因此在泌盐盐生植物中研究该基因, 具有重要价值。本研究克隆获

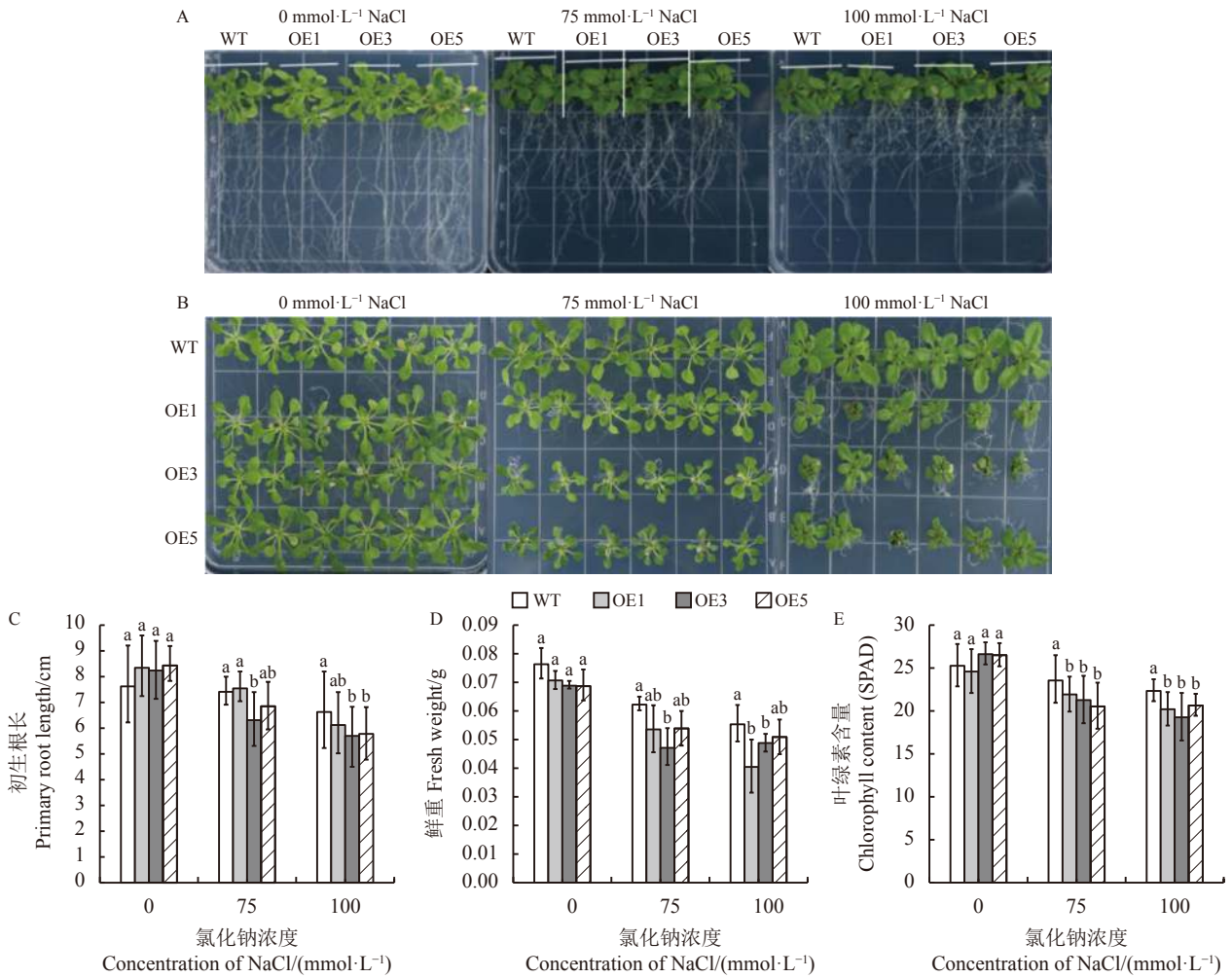


图 7 不同浓度的 NaCl 对转 *RtVAMP2-2* 基因拟南芥生长的影响

Figure 7 Effects of different concentrations of NaCl on the growth of transgenic *Arabidopsis*

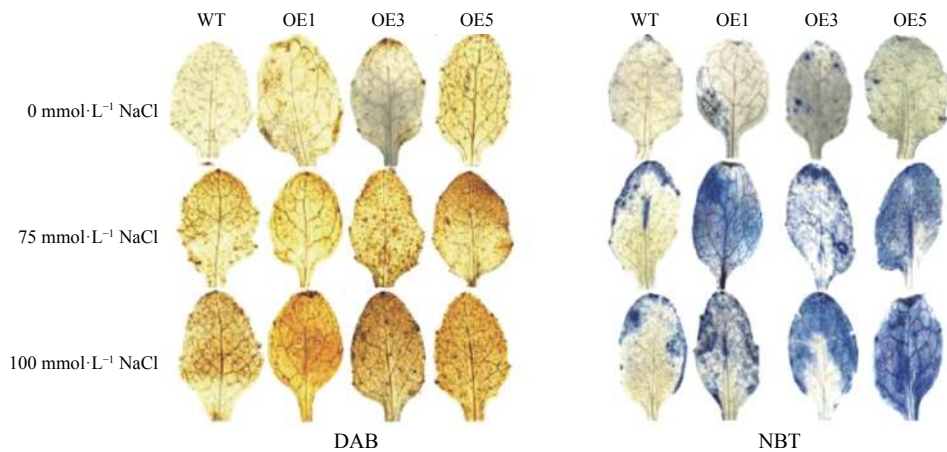


图 8 不同浓度盐胁迫下叶片的 DAB 和 NBT 染色

Figure 8 DAB and NBT staining of leaves under salt stress

得长叶红砂 *RtVAMP2-2* 基因, 并对其进行了生物信息学、亚细胞定位和表达特性分析, 发现 NaCl 能诱导 *RtVAMP2-2* 基因的表达, 说明 *RtVAMP2-2* 基因可

能在植物应对盐胁迫中发挥作用, 但具体发挥何种调控作用, 需要通过转基因或基因沉默等试验进一步加以阐释。

研究表明, VAMP 蛋白家族在植物应对盐胁迫中发挥重要作用, 但不同的成员对植物耐盐性的影响大不相同。一些 VAMP 蛋白对植物的耐盐性具有积极作用, 如 Josselyn 等^[19] 利用微阵列和 RT-qPCR 技术发现番茄 (*Solanum lycopersicum*) 的 *SIVAMP727* 等 *SNARE* 基因与盐胁迫呈正相关关系, 暗示该基因在植物盐胁迫应答中发挥重要作用。而另外一些 VAMP 蛋白则对植物的耐盐性具有消极作用, 如 Leshem 等^[20] 通过反义或突变 *AtVAMP711* 基因来抑制 *AtVAMP7C* 基因的表达, 发现含 H_2O_2 的囊泡与液泡膜的融合受到抑制, 使细胞质中保留许多含 H_2O_2 的大囊泡, 使得突变植株的液泡免受活性氧的损伤, 能够发挥良好的功能, 从而提高了植物的耐盐性, 推测该基因对植物的耐盐性具有消极作用; Sun 等^[21] 通过研究发现, 高盐度能够诱导野生大豆 *GsVAMP72* 基因的表达, 表明 *GsVAMP72* 可能参与植物应对盐胁迫的响应, 之后将 *GsVAMP72* 基因导入拟南芥中, 发现该基因的过量表达通过下调 *COR47*、*CORA15A*、*KRNI*、*RAB18* 和 *RD29A* 等应激反应基因的表达和改变细胞离子含量的方式, 显著降低了植物对盐的耐受性。本研究中得到了与 Sun 类似的结果, 将 *RtVAMP2-2* 基因转入拟南芥中, 发现盐胁迫下转基因拟南芥的生理指标比野生型

更低, 并且在叶片中积累了更多的活性氧, 说明异源表达 *RtVAMP2-2* 基因可以通过抑制转基因拟南芥根的生长, 削弱光合作用效率, 减少生物量积累, 增加氧化损伤程度, 从而导致转基因植株对盐的敏感性提高。

事实上, 本研究发现的盐胁迫下基因表达量上调, 而转基因拟南芥却对盐敏感的现象并不少见。例如曹扬荣等^[22] 发现烟草的 *NtRop1* 基因的表达水平受到 NaCl 的诱导, 将该基因转到拟南芥中, 发现转基因拟南芥对 NaCl 的敏感性有所增加; 王燕^[23] 将盐胁迫下表达量显著增加的唐古特白刺 (*Nitraria tangutorum*) *NtAOC* 基因转入到拟南芥中, 发现该基因增加了拟南芥对盐的敏感性。推测原因可能是 *RtVAMP2-2* 基因在不同植物应对非生物胁迫中所发挥的调控作用有所不同, 特别是在盐生植物和甜土植物存在较大差异, 后续将进一步通过转化盐生植物二色补血草 (*Limonium bicolor*) 进行对比分析。

综上, *RtVAMP2-2* 基因在长叶红砂应对盐胁迫中发挥作用, 转 *RtVAMP2-2* 基因拟南芥对盐敏感, 推测 *RtVAMP2-2* 基因在植物耐盐中发挥负调控作用。未来沉默或敲除植物中 *RtVAMP2-2* 的同源基因从而抑制其表达, 可能是一种提高植物耐盐性的有效手段。

参考文献 References:

- [1] DU C, MA B J, WU Z G, LI N N, ZHENG L L, WANG Y C. *Reaumuria trigyna* transcription factor *RtWRKY23* enhances salt stress tolerance and delays flowering in plants. *Journal of Plant Physiology*, 2019, 239: 38-51.
- [2] 王彩霞. ABA 对长叶红砂盐腺泌盐和耐盐性的影响. 呼和浩特: 内蒙古大学硕士学位论文, 2019.
WANG C X. Effects of ABA on salt secretion and salt tolerance of salt glands of *Reaumuria trigyna*. Master Thesis. Hohhot: Inner Mongolia University, 2019.
- [3] 周健华, 王迎春, 石松利. 长叶红砂主要水分参数随季节和生境的变化. *应用生态学报*, 2009, 20(11): 2624-2631.
ZHOU J H, WANG Y C, SHI S L. Seasonal changes of main water parameters of *Reaumuria trigyna* in different habitats. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2009, 20(11): 2624-2631.
- [4] LI N N, DU C, MA B J, GAO Z Q, WU Z G, ZHENG L L, NIU Y D, WANG Y C. Functional analysis of ion transport properties and salt tolerance mechanisms of *RtHKT1* from the recretohalophyte *Reaumuria trigyna*. *Plant and Cell Physiology*, 2019, 60(1): 85-106.
- [5] MA B J, SUO Y F, ZHANG J, XING N N, GAO Z Q, LIN X F, ZHENG L L, WANG Y C. Glutaredoxin like protein (*RtGRL1*) regulates H_2O_2 and Na^+ accumulation by maintaining the glutathione pool during abiotic stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2021, 159: 135-147.
- [6] DANG Z H, ZHENG L L, WANG J, GAO Z Q, WU S B, QI Z, WAN Y C. Transcriptomic profiling of the salt-stress response in the wild recretohalophyte *Reaumuria trigyna*. *BMC Genomics*, 2013, 14(1): 14-29.
- [7] MARIS S O, CHRISTOPH S. Endosomal functions in plants. *Traffic*, 2008, 9(10): 1589-1598.

- [8] THOMAS W, BORIS V Z, JAMES A M, BENEDIKT W, MICHAEL G, FRANCESCO P, THOMAS H S, JAMES E R. SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell*, 1998, 92(6): 759-772.
- [9] UEMURA T, UEDA T, OHNIWA R L, NAKANO A, TAKEYASU K, SATO M H. Systematic analysis of SNARE molecules in *Arabidopsis*: dissection of the post-Golgi network in plant cells. *Japan Society for Cell Biology*, 2004, 29(2): 49-65.
- [10] YI C, PARK S, YUN H S, KWON C. Vesicle-associated membrane proteins 721 and 722 are required for unimpeded growth of *Arabidopsis* under ABA application. *Journal of Plant Physiology*, 2013, 170(5): 529-533.
- [11] ZHANG B, KARNIK R, WANG Y, WALLMERTH N, BLATT M R, GREFFEN C. The *Arabidopsis* R-SNARE VAMP721 interacts with KAT1 and KC1 K⁺ channels to moderate K⁺ current at the plasma membrane. *The Plant Cell*, 2015, 27(6): 1697-1717.
- [12] SHARMA K, PANT S R, MCNEECE B T, LAWRENCE G W, KLINK V P. Co-regulation of the *Glycine max* soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptor (SNARE)-containing regulon occurs during defense to a root pathogen. *Taylor & Francis*, 2016, 11(1): 74-93.
- [13] WU X X, KAZUO E, TAKASHI U, QIU Q S. AtNHX5 and AtNHX6 are required for the subcellular localization of the SNARE complex that mediates the trafficking of seed storage proteins in *Arabidopsis*. *PLoS One*, 2016, 11(3): e0151658.
- [14] KWON C, NEU C, PAJONK S, YUN H S, LIPKA U, HUMPHRY M, BAU S, STRAUS M, KWAAITAAL M, RAMPPELT H, KASMI E F, JURGRNS G, PARKER J, PANSTRUGA R, LIPKA V, SCHULIZE-LEFERT P. Co-option of a default secretory pathway for plant immune responses. *Nature*, 2008, 451: 835-840.
- [15] SUGANO S, HAYASHI N, KAWAGOE Y, MOCHIZUK S, INOUE H, MORI M, NISHIZAWA Y, JIANG C J, MATSUI M, TAKATSUJI H. Rice *OsVAMP714*, a membrane-trafficking protein localized to the chloroplast and vacuolar membrane, is involved in resistance to rice blast disease. *Plant Molecular Biology*, 2016, 91(1/2): 81-95.
- [16] EBINE K, FUJIMOTO M, OKATANI Y, NISHIYAMA T, GOH T, ITO E, DAINOBU T, NISHITANI A, UEMURA T, SATO M. H, HANS T, TSUTSUMI N, NAKANO A, UEDA T. A membrane trafficking pathway regulated by the plant-specific RAB GTPase ARA6. *Nature Cell Biology*, 2011, 13(7): 853-860.
- [17] BULLOCK T L, ROBERTS T M, STEWART M. 2.5 Å resolution crystal structure of the motile major sperm protein (MSP) of *Ascaris suum*. *Journal of Molecular Biology*, 1996, 263(2): 284-296.
- [18] THOMSON W W, KATHRYN P. The ultrastructure of the plasmodesmata of the salt glands of *Tamarix* as revealed by transmission and freeze-fracture electron microscopy. *Protoplasma*, 1985, 125(1-2): 13-23.
- [19] JOSSELYN S, JOSE M, SIMON R. Identification and transcriptional analysis of SNARE vesicle fusion regulators in tomato (*Solanum lycopersicum*) during plant development and a comparative analysis of the response to salt stress with wild relatives. *Journal of Plant Physiology*, 2019, 242: 153018.
- [20] LESHEM Y, NAOMI M, CAGNAC O, RONEN G, NISHRI Y, SOLOMON M, COHEN G, LEVINE A. Suppression of *Arabidopsis* Vesicle-SNARE expression inhibited fusion of H₂O₂-containing vesicles with tonoplast and increased salt tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(47): 18008-18013.
- [21] SUN X L, JI W, DING X D, BAI X, CAI H, YANG S S, QIAN X, SUN M Z, and ZHU Y M. GsVAMP72, a novel *Glycine soja* R-SNARE protein, is involved in regulating plant salt tolerance and ABA sensitivity. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 2013, 113(2): 199-215.
- [22] 曹扬荣, 李志刚, 陈涛, 张志刚, 张劲松, 陈受宜. 过量表达 *Nt Rop1* 基因增加了植物对盐胁迫的敏感和过氧化氢的含量. *中国科学C辑:生命科学*, 2008, 5: 383-390.
CAO Y R, LI Z G, CHEN T, ZHANG Z G, ZHANG J S, CHEN S Y. Overexpression of a tobacco small G protein gene *NtRop1* causes salt sensitivity and hydrogen peroxide production in transgenic plants. *Science in China Series C: Life Science*, 2008, 5: 383-390.
- [23] 王燕. 唐古特白刺茉莉酸合成途径关键酶基因 *NtAOC* 和 *NtAOS* 的克隆及功能分析. 呼和浩特: 内蒙古大学硕士学位论文, 2017.
WANG Y. Cloning and functional analysis of jasmonate biosynthetic pathway key genes *NtAOC* and *NtAOS* in *Nitraria tangutorum*. Master Thesis. Hohhot: Inner Mongolia University, 2017.

(责任编辑 张瑾)