DOI: 10.3724/SP.J.1006.2020.93062

玉米阳离子/质子逆向转运蛋白 ZmNHX7 的功能鉴定

张凌霄^{1,2} 焦珍珍² 卜华虎² 王逸茹² 李健^{2,3} 郑军^{1,2,*}

¹ 北京农学院植物科学技术学院, 北京 102206; ² 中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081; ³ 吉林农业大学农学院, 吉林长春 130118

摘要: 植物阳离子/质子逆向转运蛋白可以维持细胞内的离子平衡, 在抵御离子毒害过程中发挥重要作用。本研究克隆了一个编码玉米阳离子/质子逆向转运蛋白的基因, 命名为 *ZmNHX7*。该基因编码序列(coding sequence, CDS)全长 3411 bp, 编码一条含 1136 个氨基酸的多肽链。*ZmNHX7* 基因在玉米各组织部位均有表达, 在 V7 (第 7 片叶完全展开)时期的根和茎中表达量较高。在 NaCl 与 LiCl 的胁迫条件下, 该基因表达量上调。系统进化树分析将 *ZmNHX7* 与拟南芥质膜阳离子/质子逆向转运蛋白 AtNHX7 和 AtNHX8 归为一类, 亚细胞定位结果表明该蛋白定位于细胞膜和核膜上。将 *ZmNHX7* 基因转入拟南芥 T-DNA 插入突变体中, 转基因互补株系可以恢复该突变体对 Li⁺ 的耐受性。这些结果表明, *ZmNHX7* 编码一个玉米质膜阳离子/质子逆向转运蛋白, 在缓解 Li⁺ 对植物的毒害和维持细胞内的离子平衡等方面发挥重要作用。

关键词: 玉米; *ZmNHX7*; 逆向转运蛋白; 离子毒害

Functional identification of maize cation/proton antiporter ZmNHX7

ZHANG Ling-Xiao^{1,2}, JIAO Zhen-Zhen², BU Hua-Hu², WANG Yi-Ru², LI Jian^{2,3}, and ZHENG Jun^{1,2,*}

¹ College of Plant Science and Technology, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China; ² Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; ³ College of Agronomy, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, Jilin, China

Abstract: Plant cation/proton antiporters can maintain intracellular ion homeostasis and resist ion toxicity. In this study, a gene encoding a maize cation/proton antiporter was cloned and named as *ZmNHX7*. The coding sequence of *ZmNHX7* was 3411 bp, encoding a protein with 1136 amino acids. *ZmNHX7* is ubiquitously expressed in various tissues of maize, With higher expression level in roots and stems at the V7 stage. The expression of *ZmNHX7* was induced by NaCl and LiCl stresses. In phylogenetic tree *ZmNHX7* showed a close relation with AtNHX7 and AtNHX8 of *Arabidopsis thaliana*. *ZmNHX7* was located in cell membrane and nuclear membrane by confocal laser scanning microscopy analysis of the lower epidermis of tobacco leaves. When *ZmNHX7* gene was transformed into the *Arabidopsis thaliana* T-DNA insertion mutant *nhx8*, the transgenic complementary lines could restore the tolerance of *nhx8* to Li⁺. These results indicate that *ZmNHX7* encodes a plasma membrane cation/proton antiporter of maize, which plays an important role in reducing the toxicity of Li⁺ to plants and maintaining intracellular ion homeostasis.

Keywords: maize; *ZmNHX7*; antiporter; ion toxicity

盐胁迫是造成农作物减产的主要非生物胁迫之一, 是一种多形态胁迫, 通过渗透胁迫、营养胁迫和离子毒害 3 种途径来降低作物产量甚至导致植物死亡^[1]。在耐盐实验研究中, Li⁺常常被用作 Na⁺的代替物, 因为 Li⁺可能和 Na⁺有相同的转运系统及毒性目标物, 且 Li⁺的离子毒害性更强^[2]。锂是自然界中最

轻的碱金属元素, 主要以锂辉石等矿物质的形式存在于土壤中^[3], 随着岩石、矿物的风化和水的下游流动, 锂在土壤中的浓度逐渐增加, 此外锂电池、陶瓷、玻璃等行业也使用了锂元素^[4], Li₂CO₃ 常作为情绪稳定剂和治疗躁郁症的药物, 这些人为活动导致自然界中的 Li⁺浓度升高^[5], 许多作物正在遭受离子

本研究由国家重点研发计划项目(2016YFD0101002)资助。

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2016YFD0101002).

* 通信作者(Corresponding author): 郑军, E-mail: zhengjun02@caas.cn

第一作者联系方式: E-mail: 13522840682@163.com

Received (收稿日期): 2020-02-06; Accepted (接受日期): 2020-03-24; Published online (网络出版日期): 2020-04-03.

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20200402.2005.004.html>

毒害。因此研究作物解毒和维持细胞内离子平衡的分子机理具有重要意义。

已有报道表明,植物阳离子/质子逆向转运蛋白主要有两类。第一类是液泡膜型,在液泡膜或者其他细胞器膜上表达,当受到盐胁迫时该类蛋白可以将 Na^+ 局域化在液泡内从而维持细胞内的离子稳态^[6]。AtNHX1 就是典型的液泡膜型的 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白^[7],在其他物种中也克隆到了该基因的同源基因。玉米 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白 ZmNHX1 是液泡膜型的,当玉米受到盐胁迫时,根中的 *ZmNHX1* 基因表达量上调,提高玉米的耐盐性^[8]。OsNHX1 蛋白被定位在液泡膜上,当水稻细胞质中 Na^+ 浓度过高时,它可以将 Na^+ 区隔在液泡内;将其在水稻中过表达,水稻的耐盐性增强^[9-10]。第二类是质膜型阳离子/质子逆向转运蛋白,主要起到有害阳离子外排的作用,该类蛋白通常需要借助质膜 H^+ -ATPase 水解 ATP 的能量将 H^+ 泵出细胞质,产生跨膜的 H^+ 电化学势梯度,驱动质膜上的 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白将细胞内的 Na^+ 排出细胞,降低胞质内 Na^+ 浓度^[11-12]。Shi 等^[13] 克隆了一个拟南芥质膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白 AtNHX7,该基因在维持细胞内的钠钾平衡方面发挥了重要作用,该基因突变后植物对高 Na^+ 和低 K^+ 环境的生长抑制表现得更加敏感。AtNHX8 与 AtNHX7 的氨基酸序列相似性高达 76%,定位在细胞膜上的该基因被证明是一个质膜 Li^+/H^+ 逆向转运蛋白,它可特异地恢复酿酒酵母突变体的 Li^+ 敏感表型而不能互补 Na^+ 敏感表型,AtNHX8 基因被证明与植物体解除 Li^+ 毒性紧密相关^[2,14]。

玉米是我国重要的粮饲兼用型作物,研究表明离子毒害对玉米的生长发育具有不利影响^[15]。因此了解玉米对离子胁迫的解毒机理,深入研究玉米解除离子毒害相关基因的功能对玉米的正常生长发育具有重要意义。本研究利用组织特异性表达、胁迫诱导表达、转基因互补和亚细胞定位等方法,对玉米 *ZmNHX7* 基因的功能进行了研究,实验证明其可以缓解 Li^+ 对植物的毒害作用,维持细胞内的离子平衡。

1 材料与方法

1.1 试验材料

所用玉米材料为自交系 B73,拟南芥材料为野生型(wild type, WT) Columbia-0 和由 SALK 突变体库提供的拟南芥 *nhx8* T-DNA 插入突变体,其编号为 Salk_070497。所用菌株包括大肠杆菌 DH5 α 和农杆

菌 GV3101,载体包括表达载体 pEarleyGate 104^[16] 与入门载体 pGWC^[17]。

1.2 基因序列获取与分析

在拟南芥 TAIR (<http://www.arabidopsis.org/>) 数据库获取拟南芥 *NHX* 基因家族成员序列,根据拟南芥 *NHX* 基因家族成员序列在 maize GDB (<https://www.maizegdb.org/>) 和 NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 中进行 BLASTP 分析,获得了 7 个玉米 *NHX* 基因家族成员的基因序列与编码氨基酸序列^[8]。利用 MEGA 6 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6) 软件对拟南芥和玉米 *NHX* 家族成员进行系统进化树分析,使用邻近法(neighbour-joining, NJ)构建进化树,设 Bootstrap 值为 1000^[18]。使用 CLUSTALW 程序比对蛋白序列^[19],默认参数设置,用 GeneDoc 编辑比对后的序列。

1.3 DNA 提取与 *ZmNHX7* 基因克隆

采用 CTAB 法提取玉米基因组 DNA^[20]。根据 *ZmNHX7* CDS 序列,利用 Primer 5 软件设计全长引物(*ZmNHX7*-G-F1/R1)(表 1),通过聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增获取基因全长。PCR 扩增体系(50 μL)含有 2 $\times$ Phanta Max buffer 25 μL , dNTP (2.5 $\mu\text{mol L}^{-1}$) 1 μL , 上下游引物(10 $\mu\text{mol L}^{-1}$)各 1 μL , DNA 聚合酶(1.0 U L^{-1}) 1 μL , 模板 DNA 1 μL , 用 ddH₂O 配平至 50 μL 。扩增程序为 95 预变性 3 min, 95 变性 15 s, 60 退火 15 s, 72 延伸 1 min, 35 个循环; 72 彻底延伸 5 min。扩增产物与 Loading buffer 混合,经 1% 琼脂糖凝胶电泳 15 min 后,在凝胶成像分析仪中观察目的条带。

1.4 *ZmNHX7* 基因表达分析

1.4.1 *ZmNHX7* 组织特异性分析 取玉米 B73 材料 V1 (第 1 片叶完全展开)时期的根和叶, V7 (第 7 片叶完全展开)和 R2 (籽粒建成)时期根、茎、叶,以及苞叶、穗轴、雄穗、花丝、籽粒等部位样品,置液氮中速冻,使用植物总 RNA 提取试剂盒(北京天根生化科技公司, Cat#DP432)提取上述样品总 RNA,利用反转录试剂盒(北京全式金生物科技有限公司, Cat#AU311-03)反转录为 cDNA,以 cDNA 为模板进行实时荧光定量 PCR^[21]。实时荧光定量 PCR 以玉米组成型基因 *GAPDH* 为内参(表 1),设计 *ZmNHX7* 基因的特异性引物(*ZmNHX7*-Q-F/R)(表 1),每个样品设计 3 个生物学重复,在 Applied Biosystems 7300 实时荧光定量 PCR 仪上分析,导出 CT 值,用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 公式计算获取定量结果。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

引物用途 Purpose of primer	引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'-3')
扩增基因引物 Amplified gene primer sequences	ZmNHX7-G-F1	ATGGGCGGCGAGGCTGAGCC
	ZmNHX7-G-R1	CTACTGCTCCTGGGGCGGAG
	ZmNHX7-G-F2	GCTGTGGTTGCACTGCTAAA
	ZmNHX7-G-R2	TGCAATAACAACCCCACTCA
	AtNHX8-G-F	TTCCGTACACCGTCGTCTT
	AtNHX8-G-R	CCCCATCAATTAACGTGGTC
	At-actin-F	GCCAATCCGGTGCTGGTAACA
荧光定量 PCR 引物序列 RT-PCR primer sequences	At-actin-R	CATACCAGATCCAGTTCCTCCTCCC
	ZmNHX7-Q-F	TGGGTTGGACTTGAAAGAGG
	ZmNHX7-Q-R	AACACAATGCCACCAGTGAA
	GAPDH-F	AGGATATCAAGAAAGCTATTAAGGC
基因亚细胞定位 Subcellular localization of gene	GAPDH-R	GTAGCCCCACTCGTTGTCG
	ZmNHX7-L-F	AGCAGGCTTTGACTTTATGGGCGGCGAGGCTGAGCCTGACA
	ZmNHX7-L-R	TGGGTCTAGAGACTTTCTACTGCTCTGGGGCGGAGGCACG

1.4.2 Li⁺和 Na⁺胁迫下 ZmNHX7 基因的表达模式

为了研究 ZmNHX7 基因在外源 Li⁺和 Na⁺胁迫下的表达模式, 将 B73 种子置湿润的发芽纸上卷起来, 放入 28 ℃ 培养箱培养 2~3 d, 待种子生根后水培。令营养液没过种子根部, 2 d 换一次营养液。培养 7 d 后用不同浓度的 LiCl 和 NaCl 处理 5 h^[22], 用植物总 RNA 提取试剂盒提取玉米幼苗总 RNA, 用反转录试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA, 以 cDNA 为模板, 以 ZmNHX7-Q-F/R 与 GAPDH 为引物(表 1)进行实时荧光定量 PCR 分析。用 2^{-ΔΔCT} 公式计算目标基因的相对表达量, 设 LiCl 和 NaCl 的浓度为 0 时, ZmNHX7 表达量为 1, 计算出不同浓度 LiCl 和 NaCl 处理后玉米幼苗 ZmNHX7 的表达量。

1.5 亚细胞定位

根据 ZmNHX7 基因 CDS 序列设计引物(ZmNHX7-L-F/R)(表 1), PCR 扩增获得 ZmNHX7 基因全长, 将目的片段与入门载体 pGWC 连接后转化大肠杆菌感受态细胞 DH5α, 测序正确的阳性克隆与表达载体 pEarleyGate 104^[23]进行 LR 反应, 筛选阳性克隆, 采用电转法转化农杆菌 GV3101 感受态细胞, 将空载体 pEarleyGate 104 转化农杆菌 GV3101 感受态细胞作为阴性对照。将亚细胞定位表达载体与膜和核膜 marker PM-2K 同时扩繁, 用缓冲液将二者 OD₆₀₀ 值调成一致后, 按 1:1 混合, 注射至烟草, 避光处理 2~3 d 后, 用 Zeiss LSM700 激光共聚焦显微镜观察该基因编码蛋白的亚细胞定位^[24-25]。

1.6 ZmNHX7 的转基因互补实验

应用农杆菌蘸花法侵染拟南芥获取转基因互补

纯合株系。将拟南芥突变体 nhx8 置于 MS 培养基上, 4 ℃ 春化 3 d 后转入培养室中培养, 培养条件是光照 16 h/黑暗 8 h, 温度 22 ℃, 相对湿度(relative humidity, RH)为 50%。7 d 后将拟南芥移至培养土(蛭石:营养土=1:1)中培养约 20 d, 待拟南芥初生花序生长至 5~15 cm 进行侵染。将 pEarleyGate 100-ZmNHX7 转化农杆菌 GV3101, 扩繁后侵染拟南芥进行转化, 拟南芥培养至成熟后单株收获种子, 即为 T₁ 代种子。pEarleyGate 100 上含有草铵膦(phosphinothricin, ppt)筛选标记, 因此将 T₁ 代种子种在含有 ppt 的 MS 培养基上培养 1 周, 存活的幼苗移苗培养至成熟即获得 T₂ 代种子, 直至收获的种子在含有 ppt 的培养基上完全存活, 证明已获得转基因互补纯合株系。经过逐代筛选的方法共得到 4 个转基因互补纯合株系, 命名为 COM1、COM2、COM3、COM4 (简称 COM1~COM4)。提取 4 周龄的 WT、nhx8、COM1~COM4 的 DNA, 设计 ZmNHX7 基因的特异性引物(ZmNHX7-G-F2/R2)(表 1)进行 PCR 扩增, 提取上述材料的总 RNA, 设计 AtNHX8 和 ZmNHX7 基因的特异性引物(AtNHX8-G-F/R, ZmNHX7-G-F2/R2)(表 1)进行分子验证。

1.7 拟南芥表型数据调查

1.7.1 拟南芥表型及鲜重数据分析 将拟南芥野生型(WT)、突变体材料 nhx8 和 4 个转基因互补材料(COM1~COM4)同期分别种在含有 0 mmol L⁻¹、5 mmol L⁻¹、10 mmol L⁻¹ 和 15 mmol L⁻¹ 的 Li⁺以及 50 mmol L⁻¹、75 mmol L⁻¹ 和 100 mmol L⁻¹ 的 Na⁺的

MS 培养基上, 4 春化 3 d 后转入培养室, 培养条件是 16 h 光照/8 h 黑暗, 温度 22 , 湿度 50% RH, 将培养皿水平放置, 使其垂直接受光照。于第 7 天拍照记录各个株系的生长状况, 同时选取每个处理条件下的每个株系各 20 株称重, 统计植株鲜重^[26]。

1.7.2 拟南芥根长情况及数据分析 将拟南芥野生型(WT)、突变体材料 *nhx8* 和 2 个转基因互补材料 (COM1, COM4) 同期分别种在含有 0 mmol L⁻¹、5 mmol L⁻¹、10 mmol L⁻¹ 和 15 mmol L⁻¹ 的 Li⁺ 以及 50 mmol L⁻¹、75 mmol L⁻¹ 和 100 mmol L⁻¹ 的 Na⁺ 的 MS 培养基上, 4 春化 3 d 后转入培养室, 培养条件同上。将培养皿竖直放置, 使根系竖直生长。于第 7 天照相记录各个株系的根长, 同时选取每个处理条件下的每个株系各 10 株统计根长。

2 结果与分析

2.1 玉米 *ZmNHX* 基因鉴定和系统发育分析

通过对拟南芥 *NHX* 家族成员基因 BLASTP 分析, 获得 7 个玉米 *NHX* 相关基因, 分别命名为 *ZmNHX1*~*ZmNHX7* (表 2)^[8], 其中 *ZmNHX7* 位于玉米 1 号染色体上, 基因序列号为 (GRMZM2G098494), 该基因全基因组序列长度为 17,992 bp, CDS 序列长度 3411 bp, 编码 1136 个氨基酸, 有 22 个外显子和 21 个内含子。

7 个玉米和 8 个拟南芥 *NHX* 逆向转运蛋白进化树表明, *ZmNHX7* 氨基酸序列与 *AtNHX7* 和 *AtNHX8* 同源性较高, 属于同一个分支 (图 1-A)。有研究表明 *AtNHX7* 与 *AtNHX8* 都是定位在质膜上的

表 2 玉米 *NHX* 基因信息
Table 2 Maize *NHX* gene information

基因名称 Gene name	基因序列号 Gene ID	CDS 序列长度 CDS sequence length (bp)
<i>ZmNHX1</i>	GRMZM2G037342	1641
<i>ZmNHX2</i>	GRMZM2G063492	1641
<i>ZmNHX3</i>	GRMZM2G118019	1593
<i>ZmNHX4</i>	GRMZM2G027851	1620
<i>ZmNHX5</i>	GRMZM2G090149	1620
<i>ZmNHX6</i>	GRMZM2G067747	1611
<i>ZmNHX7</i>	GRMZM2G098494	3411

阳离子/质子逆向转运蛋白^[2,11-14], 由此推测 *ZmNHX7* 基因也与质膜上阳离子的逆向运输有关。将 *ZmNHX7* 和拟南芥阳离子/质子逆向转运蛋白 *AtNHX7* 和 *AtNHX8* 进行蛋白序列比对, 结果表明 *ZmNHX7* 与 *AtNHX7* 和 *AtNHX8* 的 N 端高度保守, 且有 3 个保守结构域^[8] (图 1-B)。

2.2 玉米 *ZmNHX7* 基因的组织表达分析

实时荧光定量 PCR 结果表明 *ZmNHX7* 在玉米 V1 时期的根和叶, V7 和 R2 时期根、茎、叶, 以及苞叶、花丝、穗轴、雄穗、籽粒等部位均有表达, 但在花丝中表达量最低, V7 时期茎的表达量最高, 约是花丝中表达量的 3 倍, 其次是在 V7 时期的根中表达量较高, 约是花丝表达量的 2.2 倍 (图 2)。

2.3 *ZmNHX7* 基因的诱导表达情况

实时荧光定量 PCR 结果显示, 在不同浓度的 LiCl 与 NaCl 处理 5 h 后, *ZmNHX7* 基因的表达量显

(图 1)

图 1 拟南芥、玉米 NHX 家族进化树(A)及 ZmNHX7 分支的蛋白结构(B)

Fig. 1 Phylogenetic tree of NHX gene family in *Arabidopsis thaliana* and maize (A) and ZmNHX7 branched protein structure (B)

图 2 荧光定量 PCR 分析 ZmNHX7 基因在玉米不同组织中的表达

Fig. 2 Expression analysis of ZmNHX7 gene in different tissues of maize by real-time fluorescence quantitative PCR

V1: 玉米第 1 片叶完全展开; V7: 玉米第 7 片叶完全展开; R2: 籽粒建成。误差线表示 3 次生物学重复的标准差, 以基因 V1 时期根的相对表达水平为对照。

V1: the first leaf of maize was fully expanded; V7: the seventh leaf of maize was fully expanded; R2: grain formation period. The error bar shows the standard deviation of three biological replicates, the relative expression level in root (V1) was used as the control.

著上升(图 3)。用 10 mmol L⁻¹ LiCl 处理 5 h 后, ZmNHX7 基因表达量上升为对照的 3.24 倍, 当用 30 mmol L⁻¹ LiCl 处理 5 h 后, 表达量上升为对照的 3.54 倍(图 3-A)。用 100 mmol L⁻¹ 和 400 mmol L⁻¹

的 NaCl 处理玉米幼苗 5 h 后, ZmNHX7 基因的表达量分别上升为对照条件的 1.76 倍和 3.36 倍(图 3-B)。说明 ZmNHX7 基因受到外源 Li⁺和 Na⁺的诱导表达。

图 3 *ZmNHX7* 基因的诱导表达情况

Fig. 3 Induced expression of *ZmNHX7* gene

A: *ZmNHX7* 基因在不同浓度 LiCl 处理 5 h 后的表达量分析; B: *ZmNHX7* 基因在不同浓度 NaCl 处理 5 h 后的表达量分析。误差线代表 3 个独立重复的标准差, *和**分别表示不同浓度离子胁迫条件下 *ZmNHX7* 基因相对表达量与对照在 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 水平差异显著。A: analysis of the expression level of *ZmNHX7* after treatment with different concentrations of LiCl for 5 hours; B: analysis of the expression level of *ZmNHX7* after treatment with different concentrations of NaCl for 5 hours. error bars represent standard errors of three independent repetitions; * and **: the relative expression of *ZmNHX7* under different concentrations of ion stress is significantly different from the content at the 0.05 and 0.01 probability levels, respectively.

2.4 *ZmNHX7* 的亚细胞定位

构建 *ZmNHX7* 的亚细胞定位载体, 通过农杆菌侵染使 *ZmNHX7* 在烟草中瞬时表达, 以确定其亚细胞定位。空载体在烟草叶片细胞的细胞核、细胞膜和细胞质中均可以检测到黄色荧光(图 4-A), 而含有目的基因的表达载体只在细胞膜和核膜上检测到了荧光信号(图 4-B), 将发红色荧光的质膜与核膜

marker PM-2K 与 *ZmNHX7* 表达载体共同转化烟草, 共定位结果显示目的基因发出的黄色荧光与定位在质膜与核膜上的 PM-2K 所发的红色荧光完全重合(图 4-C)。说明 *ZmNHX7* 定位于细胞质膜和核膜。

2.5 *ZmNHX7* 的转基因互补实验

2.5.1 *ZmNHX7* 转基因互补实验分子验证 提取拟南芥 WT、*nhx8*、COM1~COM4 的 DNA 和 RNA 进行分子验证。用 *AtNHX8* 的特异性引物在 WT 和 *nhx8* 的 cDNA 中进行扩增, 其中 WT 可以扩增出条带, *nhx8* 中未扩增出条带, 证明在突变体中 *AtNHX8* 已经不能正常转录(图 5-A)。在 WT、*nhx8* 和 COM1~COM4 的 DNA 中扩增 *ZmNHX7* 基因, COM1~COM4 可以扩增出条带, 而 WT 和 *nhx8* 中没有条带, 证明 *ZmNHX7* 基因已经成功转入 4 个转基因互补株系 4 (图 5-B)。在 WT、*nhx8* 和 COM1~COM4 的 cDNA 中扩增 *ZmNHX7* 基因, COM1~COM4 可以扩增出条带证明 *ZmNHX7* 基因在转基因互补株系中正常转录(图 5-C)。

2.5.2 *ZmNHX7* 转基因互补植株表型及鲜重统计分析 根据对拟南芥不同株系(WT、*nhx8*、COM1~COM4)表型观察(图 6-A)和鲜重统计发现(图 6-B), *AtNHX8* 基因只对 Li⁺敏感, 该基因突变后, 拟南芥在含有 Li⁺的培养基上生长受限, 当 Li⁺浓度达到 10 mmol L⁻¹ 时, 拟南芥 *nhx8* 的存活率显著降低, 但转基因互补材料 COM1~COM4 与 WT 相比在表型与鲜重方面均无显著差异, 说明 *ZmNHX7* 的转入可以缓解突变体对 Li⁺的敏感性。另一方面 *AtNHX8* 基因对 Na⁺不敏感, WT、*nhx8* 和 COM1~COM4 在含有不同浓度 Na⁺的培养基上表型和鲜重均无显著差异,

图 4 *ZmNHX7* 的亚细胞定位

Fig. 4 Subcellular localization of *ZmNHX7*

A: YFP 空载在烟草叶片中的表达; B: *ZmNHX7*-YFP 在烟草叶片中的表达; C: 加上 marker 的 *ZmNHX7*-YFP 在烟草叶片中的表达。

A: localization of YFP fluorescence in tobacco leaves; B: localization of *ZmNHX7*-YFP fluorescence in tobacco leaves; C: localization of *ZmNHX7*-YFP and marker fluorescence in tobacco leaves.

图 5 通过 PCR 鉴定 *ZmNHX7* 基因在拟南芥中的转入与表达

Fig. 5 Identification of the transfer and expression of *ZmNHX7* by PCR

A: RT-PCR 检测 *AtNHX8* 基因在 WT 和 *nhx8* 中的转录表达; B: *ZmNHX7* 基因在不同拟南芥株系中的表达; C: *ZmNHX7* 基因在不同拟南芥株系中的转录表达。M: D2000 plus DNA marker。

A: RT-PCR was used to verify the transcription of *AtNHX8* gene in WT and *nhx8*; B: expression of *ZmNHX7* gene in different *Arabidopsis* lines; C: transcriptional expression of *ZmNHX7* gene in different *Arabidopsis* lines. M: D2000 plus DNA marker.

图 6 拟南芥不同株系表型图及鲜重情况

Fig. 6 Phenotype and fresh weight of different *Arabidopsis* strains

A: WT、*nhx8* 和 COM1~COM4 在含有 0、5、15 mmol L⁻¹ LiCl, 75 mmol L⁻¹ NaCl 的 MS 培养基上的生长表型图; B: WT、*nhx8* 和 COM1~COM4 在含有离子胁迫的培养基上生长 7 d 后的鲜重情况(数据显示为平均值±SD, $n = 20$ 。图柱上不同大写字母表示在 0.01 水平上同一处理下的材料间差异显著)。

A: germination and subsequent growth of wild type, *nhx8* and COM1–COM4 plants under MS agar medium and MS medium containing 5 or 15 mmol L⁻¹ LiCl, or 75 mmol L⁻¹ NaCl. B: the fresh weight of wild type, *nhx8* and COM1–COM4 after seven days of growth on medium containing ionic stress (the data are shown as mean ± SD, $n = 20$. Bars superscripted by different capitals are significantly different at $P < 0.01$ within a treatment).

这与之前的研究 *AtNHX8* 编码一个专性的 Li⁺/H⁺逆向转运蛋白相一致, 缺失该基因拟南芥易受到 Li⁺毒害, 但 Na⁺对该缺陷型的影响不显著^[2,14]。在 *nhx8* 中转入 *ZmNHX7* 基因后可以明显缓解 Li⁺对拟南芥 *nhx8* 的毒害作用。

2.5.3 根长情况分析 由不同株系拟南芥根长生长情况观察(图 7)可知, 在 Li⁺胁迫下, 拟南芥突变

体根部的生长受到影响, 当 Li⁺浓度大于 10 mmol L⁻¹ 时, 突变体的根部已停止生长, 转基因互补株系 (COM1、COM4)与 WT 的根长在同种浓度的 Li⁺胁迫下无显著差异。在同浓度的 Na⁺的处理下, WT、*nhx8*、COM1 和 COM4 根长表型相近。由此可以证明 *ZmNHX7* 基因的转入可以缓解突变体对 Li⁺的敏感性, 使拟南芥 *nhx8* 的根恢复正常生长。

图 7 拟南芥根长及其数据统计

Fig. 7 *Arabidopsis* root length and data statistics

A: WT, *nhx8*, COM1 和 COM4 在含有 0、5、10 mmol L⁻¹ LiCl, 50、100 mmol L⁻¹ NaCl 的 MS 培养基上的根长表型图; B: WT, *nhx8*, COM1, COM4 在含有离子胁迫的培养基上生长 7 d 后的根长数据统计(数据显示为平均值±SD, $n = 10$ 。图柱上不同大写字母表示在 0.01 水平上同一处理下的材料间差异显著)。

A: root length phenotype of WT, *nhx8*, COM1, and COM4 on MS medium containing 0, 5, 10 mmol L⁻¹ LiCl, and 50, 100 mmol L⁻¹ NaCl. B: the root length of WT, *nhx8*, COM1, and COM4 after seven days of growth on medium containing ionic stress (The data are shown as mean ± SD, $n = 10$. Bars superscripted by different capitals are significantly different at the $P < 0.01$ within a treatment).

3 讨论

植物的正常生长离不开无机盐,但是盐浓度过高会造成作物代谢不平衡、渗透胁迫及离子毒害,进一步引起氧化胁迫甚至死亡^[27]。土壤中 Li^+ 含量过高会对作物产生毒害作用,降低种子萌发率和叶绿素含量、影响干物质积累和根系发育^[5,28]、抑制花粉的产生和植物的节律运动。此外, Li^+ 在细胞质的积累过程中可能与蛋白质相互作用并调节各种生化过程,例如, Li^+ 可能与三磷酸肌醇相互作用并抑制肌醇-1-磷酸酶活性,因此破坏钙依赖性信号传导途径^[29]; Li^+ 和 K^+ 具有相似的运输途径,因此 Li^+ 可能破坏依赖于 K^+ 的各种代谢功能^[30]。为了使作物正常生长需要解除离子毒性,将细胞内多余的

Li^+ 排出体外。

已有报道 AtNHX8 是拟南芥阳离子/质子逆向转运蛋白家族中的一个专性 Li^+/H^+ 逆向转运蛋白,其在拟南芥的根、茎、叶、花等部位均有表达,亚细胞定位结果显示该蛋白定位于细胞质膜,它在解除植物体内的 Li^+ 毒性及维持胞内离子平衡等方面发挥重要的作用^[2,14]。通过同源克隆的方法,本研究在玉米基因组中鉴定到与拟南芥 Li^+/H^+ 逆向转运蛋白 AtNHX8 高度同源的 *ZmNHX7* 基因,该基因 CDS 全长 3411 bp,编码 1136 个氨基酸,同样具有解除 Li^+ 毒性的作用。将 *ZmNHX7* 与 AtNHX7 和 AtNHX8 进行蛋白序列比对发现,这些蛋白的 N 端高度保守,这可能与它们的基因结构相关,此类蛋白的 N 端对

应着跨膜区, C 端对应着亲水性尾巴^[2,13]。有研究表明 AtNHX7 的 C 端亲水区约含 700 个氨基酸, 其 N 端跨膜区和 C 端长链尾巴共同构成一个同源二聚体结构, 无盐胁迫时, AtNHX7 的 C 末端自抑制域与相邻的激活域相结合, 保持休眠状态, 在盐胁迫下, AtNHX7 蛋白 C 末端自抑制域被解除, 转为活化状态, 把细胞内过多的 Na^+ 排出细胞外, 从而减少 Na^+ 对细胞的危害, 使植物表现出较高的耐盐性^[31]。ZmNHX7 相较于 ZmNHX1-6 的基因序列更长, 通过蛋白序列比对其多出的序列位于 C 端, 推测这部分序列可能编码 C 端长链尾巴, 在盐胁迫和离子毒害过程中使基因转为活化状态, 对细胞内金属阳离子的外排过程发挥作用。

已有研究表明 Li^+ 对植物的毒害作用可能是由于植物细胞中的微管去磷酸化作用引起的^[32]。这样, Li^+ 会影响叶片组织中 ATP 的生成, 而叶片组织中的 ATP 是植物组织中各种代谢过程的主要能源, ATP 合成量的减少可能会使重要的细胞功能暂停, 进一步会影响细胞的生理活性。因此较高浓度的 Li^+ 可能会影响细胞的伸长和分化, 从而降低叶面积并最终降低作物鲜重。例如, Jurkowska 等^[33]报道, Li^+ 浓度达到 25 mg kg^{-1} 时足以抑制燕麦的生长, 玉米和菠菜在 Li^+ 浓度达到 40 mg kg^{-1} 的土壤中生长发育就会受到抑制。另外, 植物根在与 Li^+ 的接触过程中改变了根的重力生长^[34], 例如, 在富含 Li^+ 的土壤中种植玉米, 玉米的根尖受损, 根毛和根冠的发育受限^[35]。在本研究中, 拟南芥 AtNHX8 基因突变后, 拟南芥解除 Li^+ 毒害的功能缺失, 比较相同浓度 Li^+ 培养基上的 WT、nhx8 和转基因互补纯合株系的鲜重与根长情况, nhx8 的鲜重降低和根长发育受限情况最为显著, 但转基因互补纯合株系在鲜重积累与根长发育等方面和 WT 相比均无显著差异, 证明 ZmNHX7 基因可以发挥离子解毒的功能, 将细胞内多余的 Li^+ 排出体外, 维持细胞内正常的离子平衡。有研究表明 ZmNHX7 基因也可以将 Na^+ 排出细胞外, 在玉米抵御盐胁迫的过程中也发挥了重要作用^[36], 而在本研究中并没有构建 AtNHX7 相关的转基因互补株系, 因此该结论需要进一步研究论证。

4 结论

玉米阳离子/质子逆向转运蛋白 ZmNHX7 与拟南芥 Li^+/H^+ 逆向转运蛋白 AtNHX8 亲缘关系较近, ZmNHX7 在玉米各个时期组织部位均有表达, 在 V7 时期的根和茎中表达量较高, 它被定位在细胞质膜

与核膜上, 在受到盐离子胁迫时基因表达量上调。将该基因转入拟南芥 nhx8 突变体中, 经筛选得到的纯合转基因互补株系可以恢复突变体对 Li^+ 的敏感性。表明 ZmNHX7 在解除 Li^+ 毒害和维持植物细胞内离子平衡等方面发挥重要作用。

References

- [1] Nublat A, Desplans J, Casse F, Berthomieu P. *Sas1*, an *Arabidopsis* mutant overaccumulating sodium in the shoot, shows deficiency in the control of the root radial transport of sodium. *Plant Cell*, 2001, 13: 125–137.
- [2] 安瑞. 拟南芥 AtNHX8 基因的克隆及其功能研究. 中国农业大学博士学位论文, 北京, 2006.
An R. Cloning and Functional Analysis of *Arabidopsis* AtNHX8 Gene. PhD Dissertation of China Agricultural University, Beijing, China, 2006 (in Chinese with English abstract).
- [3] Laurence K, Jerome K, Guiomar G C, Andrew L, John C. Induced plant accumulation of lithium. *Geosciences*, 2018, 8: 56–73.
- [4] Kszos L A, Stewart A J. Review of lithium in the aquatic environment: distribution in the United States, toxicity and case example of groundwater contamination. *Ecotoxicology*, 2003, 12: 439–447.
- [5] Jiang L, Wang L, Zhang L, Tian C. Tolerance and accumulation of lithium in *Apocynum pictum* Schrenk. *Peer J*, 2018, 6: e5559.
- [6] Apse M P, Aharon G S, Snedden W A, Blumwald E. Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na^+/H^+ antiporter in *Arabidopsis*. *Science*, 1999, 285: 1256–1258.
- [7] Kumar S, Kalita A, Srivastava R, Sahoo L. Co-expression of *Arabidopsis* NHX1 and bar improves the tolerance to salinity, oxidative stress, and herbicide in transgenic mungbean. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 1896.
- [8] 卜华虎. 玉米 Na^+/H^+ 质子泵 ZmNHX1 功能的初步研究. 中央民族大学硕士学位论文, 北京, 2011.
Bu H H. Preliminary Study on the Function of Maize Na^+/H^+ Proton Pump ZmNHX1. MS Thesis of Minzu University of China, Beijing, China, 2011 (in Chinese with English abstract).
- [9] Fukuda A, Nakamura A, Tanaka Y. Molecular cloning and expression of the Na^+/H^+ exchanger gene in *Oryza sativa*. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1446: 149–155.
- [10] Fukuda A, Nakamura A, Tagiri A, Tanaka H, Miyao A, Hirochika H, Tanaka Y. Function, intracellular localization and the importance in salt tolerance of a vacuolar Na^+/H^+ antiporter from rice. *Plant Cell Physiol*, 2004, 45: 146–59.
- [11] 徐璐, 郭善利, 尹海波. Na^+/H^+ 逆向转运蛋白与植物耐盐性研究. 湖北农业科学, 2016, 55: 2727–2730.
Xu L, Guo S L, Yin H B. The Na^+/H^+ antiporter and its relation to salt tolerance in plants. *Hubei Agric Sci*, 2016, 55: 2727–2730 (in Chinese with English abstract).
- [12] 马清, 包爱科, 伍国强, 王锁民. 质膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白与植物耐盐性. 植物学报, 2011, 46: 206–215
Ma Q, Bao A K, Wu G Q, Wang S M. Plasma membrane Na^+/H^+ antiporter is involved in plant salt tolerance. *Chin Bull Bot*, 2011, 46: 206–215 (in Chinese with English abstract).

- [13] Shi H, Ishitani M, Kim C, Zhu J K. The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene *SOS1* encodes a putative Na^+/H^+ antiporter. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 6896–6901.
- [14] An R, Chen Q J, Chai M F, Lu P L, Su Z, Qin Z X, Chen J, Wang X C. *AtNHX8*, a member of the monovalent cation: proton antiporter-1 family in *Arabidopsis thaliana*, encodes a putative Li^+/H^+ antiporter. *Plant J*, 2010, 49: 718–728.
- [15] 沈丹丹, 程文, 王志武, 卢增斌, 赵苏嫻, 丁照华, 张恩盈. 我国玉米耐盐种质研究现状与展望. *山东农业科学*, 2018, 50(11): 163–167.
Shen D D, Cheng W, Wang Z W, Lu Z B, Zhao S X, Ding Z H, Zhang E Y. Research advances and prospects of salt tolerant maize germplasms in China. *Shandong Agric Sci*, 2018, 50(11): 163–167 (in Chinese with English abstract).
- [16] 许静, 单亚楠, 何豆, 陈淞渝, 庄炜, 王爱荣. 甘蓝型油菜 SNARE 蛋白 SYP122 叶片瞬时表达体系的建立. *福建农林大学学报(自然科学版)*, 2019, 48: 459–465.
Xu J, Shan Y N, He D, Chen S Y, Zhuang W, Wang A R. Establishment of transient expression system of SNARE protein SYP122 in *Brassica napus* leaves. *J Fujian Agric & For Univ* (Nat Sci Edn), 2019, 48: 459–465 (in Chinese with English abstract).
- [17] 李磊, 杨远柱, 刘泓, 杜长青, 林建中, 朱咏华, 刘选明. 金针菇谷氨酸脱氢酶基因的克隆及原核表达. *生命科学研究*, 2013, 17: 230–237.
Li L, Yang Y Z, Liu H, Du C Q, Lin J Z, Zhu Y H, Liu X M. Cloning of a glutamate dehydrogenase gene from *Flammulina velutipes* and prokaryotic expression. *Life Sci Res*, 2013, 17: 230–237 (in Chinese with English abstract).
- [18] 高凯. NJ 进化树构建方法的改进及其应用. 北京工业大学硕士学位论文, 北京, 2008.
Gao K. Improvement and Application of Neighbor-Joining Method for Phylogenetic Tree Reconstruction. MS Thesis of Beijing University of Technology, Beijing, China, 2008 (in Chinese with English abstract).
- [19] Higgins D G, Thompson J D, Gibson T J. Using CLUSTAL for multiple sequence alignments. *Methods Enzymol*, 1996, 266: 383–402.
- [20] Attitalla I H. Modified CTAB method for high quality genomic DNA extraction from medicinal plants. *Pakistan J Biol Sci*, 2011, 14: 998–999.
- [21] 杨明峰, 韩宁, 陈敏, 王宝山. 植物盐胁迫响应基因表达的器官组织特异性. *植物生理学通讯*, 2002, 38: 394–398.
Yang M F, Han N, Chen M, Wang B S. Organ tissue specificity of plant salt stress response gene expression. *Plant Physiol J*, 2002, 38: 394–398.
- [22] Zhao W T, Feng S J, Li H, Faust F, Kleine T, Li L N, Yang Z M. Salt stress-induced *FERROCHELATASE 1* improves resistance to salt stress by limiting sodium accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *Sci Rep*, 2017, 7: 14737.
- [23] Earley K W, Haag J R, Pontes O, Oppen K, Juehne T, Song K, Pikaard C S. Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *Plant J*, 2006, 45: 616–629.
- [24] Batistic O, Sorek N, Schüttke S, Yalovsky S, Kudla J. Dual fatty acyl modification determines the localization and plasma membrane targeting of CBL/CIPK Ca^{2+} signaling complexes in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2008, 20: 1346–1362.
- [25] 许青松, 赵佳, 魏运民, 韩蓉蓉, 刘卢生, 蒋曹德, 王永雄. 紫花苜蓿 *MsOXO* 基因的克隆及表达分析. *浙江农业学报*, 2019, 31: 11–19.
Xu Q S, Zhao J, Wei Y M, Han R R, Liu L S, Jiang C D, Yu Y X. Cloning and expression analysis of oxalate oxidase gene *MsOXO* from *Medicago sativa*. *Acta Agric Zhejiangensis*, 2019, 31: 11–19 (in Chinese with English abstract).
- [26] Zhang F, Li L, Jiao Z, Chen Y, Liu H, Chen X, Fu J, Wang G, Zheng J. Characterization of the Calcineurin B-Like (CBL) gene family in maize and functional analysis of *ZmCBL9* under abscisic acid and abiotic stress treatments. *Plant Sci*, 2016, 253: 118–129.
- [27] 蔡晓峰, 胡体旭, 叶杰, 张余洋, 李汉霞, 叶志彪. 植物盐胁迫抗性的分子机制研究进展. *华中农业大学学报*, 2015, 34(3): 134–141.
Cai X F, Hu T X, Ye J, Zhang Y Y, Li H X, Ye Z B. Molecular mechanisms of salinity tolerance in plants. *J Huazhong Agric Univ*, 2015, 34(3): 134–141 (in Chinese with English abstract).
- [28] Hawrylak N B, Kalinowska M, Szymańska M. A study on selected physiological parameters of plants grown under lithium supplementation. *Biol Trace Element Res*, 2012, 149: 425–430.
- [29] Harwood A J. Lithium and bipolar mood disorder: the inositol-depletion hypothesis revisited. *Mol Psychiatr*, 2005, 10: 117–126.
- [30] Bakhat H F, Rasul K, Farooq A B U, Zia Z, Natasha, Fahad S, Abbas S, Shah G M, Rabbani F, Hammad H M. Growth and physiological response of spinach to various lithium concentrations in soil. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2019, 11: 1–9.
- [31] 李晓院, 解莉楠. 盐胁迫下植物 Na^+ 调节机制的研究进展. *生物技术通报*, 2019, 35(7): 148–155.
Li X Y, Xie L N. Research progress in Na^+ regulation mechanism of plants under salt stress. *Biotechnol Bull*, 2019, 35(7): 148–155 (in Chinese with English abstract).
- [32] Bartolo M E, Carter J V. Lithium decreases cold-induced microtubule depolymerization in mesophyll cells of spinach. *Plant Physiol*, 1992, 99: 1716–1718.
- [33] Jurkowska H, Rogoz A, Wojciechowicz T. Comparison of lithium-toxic influence on some cultivars of oats, maize and spinach. *Acta Agrar Silv Ser Silv*, 2018 36: 37–42.
- [34] Mulkey T J. Alteration of growth and gravitropic response of maize roots by lithium. *Gravit Space Biol Bull*, 2005, 18: 119–120.
- [35] Kabata P A, Mukherjee A B. Trace Elements from Soil to Human. Berlin: Environmental Chemistry Press, 2007. pp 9–38.
- [36] 赵祥强. 玉米 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因 *ZmSOS1* 的克隆与鉴定. *安徽农业科学*, 2009, 37: 17843–17848.
Zhao X Q. Cloning and identification of a new Na^+/H^+ antiporter gene *ZmSOS1* in maize. *J Anhui Agric Sci*, 2009, 37: 17843–17848 (in Chinese with English abstract).