



液泡定位的 β -葡萄糖苷酶增强拟南芥的耐旱性

王棚涛, 刘浩, 滑红杰, 王磊, 宋纯鹏*

河南大学生命科学学院, 棉花生物学国家重点实验室, 河南省植物逆境生物学重点实验室, 开封 475004

* 联系人, E-mail: songcp@henu.edu.cn

2011-07-21 收稿, 2011-09-01 接受

国家自然科学基金资助项目(90817106, 31170253 和 30800075)

摘要 植物激素脱落酸(abscisic acid, ABA)在植物生长发育及适应多种胁迫环境过程中发挥重要作用, 植物在应对这些不断变化的生理需求及环境条件时细胞内 ABA 水平也发生相应的变化. 迄今为止, 人们还未完全了解植物体内 ABA 水平的精细调控机制. 本文中, 我们的研究表明拟南芥中 β -葡萄糖苷酶家族成员之一 BGLU10 参与了植物的耐旱性反应. T-DNA 插入纯合突变体 *bglu10* 表现出干旱敏感的表型, 包括快速的水分丧失, 叶片表面温度较野生型低, ABA 含量、 β -葡萄糖苷酶活性及 ABA 和干旱响应基因的表达量均低于野生型. 与 *bglu10* 突变体相比, BGLU10 的超表达转基因植物比野生型耐旱性更强, 表现为较低的失水速率, 较野生型更高的 ABA 含量、 β -葡萄糖苷酶活性及 ABA 和干旱响应基因的表达水平. 拟南芥叶肉细胞原生质体瞬时表达结果证明 BGLU10 蛋白定位于液泡中. 另外, BGLU10 基因在植物多种组织中均有表达, 且受多种非生物胁迫诱导表达, 这些结果暗示了 BGLU10 可能在多种胁迫条件下水解 ABA-葡萄糖苷(ABA-GE)释放自由 ABA, 参与植物对这些胁迫的应答反应.

关键词

β -葡萄糖苷酶
干旱
BGLU10
脱落酸
拟南芥

植物激素脱落酸(abscisic acid, ABA)在植物应对多种非生物胁迫包括干旱、盐、冷等过程中发挥重要作用, 此外 ABA 还调控植物生长发育过程如种子休眠、萌发、幼苗生长、侧根发育、生殖生长及衰老等^[1-3]. 细胞内 ABA 水平随着植物适应这些环境变化及生理过程而不断发生变化. 比如, 在种子成熟和环境胁迫条件下细胞内 ABA 水平急剧升高; 相反, 种子萌发及环境胁迫解除时 ABA 水平显著下降^[4,5].

植物体内 ABA 水平高低受控于复杂的从头合成途径、羟基化代谢分解和共价结合失活的共同调节. 对于拟南芥中 ABA 的从头合成途径人们已经有了较深入的了解^[6], ABA 的从头合成步骤大多在叶绿体中进行, 其后包括从黄质醛到 ABA 在内的最后 2 步合成步骤在细胞质内完成^[7]. 大量研究表明 ABA 从头合成途径对于 ABA 水平的调控至关重要, ABA 合成突变体表现出 ABA 缺陷的表型, 包括种子提早萌发、易于萎蔫, 并对环境胁迫更为敏感^[8]. 另外, 大

量的数据也证明, 编码 ABA 合成的关键酶基因受环境胁迫或植物生长发育需要而表达量上调, 最终导致植物体内 ABA 水平的升高^[9,10]. 植物体内 ABA 通过氧化代谢或共价结合而失活^[6]. 其中 ABA 的氧化代谢失活途径在植物多种生理过程中发挥重要作用, 氧化代谢主要产物为 8'-OH-ABA, 此反应由 ABA 8'-羟化酶催化完成. 随后 8'-OH-ABA 自发异构化形成红花菜豆酸(phaseic acid, PA), 此后 PA 被还原形成二氢红花菜豆酸(DPA). ABA 8'-羟化酶属于细胞色素 P450 单加氧酶家族, 并受 ABA 处理和脱水胁迫诱导表达^[11]. 除了 8'-OH-ABA 之外, 人们还发现了 7'-OH-ABA 和 9'-OH-ABA 作为 ABA 氧化代谢的次要途径存在于多种植物中^[6]. 对于 ABA 的共价结合失活途径, 其 C-1 位羧基和多个位置的羟基甚至氧化代谢产物均可以作为底物与葡萄糖共价结合, 其中 ABA-葡萄糖酯(ABA-GE)是 ABA 共价结合失活的主要形式^[12]. 此反应由 ABA 特异的糖基转移酶催化完

英文版见: Wang P T, Liu H, Hua H J, et al. A vacuole localized β -glucosidase contributes to drought tolerance in *Arabidopsis*. Chinese Sci Bull, 2011, 56, doi: 10.1007/s11434-011-4802-7

成^[13]。早期人们认为 ABA-GE 这种无生理活性的 ABA 代谢产物可能不作为 ABA 的储藏或运输形式,且随着时间的推移或在胁迫环境条件下 ABA-GE 在液泡或质外体空间积累^[14]。然而,后来有研究暗示 ABA-GE 可能作为 ABA 的长距离运输形式,并为水解产生游离 ABA 提供了潜在的来源和途径^[15]。最近人们还发现外源 ABA-GE 可以抑制拟南芥幼苗下胚轴生长,由于 ABA-GE 不能自由通过细胞膜,这一结果使人们推想这种外源施加的 ABA-GE 可能被根吸收,并被 ABA- β -D-葡萄糖苷酶水解释放自由 ABA 而发挥抑制下胚轴生长的作用^[16]。令人兴奋的是, Lee 等人^[17]的直接证据显示在胁迫条件下,ABA-GE 可被 β -葡萄糖苷酶 AtBG1 水解并导致有生物学活性的 ABA 浓度升高。然而, Lee 等人^[17]的研究证明 β -葡萄糖苷酶 AtBG1 定位于内质网中,即使在胁迫条件下也如此。如前文所述,ABA-GE 储存于液泡或细胞壁甚至木质部汁液中^[18],因而, Lee 等人^[17]推测在细胞膜上可能存在一种蛋白转运系统,负责将 ABA-GE 运送入内质网并被 AtBG1 水解。

生物信息学分析暗示拟南芥 β -葡萄糖苷酶家族包含 48 个成员^[19],其中 Lee 等人^[17]报道的 AtBG1 为第 18 个成员 BGLU18。本研究中,我们的结果表明拟南芥中 β -葡萄糖苷酶家族另一成员 BGLU10 定位于液泡中,并参与植物的耐旱性反应。

1 材料与方法

(i) 植物材料与生长条件。拟南芥材料为 Columbia-0 生态型。植物种植与生长条件如下:种子经表面消毒后于 4℃ 黑暗条件下放置 3 d 以破除休眠,然后点播于含 0.6% 琼脂粉的 MS 培养基中并置于培养室生长(温度 22±2℃,光周期 16 h 光/8 h 暗,相对湿度 70%)。待幼苗长至 7~10 d 时移栽于营养土中,于生长室继续培养。对于干旱胁迫实验,幼苗在正常浇水条件下生长 20 d,此后停止浇水继续培养 10 d 后进行干旱表型分析。

(ii) *bglu10* 突变体的获得。BGLU10(At4g27830)基因的 T-DNA 插入种子购于拟南芥资源信息中心(<http://www.arabidopsis.org/abrc/>)。bglu10 插入纯合突变体通过 PCR 方法鉴定获得,PCR 引物如下:基因特异引物分别为 LP(TTAACGGTCAAGACAACGACC)和 RP(ATCCTTTACATGATTTTGCGG),载体左边界引物为 LBal(TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG)

和 LBb1(GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT)。PCR 鉴定所得纯合突变体与野生型拟南芥杂交,其子二代 F₂ 用于表型分析实验。

(iii) 载体构建。通过 PCR 方法扩增得到 BGLU10 基因的全长 cDNA 片段,用于构建 S1300+ 超表达载体和 GFP 融合蛋白载体。所用引物如下:超表达载体引物(下画线表示酶切位点)为正向 CCC-CTGCAGATGAAACTTTACTCTCTACTTTCCGTTT-TCT(*Pst* I)和反向 CCCGTCGACTTACAATGAAGA-AGAGCCAGAGATGTTGCTCTG(*Sal* I); pHBT-GFP 融合蛋白载体引物(下画线表示酶切位点)为正向 CCC-GTCGACATGAAACTTTACTCTCTACTTTCCG(*Sal* I)和反向 GGCCCGCGGTCAATGAAGAAGAGCCA-GAGATGTTGC(*Sac* II)。选择 γ -TIP1(At2g36830)作为液泡定位蛋白用于和 BGLU10 进行共定位研究,将其插入 pHBT-DsRed 载体的引物(下画线表示酶切位点)为 CCCGTCGACATGCCGATCAGAAACATCGCC(*Sal* I)和 GGCGGATCCCGGTAGTCTGTGGTTGGG-AGCTG(*Bam* H I)。此外,扩增 BGLU10 基因上游约 800 bp 的片段插入 pCAMBIA1381-GUS 载体中,用于研究该基因的组织表达特性,所用引物(下画线表示酶切位点)为正向 CCCGAATTCTTATCTTCGATC-ATCTAAGTTA(*Eco* R I)和反向 GGGCTGCAGTT-TGCTTTTGCTACTTTTCGTG(*Pst* I)。

(iv) 植物及原生质体转化。将构建的 BGLU10 基因的 GUS 载体和超表达载体转入农杆菌 GV3101 中,并通过农杆菌浸染野生型拟南芥获得转基因植物,分别用于 BGLU10 基因的组织表达分析和超表达植物耐旱性分析。蛋白亚细胞定位分析参照文献[20]完成,通过 PEG 介导的方法将 BGLU10-pHBT-GFP 和 γ -TIP1-pHBT-DsRed 载体共转化拟南芥叶肉细胞原生质体,弱光下室温放置 16~20 h 后进行荧光定位的共聚焦显微镜检测。

(v) 激光共聚焦显微镜检测 BGLU10 的亚细胞定位。原生质体荧光检测在激光共聚焦显微镜 FV1000 (Olympus, 日本)上进行,所有图像均使用 60×油镜采集。GFP 和叶绿体自发荧光由 488 nm 激发光所激发,荧光采集波长分别为 500~530 nm(GFP)和 650~750 nm(叶绿体荧光),RFP 激发光为 543 nm,荧光采集波长为 560~630 nm。在采集荧光的同时采集透射光图像用于共定位分析。

(vi) GUS 组织化学染色。将 10 个独立株系的

BGLU10 基因启动子的 GUS 转基因植株幼苗或组织浸泡于 GUS 染色液(3 mmol/L X-Gluc, 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲液, pH 7.0, 0.1% Triton X-100, 8 mmol/L β -巯基乙醇)中, 并于暗中 37℃放置过夜, 此后用 70% 乙醇脱色后拍照.

(vii) 半定量和定量 RT-PCR. 取培养室中正常生长(温度 $22\pm 2^\circ\text{C}$, 光周期 16 h 光/8 h 暗, 相对湿度 70%, 隔日浇水)15 d 和干旱处理(正常生长 10 d 后, 停止浇水 5 d)的拟南芥幼苗用于提取 RNA. RNA 提取和 cDNA 合成分别按照 TRIZOL(Invitrogen, 美国)方法和 M-MLV 试剂盒(Promega, 美国)说明书进行. 对于半定量 RT-PCR 实验, 以 *Actin2* 为参照检测 *BGLU10* 基因的表达量. 实时定量 RT-PCR 采用 SYBR Premix Ex Taq 试剂盒(TaKaRa, 中国), 在 MX3005P 定量 PCR (Stratagene, Agilent, 美国) 仪上进行. 扩增条件为: 95℃预变性 30 s, 95℃变性 25 s, 60℃退火 25 s, 72℃延伸 25 s, 40 个循环, 溶解曲线设置为 95℃ 60 s, 55℃ 30 s, 95℃ 30 s. 以 *Actin2* 为参照计算基因相对表达量. 定量 RT-PCR 实验重复 3 次.

(viii) 远红外成像分析. 干旱胁迫下远红外成像分析参照文献[21]方法进行. 拟南芥幼苗在培养室中正常生长(温度 $22\pm 2^\circ\text{C}$, 光周期 16 h 光/8 h 暗, 相对湿度 70%, 隔日浇水)7 d 后, 停止浇水 3 d, 然后于远红外成像仪(Therma CAM SC3000, FLIR System, 美国)下进行图像采集与分析, 拍摄的热图作为 14-bit IMG 格式文件存于 PMCIA 存储卡中, 随后在计算机上通过 IRwinReport 5.31 软件进行热图温度统计、分析和处理.

(ix) β -葡萄糖苷酶活性测定. 取干旱胁迫 10 d 的 WT, *bglu10* 和 *BGLU10-OE* 幼苗用于 β -葡萄糖苷酶活性测定, 同时以正常浇水生长的拟南芥幼苗为对照. 总 β -葡萄糖苷酶提取方法: 称取 2 g 拟南芥叶片, 用清水漂洗干净并吸干水分, 加入 100 mL 0.1 mol/L(pH 6.6)的磷酸缓冲液, 研磨成匀浆. 浆液于 4℃, 6000×g 离心 10 min. 上清液用 0.1 mol/L HCl 酸化至 pH 5.0, 再于 6000×g, 离心 10 min. 上清液即为粗提酶液, 于 4℃冰箱保存, 24 h 内进行活性测定.

总 β -葡萄糖苷酶活性测定参照文献[18]方法进行: 用二甲基亚砜(DMSO)将对硝基苯- β -D-半乳糖吡喃糖苷(pNPG)配置为 200 mg/mL 的母液, 于 -20℃保存备用. 酶活性测定体系: 取 12.5 μL 酶液与 0.4 mL (pH 4.8, KOH)的磷酸-柠檬酸缓冲液混合, 加入

10 μL pNPG 母液后于 37℃温浴 60 min, 反应结束后加入 1 mL Na_2CO_3 (200 mmol/L)溶液终止反应. 在 405 nm 处测定对硝基苯酚吸光度, 并以公式 $\varepsilon = 18300 \Delta\text{Abs} \times 1 \times (\text{mol cm})^{-1}$ 计算相对酶活性.

(x) ABA 含量测定. 参照文献方法以气相色谱-质谱方法测定 ABA 含量^[22-26]. 拟南芥培养和干旱处理方法同 β -葡萄糖苷酶活性测定实验. 取拟南芥叶片 1 g 于液氮中研磨成粉末, 将粉末置于 30 mL 含 95%异丙醇和 5%冰醋酸的提取液中, 4℃提取过夜, 上清液于冷冻干燥机中抽干, 再用 4 mL NaOH (1 mol/L)溶解沉淀物, 并用 3 mL 二氯甲烷洗 3 次以除去亲脂成分, 水相用 6 mol/L HCl 调 pH 至 3.5, 并加入乙酸乙酯提取 3 次, 将 3 次乙酸乙酯提取液混合后蒸发干燥, 干粉用 pH 8.0 的磷酸缓冲液溶解并过聚乙烯吡咯烷酮柱子. 提取物干燥后加入重氮甲烷进行甲基化, 然后进行气相色谱-质谱分析(6890N Network GC 系统, 5973 Network Mass Selective Detector; Agilent, 美国). 内源 ABA 含量根据峰面积计算, 并除以样品重量得到.

2 结果

2.1 *BGLU10* 基因缺失导致拟南芥对干旱敏感

新近的研究初步证明 β -葡萄糖苷酶 AtBG1 可以水解 ABA-GE 产生具生物学活性的自由 ABA, 参与植物的脱水胁迫反应^[17]. 本文所研究的 *BGLU10* 同样属于拟南芥 β -葡萄糖苷酶基因家族^[19]. 为验证 *BGLU10* 是否同样参与植物的干旱应答过程, 我们鉴定获得了 *BGLU10* 基因(At4g27830)的 T-DNA 插入突变体^[27]SALK_101672, 该突变体中 T-DNA 插入在 *BGLU10* 基因的第 3 个外显子中(图 1(a)). 逆转录 RT-PCR 结果证明突变体 *bglu10* 中无 *BGLU10* 基因的转录产物存在(图 1(b)). 在正常浇水生长条件下(温度 $22\pm 2^\circ\text{C}$, 光周期 16 h 光/8 h 暗, 相对湿度 70%, 隔日浇水)突变体 *bglu10* 与野生型 WT 间无明显生长差异(图 1(c)), 而在干旱处理条件下, *bglu10* 耐旱性明显差于 WT, 干旱处理 10 d 时 *bglu10* 已趋于萎蔫死亡状态, 而 WT 则表现出较轻微的脱水症状(图 1(d)). 与此相对应, 叶面温度远红外图像显示 *bglu10* 比 WT 低约 0.6℃(图 1(e), (g); $P < 0.05$ 水平存在显著差异), 而且 *bglu10* 叶片失水率也明显快于 WT, 在 200 min 时 *bglu10* 和 WT 失水率分别为 38%和 29%(图 1(h); $P <$

0.05 水平存在显著差异)。叶面温度的差异也许暗示了 *BGLU10* 参与了 ABA 含量的调节, 进而调节气孔开度和水分丧失, 即 *BGLU10* 与 *AtBG1* 的作用类似, 同样参与植物干旱反应过程。

2.2 *BGLU10* 基因超表达增强植物的耐旱性

大量的研究证明干旱条件下植物体会大量合成 ABA, 从而促进气孔关闭减少水分散失以提高植物对干旱的耐受能力^[28]。为进一步验证 *BGLU10* 在植物干旱反应中的作用, 我们创建了 *BGLU10* 基因的超表达转基因植物, 定量 PCR 结果显示超表达株系中 *BGLU10* 基因表达量约为 WT 中的 30 倍(图 2(a))。将正常浇水生长 10 d 的 *bglu10*, *BGLU10-OE* 和 WT 植物停止浇水, 进行干旱胁迫处理, 当干旱处理 5 d

时, 突变体 *bglu10* 表现出明显的脱水症状, 而 WT 植物脱水症状较轻微, 相反 *BGLU10-OE* 植物则显示出比 WT 更良好的生长状态(图 2(b))。当干旱处理后复水时, *BGLU10-OE* 植物所有叶片均恢复生长状态, 而 WT 植物恢复状况比 *BGLU10-OE* 植物稍差, *bglu10* 则表现出最差的恢复生长状态, 仅上部叶片可从脱水状态中得以恢复生长(图 2(c))。我们进一步观察到叶片失水速率与植物的脱水耐性表型相一致(图 2(d))。这一结果表明 *BGLU10* 超表达植物耐旱性强于 WT, 而 *bglu10* 突变体对干旱最敏感, 即植物的耐旱性与 *BGLU10* 基因的表达水平呈正相关。

2.3 *BGLU10* 调控植物耐旱性机制分析

干旱胁迫环境下植物体内 ABA 水平急剧升高,

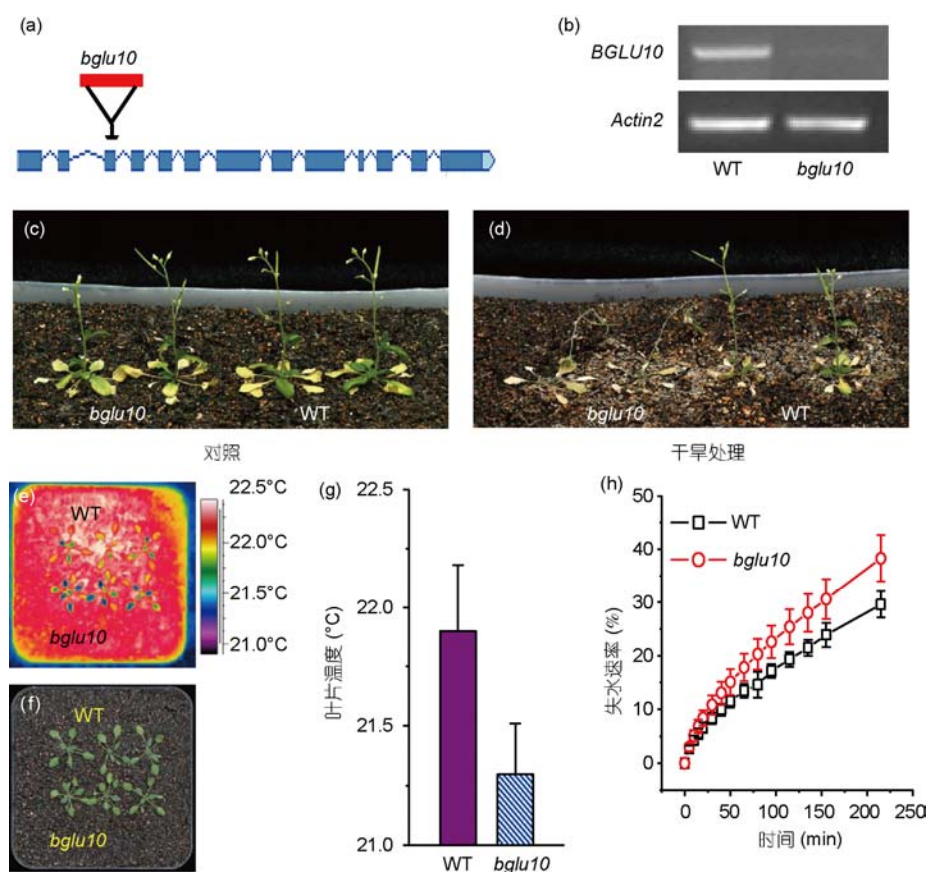


图 1 *BGLU10* 基因缺失导致植物对干旱敏感

(a) *BGLU10* 基因中 T-DNA 的插入位置; (b) 逆转录 RT-PCR 结果显示 *BGLU10* 基因在 *bglu10* 突变体中无转录产物。Actin2 为参照; (c) 种子萌发后 10 d 的幼苗移种于营养土中正常浇水条件下生长 30 d; (d) 植物在移入营养土中正常浇水条件下生长 20 d 后停止浇水 10 d; (e) 生长 14 d 的 WT 和 *bglu10* 植物在营养土中干旱处理 3 d 的远红外图像; (f) 常规照片显示图(e)中植物的生长状态; (g) *bglu10* 和 WT 植物叶面温度差异统计分析(每个叶片测定 2 个像素点, 共统计 40 个像素点取平均值并统计方差); (h) 折线图显示 *bglu10* 和 WT 失水速率(取 6 个叶片进行失水率统计分析, 实验重复 4 次取平均值并统计方差)

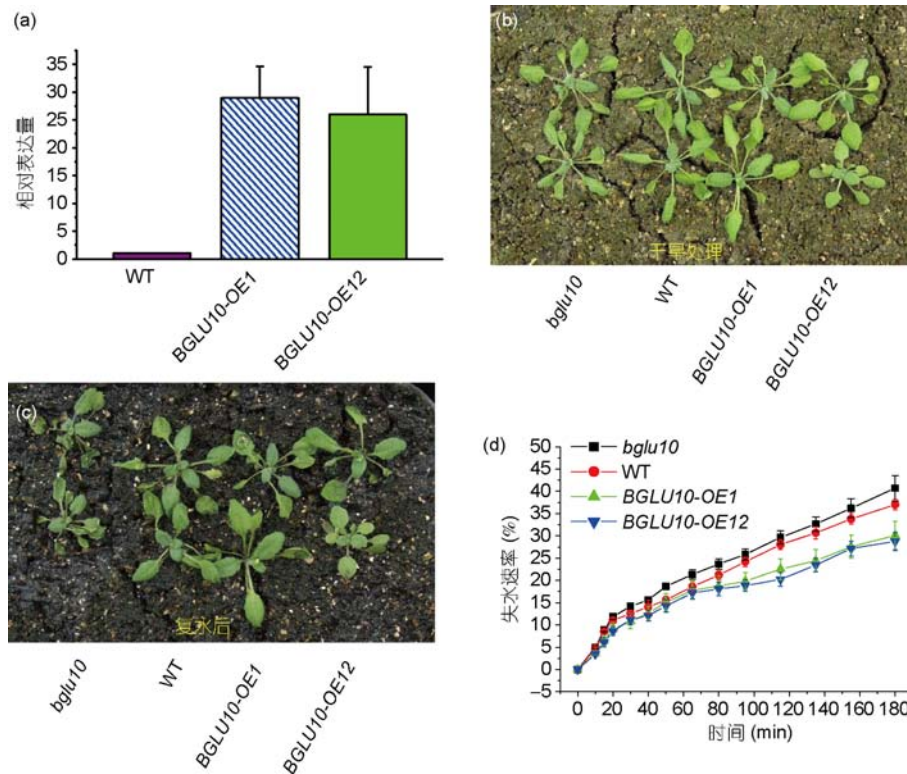


图2 *BGLU10* 基因超表达增强植物的耐旱性

(a) WT 和 *BGLU10*-OE 植物定量 PCR 结果; (b) 干旱处理 5 d 后 *bglu10*, WT 和 *BGLU10*-OE 植物的脱水症状; (c) *bglu10*, WT 和 *BGLU10*-OE 植物复水后叶片恢复生长状况; (d) *bglu10*, WT 和 *BGLU10*-OE 植物失水速率比较(每种植物取 6 个叶片, 实验重复 4 次取平均值并计算方差)

并通过复杂的基因表达网络调控最终表现为植物干旱适应能力提高^[9,29]。为进一步阐明 *BGLU10* 在植物抗旱中的作用, 我们测定和分析了正常生长及干旱胁迫条件下植物体内总 β -葡萄糖苷酶活性, 结果显示 *bglu10*, WT 和 *BGLU10*-OE 植物在干旱胁迫条件下 β -葡萄糖苷酶活性均比正常生长条件下升高, 其中 *BGLU10*-OE 植物总体 β -葡萄糖苷酶活性最高, 而 *bglu10* 突变体总体酶活性最低(图 3(a), 在 $P < 0.05$ 水平上任意两者间均存在显著性差异), 而且 *bglu10*, WT 和 *BGLU10*-OE 植物中 ABA 含量测定结果与 β -葡萄糖苷酶活性结果相一致(图 3(b))。前人的研究表明 *ATHB6* 和 *RD22* 两个基因的表达量受植物体内 ABA 水平和干旱处理而显著升高^[30-32]。我们进一步通过定量 PCR 方法检测了 *bglu10*, WT 和 *BGLU10*-OE 植物中 *ATHB6* 和 *RD22* 两个基因的表达量是否受 *BGLU10* 基因表达水平及 ABA 含量的影响, 结果表明 *ATHB6* 和 *RD22* 两个基因的表达量均受干旱处理而上调, 其中 *BGLU10*-OE 植物中 *ATHB6* 和 *RD22* 两个基因表达量

最高, 而在 *bglu10* 突变体中最低(图 3(c)和(d))。这一结果暗示 *BGLU10* 可能通过调节 ABA 含量进而调控耐旱基因表达而参与植物的干旱应答反应。

2.4 *BGLU10* 定位于液泡中

文献[19]基于蛋白质氨基酸序列信号肽的生物信息学分析预测, *BGLU10* 蛋白可能定位于液泡中。为进一步揭示 *BGLU10* 在植物干旱应答反应中的调控机制, 我们通过拟南芥叶肉细胞原生质体瞬时表达方法来研究 *BGLU10* 的亚细胞定位, 结果表明带 GFP 标签的 *BGLU10* 融合蛋白存在于细胞中的特定区域, 这些区域无叶绿体等细胞器存在(图 4(a3))。随后我们选择了液泡膜蛋白 γ -TIP1 作为液泡的标志蛋白用以验证 *BGLU10* 所在区域是否为液泡^[33], 并将 γ -TIP1 基因编码区插入红色荧光蛋白 pHBT-DsRed 载体中以便于进行荧光共定位观察分析, 当 *BGLU10*-pHBT-GFP 和 γ -TIP1::pHBT-DsRed 两个载体同时转化拟南芥叶肉细胞原生质体时, *BGLU10*::GFP 绿色

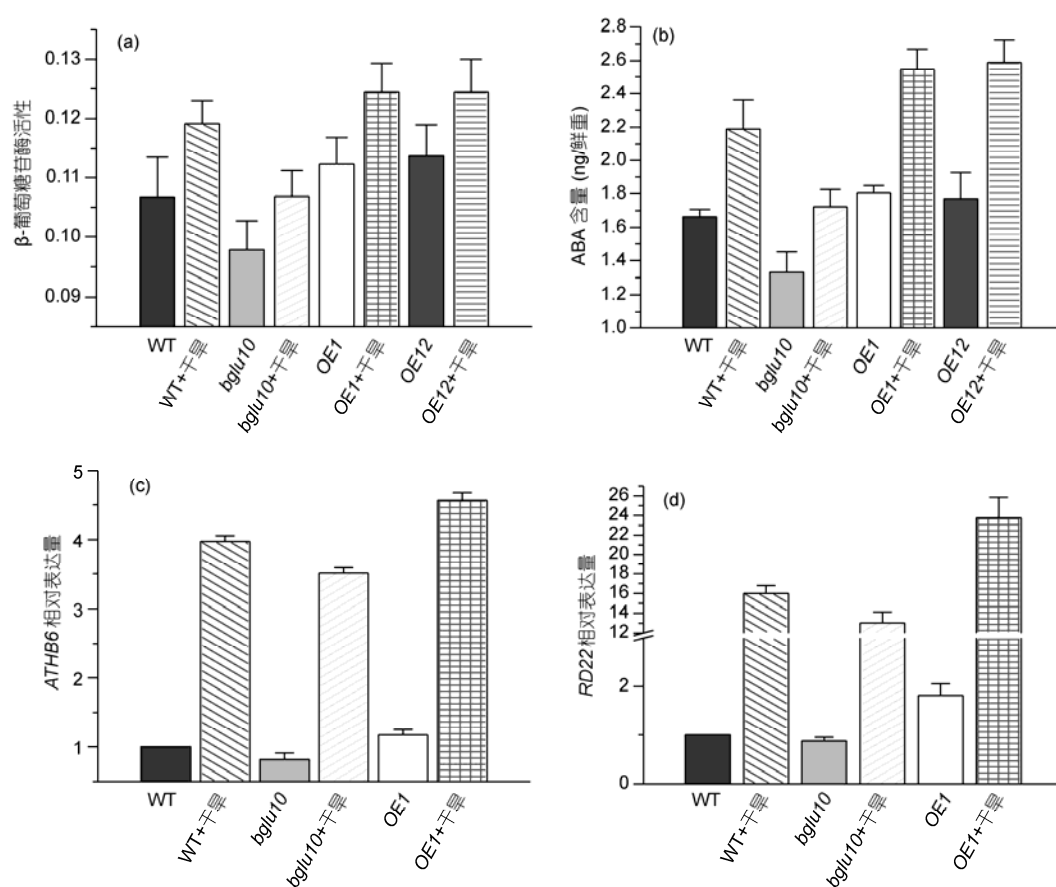


图3 BGLU10 调控植物干旱反应机制分析

(a) *bglu10*, WT 和 *BGLU10-OE* 植物在正常浇水条件及干旱胁迫处理时总 β -葡萄糖苷酶活性 (实验重复 3 次取平均值并计算方差); (b) *bglu10*, WT 和 *BGLU10-OE* 植物在正常浇水条件及干旱胁迫处理时 ABA 含量 (实验重复 3 次取平均值并计算方差); (c) 和 (d) 定量 RT-PCR 结果显示在 *bglu10*, WT 和 *BGLU10-OE* 植物中 *ATHB6* 或 *RD22* 基因表达水平受干旱胁迫诱导 (实验重复 3 次取平均值并计算方差)

荧光与 γ -TIP1::DsRed 红色荧光发生良好重叠 (图 4(b3)~(e3)). 同时, 我们观察到 pHBT-GFP 载体作为对照转化原生质体时, 绿色荧光几乎遍布整个细胞 (图 4(a1)~(d1)); 而且 pHBT-DsRed 载体作为对照也显示同样的结果 (图 4(a2)~(d2)). 这一结果说明 BGLU10 酶蛋白定位于液泡中, 并暗示 BGLU10 可能水解液泡中储存的 ABA-GE, 释放具生物学活性的游离 ABA 并导致细胞内 ABA 水平升高.

2.5 BGLU10 基因在多种组织中表达并受多种非生物胁迫诱导

为检测 *BGLU10* 基因在植物中的组织表达情况, 我们将该基因编码区上游约 800 bp 的片段插入 *GUS* 报告基因前以驱动 *GUS* 基因表达, pBGLU10-GUS 转

基因植物的组织染色结果表明 *BGLU10* 基因在根、莲座叶、茎及茎生叶、花和果荚中均有表达, 尤其在成熟的输导组织中表达水平较高 (图 5(a)). 逆转录 RT-PCR 结果也印证了 GUS 的染色结果 (图 5(b)). 此外, *BGLU10* 基因表达水平还受 ABA、盐及脱水处理诱导升高 (图 5(c)). *BGLU10* 基因组织表达染色和胁迫诱导分析的结果可能暗示了 *BGLU10* 基因参与多种胁迫条件下 ABA-GE 的水解, 释放游离 ABA 参与这些非生物胁迫应答反应.

3 讨论

植物激素 ABA 不仅调节植物的生长发育, 还调节植物的多种逆境胁迫应答反应, 植物体内 ABA 水平受合成速率和分解代谢速率的共同调节^[6]. 长期以

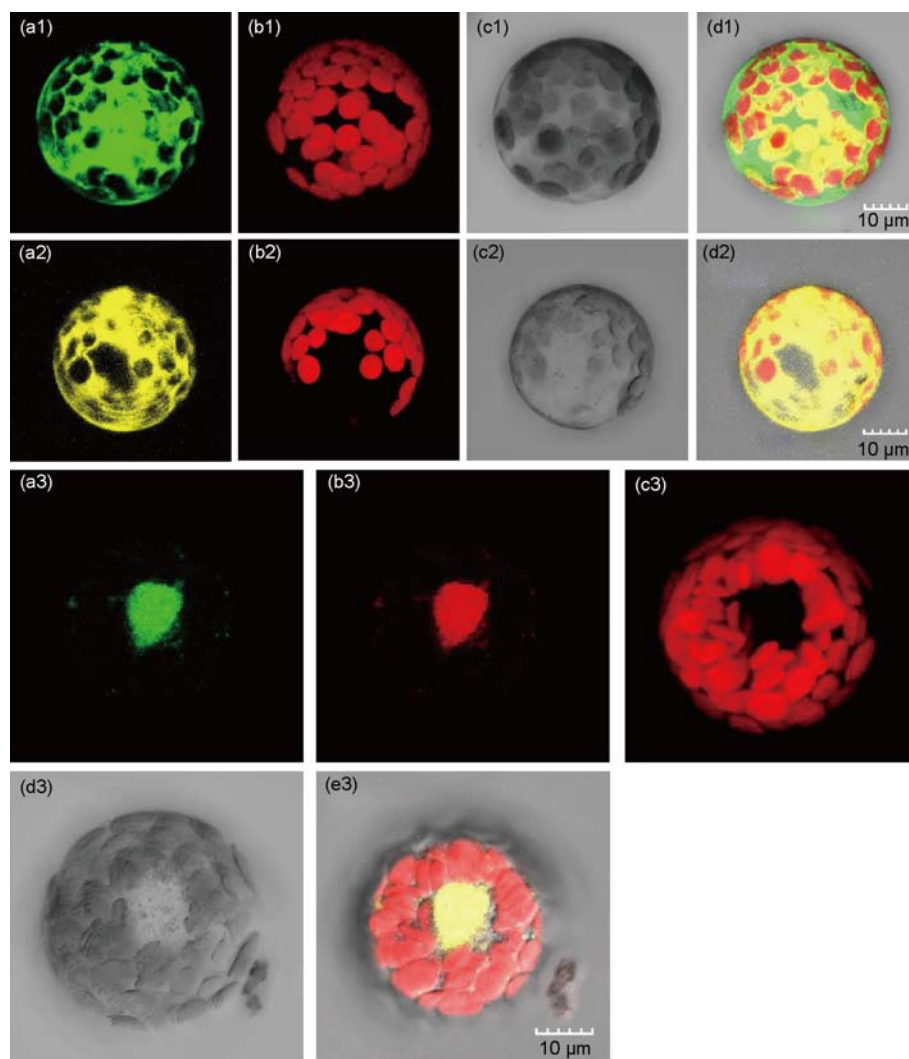


图 4 BGLU10 在原生质体中的亚细胞定位观察

(a1)~(d1) pHBT-GFP 载体作为对照转化原生质体时绿色荧光几乎遍布整个细胞; (a2)~(d2) pHBT-DsRed 载体作为对照转化原生质体时红色荧光几乎遍布整个细胞; (a3) BGLU10::GFP 的绿色荧光; (b3) γ -TIP1::RFP 的红色荧光; (c3) 叶绿体自发荧光; (d3) 原生质体透射光图像; (e3) 叠加图像((a3), (b3), (c3), (d3))

来人们认为 ABA-GE 仅作为 ABA 的无活性储存形式^[34]。2006 年, Lee 等人^[17]首次报道拟南芥中 β -葡萄糖苷酶家族成员之一 ATBG1 的 T-DNA 插入突变体表现出对干旱敏感的表型, 而且外源施加 ABA 可以部分恢复这些干旱敏感的性状, 这一研究结果为人们认识胁迫条件下植物体内 ABA 水平调节机制提供了新的思路。

本研究的实验结果表明, 拟南芥 β -葡萄糖苷酶家族另外一个成员 BGLU10 也参与植物的干旱抗性反应。在干旱胁迫处理时 T-DNA 插入突变体 *bglu10* 比野生型 WT 更快萎蔫死亡(图 1(c), (d)), 叶面温度

的远红外成像分析(图 1(e))结果暗示了 *bglu10* 突变体可能由于气孔处于较大的开放状态而导致水分丧失过快(图 1(g), (h))。相反, *BGLU10* 基因的过表达植物表现出比 WT 更强的耐旱性(图 2((b)~(d))), ABA 含量测定结果也与植物耐旱性差异结果相一致, 无论正常浇水生长还是干旱处理条件下, *BGLU10-OE* 株系 ABA 含量均高于 WT 和 *bglu10* 突变体; 相反, *bglu10* 突变体在上述两种生长条件下, ABA 含量均较低(图 3(b))。大量的研究证明 ABA 介导的植物脱水耐性反应与特定基因的表达调控有关, 其中 *ATHB6* 基因受缺水和外源 ABA 处理而表达上调^[35]。另外,

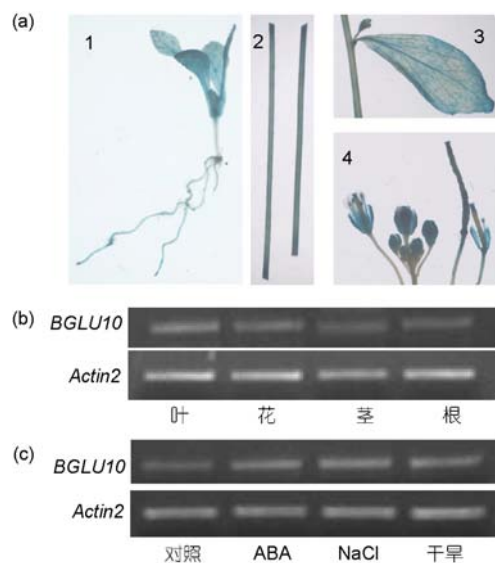


图5 *BGLU10* 基因的表达分析

(a) *BGLU10* 基因启动子驱动的 GUS 组织表达染色: 1, 2 周龄的幼苗; 2, 茎; 3, 茎生叶; 4, 花序和果荚; (b) 逆转录 RT-PCR 结果显示 *BGLU10* 基因在多种组织中的表达; (c) 逆转录 RT-PCR 结果显示 *BGLU10* 基因受多种非生物胁迫而诱导表达

脱水响应基因之一 *RD22* 也受外源 ABA 处理和干旱胁迫诱导表达^[30,36]。我们对 *ATHB6* 和 *RD22* 两个干旱或 ABA 响应基因的表达分析表明, *BGLU10-OE* 植物中这两个基因表达最高而在 *bglu10* 突变体中表达较低(图 3(c), (d))。同时, *bglu10*, WT 和 *BGLU10-OE* 植物中, 总 β -葡萄糖苷酶活性也与植物间抗旱性差异呈正相关(图 3(a))。 *BGLU10* 基因的组织表达分析表

明, 该基因在根、茎、叶及果荚等均有表达(图 5(a), (b)), 而且该基因的表达受多种非生物胁迫诱导升高(图 5(c))。这些结果也有助于解释 ABA 含量与耐旱性的关系, 即 *BGLU10* 的功能与 *ATBG1* 类似, 参与水解 ABA-GE 释放游离 ABA 从而增强植物的抗旱能力。

如前所述, 植物中 ABA-GE 一般储存在液泡、质外体空间甚至木质部汁液中^[18]。Lee 等人^[17]的研究表明 *ATBG1* 定位于内质网内, 因而作者假定细胞膜上存在一种 ABA-GE 的转运蛋白, 负责干旱等胁迫条件下将液泡或质外体空间存储的 ABA-GE 运输入内质网, 被 *ATBG1* 水解释放游离 ABA。然而这种假定的 ABA-GE 转运蛋白是否存在, 其转运 ABA-GE 的机制如何均需要进一步的研究。我们利用液泡膜蛋白 γ -TIP1 作为液泡的标志蛋白通过 GFP 和 RFP 的共定位结果证明 *BGLU10* 定位于液泡内(图 4((a3)~(e3))), 这一结果不仅验证了 *BGLU10* 亚细胞定位的生物信息学分析^[19], 更重要的是 *BGLU10* 的液泡内定位为其直接水解液泡内存在的 ABA-GE 提供了细胞内区隔的潜在理论基础。液泡中储存的 ABA-GE 是否不断地被水解, 释放游离 ABA, 还是在特定的胁迫或生长发育阶段被快速水解? 也就是说何种信号触发 *BGLU10* 的活性使其发挥酶解 ABA-GE 的功能? *BGLU10* 酶活性调节的分子机制如何? 这些问题的回答有助于人们全面了解 *BGLU10* 在植物抗旱反应中的功能, 以及为通过基因工程等手段提高植物的抗旱性提供理论依据。

致谢 感谢湖南农业大学肖浪涛教授在 ABA 含量测定实验中提供的帮助。

参考文献

- 1 Finkelstein R R, Gampala S S L, Rock C D. Absciscic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell*, 2002, 14 (Suppl): S15–S45
- 2 Christmann A, Moes D, Himmelbach A, et al. Integration of abscisic acid signalling into plant responses. *Plant Biol (Stuttg)*, 2006, 8: 314–325
- 3 Seki M, Umezawa T, Urano K, et al. Regulatory metabolic networks in drought stress responses. *Curr Opin Plant Biol*, 2007, 10: 296–302
- 4 Ali-Rachedi S, Boinot D, Wagner M H, et al. Changes in endogenous abscisic acid levels during dormancy release and maintenance of mature seeds: Studies with the Cape Verde Islands ecotype, the dormant model of *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 2004, 219: 479–499
- 5 Chiwocha S D, Cutler A J, Abrams S R, et al. The *etr1-2* mutation in *Arabidopsis thaliana* affects the abscisic acid, auxin, cytokinin and gibberellin metabolic pathways during maintenance of seed dormancy, moist-chilling and germination. *Plant J*, 2005, 42: 35–48
- 6 Nambara E, Marion-Poll A. ABA biosynthesis and catabolism. *Annu Rev Plant Biol*, 2005, 56: 165–185
- 7 Wasilewska A, Vlad F, Sirichandra C, et al. An update on abscisic acid signaling in plants and more.... *Mol Plant*, 2008, 1: 198–217
- 8 Hey S J, Byrne E, Halford N G. The interface between metabolic and stress signalling. *Ann Bot*, 2010, 105: 197–203
- 9 Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *J Exp Bot*, 2007, 58: 221–227
- 10 Urano K, Maruyama K, Ogata Y, et al. Characterization of the ABA-regulated global responses to dehydration in *Arabidopsis* by metabolomics. *Plant J*, 2009, 57: 1065–1078

- 11 Umezawa T, Okamoto M, Kushiro T, et al. CYP707A3, a major ABA 8'-hydroxylase involved in dehydration and rehydration response in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 2006, 46: 171–182
- 12 Cutler A J, Krochko J E. Formation and breakdown of ABA. *Trends Plant Sci*, 1999, 4: 472–478
- 13 Priest D M, Ambrose S J, Vaistij F E, et al. Use of the glucosyltransferase UGT71B6 to disturb abscisic acid homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 2006, 46: 492–502
- 14 Lehmann H, Glund K. Absciscic acid metabolism-vascular/extravascular distribution of metabolites. *Planta*, 1986, 168: 559–562
- 15 Sauter A, Dietz K J, Hartung W. A possible stress physiological role of abscisic acid conjugates in root-to-shoot signalling. *Plant Cell Environ*, 2002, 25: 223–228
- 16 Kato-Noguchi H, Tanaka Y. Effect of ABA-beta-D-glucopyranosyl ester and activity of ABA-beta-D-glucosidase in *Arabidopsis thaliana*. *J Plant Physiol*, 2008, 165: 788–790
- 17 Lee K H, Piao H L, Kim H Y, et al. Activation of glucosidase via stress-induced polymerization rapidly increases active pools of abscisic acid. *Cell*, 2006, 126: 1109–1120
- 18 Dietz K J, Sauter A, Wichert K, et al. Extracellular β -glucosidase activity in barley involved in the hydrolysis of ABA glucose conjugate in leaves. *J Exp Bot*, 2000, 51: 937–944
- 19 Xu Z, Escamilla-Treviño L, Zeng L, et al. Functional genomic analysis of *Arabidopsis thaliana* glycoside hydrolase family 1. *Plant Mol Biol*, 2004, 55: 343–367
- 20 Yoo S D, Cho Y H, Sheen J. *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: A versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nat Protoc*, 2007, 2: 1565–1572
- 21 Merlot S, Mustilli A C, Genty B, et al. Use of infrared thermal imaging to isolate *Arabidopsis* mutants defective in stomatal regulation. *Plant J*, 2002, 30: 601–609
- 22 Browning G, Wignall T A. Identification and quantitation of indole-3-acetic and abscisic acids in the cambial region of *Quercus robur* by combined gas chromatography-mass spectrometry. *Tree Physiol*, 1987, 3: 235–246
- 23 Qi Q, Rose P A, Abrams G D, et al. (+)-Absciscic acid metabolism, 3-ketoacyl-coenzyme A synthase gene expression, and very-long-chain monounsaturated fatty acid biosynthesis in *Brassica napus* embryos. *Plant Physiol*, 1998, 117: 979–987
- 24 Kamboj K S, Browning G, Blake P S, et al. GC-MS-SIM analysis of abscisic acid and indole-3-acetic acid in shoot bark of apple rootstocks. *Plant Growth Regul*, 1999, 28: 21–27
- 25 Kang D J, Seo Y J, Lee J D, et al. Jasmonic acid differentially affects growth, ion uptake and abscisic acid concentration in salt-tolerant and salt-sensitive rice cultivars. *J Agron Crop Sci*, 2005, 191: 273–282
- 26 Seo H S, Kim S K, Jang S W, et al. Effect of jasmonic acid on endogenous gibberellins and abscisic acid in rice under NaCl stress. *Biol Plant*, 2005, 49: 447–450
- 27 Alonso J M, Stepanova A N, Leisse T J, et al. Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science*, 2003, 301: 653–657
- 28 Iuchi S, Kobayashi M, Taji T, et al. Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant J*, 2001, 27: 325–333
- 29 Ni F T, Chu L Y, Shao H B, et al. Gene expression and regulation of higher plants under soil water stress. *Curr Genomics*, 2009, 10: 269–280
- 30 Abe H, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao T, et al. Role of *Arabidopsis* MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. *Plant Cell*, 1997, 9: 1859–1868
- 31 Söderman E, Hjellström M, Fahleson J, et al. The HD-Zip gene *ATHB6* in *Arabidopsis* is expressed in developing leaves, roots and carpels and up-regulated by water deficit conditions. *Plant Mol Biol*, 1999, 40: 1073–1083
- 32 Uno Y, Furihata T, Abe H, et al. *Arabidopsis* basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 11632–11637
- 33 Hunter P R, Craddock C P, Di Benedetto S, et al. Fluorescent reporter proteins for the tonoplast and the vacuolar lumen identify a single vacuolar compartment in *Arabidopsis* cells. *Plant Physiol*, 2007, 145: 1371–1382
- 34 Hartung W, Sauter A, Hose E. Absciscic acid in the xylem: Where does it come from, where does it go to? *J Exp Bot*, 2002, 53: 27–32
- 35 Deng X, Phillips J, Bräutigam A, et al. A homeodomain leucine zipper gene from *Craterostigma plantagineum* regulates abscisic acid responsive gene expression and physiological responses. *Plant Mol Biol*, 2006, 61: 469–489
- 36 Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. The plant hormone abscisic acid mediates the drought-induced expression but not the seed-specific expression of *rd22*, a gene responsive to dehydration stress in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet*, 1993, 238: 17–25