DOI: 10.3724/SP.J.1006.2020.91067

小麦脱落酸受体基因 *TaPYR1* 介导植株抵御干旱逆境功能研究

韩 乐 杜萍萍 肖 凯*

河北农业大学农学院, 河北保定 071001

摘 要: 脱落酸(ABA)受体 PYR/PYL/RCAR 通过与渗透胁迫诱导的 ABA 结合, 参与植株体内 ABA 介导的信号转导过程, 在调控植株干旱逆境抵御过程中具有重要的生物学功能。本文研究了鉴定的 1 个干旱响应的 PYR 家族成员 *TaPYR1* 的分子特征、应答干旱表达模式及其介导植株抵御干旱逆境的功能。结果表明, *TaPYR1* 与植物种属中部分 PYR 基因在氨基酸序列水平上高度同源, 编码蛋白含有 PYR 家族成员保守结构域, 翻译蛋白经内质网分选后定位于细胞质膜。*TaPYR1* 基因在小麦根、叶中均呈明显的干旱诱导表达模式, 在干旱胁迫 48 h 表达量达到峰值。与野生型对照(WT)相比, 超表达 *TaPYR1* 烟草转化株系, 干旱处理下植株长势增强, 干鲜重增加。干旱处理下, 转化株系较对照的光合能力增强, 细胞保护酶活性提高, 渗透调节物质脯氨酸和可溶性糖含量增加。研究表明, *TaPYR1* 通过在转录水平上应答干旱逆境, 改善干旱胁迫下的植株相关生理过程, 在增强植株抵御干旱逆境能力中发挥重要作用。

关键词: 小麦; ABA 受体基因; 表达; 遗传转化; 功能鉴定

Functional characteristics of *TaPYR1*, an abscisic acid receptor family gene in mediating wheat tolerance to drought stress

HAN Le, DU Ping-Ping, and XIAO Kai*

College of Agronomy, Hebei Agricultural University, Baoding 071001, Hebei, China

Abstract: ABA receptors are involved in the mediation of ABA signaling transduction through interaction with abscisic acid (ABA) molecules induced by osmotic stresses and play critical roles in regulating the drought stress tolerance in plants. In this study, *TaPYR1*, an ABA family gene in wheat that was shown to be differentially expressed in our previous transcriptome analysis was used to analyze its molecular property, expression patterns under drought stress condition, and functions in mediating plant adaptation to drought stress. *TaPYR1* shares high similarities to its plant counterparts at amino acid level. *TaPYR1* protein contains the conserved domains specified by the plant PYR proteins and was targeted onto the plasma membrane after endoplasmic reticulum (ER) assortment. The expression of *TaPYR1* was induced in both roots and leaves under drought, with the highest expression levels at 48 h of drought treatment. Transgene analysis on *TaPYR1* was performed to assess the gene function in mediating plant drought tolerance. Compared with wild type (WT), the tobacco lines overexpressing *TaPYR1* enhanced growth vigor and increased fresh and dry weight under drought stress. In addition, the transgenic lines with *TaPYR1* overexpression also increased photosynthetic function, enhanced activities of cellular antioxidant enzymes, and elevated the contents of osmolytes (i.e., proline and soluble sugar) under drought condition. Our investigation suggests that *TaPYR1* transcriptively responds to drought stress signaling and plays an important role in regulating plant drought adaptation by improving the associated physiological processes.

Keywords: *Triticum aestivum*; ABA receptor gene; expression; genetic transformation; functional characterization

干旱是作物生长、发育和产量形成的重要限制因素, 增强小麦等麦类作物水资源利用效率对于保障我国粮食安全及农业可持续发展具有重要实践意

义^[1]。研究表明, 植株在长期的演化过程中, 已形成系统的抵御干旱等渗透胁迫逆境信号转导和相关生理途径^[2-3]。其中, 脱落酸(abscisic acid, ABA)依赖途

本研究由国家自然科学基金项目(31872869)和国家重点研发计划项目(2017YFD0300902)资助。

This study was supported by the Natural Science Foundation of China (31872869) and the National Key Research and Development Program of China (2017YFD0300902).

* 通信作者(Corresponding author): 肖凯, E-mail: xiaokai@hebau.edu.cn

第一作者联系方式: E-mail: hanle95@163.com

Received (收稿日期): 2019-11-09; Accepted (接受日期): 2020-01-15; Published online (网络出版日期): 2020-02-14.

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20200214.1408.004.html>

径通过介导干旱诱导的 ABA 信号传递,在转录水平上激活下游渗透胁迫防御、初级和次级代谢、气孔开度调节等相关基因表达,在增强植株适应和抵御干旱逆境中发挥着重要生物学功能^[4-6]。

近年来研究证实,ABA 依赖的信号传递途径与感受渗透胁迫逆境诱发的 ABA 受体蛋白密切相关^[7-9]。干旱等渗透胁迫诱导的 ABA 首先被特定 ABA 受体家族成员感知,该家族成员识别和结合干旱诱导的 ABA 后形成受体-ABA 复合体,进一步与信号组分磷酸酶(PP2Cs)互作,形成受体-ABA-PP2Cs 三聚体,由此解除 PP2Cs 与 SnRK 转录因子互作造成的对 SnRK 转录和功能的限制。活化的 SnRK 转录因子进而调控下游干旱响应关键基因转录,增强植株对干旱胁迫的适应和抵御能力^[10]。近年来,有关模式植物拟南芥中 ABA 受体基因及其功能的鉴定研究已有较多报道,证实 Pyrabactin 1 (PYR 1)/PYR 1 和 PYL 蛋白具有结合 ABA 及将 ABA 信号向下游传递的功能^[11]。通过上述 ABA 受体与 ABA 和 PP2Cs 核心 ABA 信号元件互作激活 SnRK 2 家族成员,调控干旱逆境下生理生化过程,改善植株响应干旱等渗透胁迫逆境的相关生理生化过程^[12-13]。

植物种属中 ABA 受体 PYR (PYRABACTIN RESISTANCE)以家族的形式存在。迄今在模式植物拟南芥中鉴定了 PYR1 及其他 13 个同源基因(PYR1-Like),分别命名为 PYL1~PYL13。对上述拟南芥 ABA 受体编码基因应答干旱逆境模式和基因突变体研究表明,部分 PYR 家族成员呈干旱诱导表达模式,基因失活的突变体对干旱胁迫的耐受性与野生型对照相比发生明显改变^[14]。表明 PYR 家族成员通过介导 ABA 信号传递,在植株适应和抵御干旱逆境中发挥着重要生物学功能。

小麦是我国北方重要粮食作物,增强小麦抗旱能力对于节省水资源开发及促进我国粮食可持续发展具有重要实践意义。作者前期利用高通量测序分析鉴定了 1 个对干旱显著应答的小麦 ABA 受体基因 *TaPYR1*。基于此,本研究针对迄今有关小麦种属 PYR 家族成员研究尚少的现状,对该小麦 PYR 家族成员分子特征、应答干旱表达模式及介导植株抵御干旱逆境的能力进行了研究,旨在丰富小麦响应干旱逆境分子机理的认识,为今后小麦抗旱遗传改良提供理论。

1 材料与方法

1.1 材料及处理

以小麦品种济麦 22 为材料,采用试验室建立的 Hoagland 培养法培养小麦幼苗。培养条件为温度 25 /20 (白天/夜间),光周期 12 h/12 h (光期/暗期),空气湿度 65%~75%。期间每 3 d 更换一次营养液。三叶期时,将幼苗移至含有 5%聚乙二醇(PEG-6000)的营养液内,处理 6、12、24 和 48 h 后收获根叶样本。此外,将部分干旱处理 48 h 后幼苗转移至正常 Hoagland 营养液,处理 24 h 和 48 h 收获根叶样本。以干旱处理前(0 h)根叶作对照。收获各处理时间点样本经液氮速冻后置-80 °C 冰箱备用。

1.2 *TaPYR1* 分子特征研究

以 *TaPYR1* 蛋白序列为基础查找 GenBank 同源蛋白,采用 Mega 软件建立 *TaPYR1* 与其植物种属同源蛋白系统进化树。利用 ProtParam 软件,在线分析 *TaPYR1* 分子量和等电点;运用 NCBI 的 CDD (Conserved Domain Database)在线工具,鉴定 *TaPYR1* 保守域;采用 *TaPYR1* 与报告基因 *GFP* 融合蛋白(*TaPYR1*-GFP)在细胞内定位试验,明确 *TaPYR1* 亚细胞定位特征。方法如下:采用 DNA 重组技术构建表达载体 pCambia1300-*TaPYR1*-GFP。扩增 *TaPYR1* CDS 的正向引物为 5'-TGCTCTA GAATGGAGCAGCAGCCTGTG-3',反向引物为 5'-CGGACTAGTTTATTCTGCCGGCGGCGC-3'。用将重组质粒农杆菌用针头注射入烟草表皮细胞,48 h 后用激光共聚焦显微镜(FV10-ASW, OLYMPUS)于激发光波长 480 nm 和发射光波长 510 nm 下观察 GFP 信号,确定供试基因编码蛋白的亚细胞位置。

1.3 *TaPYR1* 应答干旱逆境的表达模式研究

参照试剂说明书采用 TRIzol 提取样本根、叶总 RNA。参照 Guo 等^[15]的方法采用 qRT-PCR 技术,鉴定 *TaPYR1* 在各处理时间点的转录本丰度。以小麦组成型基因 *Tatubulin* 作为目标基因转录本均一化内标,扩增该内标基因正向引物为 5'-CATGCTATCCCTC GTCTCGACCT-3',反向引物为 5'-CGCACTTCATG ATGGAGTTGTAT-3'。

1.4 转基因烟草株系建立

参照 Sun 等^[16]的方法,以干旱处理 48 h 小麦根系 cDNA 为模板,采用 RT-PCR 技术扩增 *TaPYR1* 正、反义序列。其中,扩增正义序列正向引物为 5'-AAA

CCATGGAGCAGCAGCCTGTG-3', 反向引物为 5'-GCAAAGAGTATCACAGCATCCGG-3'; 扩增反义序列正向引物为 5'-AAACCATGGCAAAGAGTATCACAGCA-3', 反向引物为 5'-AAAGGTAACCGCGTCGAGTCGAGTCCA-3'。采用农杆菌介导转化法将正、反义表达载体分别转化烟草(cv. Wiscosin 35), 构建正、反义表达 *TaPYR1* 转化株系。

1.5 干旱处理下转化株系植株形态和干质量测定

以 *TaPYR1* 正义株系 Sen 1、Sen 2 和反义株系 Anti 1、Anti 2 及野生型对照(WT)为材料, 采用与上述培养小麦幼苗相似的溶液培养法培养供试材料, 三叶期将供试材料分为两组条件, 一组用正常 Hoaland 营养液培养(对照), 另一组转入含有 5% PEG 的 Hoagland 营养液进行干旱处理。4 周后用数码相机记录植株长势。此外, 选取各处理代表性植株 3 株, 置烘箱内烘干后称重, 获得植株干质量。

1.6 干旱处理下转化株系生理生化参数测定

以上述不同处理 4 周后供试材料叶片为样本, 参照 Guo 等^[15]方法, 测定不同处理下转化株系光合速率(P_n)、胞间 CO_2 浓度(C_i)、光系统 II 光化学活性(PS_{II})和叶绿体光化学淬灭系数(NPQ)。此外, 参照 Huang 等^[17]的方法测定超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)活性和丙二醛(MDA)含量; 参照 Wang 等^[18]的方法, 测定脯氨酸含量和可溶性糖含量。

1.7 干旱处理下转化株系细胞保护酶编码基因表达模式研究

以干旱处理 4 周后供试材料叶片为样本, 对 4 个编码 SOD 家族基因(*NtSOD1*、*NtFeSOD*、*NtSOD2*、*NtMnSOD2*)、6 个编码 CAT 蛋白基因(*NtCAT*、*NtCAT1*、*NtCAT1;1*、*NtCAT1;2*、*NtCAT1;3*、*NtCAT3*)和 10 个编码 POD 蛋白基因(*NtPOD1;1*、*NtPOD1;2*、*NtPOD1;3*、*NtPOD1;4*、*NtPOD1;5*、*NtPOD1;6*、*NtPOD1;7*、*NtPOD4*、*NtPOD9*、*NtPOD2;1*)的表达模式进行了研究。上述细胞保护酶基因的 GenBank 登录号和用于扩增上述基因扩增的引物见附表 1。参照 Sun 等^[16]的方法检测上述细胞保护酶各家族基因的转录丰度进行。以烟草组成型表达基因 *Nitubulin* 为目标基因表达丰度均一化内参。扩增该内参基因正向引物为 5'-TACACAGGGGAAGG AATGG-3', 反向引物为 5'-CTCGAAACCAACGGTATC-3'。

1.8 数据统计学分析

采用 Microsoft Excel 2003 和 DPS 7.05 软件进行数据处理和统计分析。各测定数据均源于 4 次测试重复结果。

2 结果与分析

2.1 *TaPYR1* 的分子特征

TaPYR1 cDNA 全长 840 bp, 开放读码框长度为 636 bp, 编码 211 个氨基酸。*TaPYR1* 蛋白分子量为 22.621 kD, 等电点(pI)为 4.97。蛋白结构预测分析表明, *TaPYR1* 含有植物种属 PYR 家族成员保守的 SRPBCC 超家族保守区域(图 1-A); 蛋白多重比对结果表明, *TaPYR1* 在 44~192 氨基酸区段与其同源蛋白高度保守, 和其他物种同源蛋白具有相似的保守域结构(图 1-B)。系统进化分析表明, 在氨基酸水平上, *TaPYR1* 与单子叶植物种属如节节麦、大麦、水稻和玉米等同源蛋白在序列组成上高度相似(图 1-C), 表明上述成员可能具有相似的进化祖先。采用蛋白定位检测试验鉴定 *TaPYR1*-GFP 融合蛋白的亚细胞位置表明, *TaPYR1*-GFP 融合蛋白的荧光信号出现在细胞质膜。说明 *TaPYR1* 经内质网分选后定位于质膜, 在此处参与结合 ABA 及特定 ABA 信号的传递。

2.2 *TaPYR1* 应答干旱胁迫逆境的表达模式

正常生长条件下, 小麦根、叶片内 *TaPYR1* 转录本数量均较低; 干旱处理下, *TaPYR1* 表达上调, 表现在 48 h 处理时间内, 随处理进程转录本数量不断增多。此外, 将经 48 h 干旱处理植株转移至正常条件后, 根、叶内 *TaPYR1* 表达水平逐渐下调, 大致恢复至处理前水平(图 2)。表明 *TaPYR1* 呈典型干旱应答表达模式, 通过转录调节参与植株应答干旱胁迫过程。

2.3 干旱胁迫下转化株系的植株生长特征

正常生长条件下, 供试转化株系和与野生型(wild type, WT)植株长势一致(图 3-A)。干旱处理下, 与 WT 相比, 正义转化 *TaPYR1* 烟草株系(Sen 1 和 Sen 2)植株长势明显增强(图 3-A), 植株干质量显著增多(图 3-B); 与此相反, 反义转化 *TaPYR1* 的烟草株系(Anti 1 和 Anti 2)植株长势明显变差(图 3-A), 植株干质量显著降低(图 3-B)。说明 *TaPYR1* 转录丰度改变能诱发干旱逆境下植株长势和干物质积累能力的明显改变, 该基因在介导植株抵御干旱胁迫过程中发挥着重要生物学作用。

图 1 TaPYR1 蛋白的分子特征

Fig. 1 Molecular characteristics of the TaPYR1 protein

A: TaPYR1 蛋白结构预测; B: TaPYR1 蛋白多重序列比对; C: TaPYR1 氨基酸水平系统进化分析。

A: TaPYR1 protein structure predicted; B: alignment results among TaPYR1 protein and its homologous proteins; C: phylogenetic relations among TaPYR1 and its counterparts in plant species.

图 2 根叶中 TaPYR1 应答干旱胁迫逆境表达模式

Fig. 2 Expression patterns of TaPYR1 in both roots and leaves under drought stress

0 h, 处理前对照; 6、12、24 和 48 h, 干旱处理时间点; R24 h 和 R48 h, 恢复处理时间点。

0 h, control before treatment; 6, 12, 24, and 48 hours, time points under drought treatment; R24 h and R48 h, time points of recovery treatment after drought treatment.

2.4 干旱胁迫下转化株系的光合特性

与前述的植株长势一致, 正常生长条件下, 转化株系和 WT 的光合参数无明显差异(图 4-A~D)。干旱处理下, 与 WT 相比, 超表达 TaPYR1 烟草株系 (Sen 1 和 Sen 2) 叶片光合速率(P_n)和光系统 II 光化学效率(PS_{II})显著增高, 胞间 CO_2 浓度(C_i)叶绿体光化学淬灭系数(NPQ)降低; 而反义表达 TaPYR1 烟草株系 (Anti 1 和 Anti 2) P_n 和 PS_{II} 显著降低, C_i 和 NPQ 增大(图 4-A~D)。表明 TaPYR1 具有显著增强干旱胁迫下植株光合作用的能力。

2.5 干旱胁迫下转化株系的气孔关闭及持水特征

以干旱处理 60 min 内不同时间点(处理前 0、0.25、0.5 和 1 h)转化株系 (Sen 1 和 Anti 1) 和 WT 为材料, 对 TaPYR1 调控气孔开闭特性和叶片持水力

图 3 干旱胁迫下转化株系的植株生长特征

Fig. 3 Growth characteristics of the transgenic plants under drought stress

A: 干旱胁迫下 *TaPYR1* 转化株系植株生长情况; B: 干旱胁迫下 *TaPYR1* 转化株系干质量。WT, 野生型; Sen 1 和 Sen 2, 正义表达 *TaPYR1* 株系; Anti 1 和 Anti 2, 反义表达 *TaPYR1* 株系。误差线表示标准差, 符号*表示相对于 WT 的差异显著($P < 0.05$)。

A: Plant growth characteristics of transgenic lines overexpressing *TaPYR1* under drought stress; B: Plant biomass of transgenic lines overexpressing *TaPYR1* under drought stress. WT, wild type; Sen 1 and Sen 2, lines overexpressing *TaPYR1*; Anti 1 and Anti 2, lines with *TaPYR1* knockdown expression. Error bars indicate SE and symbol * represents significant difference relative to WT ($P < 0.05$).

进行了研究。随干旱处理进程, 转化株系和 WT 气孔开度均不断变小。但与 WT 相比, 正义烟草株系 (Sen 1) 气孔关闭速率加快, 而反义株系 (Anti 1) 气孔关闭速率变慢 (图 5-A)。与气孔关闭速率表现相反, Sen 1 在干旱各处理时间点的叶片持水力均高于 WT, 而 Anti 1 则相反, 各处理时间点的叶片持水

力均低于 WT (图 5-B)。上述结果表明, *TaPYR1* 能调控干旱处理下的植株叶片气孔加速关闭, 减少植株水分散失, 一定程度上增强植株持水和抵御干旱逆境能力。

2.6 干旱胁迫下转化株系的细胞保护酶活性、渗透物质含量及保护酶基因表达模式

干旱处理下, 与 WT 相比, Sen 1 株系 SOD、CAT 和 POD 活性增高, MDA 含量降低; 与此相反, Anti 1 株系上述细胞保护酶活性降低, MDA 含量增高 (图 6-A~D)。此外, 与 WT 相比, 干旱处理下 Sen 1 株系可溶性糖与脯氨酸含量增高, Anti 1 株系可溶性糖与脯氨酸含量降低 (图 6-E, F)。表明 *TaPYR1* 介导植株抵御干旱逆境能力的增强, 与其改善逆境胁迫下的细胞活性氧稳态和增强渗透物质生化合成代谢有关。

对干旱胁迫下转化株系和 WT 编码细胞保护酶家族基因的表达模式研究发现, 与 WT 相比, Sen 1 株系 *NtSOD2*、*NtCAT* 和 *NtPOD1*;3、*NtPOD1*;4 及 *NtPOD4* 的表达显著上调; 而 Anti 1 株系上述基因的表达则显著下调 (图 7)。上述结果表明, *TaPYR1* 对特定细胞保护酶编码基因进行转录调控, 由此提高植株干旱逆境下的细胞保护酶活性, 改善干旱胁迫下的细胞活性氧相对稳态, 增强植株干旱抵御能力。

3 讨论

ABA 信号通路诱发一系列逆境防御相关生理生化过程改变, 在介导植株抵御干旱、盐分等渗透胁迫逆境过程中发挥着重要生物学功能^[19-21]。其中, ABA 受体蛋白通过与逆境诱发的 ABA 结合, 介导

(图 4)

图 4 干旱胁迫下转化株系的光合特性

Fig. 4 Photosynthetic characteristic of transgenic lines under drought stress

A: 光合速率(P_n); B: 胞间 CO_2 浓度(C_i); C: 叶绿体光化学淬灭系数 (NPQ); D: 光系统 II 光化学效率(Φ_{PSII})。误差线表示标准差, 符号 * 表示相对于 WT 的差异显著($P < 0.05$)。

A: Photosynthetic rate (P_n); B: Intercellular CO_2 concentration (C_i); C: Photochemical quenching absorption of chloroplast (NPQ); D: Photochemical efficiency of photo system II (Φ_{PSII}). Error bars indicate SE and symbol * represents significant difference relative to WT ($P < 0.05$).

图 5 干旱胁迫下转化株系的气孔关闭及叶片持水特征

Fig. 5 Stomatal closure properties and water retention capacities of transgenic lines under drought stress

A: 气孔关闭特征; B: 叶片持水力。

A: stomatal closure characteristic; B: water retention capacity of leaves.

(图 6)

图 6 干旱胁迫下转化株系的细胞保护酶活性及渗透物质含量
Fig. 6 Activities of the cellular protection enzymes and osmolyte contents in transgenic lines under drought stress
A: SOD 活性; B: CAT 活性; C: POD 活性; D: MDA 含量; E: 脯氨酸含量; F: 可溶性糖含量。误差线表示标准差, 符号*表示相对于 WT 的差异显著($P < 0.05$)。
A: SOD activities; B: POD activities; C: CAT activities; D: MDA contents; E: proline contents; D: soluble sugar contents. Error bars indicate SE and symbol * represents significant difference relative to WT ($P < 0.05$).

图 7 干旱胁迫下转化株系的保护酶基因表达模式
Fig. 7 Expression patterns of protective enzyme genes in transformed lines under drought stress
A: SOD 家族基因; B: CAT 家族基因; C: POD 家族基因。误差线表示标准差, 符号*表示相对于 WT 的差异显著($P < 0.05$)。
A: SOD family genes; B: CAT family genes; C: POD family genes. Error bars indicate SE and symbol * represents significant difference relative to WT ($P < 0.05$).

逆境信号传递, 是特定渗透胁迫诱导的 ABA 信号传递通路重要组分^[22]。本研究对小麦种属 *TaPYR1* 分子特征研究表明, 该基因编码蛋白与植物种属部分同源蛋白在序列组成上高度相似, 其编码蛋白含有

PYR 家族蛋白的 SRPBCC 超家族保守区域(44~192 aa)。此外, 对该基因编码蛋白的亚细胞定位试验结果显示, *TaPYR1* 蛋白经内质网分选后定位于细胞质膜。上述基因及其编码蛋白特征表明, *TaPYR1* 是

小麦种属中 ABA 受体家族成员, 其编码蛋白通过在胞质膜上结合 ABA, 参与植株特定逆境信号的转导过程。

部分 ABA 信号通路组分编码基因, 通过在转录水平上对渗透胁迫逆境产生应答, 对特定逆境信号进行传递^[23]。如拟南芥 PYR 家族成员 *AtPYL* 的转录本丰度在干旱和盐分逆境下显著增大, 通过基因转录效率改变, 改善与 ABA 结合能力, 对参与植株逆境响应的 ABA 信号通路产生调控^[24]。本研究发现, *TaPYR1* 在植株根叶组织内呈典型的干旱诱导表达模式, 该基因在上述组织内的表达随干旱处理进程不断增强, 且其干旱诱导表达随正常生长恢复处理不断减弱。表明该基因转录受到干旱逆境的调节。进一步揭示该基因转录机制, 将深入对小麦等麦类种属 ABA 信号转导通路及适应干旱逆境分子机理的认识。

气孔调节是植物抵御干旱胁迫和适应环境的重要机制之一。植物通过控制气孔运动特征影响气孔开闭程度, 进而调控叶片蒸腾速率和水分利用效率 (WUE)^[25]。同时, 气孔开闭程度通过影响光合作用底物 CO_2 向光合羧化位点的传输, 对干旱等渗透胁迫逆境下的光合碳同化能力产生重要影响^[26]。本研究对遗传转化 *TaPYR1* 烟草株系干旱逆境下植株长势和干物质积累特征研究表明, 正义表达供试基因的烟草株系, 植株抵御干旱逆境的能力发生明显改变。表现为与对照 (WT) 相比, 正义株系的长势增强, 干质量增大; 反义株系的长势减弱, 干质量降低。对上述株系抵御干旱逆境相关的气孔开闭及光合生理研究表明, *TaPYR1* 对干旱逆境下植株长势和干质量的调控, 与其对气孔运动和光合碳同化能力的调节密切相关。因此, 该小麦 ABA 受体基因通过对气孔关闭和光合碳同化正向调控, 改善干旱逆境下的植株保水和干物质累积能力。

干旱等非生物逆境下, 植株体内通过增强细胞保护酶如 SOD、CAT 和 POD 等生化活性, 增强对逆境诱导增多的活性氧 (超氧阴离子、过氧化氢和羟自由基等) 清除能力, 减轻细胞的膜质过氧化程度, 在增强植株抵御逆境胁迫过程中发挥着重要生物学功能^[27]。本研究表明, 与 WT 相比, 干旱胁迫下正义株系上述细胞保护酶活性均明显增强, 膜质过氧化产物丙二醛含量降低。与此相反, 干旱处理下反义株系细胞保护酶活性降低, 丙二醛含量增多。表明 *TaPYR1* 通过对干旱逆境下细胞活性氧内稳态

的调节, 对植株适应和抵御干旱逆境的能力也产生重要影响。本研究通过对编码上述保护酶的基因家族成员表达分析表明, 特定细胞保护酶家族基因包括 *NtSOD2*、*NtCAT* 和 *NtPOD1;3*、*NtPOD1;4* 和 *NtPOD4* 转录受到 PYR 的调控。与 WT 相比, 干旱逆境下正、反义株系中上述保护酶基因分别呈典型的上、下调表达特征, 表明上述保护酶基因通过转录调节, 影响转化株系干旱处理下的细胞保护功能, 进而影响植株抵御干旱逆境的能力。进一步解析特定应答干旱逆境细胞保护酶编码基因的转录机制及耐逆功能, 将丰富对作物维持逆境下细胞活性氧稳态及抗逆分子机制的认识。

4 结论

小麦 ABA 受体基因 *TaPYR1* 编码蛋白含有 PYR/PYL/RCAR 家族保守结构域, 翻译蛋白经内质网分选后定位于细胞质膜。*TaPYR1* 呈典型干旱诱导表达模式, 遗传转化该小麦 ABA 受体基因对植株抵御干旱逆境能力产生重要影响。该基因通过对气孔关闭速率、光合碳同化、细胞保护能力和渗透物质正向调控, 增强植株抵御干旱逆境能力。*TaPYR1* 对细胞保护能力的调节, 与其对细胞保护酶家族基因 *NtSOD2*、*NtCAT* 和 *NtPOD1;3*、*NtPOD1;4* 和 *NtPOD4* 的转录调控有关。

References

- [1] 居辉, 熊伟, 许吟隆, 林而达. 气候变化对我国小麦产量的影响. 作物学报, 2005, 31: 98–101.
Ju H, Xiong W, Xu Y L, Lin L D. Effects of climate change on wheat yield in China. *Acta Agron Sin*, 2005, 31: 98–101 (in Chinese with English abstract).
- [2] Bi H, Kovalchuk N, Langridge P, Tricker P J, Lopato S, Borisjuk N. The impact of drought on wheat leaf cuticle properties. *BMC Plant Biol*, 2017, 17: 85.
- [3] Arbona V, Zandalinas S I, Manzi M, González-Guzmán M, Rodríguez P L, Gómez-Cadenas A. Depletion of abscisic acid levels in roots of flooded *Carrizo citrange* (*Poncirus trifoliata* L. Raf. × *Citrus sinensis* L. Osb.) plants is a stress-specific response associated to the differential expression of PYR/PYL/RCAR receptors. *Plant Mol Biol*, 2017, 93: 623–640.
- [4] Ha Y M, Shang Y, Yang D, Nam K H. Brassinosteroid reduces ABA accumulation leading to the inhibition of ABA-induced stomatal closure. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 504: 143–148.
- [5] Huang X, Shi H, Hu Z, Liu A, Amombo E, Chen L, Fu J. ABA is involved in regulation of cold stress response in Bermudagrass. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 1613.
- [6] Li W, De Ollas C, Dodd I C. Long-distance ABA transport can mediate distal tissue responses by affecting local ABA concentra-

- tions. *J Integr Plant Biol*, 2018, 60: 16–33.
- [7] Park E J, Kim T H. Production of ABA responses requires both the nuclear and cytoplasmic functional involvement of PYR1. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 484: 34–39.
- [8] Liu S, Lü Z, Liu Y, Li L, Zhang L. Network analysis of ABA-dependent and ABA-independent drought responsive genes in *Arabidopsis thaliana*. *Genet Mol Biol*, 2018, 41: 624–637.
- [9] Sussmilch F C, Atallah N M, Brodribb T J, Banks J A, Mcadam S A M. Absciscic acid (ABA) and key proteins in its perception and signaling pathways are ancient, but their roles have changed through time. *Plant Sig Behav*, 2017, 12: e1365210.
- [10] Han S, Min M K, Lee S Y, Lim C W, Bhatnagar N, Lee Y, Shin D, Chung K Y, Lee S C, Kim B G, Lee S. modulation of ABA signaling by altering VxGPhiL motif of PP2Cs in *Oryza sativa*. *Mol Plant*, 2017, 10: 1190–1205.
- [11] Nakashima K, Yamaguchi-Shinozaki K. ABA signaling in stress-response and seed development. *Plant Cell Rep*, 2013, 32: 959–970.
- [12] Verslues P E. ABA and cytokinins: challenge and opportunity for plant stress research. *Plant Mol Biol*, 2016, 91: 629–640.
- [13] Ditttrich M, Mueller H M. The role of *Arabidopsis* ABA receptors from the PYR/PYL/RCAR family in stomatal acclimation and closure signal integration. *Nat Plants*, 2019, 5: 1002–1011.
- [14] Huang A X, She X P, Zhao J L, Zhang Y Y. Inhibition of ABA-induced stomatal closure by fusicoccin is associated with cytosolic acidification-mediated hydrogen peroxide removal. *Bot Stud*, 2010, 55: 33.
- [15] Guo C, Zhao X, Liu X, Zhang L, Gu J, Li X, Lu W, Xiao K. Function of wheat phosphate transporter gene *TaPHT2;1* in Pi translocation and plant growth regulation under replete and limited Pi supply conditions. *Planta*, 2013, 237: 1163–1178.
- [16] Sun Z H, Ding C H, Li X J, Xiao K. Molecular characterization and expression analysis of TaZFP15, a C2H2-type zinc finger transcription factor gene in wheat (*Triticum aestivum* L.). *J Integr Agric*, 2012, 1: 35–46.
- [17] Huang X S, Liu J H, Chen X J. Overexpression of *PtrABF* gene, a bZIP transcription factor isolated from *Poncirus trifoliata*, enhances dehydration and drought tolerance in tobacco via scavenging ROS and modulating expression of stress-responsive genes. *BMC Plant Biol*, 2010, 10: 230.
- [18] Wang X H, Xu K Z, Li D Y, Zhang Z A, Wu Z H. Changes of soluble sugar content and specific leaf weight in soybean genetic improvement. *Soybean Sci*, 2007, 26: 879–884.
- [19] Joo H, Lim C W, Lee S C. Identification and functional expression of the pepper RING type E3 ligase, CaDTR1, involved in drought stress tolerance via ABA-mediated signalling. *Sci Rep*, 2016, 6: 30097.
- [20] Lim C W, Lee S C. Pepper protein phosphatase type 2C, CaADIP1 and its interacting partner CaRLP1 antagonistically regulate ABA signalling and drought response. *Plant Cell Environ*, 2016, 39: 1559–1575.
- [21] Park C, Lim C W, Baek W, Kim J H, Lim S, Kim S H, Kim K N, Lee S C. The pepper WPP domain P protein, CaWDP1, acts as a novel negative regulator of drought stress via ABA signaling. *Plant Cell Physiol*, 2017, 58: 779–788.
- [22] Fujita Y, Yoshida T, Yamaguchi-Shinozaki K. Pivotal role of the AREB/ABF-SnRK2 pathway in ABRE-mediated transcription in response to osmotic stress in plants. *Physiol Plant*, 2013, 147: 15–27.
- [23] Han S, Lee Y, Park E J, Min M K, Lee Y, Kim T H, Kim B G, Lee S. Structural determinants for pyrabactin recognition in ABA receptors in *Oryza sativa*. *Plant Mol Biol*, 2019, 100: 319–333.
- [24] Tischer S V, Wunschel C, Papacek M, Kleigrew K, Hofmann T, Christmann A, Grill E. Combinatorial interaction network of abscisic acid receptors and coreceptors from *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114: 10280–10285.
- [25] Yang J, Zhao S, Zhao B, Li C. Overexpression of TaLEA3 induces rapid stomatal closure under drought stress in *Phellodendron amurense* Rupr. *Plant Sci*, 2018, 277: 100–109.
- [26] Jin J, Lauricella D, Armstrong R, Sale P, Tang C. Phosphorus application and elevated CO₂ enhance drought tolerance in field pea grown in a phosphorus-deficient vertisol. *Ann Bot*, 2015, 116: 975–985.
- [27] Shi G C, Fu J Y, Rong L J, Zhang P Y, Xiao K. TaMIR1119, a miRNA family member of wheat (*Triticum aestivum*), is essential in the regulation of plant drought tolerance. *J Integr Agric*, 2018, 17: 2369–2378.

附表 1 *NtSOD*、*NtCAT* 和 *NtPOD* 家族基因特异性扩增引物Supplementary table 1 The specific primers for amplification of the *NtSOD*, *NtCAT*, and *NtPOD* family genes

目的基因 Gene	登录号 Accession number	上游引物 Forward primer (5'–3')	下游引物 Reverse primer (5'–3')
<i>NtSOD1</i>	KJ874395	GTGGACATGTCGTGTC AAGG	TTCTCACCAACTCCTGCACTT
<i>NtFeSOD</i>	KF724056	CATCACAGAGCTTATGTCGACA	CTAGAACTGACTGCTTCCCA
<i>NtSOD2</i>	EU123521	ATGTCACGGGACCACATTAC	AACCCTTCCACCAGCATTTC
<i>NtMnSOD2</i>	AB093097	GACGGACCTTAGCAACAGGG	ACCAATGGGTCTCTGATTAGCAG
<i>NtCAT</i>	NTU07627	GTCTCAGGCTGACAAGTCTT	ACGGAAGACAGAGTAGCAGC
<i>NtCAT1</i>	EF532799	CAAGGATCTCTACGACTCGATT	CTTGAGGGCAAATAATCCACCT
<i>NtCAT1;1</i>	NTU93244	TCCTGCTAATGCTCCAAAGTGT	AATGCATATGTATTAGGAATGCTC
<i>NtCAT1;2</i>	HF564632	GGTATCGACTTGGACCAAACCTA	GGTCTCACATTAAGCCTAGAAG
<i>NtCAT1;3</i>	HF564631	TTGCAGCCGGTGGGAAGATT	GGTCTCACATTAAGCCTAGAAG
<i>NtCAT3</i>	HF564633	GTCTTGGGCCAAACTATCTGCA	TCAGCTTCACATTGTGGGCC

(续附表 1)

目的基因 Gene	登录号 Accession number	上游引物 Forward primer (5'-3')	下游引物 Reverse primer (5'-3')
<i>NiPOD1;1</i>	L02124	GGAATTTGTCCTCAAGGTGGAA	CTTATTGGAATTGCCATTTTCAGC
<i>NiPOD1;2</i>	AB044154	CTGACATGGTCTGTGCCTAC	TCAGTTGATAGCAGAGCAAACCTT
<i>NiPOD1;3</i>	AB044153	AAGATCTTGTCTGCTCTTACTGG	AATTGGATTTTCCAGCTTGCG
<i>NiPOD1;4</i>	D11396	TGCTGGTAGTCAAAGTCAGTTTT	CCCATGTTGAACACGTTCTTACC
<i>NiPOD1;5</i>	AB178953	AACAGCAACAACGTAAACCCAGC	TTAATTTTGGACCACATTCAGGA
<i>NiPOD1;6</i>	AB027753	TCAACTCCACTGGTGGCCCT	AATTCGATTTTGCAGCTTGCGC
<i>NiPOD1;7</i>	AB027752	GCCCAAGAAGTTCAGGCTCA	ATACAAATACAGTCCTTTACTCG
<i>NiPOD2;1</i>	AB178954	AGGGGAAAAGACCTCACCAC	AGTTTCCCATCTTGATCATAGCA
<i>NiPOD4</i>	AY032675	AGACTCAAAGATAGCAAACCTCA	CTTCCTGATGTCACCCTTGA
<i>NiPOD9</i>	AY032674	CACCACCTTCATTCAACGCTA	ACATCTCAGACAAAACACTTGTC