

高换超,许雯雯,井朋伟,等. 我国野生燕山葡萄 *VyUSPI* 基因抗逆功能的初步验证[J]. 江苏农业科学,2022,50(10):159–165.
doi:10.15889/j.issn.1002–1302.2022.10.025

我国野生燕山葡萄 *VyUSPI* 基因抗逆功能的初步验证

高换超^{1,2}, 许雯雯¹, 井朋伟¹, 程珊珊¹, 侯小进^{1,2}, 李桂荣^{1,2}

(1. 河南科技学院园艺园林学院,河南新乡 453003;

2. 河南省园艺植物资源利用与种质创新工程研究中心,河南新乡 453003)

摘要:研究我国野生葡萄燕山葡萄 (*Vitis yeshanensis* ‘Yanshan’) *VyUSPI* 基因在转基因烟草不同逆境下的表达情况,选择从供试材料中克隆所获得的 *VyUSPI* 基因,利用重组法构建其载体,并用农杆菌介质为导体转化转基因烟草植株,获得 *USP* 转基因烟草植株,然后对转基因烟草植株进行不同逆境处理,并对该基因进行初步的功能研究。结果表明,在不同的逆境条件下,*USP* 转基因烟草均具有一定的抗干旱能力,但是不具备抗寒能力。较高浓度 NaCl、甘露醇、PEG–6000 以及低温处理会抑制转基因烟草种子的萌发。而在不同浓度 NaCl、甘露醇处理下,转基因烟草植株幼苗均比野生型 (WT) 植株幼苗的表现要好;不同浓度 PEG–6000 处理对转基因烟草幼苗生长的影响并不明显;但在低温处理条件下,转基因烟草植株幼苗全部死亡。植物在受到外界胁迫时 *VyUSPI* 基因的表达会上调,蛋白活性被激活之后,有助于提高植物的抗逆性,增强其环境的适应性,因此 *USP* 对逆境胁迫存在一定的抗性。

关键词:燕山葡萄; *VyUSPI* 基因; 转基因烟草; 逆境胁迫; 功能验证

中图分类号:S663.101 **文献标志码:**A **文章编号:**1002–1302(2022)10–0159–07

普遍胁迫蛋白 (universal stress protein, USP) 是一种普遍存在于植物中的抗逆性相关蛋白,所有蛋白质至少含有 1 个 USP 结构域和其他催化基序,在特定的组织、器官和发育阶段或在不同的胁迫条件

下差异表达^[1–2]。USP 属于自磷酸化丝氨酸和苏氨酸的磷酸蛋白,可作为三磷酸鸟苷 (GTP) 和腺嘌呤核苷三磷酸 (ATP) 的磷酸供体。

目前,在植物逆境分子生理研究中,都有克隆到 *USP* 基因的报道,在水稻、棉花、拟南芥等全基因组测序的情况下,很多物种中都发现并克隆到了 *USP* 基因^[3–8]。USP 在水稻中至少由 10 个基因编码,在拟南芥中由 17 个基因编码,并且都位于第 5 条染色体上。在亚细胞水平上,*USP* 基因被定位存

收稿日期:2021–07–24

作者简介:高换超 (1995—),男,河南长垣人,硕士研究生,主要从事果树生物技术育种研究。E-mail:huanchaogao@163.com。

通信作者:李桂荣,博士,教授,主要从事果树生物技术育种研究。E-mail:liguirong10@163.com。

[8]彭颖姝,李铁华,文仕知,等. 不同沙藏处理对青冈栎种子萌发的影响[J]. 中南林业科技大学学报,2016,36(8):44–48.

[9]李庆梅,刘艳,刘广全,等. 栎属 7 种植物种子的发芽抑制物质研究[J]. 生态学报,2013,33(7):2104–2112.

[10]周健,苏友谊,代松,等. 紫荆种子成熟过程中种皮和胚乳超微结构观察[J]. 南京林业大学学报 (自然科学版),2016,40(6):27–32.

[11]杨万霞,洪香香,方升佐. 青钱柳种子的种皮构造及其对透水性的影响[J]. 南京林业大学学报 (自然科学版),2005,29(5):25–28.

[12]Greipsson S. Effects of stratification and GA₃ on seed germination of a sand stabilising grass *Leymus arenarius* used in reclamation[J]. Seed Science and Technology,2001,29(1):1–10.

[13]周健,代松,钱存梦,等. 大花四照花种子休眠解除过程中种皮和胚乳结构变化[J]. 东北林业大学学报,2014,44(5):34–38.

[14]钱领元,施拱生. 乌柏籽“蜡被”形成过程的研究[J]. 浙江林业学院学报,1986,3(1):1–5.

[15]Evenari M. Germination inhibitors[J]. The Botanical Review, 1949,15(3):153–194.

[16]朱铭玮,邹雨婷,李永荣,等. 油用牡丹‘凤丹’种子内源抑制物研究[J]. 西南林业大学学报,2019,39(6):64–70.

[17]Rakic S, Povrenovic D, Tesevic V, et al. Oak acorn, polyphenols and antioxidant activity in functional food[J]. Journal of Food Engineering,2006,74(3):416–423.

[18]Shimada T. Nutrient compositions of acorns and horse chestnuts in relation to seed–hoarding[J]. Ecological Research,2001,16(4):803–808.

[19]李庆梅. 几种北方落叶栎种子发育的形态生理及萌发特性研究[D]. 北京:北京林业大学,2013.

[20]景美清,李志辉,杨模华,等. 赤皮青冈种子质量与萌发特性研究[J]. 中国农学通报,2012,28(34):27–30.

在于细胞质中,能够参与大量的胁迫应答反应^[4-5]。Chou 等研究发现,当细胞受到外界环境胁迫时,该基因的表达会明显上调,蛋白活性被激活,有助于提高其抗逆性,增强其适应性^[6-7]。Udawat 等研究发现,USP 在海蓬子(*Salicornia brachiata*)耐盐胁迫中起着至关重要的作用;*SbUSP* 基因主要通过清除转基因烟草细胞内的活性氧,显著提高了烟草的耐盐性^[8]。在大豆植物中,黄姗等将克隆得到的大豆 *GmUSP1* 基因对其进行不同浓度的 NaCl、脱落酸(ABA)、聚乙二醇(PEG)6000 胁迫处理,分析发现耐盐品种和感盐品种对胁迫诱导响应时间和表达量存在差异,推测该基因可能参与逆境胁迫的应答调控^[9]。Loukehaich 从番茄基因组中克隆 *SlUSP1* 基因,通过表达模式分析发现该基因在植物中具有组织特异性,在盐、高低温、干旱及 ABA 逆境条件下候选基因被诱导^[10]。赵莘对葡萄 *VpUSP* 基因的研究表明,该基因在与白粉病病菌互作过程中具有表达活性^[11]。

我国是葡萄属植物的重要起源地之一,具有丰富的野生葡萄属种质资源,对野生葡萄资源抗逆机制的研究有重要意义,但关于葡萄 *USP* 基因在抗逆性方面的研究较少。本研究以我国野生燕山葡萄(*Vitis yeshanensis* ‘Yanshan’)为材料,克隆获得 *VyUSP1* 基因,转基因获得 *USP* 烟草植株,然后对转 *VyUSP1* 基因烟草植株进行不同逆境处理,对该基因抗逆功能开展研究,有助于探讨燕山葡萄中 *VyUSP1* 基因的功能,以期为燕山葡萄资源的利用提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为中国野生燕山葡萄、本氏烟草(*Nicotiana benthamiana*)。

试验地点为河南科技学院园艺园林学院分子生物学实验室;试验时间为 2020 年 3—12 月。

1.2 试验方法

1.2.1 燕山葡萄 *VyUSP1* 基因在烟草中的功能研究

1.2.1.1 构建植物表达载体 pBI121-*VyUSP1*,将其导入根癌农杆菌 GV3101。

(1)步骤 1:*VyUSP1* 基因的克隆。

总 RNA 的提取。采用 Trizol 方法提取葡萄叶片总 RNA;取 RNA 1 μg ,用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳

检测总 RNA 的完整性,利用核酸蛋白检测仪检测其纯度及浓度。

相关基因片段的扩增。基因扩增体系体积为 50 μL :分别加入 2 μL 模板、引物和 dNTP;0.4 μL LA 酶;5 μL 10 \times LA Buffer,最后加入 ddH₂O 补齐 50 μL 。PCR 程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,变性至延伸步骤循环 30 次;72 $^{\circ}\text{C}$ 再次延伸 10 min,16 $^{\circ}\text{C}$ 保持 10 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

扩增产物与克隆载体 pMD18-T 连接后转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态中,筛选阳性克隆进行测序鉴定。连接 pMD18-T 体系总体积为 10 μL :扩增产物 7.5 μL 、pMD18-T 0.5 μL 、10 \times T₄ ligase Buffer 1 μL 、T₄ ligase 1 μL 。需 16 $^{\circ}\text{C}$ 连接 2~5 h。转化流程:大肠杆菌 DH5 α 感受态放在冰上 4~5 min 使其完全溶解之后将连接 pMD18-T 的连接液加入到感受态管中,静置 30 min,42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 2 min,取出后立即放冰上 2 min。在无菌操作台中向感受态管中加入 400 μL 液体 LB 培养基,标记封口后放于 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床上,160~200 r/min 振荡 1 h。取出后 12 000 r/min 离心 2 min,去除部分上清液,剩余菌液吸打均匀,涂在 LB 固体培养基上,标记封口后在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下倒置培养 14 h。

(2)步骤 2:构建 *VyUSP1* 基因表达载体。

用限制性内切酶 *Xba*I 和 *Sma*I 酶切重组载体 pBI121-G,分别回收目的片段和表达载体片段,用 Exnase II 37 $^{\circ}\text{C}$ 连接 30 min 后转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态中,得到的菌液进行质粒提取后转化到根癌农杆菌 GV3101 中即可。酶切连接体系总体积为 40 μL :pBI121-G 10 μL 、BSA 4 μL 、1 \times T Buffer 4 μL 、*Xba*I 1 μL 、*Sma*I 1 μL 、ddH₂O 补齐至 40 μL 。此体系 37 $^{\circ}\text{C}$ 连接 2 h。酶切连接体系总体积为 40 μL :载体片段与扩增片段、Exnase II 各 0.5 μL 、5 \times CE II Buffer 5 μL 、ddH₂O 补齐至 40 μL 。37 $^{\circ}\text{C}$ 连接 30 min。

(3)步骤 3:利用农杆菌介导叶盘法转化本氏烟草。

转化流程:从无菌试管苗上分别剪取烟草叶片,切成 0.5 cm \times 0.5 cm 的叶块,MS 培养基预培养 3 d;挑取单菌落,接种于含卡那霉素(Kan)60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、庆大霉素(Gent)30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LB 液体培养基中,28 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 振荡培养过夜;取 200 μL 新鲜菌液接种于 20 mL LB 培养基中培养至

生长对数期,4 ℃、5 000 r/min 离心 5 min;收集沉淀,并用 MS 液体培养基重悬沉淀,并置于 28 ℃ 恒温摇床,200 r/min 培育 2 h ($D_{600\text{ nm}}=0.5$);将预培养的叶片浸入准备好的农杆菌菌液中培养 5 min,取出叶片,置于无菌滤纸上,除去叶盘表面多余的农杆菌菌液;将上述叶盘转入 MS 培养基,25 ℃ 黑暗条件下共培养 2 d;将共培养后的叶片转入分化培养基 MS + 1.0 mg/L 6-苄氨基嘌呤(6-BA) + 0.3 mg/L 萘乙酸(NAA) + 25 mg/L 潮霉素(HygB) + 500 mg/L 羧苄西林(Carb),25 ℃ 培养;待芽长到 1.5 cm 左右时,切下转移到生根培养基 MS + 0.3 mg/L NAA + 25 mg/L HygB + 500 mg/L Carb 中,进行生根培养。

1.2.1.2 种子逆境胁迫处理 用 NaCl、PEG-6000、甘露醇溶液和不同温度处理转基因烟草植株与野生型烟草植株 T2 种子。NaCl 处理:0、150、300 mmol/L NaCl;干旱处理:0、150、300 mmol/L 甘露醇;高渗透处理:对照、15%、30% PEG-6000;低温处理:4、-10、-20 ℃ 处理。然后分别在 0~15 d 统计种子的发芽率。发芽率 = 发芽种子数/种子总数 × 100%。

1.2.1.3 幼苗逆境胁迫处理 用 NaCl、PEG-6000、甘露醇溶液和不同温度处理转基因烟草植株与野生型(WT)烟草植株幼苗。NaCl 处理:0、150、300 mmol/L NaCl;干旱处理:0、150、300 mmol/L 甘露醇;高渗透处理:对照、15%、30% PEG-6000;低温处理:4、-10 ℃ 处理。统计存活率,存活率 = 存活幼苗数/幼苗总数 × 100%。

1.2.2 燕山葡萄 *VyUSPI* 启动子功能验证 (1)构建燕山葡萄 *VyUSPI* 基因启动子的植物表达载体(所用载体为 pBI121)。(2)利用叶盘法转化烟草。(3)转基因烟草植株幼苗的组织器官表达分析及对不同胁迫的响应;对根、茎、叶进行 β 葡萄糖苷酸酶(GUS)染色:幼苗分别用 150 mmol/L NaCl、15%

PEG-6000、150 mmol/L 甘露醇进行 GUS 染色。(4)用 GUS 染色法验证转 *VyUSPI* 基因烟草植株成苗对渗透胁迫的响应。

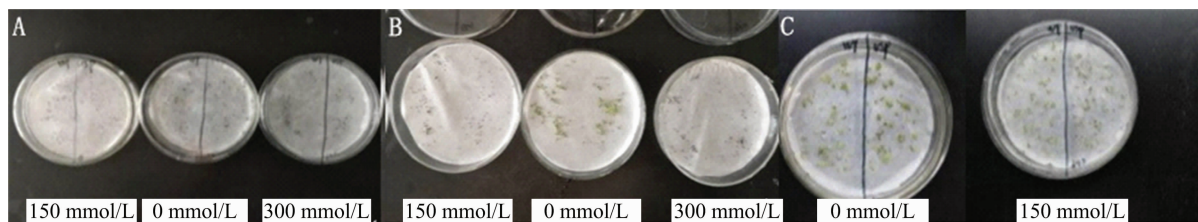
2 结果与分析

2.1 USP 启动子 GUS 染色

不同浓度 NaCl 处理的转基因烟草 2、4、8、12、24 h 5 个时间段中 2、8、24 h 均被染色,而 WT 幼苗均无染色表现;转基因烟草植株在甘露醇和 PEG-6000 不同浓度处理中的 2、8 h 条件下,观察发现转基因植株叶片均被染色;在 4 ℃ 处理中转基因烟草植株叶片在 2、4、8、12、24 h 5 个时间段的染色情况与 WT 烟草幼苗的染色情况均无明显变化。根据以上情况综合分析表明,在 NaCl 处理中转基因植株叶片的染色情况表现比较明显,而其他处理中转基因植株叶片染色情况相对微弱。

2.2 转基因烟草种子在不同逆境处理下的发芽率

2.2.1 不同浓度 NaCl 处理对转基因烟草种子发芽率的影响 由图 1、表 1 可以看出,种子播种在添加不同浓度 NaCl 的 MS 培养基上,培养 0~15 d 后,未添加 NaCl 处理的转基因烟草种子和 WT 种子发芽率均为 100.0%。150 mmol/L NaCl 处理 3 d 后的转基因烟草种子发芽率达到 100%,处理 7 d 后的转基因烟草种子发芽率达到 41%,处理 15 d 后的转基因烟草种子发芽率为 33.3%。而 300 mmol/L NaCl 处理后的转基因烟草种子发芽率从 3 d 到 15 d 变化幅度较大,从 20.0% 降到了 0。综上所述,转 *VyUSPI* 基因烟草种子在 150 mmol/L NaCl 处理下,时间越长发芽率越低;随着处理的 NaCl 浓度升高,转 *VyUSPI* 基因烟草种子发芽率也降低,说明盐胁迫浓度过高或者时间过长均对转 *VyUSPI* 基因烟草种子发芽不利。



A、B、C 分别代表播后 3、7、15 d,图 2、图 3 同

图1 不同浓度 NaCl 处理的烟草种子

2.2.2 不同浓度甘露醇处理对转基因烟草种子发芽率的影响 由图 2、表 2 可以看出,种子播种在添加不同浓度甘露醇的 MS 培养基上,培养 0~15 d

后,未添加甘露醇处理的转基因烟草种子和 WT 种子发芽率均为 100.0%。150 mmol/L 甘露醇处理 3 d 后的转基因烟草种子发芽率达到 100.0%,处理 7 d

表 1 不同浓度 NaCl 处理对转基因烟草种子发芽率的影响

试验材料	处理时间	0 mmol/L NaCl			150 mmol/L NaCl			300 mmol/L NaCl		
		种子总数 (粒)	发芽种子数 (粒)	发芽率 (%)	种子总数 (粒)	发芽种子数 (粒)	发芽率 (%)	种子总数 (粒)	发芽种子数 (粒)	发芽率 (%)
转基因烟草	播后 3 d	90	90	100.0	90	90	100.0	90	18	20.0
WT	播后 3 d	90	90	100.0	90	26	28.9	90	11	12.2
转基因烟草	播后 7 d	90	90	100.0	90	37	41.1	90	9	10.0
WT	播后 7 d	90	90	100.0	90	13	14.4	90	4	4.4
转基因烟草	播后 15 d	90	90	100.0	90	30	33.3	90	0	0.0
WT	播后 15 d	90	90	100.0	90	8	8.9	90	0	0.0

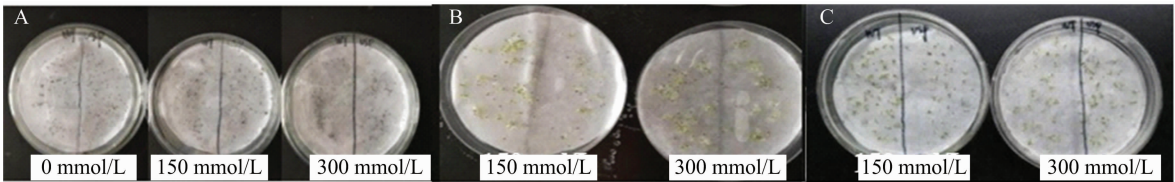


图2 不同浓度甘露醇处理种子

表 2 不同浓度甘露醇处理对转基因烟草种子发芽率的影响

试验材料	处理时间	0 mmol/L 甘露醇			150 mmol/L 甘露醇			300 mmol/L 甘露醇		
		种子总数 (粒)	发芽种子数 (粒)	发芽率 (%)	种子总数 (粒)	发芽种子数 (粒)	发芽率 (%)	种子总数 (粒)	发芽种子数 (粒)	发芽率 (%)
转基因烟草	播后 3 d	90	90	100.0	90	90	100.0	90	30	33.3
WT	播后 3 d	90	90	100.0	90	10	11.1	90	0	0.0
转基因烟草	播后 7 d	90	90	100.0	90	86	95.6	90	15	16.7
WT	播后 7 d	90	90	100.0	90	5	5.6	90	0	0.0
转基因烟草	播后 15 d	90	90	100.0	90	56	62.2	90	0	0.0
WT	播后 15 d	90	90	100.0	90	0	0.0	90	0	0.0

后达到 95.6%，处理 15 d 后为 62.2%。而 150 mmol/L 甘露醇处理 WT 种子 0~15 d 后发芽率较低。300 mmol/L 甘露醇处理转基因烟草种子 0~15 d 后发芽率均低于 150 mmol/L 处理,说明较高甘露醇含量处理会抑制转基因烟草种子的萌发。

2.2.3 不同浓度 PEG-6000 处理对转基因烟草种子发芽率的影响 由表 3 可以看出,种子播种在添加不同浓度 PEG-6000 的 MS 培养基上,培养 0~15 d 后,未添加 PEG-6000 处理的转基因烟草种子和 WT 种子发芽率均为 100%。15% PEG-6000 处理 3 d 后的转基因烟草种子发芽率达到 100%,处理 7 d 后达到 26.7%,处理 15 d 后为 20.0%。而 15% PEG-6000 处理 WT 种子 0~15 d 后发芽率较低 30% PEG-6000 处理转基因烟草种子发芽率均为 0,说明较高 PEG-6000 含量处理会抑制转基因烟草种子的萌发。

2.2.4 低温处理对转基因烟草种子发芽率的影响

由图 3、表 4 可以看出,种子播种在 MS 培养基上,低温培养 0~15 d 后,未低温处理的转基因烟草种子和 WT 种子发芽率均为 100%。-10℃处理 3 d 后的转基因烟草种子发芽率为 33.3%,处理 7 d 后下降为 26.7%,处理 15 d 为 0%。而 -10℃处理 WT 种子 0~15 d 后发芽率均高于转基因烟草种子发芽率。-20℃条件下培养转基因烟草和 WT 种子发芽率均为 0,说明温度低会抑制转基因烟草种子的萌发。

2.3 不同逆境处理对转基因烟草幼苗生长的影响
2.3.1 不同浓度 NaCl 处理对转基因烟草幼苗生长的影响 由图 4 可以看出,在 150 mmol/L NaCl 处理下 WT 植株幼苗和转基因植株幼苗的生长状况均出现了走向衰弱的趋势,但是转基因植株幼苗的生长势较旺盛,其综合情况要比 WT 植株幼苗的好;在 300 mmol/L NaCl 处理下 WT 植株幼苗株型矮小,生长势弱且叶片狭小而转基因烟草幼苗在这 3 个方面

表 3 不同浓度 PEG - 6000 处理对转基因烟草种子发芽率的影响

试验材料	处理时间	对照			15% PEG - 6000			30% PEG - 6000		
		种子总数 (粒)	发芽种子数 (粒)	发芽率 (%)	种子总数 (粒)	发芽种子数 (粒)	发芽率 (%)	种子总数 (粒)	发芽种子数 (粒)	发芽率 (%)
转基因烟草	播后 3 d	90	90	100.0	90	90	100.0	90	0	0.0
WT	播后 3 d	90	90	100.0	90	0	0.0	90	0	0.0
转基因烟草	播后 7 d	90	90	100.0	90	24	26.7	90	0	0.0
WT	播后 7 d	90	90	100.0	90	6	6.7	90	0	0.0
转基因烟草	播后 15 d	90	90	100.0	90	18	20.0	90	0	0.0
WT	播后 15 d	90	90	100.0	90	0	0.0	90	0	0.0

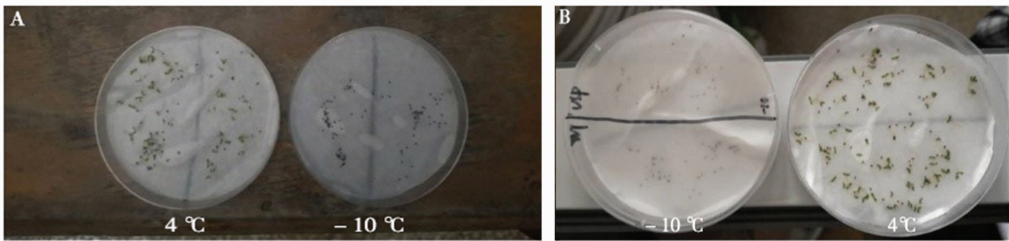
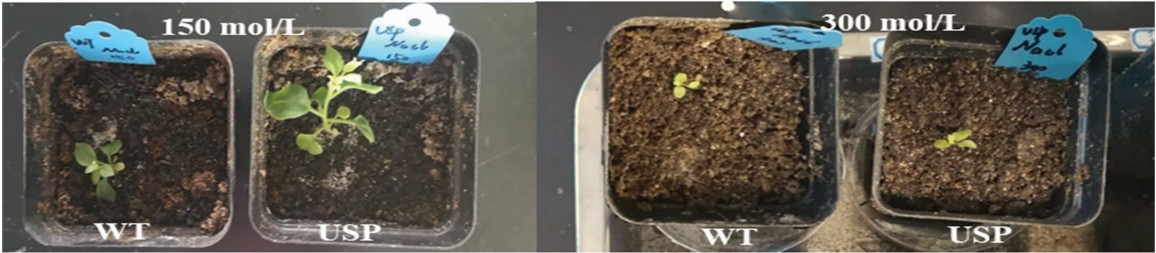


图3 不同温度处理种子

表 4 低温处理对转基因烟草种子发芽率的影响

试验材料	处理时间	4 °C			-10 °C			-20 °C		
		种子总数 (粒)	发芽种子数 (粒)	发芽率 (%)	种子总数 (粒)	发芽种子数 (粒)	发芽率 (%)	种子总数 (粒)	发芽种子数 (粒)	发芽率 (%)
转基因烟草	播后 3 d	90	90	100.0	90	30	33.3	90	0	0.0
WT	播后 3 d	90	90	100.0	90	60	66.7	90	0	0.0
转基因烟草	播后 7 d	90	90	100.0	90	11	26.7	90	0	0.0
WT	播后 7 d	90	90	100.0	90	39	43.3	90	0	0.0
转基因烟草	播后 15 d	90	90	100.0	90	0	0.0	90	0	0.0
WT	播后 15 d	90	90	100.0	90	20	22.2	90	0	0.0



WT 指野生型烟草幼苗；USP 指转在因烟草幼苗。下图同

图4 不同浓度 NaCl 处理下烟草幼苗生长状况

的状况均优于 WT 幼苗的状况,但两者均有继续生长的趋势。

2.3.2 不同浓度甘露醇处理对转基因烟草幼苗生长的影响 由图 5 可以看出,在 150、300 mmol/L 甘露醇 2 个处理中,转基因烟草植株幼苗的生长状况比 WT 植株幼苗的表现要好。

2.3.3 不同浓度 PEG - 6000 处理对转基因烟草幼

苗生长的影响 由图 6 可以看出,30% PEG - 6000 处理转基因烟草植株幼苗和 WT 植株幼苗均无生长迹象,并且在 15% 浓度处理下两者差异不明显。

2.3.4 不同低温处理对转基因烟草幼苗生长的影响 由图 7 可以看出,在 4 °C 处理下,转基因烟草幼苗的生长势优于 WT 幼苗,在 -10 °C 低温下,转基因烟草幼苗和 WT 幼苗全部死亡。

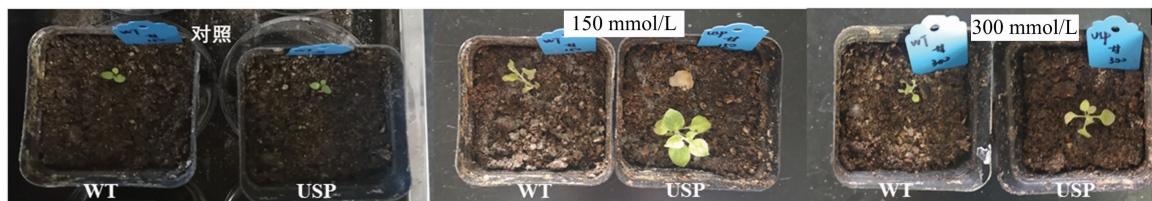


图5 不同浓度甘露醇处理下烟草幼苗生长状况



图6 不同浓度 PEG-6000 处理下烟草幼苗生长状况

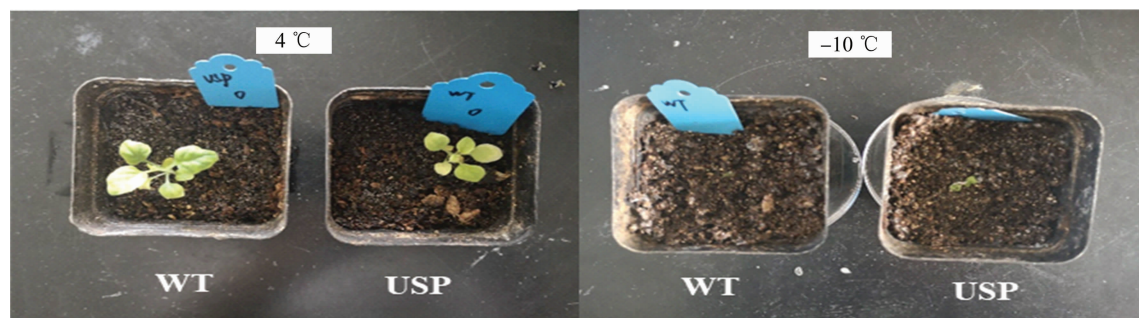


图7 低温处理下烟草幼苗生长状况

3 讨论与结论

应激蛋白是一种普遍存在于植物中的抗性相关蛋白,一般存在于细胞质中,在植物受到外界胁迫时表达上调,增强植物的抗逆性。葡萄容易受到盐碱、干旱等逆境危害,危害严重的会给葡萄生产造成巨大的经济损失。发掘葡萄种质的抗逆性基因,提高葡萄新品种的抗逆性是解决此问题的有效途径之一。本试验主要研究了我国野生葡萄燕山葡萄 *V_yUSP1* 基因在转基因烟草不同逆境下的表达情况,结果发现 *V_yUSP1* 基因比较抗盐和耐旱。陈莹等研究发现,高羊茅(*Festuca arundinacea* Schreb)逆境胁迫蛋白基因 *FaUSP* 的超量表达可以增强葡萄的抗旱能力,推测该基因与抗旱性相关^[12]。刘峻玲等研究青杆(*Picea wilsonii*) *PwUSP1* 基因时,发现在干旱和盐胁迫条件下,*PwUSP1* 通过增强植物的活性氧(ROS)清除能力及抑制膜脂氧化损伤来提

高植物对非生物胁迫的耐受性^[13]。本试验研究结果均与这些研究结果一致,植物在受到外界逆境刺激后,通过系列信号分子调节相关抗逆基因和蛋白的表达,进而改变自身表观形态和生理生化水平来适应逆境^[14-15]。在感觉到外部逆境刺激后,植物将外源信号导入细胞内下游信号通路,包括激活蛋白激酶或磷酸酶,刺激下游靶蛋白,以及植物激素的生物合成,以控制植物的生长发育^[16-17]。特别是这些复杂信号交叉网络精确地调节了胁迫反应基因的表达,并保护植物免受外部胁迫^[15,18-20]。

本试验以我国野生燕山葡萄为材料,克隆获得 *V_yUSP1* 基因,利用重组法构建其载体,并用农杆菌介质为导体转化转基因烟草植株,获得 *USP* 转基因烟草植株。然后对转基因烟草植株进行不同逆境处理,探究该基因的抗逆性。研究结果表明,在不同的逆境条件下,*USP* 转基因烟草均具有一定的抗旱能力,但是不具备抗寒能力。较高浓度 NaCl、

甘露醇、PEG-6000 以及低温处理会抑制转基因烟草种子的萌发。而在不同浓度 NaCl、甘露醇处理下,转基因烟草植株幼苗均比 WT 植株幼苗的表现要好;不同浓度 PEG-6000 处理对转基因烟草幼苗生长的影响并不明显;但在低温处理的条件下,转基因烟草植株幼苗全部死亡。综上所述,USP 转基因植株对逆境有一定的抗性,植物在受到外界胁迫时 *VyUSP1* 基因的表达上调,蛋白活性被激活,有助于提高植物的抗逆性,增强其环境适应性。

参考文献:

- [1] Li W T, Wei Y M, Wang J R, et al. Identification, localization, and characterization of putative USP genes in barley[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2010, 121(5): 907-917.
- [2] Wang X F, Su J, Yang N, et al. Functional characterization of selected universal stress protein from *Salvia miltiorrhiza* (*SmUSP*) in *Escherichia coli*[J]. Genes, 2017, 8(9): 224.
- [3] Gustavsson N, Diez A, Nystrom T. The universal stress protein paralogues of *Escherichia coli* are co-ordinately regulated and co-operate in the defence against DNA damage [J]. Molecular Microbiology, 2002, 43(1): 107-117.
- [4] Conrath U. Molecular aspects of defence priming [J]. Trends in Plant Science, 2011, 16(10): 524-531.
- [5] Petrov V, Hille J, Mueller-Roeber B, et al. ROS-mediated abiotic stress-induced programmed cell death in plants [J]. Frontiers in Plant Science, 2015, 6: 69.
- [6] Chou M X, Wei X Y, Chen D S, et al. A novel nodule-enhanced gene encoding a putative universal stress protein from *Astragalus sinicus* [J]. Journal of Plant Physiology, 2007, 164(6): 764-772.
- [7] Freestone P, Nyström T, Trinei M, et al. The universal stress protein, UspA, of *Escherichia coli* is phosphorylated in response to stasis [J]. Journal of Molecular Biology, 1997, 274(3): 318-324.
- [8] Udawat P, Jha R K, Sinha D, et al. Overexpression of a cytosolic abiotic stress responsive universal stress protein (*SbUSP*) mitigates salt and osmotic stress in transgenic tobacco plants [J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7: 518.
- [9] 黄 珊, 王伟旗, 侯文胜. 大豆 *Usp1* 基因的克隆和表达分析 [J]. 大豆科学, 2012, 31(4): 546-551.
- [10] Loukehaich R. 广谱胁迫蛋白编码基因 (*SIUSP1*) 介导番茄抗旱性的研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2011.
- [11] 赵 莘. 中国野生华东葡萄抗白粉病基因 (*VpUSP*) 克隆及表达分析 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2010.
- [12] 陈 莹, 陈 锡, 王 茜, 等. 高羊茅逆境胁迫蛋白基因 *FaUSP* 的克隆、表达及生物学功能分析 [J]. 生物技术通报, 2021, 37(2): 32-39.
- [13] 刘峻玲, 梁珂豪, 苗雅慧, 等. 青杆 *PwUSP1* 基因特征及对干旱和盐胁迫的响应 [J]. 北京林业大学学报, 2020, 42(10): 62-70.
- [14] Gilroy S, Bialasek M, Suzuki N, et al. ROS, calcium, and electric signals: key mediators of rapid systemic signaling in plants [J]. Plant Physiology, 2016, 171(3): 1606-1615.
- [15] Choudhury F K, Rivero R M, Blumwald E, et al. Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination [J]. The Plant Journal, 2017, 90(5): 856-867.
- [16] Sheikh A H, Eschen-Lippold L, Pecher P, et al. Regulation of WRKY46 transcription factor function by mitogen-activated protein kinases in *Arabidopsis thaliana* [J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7: 61.
- [17] Akimoto-Tomiya C, Tanabe S, Kajiwar H, et al. Loss of chloroplast-localized protein phosphatase 2Cs in *Arabidopsis thaliana* leads to enhancement of plant immunity and resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* infection [J]. Molecular Plant Pathology, 2018, 19(5): 1184-1195.
- [18] Sewelam N, Kazan K, Schenk P M. Global plant stress signaling: reactive oxygen species at the cross-road [J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7: 187.
- [19] Nejat N, Mantri N. Plant immune system: crosstalk between responses to biotic and abiotic stresses the missing link in understanding plant defence [J]. Current Issues in Molecular Biology, 2017, 23: 1-16.
- [20] 沈彦辉, 陈宏坤, 高璐阳, 等. 灰葡萄孢 *Bctre1* 的基因组定位、蛋白质结构预测及表达分析 [J]. 山东农业科学, 2020, 52(3): 13-18.