

研究报告

Research Report

拟南芥肌醇半乳糖苷酶 *AtGolS2* 基因在非生物胁迫应答中的功能分析

沈阳 贾博为 王金玉 才晓溪 胡冰霜 王研 陈悦 孙明哲* 孙晓丽*

黑龙江八一农垦大学农学院, 作物逆境分子生物学实验室, 大庆, 163000

* 共同通信作者, csmb12016@126.com; hlj_mzsun@163.com

摘要 土壤盐碱化是导致作物减产的主要因素之一, 鉴定关键耐盐碱基因对于利用分子育种手段培育耐盐碱作物新品种具有重要意义。本研究通过 NaHCO_3 处理筛选, 获得了苏打盐碱敏感的拟南芥突变体 *atgols2*。生物信息学分析发现 *AtGolS2* 编码肌醇半乳糖苷酶, 是糖基转移酶家族 A 超家族中一员。SMART 分析 *AtGolS2* 蛋白互作网络, 发现其互作蛋白与脂类代谢、半乳糖生物合成、棉子糖生物合成相关, 且参与非生物胁迫应答。转录表达数据分析发现 *AtGolS2* 表达显著响应盐、高渗、干旱和 ABA 胁迫。利用三引物法 PCR 鉴定 *atgols2* 为 T-DNA 插入纯合突变体, 并进一步分析了 *atgols2* 在高盐、高渗和 ABA 处理下的表型, 结果表明 *AtGolS2* 基因缺失降低了对高盐、高渗和 ABA 胁迫的耐性。本研究初步明确了 *AtGolS2* 基因正调控苏打盐碱、高盐、高渗和 ABA 应答过程, 为进一步阐明 *GolS* 家族基因耐逆功能和作用机制提供一定基础。

关键词 拟南芥, 肌醇半乳糖苷酶, *AtGolS2*, 非生物胁迫, 功能分析

Functional Analysis of *Arabidopsis thaliana* Galactinol Synthase *AtGolS2* in Response to Abiotic Stress

Shen Yang Jia Bowei Wang Jinyu Cai Xiaoxi Hu Bingshuang Wang Yan Chen Yue Sun Mingzhe* Sun Xiaoli*

Crop Stress Molecular Biology Laboratory, College of Agriculture, Heilongjiang Bayi Agriculture University, Daqing, 163000

* Co-corresponding authors, csmb12016@126.com; hlj_mzsun@163.com

DOI: 10.5376/mpb.cn.2020.18.0005

Abstract Soil salt-alkalization is one of the adverse factors limiting crop yields. Identification of key salt-alkaline tolerant genes is of great significance for molecular breeding of stress-resistant crops. In this study, a T-DNA insertion *Arabidopsis* mutant *atgols2* showing higher sensitivity to bicarbonate salt-alkaline stress was screened out against NaHCO_3 treatment. Further bioinformatic analysis revealed that the *AtGolS2* gene encoded a galactinol synthase, which is a member of the glycosyltransferase family A superfamily. We predicted the protein interaction network of *AtGolS2* via SMART online analysis, and found that these *AtGolS2* interacting proteins were related to lipid metabolism, galactose biosynthesis and raffinose biosynthesis, and participated in abiotic stress responses. By using the online expression data, we showed that *AtGolS2* expression responded to salt, osmotic, drought and ABA stresses. PCR amplification by using the three primers method verified the homozygous T-DNA insertion in *atgols2*. Phenotypic assays further uncovered that *atgols2* mutant was more sensitive to high salt, osmotic and ABA stresses than the wild type *Arabidopsis*. Taken together, results in this study revealed the positive function of *AtGolS2* in

本文首次发表在《分子植物育种》上, 现依据版权所有人授权的许可协议, 采用 Creative Commons Attribution License, 协议对其进行授权, 再次发表与传播

收稿日期: 2020 年 7 月 1 日; 接受日期: 2020 年 7 月 7 日; 发表日期: 2020 年 7 月 7 日

引用格式: 沈阳, 贾博为, 王金玉, 才晓溪, 胡冰霜, 王研, 陈悦, 孙明哲, 孙晓丽, 2020, 拟南芥肌醇半乳糖苷酶 *AtGolS2* 基因在非生物胁迫应答中的功能分析, 分子植物育种(网络版), 18(24): 1-10 (doi: 10.5376/mpb.cn.2020.18.0024) (Shen Y., Jia B.W., Wang J.Y., Cai X.X., Hu B.S., Wang Y., Chen Y., Sun M.Z., and Sun X.L., 20XX, Functional analysis of *Arabidopsis thaliana* galactinol synthase *AtGolS2* in response to abiotic stress, Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding (online)), 18(24): 1-10 (doi: 10.5376/mpb.cn.2020.18.0024))

bicarbonate salt-alkaline, high salt, osmotic and ABA stresses, which will facilitate further research regarding the function and molecular mechanism of the GolS family genes in stress responses.

Keywords *Arabidopsis thaliana*, Galactinol synthase, *AtGolS2*, Abiotic stress, Functional analysis

植物在生长发育过程中不可避免地受到干旱、低温和土壤盐碱化等非生物胁迫的影响。盐碱胁迫是影响作物生长发育并最终导致减产的主要因素之一(Ismail and Horie, 2017)。干旱、低温和盐碱胁迫的共同特点是造成细胞缺水,引起细胞水平衡失调、蛋白质大分子变性,破坏细胞膜结构等,影响植物的生长和发育(吴杨等, 2017)。当植物面对低温、干旱和高盐胁迫时,细胞内可溶性糖如葡萄糖、蔗糖、棉子糖系列寡糖(raffinose family oligosaccharides, RFOs)的含量增加,维持渗透平衡,增强植物对胁迫的耐受性(Salvi et al., 2018)。因此,鉴定关键的糖类代谢基因对于培育优良抗逆作物有重要意义。

肌醇半乳糖苷合酶(galactinol synthase, GolS)是从豌豆种子中发现,能够催化 UDP-半乳糖和肌醇形成肌醇半乳糖苷,为 RFOs 提供活化的半乳糖基,调节植物体内 RFOs 的积累(Bachmann and Keller, 1995)。GolS 只存在于开花植物中,拟南芥中有(*Arabidopsis thaliana*) 7 个(Selvaraj et al., 2017),水稻(*Oryza sativa* L.)中有 2 个(Shimosaka and Ozawa, 2015),玉米(*Zea mays* L.)中有 10 个(Zhou et al., 2012)。近年来研究发现在拟南芥中超表达玉米肌醇半乳糖苷合成酶(ZmGolS2)显著提高了植株叶片中的肌醇半乳糖苷和棉子糖含量,并且增强了植株的氧化胁迫耐受性(Gu et al., 2019)。转 *AmGolS* 基因的红叶石楠(*Photinia serratifolia*)植株抗寒能力明显提高(Downie et al., 2003)。在番茄(*Solanum lycopersicum*)和匍匐筋骨草(*Ajuga reptans*)中, GolS 的表达受低温诱导(Downie et al., 2003; Dos Santos et al., 2011)。同时 GolS 在植物重金属胁迫应答过程中也发挥了作用, TaGolS3 表达受 ZnCl₂ 和 CuCl₂ 诱导,在拟南芥中超表达 TaGolS3 显著提高了转基因植株 ROS 清除能力、抗氧化酶活性和脯氨酸含量,而丙二醛(MDA)含量显著降低(Wang et al., 2016)。综上所述, GolS 参与植物的氧化、低温和重金属胁迫等逆境响应,但在盐碱胁迫方面的报道较少。

本研究从一批拟南芥 T-DNA 插入突变体中筛选获得一个苏打盐碱胁迫十分敏感的突变体 *atgols2*, 进一步分析发现 *AtGolS2* 基因表达也响应高盐、高渗和 ABA 胁迫,且 *atgols2* 突变体对高盐、高渗和 ABA 胁迫更为敏感。本研究揭示了 *AtGolS2* 基因缺失对非生物胁迫耐性的影响,为后续解析 *GolS* 基因在逆境应答

中的功能和作用机制奠定了基础。

1 结果与分析

1.1 苏打盐碱敏感的 *atgols2* 拟南芥突变体筛选

为鉴定耐苏打盐碱基因,本课题组前期从拟南芥生物资源保藏中心(Arabidopsis Biological Resource Center, ABRC) 购买了一批拟南芥 T-DNA 插入突变体,从中筛选苏打盐碱敏感株系。图 1 所示为部分苏打盐碱敏感突变体(#6, #7, #9, #11, #15)在 0 mmol/L 或 10 mmol/L NaHCO₃ 1/2 MS 培养基上的生长状态。正常条件下各株系正常生长,生长状态一致;而播种于含有 10 mmol/L NaHCO₃ 培养基中的各株系种子萌发均受到抑制,尤其是 #11 突变体萌发的种子数最少(图 1A)。萌发率统计结果也表明,10 mmol/L NaHCO₃ 处理下野生型(wild type, WT)、#6、#7、#9、#11、#15 突变体种子萌发均变慢,7 d 萌发率分别为 52.9%、40.2%、42.7%、42.1%、35.8%、39.8%(图 1B)。

本研究选取萌发率最低的 #11 突变体(SALK_101144)作为研究对象。根据拟南芥数据库 TAIR 获得 #11 突变体的 T-DNA 插入侧翼序列,发现 T-DNA 插入在 *AT1G56600* 基因。根据 NCBI 及 TAIR 注释, *AT1G56600* 是一个编码肌醇半乳糖苷合酶的基因,命名为 *AtGolS2* (Nishizawa et al., 2008)。

1.2 *AtGolS2* 蛋白保守结构域分析

利用 SMART 分析 *AtGolS2* 蛋白保守结构域,发现该蛋白具有一个糖基转移酶家族 8 结构域(Glyco_transf_8 domain),属于糖基糖基转移酶家族 A 超家族中的一员(图 2A)。在拟南芥中,该家族共有 7 个基因 *AtGolS1*~*7* (Nishizawa et al., 2008)。蛋白序列比对发现,拟南芥肌醇半乳糖苷合酶家族蛋白序列高度保守,均具有 1 个保守的 Glyco_transf_8 结构域(图 2B)。该结构域具有将糖基从活化的核苷酸-糖供体转移到受体分子上合成低聚糖、多糖和糖缀合物的作用,可以增加植物体内多糖含量。已有文献表明 *AtGolS1* 通过增加棉子糖含量,提高氧化胁迫耐受性(Song et al., 2016);在白杨(*Populus*)中超量表达 *AtGolS3* 提高了杨树体内半乳糖醇和棉子糖的积累,增强了对活性氧的耐性(La Mantia et al., 2018)。由此推测具有相同结构域的 *AtGolS2* 可能通过参与脂多糖生物合成

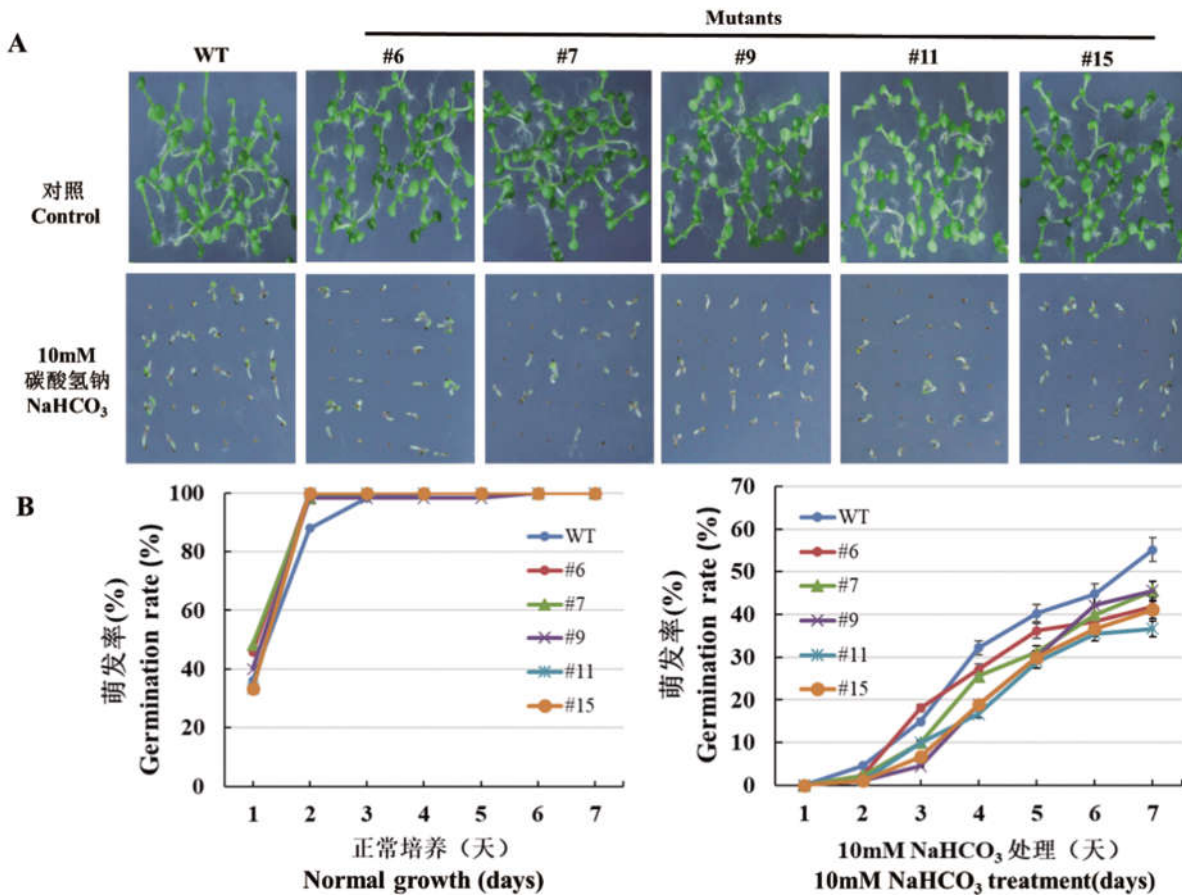


图1 苏打盐碱胁迫下拟南芥突变体表型及萌发率分析

注: A: 苏打盐碱胁迫下拟南芥突变体表型分析; B: 苏打盐碱胁迫下拟南芥突变体萌发率统计

Figure 1 Phenotype and germination rates analysis of Arabidopsis mutants under bicarbonate saline-alkali stress

Note: A: Phenotype of Arabidopsis mutants under bicarbonate saline-alkali stress; B: Germination rates of Arabidopsis mutants under bicarbonate saline-alkali stress

或糖原合成,提高半乳糖醇和棉子糖含量,进而参与非生物胁迫应答。

1.3 *AtGols2* 蛋白互作网络分析

利用 SMART-Interactions 分析 *AtGols2* 可能参与的信号传导通路,模型预测结果表明 *RD20*、*USP*、*AT5G18200*、*UGE2*、*UGE5*、*DIN10*、*SIP2*、*STS*、*RFS1*、*RFS5* 可能与 *AtGols2* 存在蛋白互作(图3)。通过 NCBI 蛋白数据库对互作蛋白进行功能注释分析(表1),根据10个互作蛋白的性质可将它们分成以下三类:脂类代谢相关蛋白、半乳糖生物合成相关蛋白、棉子糖生物合成相关蛋白。

脂类代谢相关蛋白:*RD20* 基因是 Calciosin (油体钙)家族的一个成员,该家族蛋白促使种子在发芽过程中贮藏脂质,参与植物体内的脂类代谢,*RD20* 参与响应盐、干旱和渗透胁迫(Aubert et al., 2011, Aubert et al., 2010; Sham et al., 2015; Park et al., 2018)。

半乳糖生物合成相关蛋白:*UGE2*、*UGE5*、*USP*、*AT5G18200* 分别编码 UDP-半乳糖差向异构酶、UDP-半乳糖焦磷酸化酶和 UTP 半乳糖-1-磷酸尿酸转移酶,在半乳糖的生物合成及分解过程中起到重要的作用。其中 *UGE2* 表达受低温、渗透胁迫诱导,*UGE5* 表达受低温、渗透和盐胁迫诱导 (Aznar et al., 2018), *USP* 表达受低温胁迫抑制 (Decker and Kleczkowski, 2017), *AT5G18200* 受盐胁迫诱导(Kotake et al., 2007)。

棉子糖生物合成相关蛋白:*DIN10*、*SIP2*、*STS*、*RFS1*、*RFS5* 分别编码棉子糖基水解酶和棉子糖特异性 α -半乳糖苷酶棉子糖合酶,在棉子糖的生物合成及分解过程中起到重要的作用,同时也参与响应非生物胁迫。*DIN10* 表达受低温,活性氧胁迫诱导 (Maruyama et al., 2009; Lee et al., 2017); *SIP2* 表达受渗透胁迫诱导 (Fujita et al., 2005); *STS* 表达受盐胁迫抑制;*RFS5* 受低温、渗透、盐和干旱胁迫诱导(Nishizawa et al., 2008)。

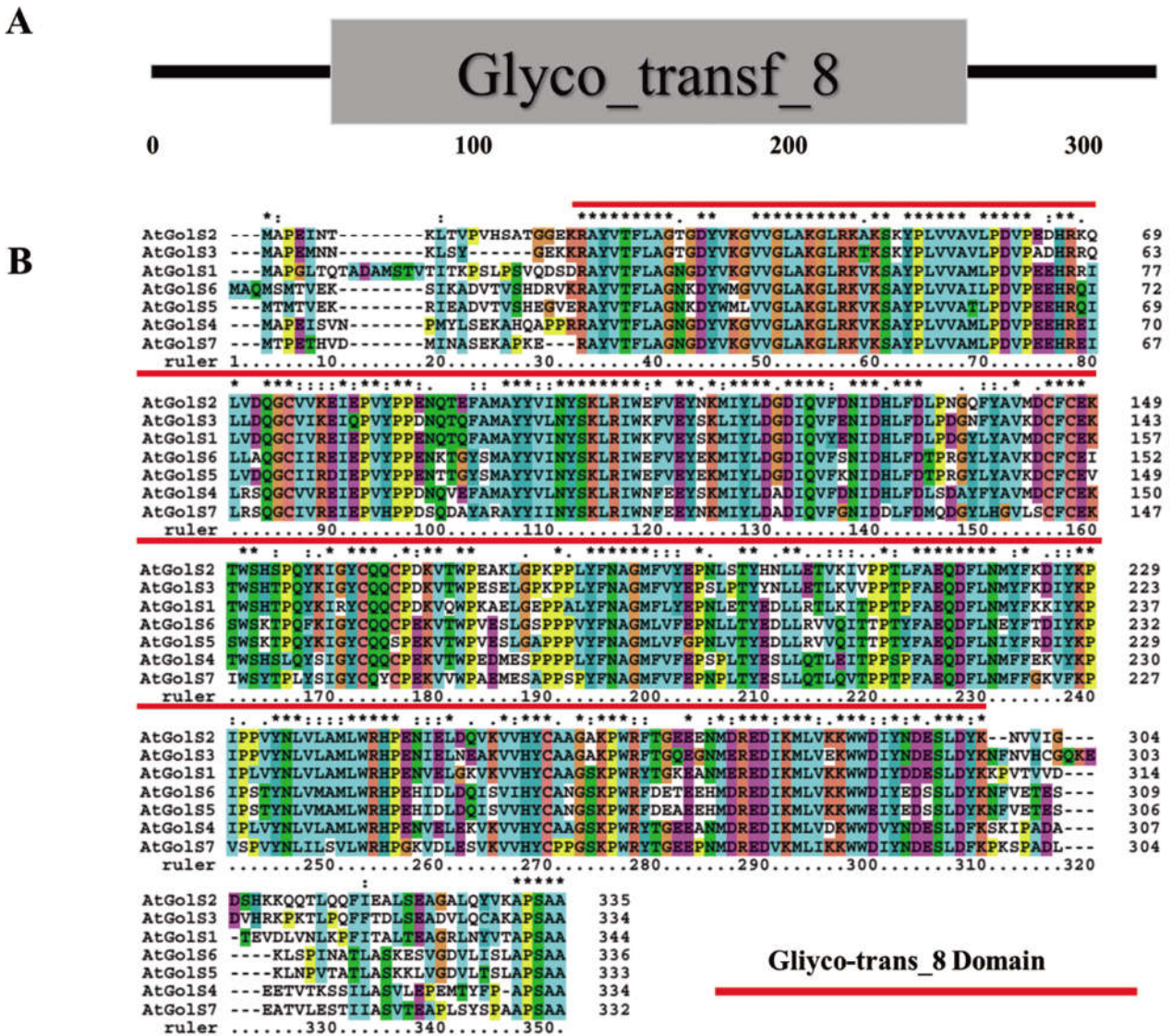


图 2 AtGolS2 蛋白保守结构域分析

注: A: AtGolS2 蛋白保守结构域预测; B: 拟南芥 AtGolS2 同源蛋白多重序列比对, 红色横线标识 Glyco_transf_8 domain 保守结构域位置

Figure 2 Analysis of conserved domains in AtGolS2 protein

Note: A: SMART prediction of the conserved domain in AtGolS2; B: Multiple alignment of AtGolS2 and homologous GolS proteins in Arabidopsis, the red line marked the position of Glyco_transf_8 domain

通过对 AtGolS2 互作蛋白功能注释分析, 发现互作蛋白与植物体内半乳糖和棉子糖生物合成相关, 且大多响应非生物胁迫。推测 AtGolS2 可能与上述蛋白相互作用, 影响体内糖类含量进而响应非生物胁迫。

1.4 AtGolS2 基因非生物胁迫表达模式分析

基于 Arabidopsis eFP Browser 在线数据分析 AtGolS2 基因在非生物胁迫(冷, 渗透, 盐, 干旱)和激素处理(ABA, GA, ETH)下的表达模式。结果如图 4 所示, 无论是地上(Shoot)还是地下(Root)部分, AtGolS2 基因在低温、GA 和 ETH 胁迫下, 基因表达基本无变化。然

而当遭受渗透、盐、干旱及 ABA 胁迫后 AtGolS2 基因表达量显著上升。尤其是在盐和渗透胁迫处理 3 h 后, AtGolS2 基因表达量上升倍数高达 400 和 500 倍, 暗示 AtGolS2 基因可能通过 ABA 依赖途径参与盐、渗透和干旱胁迫应答。

1.5 atgols2 T-DNA 插入突变体鉴定

根据 atgols2 突变体 T-DNA 插入侧翼序列, 绘制 T-DNA 插入结构图。如图 5A 所示, T-DNA 插入在 AtGolS2 基因启动子区中。根据插入位点设计基因特异引物(P1, P2), 采用三引物法 PCR 鉴定 atgols2 是否

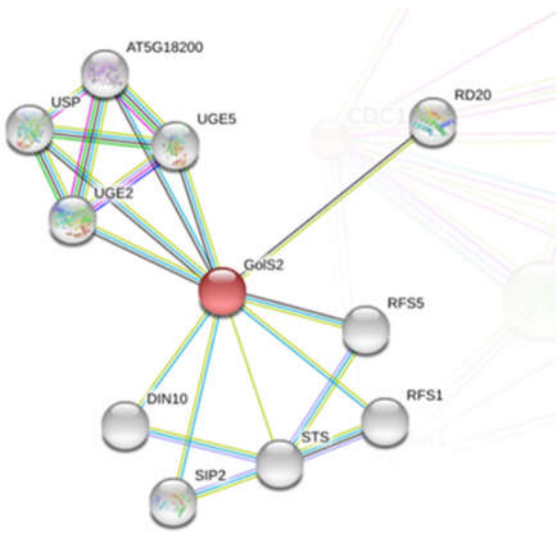
图3 *AtGolS2* 蛋白互作网络示意图

Figure 3 Schematic diagram of *AtGolS2* protein interaction network

为 T-DNA 插入纯合突变体。当以 LB (T-DNA 序列特异引物)+P2 (基因特异反向引物) 进行 PCR 扩增时, WT 中未扩增出条带, 而突变体植株可见 500 bp 的目的条带, 说明突变体中有 T-DNA 插入(图 5B)。以 P1+P2 引物组合进行 PCR 扩增, WT 中扩增出 626 bp 大小的目的条带, 而突变体植株没有条带, 说明突变体是纯合的(图 5C)。上述结果表明鉴定的 6 株突变体植株均为拟南芥 *AtGolS2* 基因的 T-DNA 纯合插入突变体。

1.6 *atgols2* 突变体盐、渗透胁迫和 ABA 处理下表型分析

为验证 *AtGolS2* 基因在盐、渗透胁迫和 ABA 处理下的功能, 对比 WT 与突变体 *atgols2* 种子在含 125 mmol/L NaCl、250 mmol/L Mannitol、0.6 μ m ABA 以及正常 1/2 MS 培养基上的生长状况。正常条件下, WT 和 *atgols2* 生长状态一致且萌发速率一致; 在含有 125 mmol/L NaCl、250 mmol/L Mannitol 和 0.6 μ mol/L ABA 培养基中 WT 和 *atgols2* 均生长迟缓, 萌发速率受到影响。萌发率统计结果表明: 在含有 125 mmol/L NaCl、250 mmol/L Mannitol 和 0.6 μ mol/L ABA 培养基中, 培养 2 天时, *atgols2* 种子萌发率均显著低于 WT (图 6B), 培养 7 天后, *atgols2* 和 WT 均能全部萌发, 说明 *AtGolS2* 基因的缺失可能抑制种子萌发速率, 但不影响种子最终萌发。在 NaCl 和 Mannitol 处理下培养 7 天后, *atgols2* 突变体展叶率低于 WT, 幼苗长势明显不如 WT (图 6A)。上述结果表明 *AtGolS2* 基因缺失降低了拟南芥对高盐、高渗和 ABA 胁迫的耐性, 抑制拟

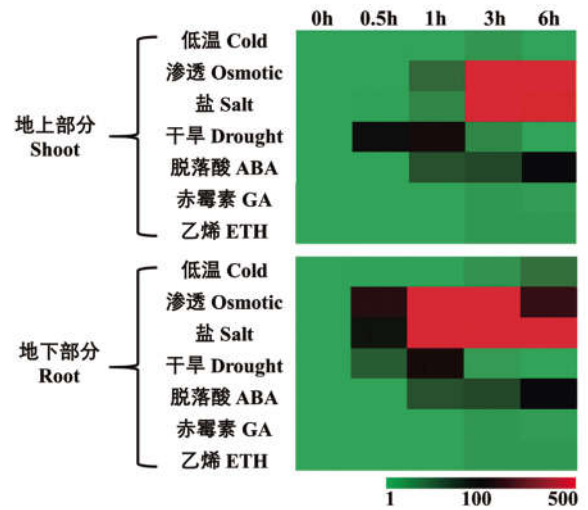
图4 *AtGolS2* 在非生物胁迫和激素处理下的表达模式

Figure 4 The expression pattern of *AtGolS2* under abiotic stress and hormone treatment

南芥的正常生长。

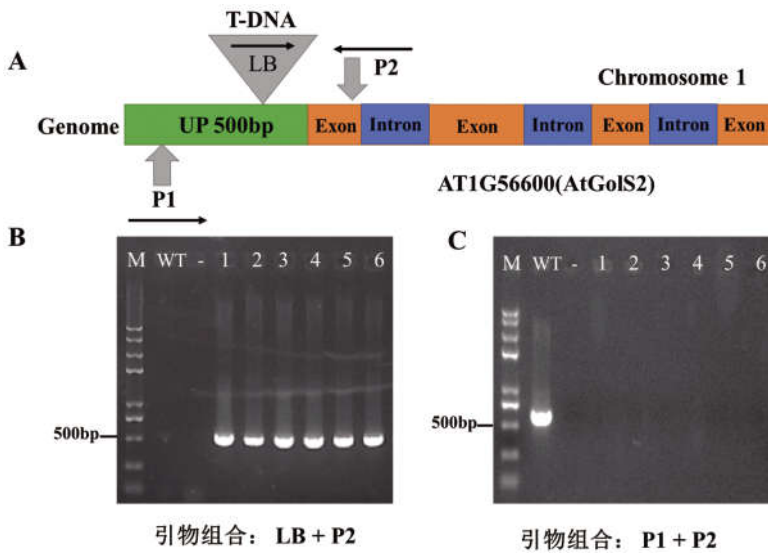
2 讨论

土地盐碱化是世界上普遍存在的问题, 严重影响植物的生长发育, 限制作物的质量和产量。世界上有 8.31 亿 hm^2 的土壤因盐分过高而无法有效利用 (Jin et al., 2008)。盐胁迫主要由中性盐如 NaCl、 Na_2SO_4 引起, 而盐碱胁迫主要由碱性盐如碳酸氢盐(HCO_3^-)和碳酸盐(CO_3^{2-})引起。盐胁迫对植物的危害主要包括离子胁迫、渗透胁迫和氧化胁迫, 而盐碱胁迫在此基础上增加了 HCO_3^- 或 CO_3^{2-} 引起的离子胁迫及高 pH 胁迫, 比盐胁迫危害更大(刘奕嫩等, 2018)。因此, 鉴定耐盐碱关键基因对于提高作物耐盐碱能力和开发利用盐碱地具有重要意义。

本研究以发掘植物盐碱胁迫响应基因为出发点, 利用课题组前期购买的拟南芥 T-DNA 插入突变体筛选出对苏打盐碱胁迫最敏感的 #11 号突变体—*atgols2* (图 1)。现有研究已证实 GoIS 参与干旱、氧化、低温胁迫响应, 但在苏打盐碱胁迫方面的报道鲜有。本研究发现 *atgols2* 突变体对苏打盐碱敏感性增加, 为 GoIS 参与苏打盐碱应答提供了证据。此外, 本研究还发现 *AtGolS2* 基因表达显著受盐、渗透、干旱和 ABA 处理诱导(图 4), 且 *atgols2* 突变体种子萌发对高盐、高渗和 ABA 胁迫更加敏感(图 6B), 说明 *AtGolS2* 基因正调控拟南芥对非生物胁迫的耐性。与本研究结论一致, 杨树中过表达 *AtGolS3/AtGolS2* 导致体内抗氧化酶合成基因表达增强, 抗氧化能力增强, 气孔开度减小, 耐旱能力增强(Yu et al., 2017; La Mantia et al., 2018)。在

表 1 AtGolS2 互作蛋白功能注释
Table 1 Annotation of the function of AtGolS2 interacting protein

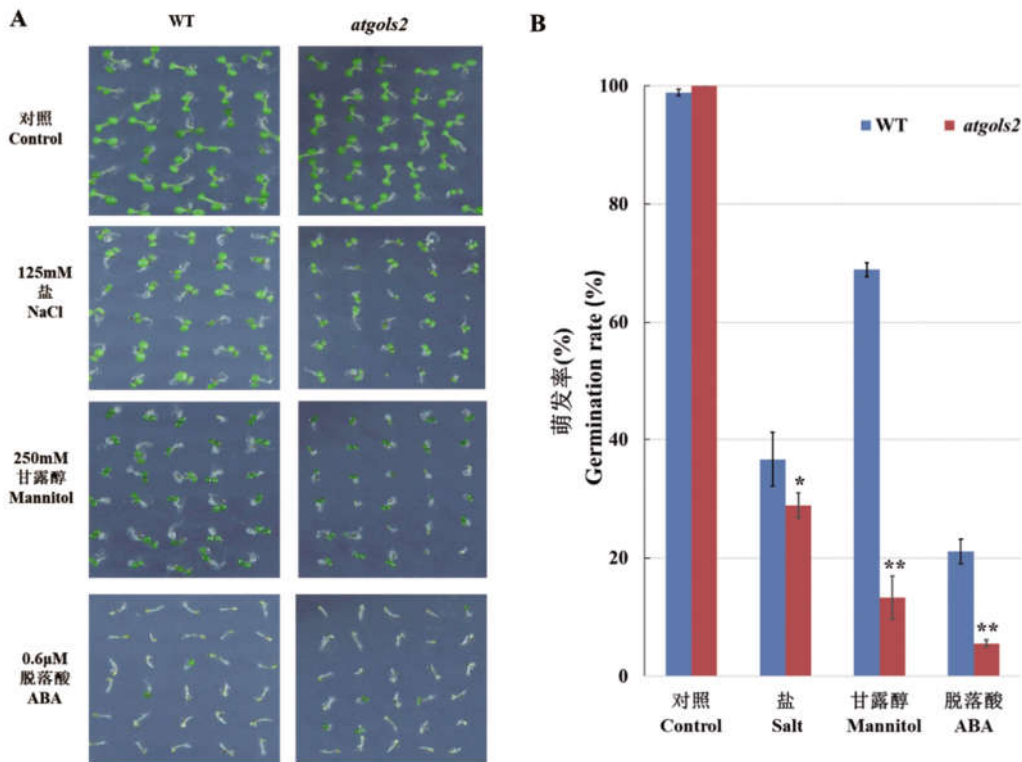
基因简称	登录号	编码蛋白类型	功能注释	非生物胁迫表达模式	参考文献
Gene name	Accession number	Encoding protein type	Functional annotation	Expression pattern under abiotic stress	References
<i>RD20</i>	AT2G33380	油体钙相关蛋白	脂类代谢	受盐、干旱和渗透胁迫诱导	Aubert et al., 2010; Sham et al., 2015;
<i>UGE2</i>	AT4G23920	Caleosin UDP-半乳糖差向异构酶	Lipid metabolism 半乳糖生物合成	Induced by salt, drought and osmotic stress 受低温, 渗透胁迫诱导	Aubert et al., 2011; Park et al., 2018 Aznar et al., 2018
<i>UGE5</i>	AT4G10960	Galactose epimerase	Galactose biosynthesis	Induced by low temperature and osmotic stress	Aznar et al., 2018
<i>USP</i>	AT5G52560	UDP-半乳糖差向异构酶 Galactose epimerase	半乳糖生物合成 Galactose biosynthesis	受低温, 渗透和盐胁迫诱导 Induced by low temperature, Osmotic and salt stress	Decker and Kleczkowski, 2017
<i>AT5G18200</i>	AT5G18200	Galactose pyrophosphorylase UTP 半乳糖-1-磷酸尿酸转移酶	Galactose biosynthesis 半乳糖生物合成	受低温胁迫抑制 Inhibited by low temperature stress	Kotake et al., 2007
<i>DIN10</i>	AT5G20250	Galactose-1-phosphate urate transferase 糖基水解酶	Galactose biosynthesis 糖代谢	Induced by salt stress 受高温, 活性氧胁迫诱导	Maryama et al., 2009; Lee et al., 2017
<i>SIP2</i>	AT3G57520	Glycosyl hydrolase 棉子糖特异性 α -半乳糖苷酶	Glucose metabolism 棉子糖生物合成	Induced by high temperature, reactive oxygen stress 受渗透胁迫诱导	Fujita et al., 2005
<i>STS</i>	AT4G01970	Raffinose-specific α -galactosidase 棉子糖合酶	Galactose biosynthesis 棉子糖生物合成	Induced by osmotic stress 受盐胁迫抑制	Nishizawa et al., 2008
<i>RFSS</i>	AT5G40390	Raffinose synthase 棉子糖合酶	Galactose biosynthesis 参棉子糖生物合成	Inhibited by salt stress 受低温, 渗透, 盐和干旱胁迫诱导	Nishizawa et al., 2008
		Raffinose synthase	Galactose biosynthesis	Induced by low temperature, Osmotic, salt and drought stress	

图 5 *atgols2* 突变体 T-DNA 纯合插入检测

注: A: *atgols2* 突变体 T-DNA 插入模式图; B: *atgols2* 突变体插入鉴定; M: DNA marker; -: 阴性对照; WT: 野生型对照; 1-6: 突变体植株; C: *atgols2* 突变体纯合鉴定; M: DNA marker; -: 阴性对照; WT: 野生型对照; 1-6: 突变体植株

Figure 5 Detection of the T-DNA homozygous insertion in *atgols2* mutant

Note: A: *atgols2* mutant T-DNA insertion pattern diagram; B: T-DNA insertion identification of *atgols2* mutant Arabidopsis M: DNA marker; -: Negative control; WT: wild-type control; 1-6: Mutant plant; C: Homozygous identification of *atgols2* mutant Arabidopsis M: DNA marker; -: Negative control; WT: wild-type control; 1-6: Mutant plant

图 6 盐, 渗透胁迫和 ABA 处理下 *atgols2* 突变体表型及萌发率统计

注: A: 盐, 渗透胁迫和 ABA 处理下的 *atgols2* 突变体表型; B: 盐, 渗透胁迫和 ABA 处理 2 d 的 *atgols2* 突变体萌发率; * 在 $p < 0.05$ 水平上差异显著 ($n=30$), ** 在 $p < 0.01$ 水平上差异显著 ($n=30$)

Figure 6 Phenotype and germination rates analysis of *atgols2* mutant under salt, osmotic and ABA treatment

Note: A: Phenotype of *atgols2* mutant under salt, osmotic and ABA treatment; B: Germination rates of *atgols2* mutant under salt, osmotic and ABA treatment for 2 day; *: Significantly different at $p < 0.05$ level ($n=30$); **: Significantly different at $p < 0.01$ level ($n=30$)

二穗短柄草(*Brachypodium distachyon*)中转入 *AtGolS2* 基因, 植物体内叶绿素含量增多, 耐旱能力增强(Himuro et al., 2014)。拟南芥中过表达 *CaGolS1/CaGolS2* 通过减少 ROS 积累, 增强了高温耐受性(Salvi et al., 2018)。红叶石楠中转入 *AmGolS* 基因, 转基因植株抗寒能力明显提高(Downie et al., 2003; Dos Santos et al., 2011)。本研究发现了 *AtGolS2* 基因参与苏打盐碱和 ABA 应答, 未来将进一步评价 *GolS* 基因在作物苏打盐碱性状改良中的应用价值。*AtGolS2* 编码蛋白属于糖基转移酶家族 A 超家族, 该家族负责编码合成肌醇半乳糖苷合酶, 该酶催化 RFOs 生物合成的第一步。RFOs 利用肌醇半乳糖苷提供的半乳糖基合成一系列不同的寡糖(Saravitz et al., 1987)。已有研究发现在拟南芥中超量表达 *AtGolS2* 增加了半乳糖醇和棉子糖的含量, 减小叶片气孔开度, 降低蒸腾速率, 提高了耐旱性(Nishizawa et al., 2008)。在大豆(*Glycine max*)和水稻中转入 *AtGolS2*, 与 WT 相比半乳糖醇水平含量增多, 耐旱能力增强, 产量得到提升(Honna et al., 2016; Selvaraj et al., 2017)。TsGolS2 是从盐芥(*Thellungiella salsuginea*)克隆得到的, 与 *AtGolS2* 具有高度同源性, 在拟南芥中过表达 *TsGolS2*, 转基因植物中半乳糖醇、棉子糖和 α -酮戊二酸的含量显著增加, 提高了对高盐和高渗胁迫的耐受性(Sun et al., 2013)。此外, *AtGolS3*、*CaGolS1*、*CaGolS2* 表达均促进了棉子糖的积累(Downie et al., 2003; Dos Santos et al., 2011)。然而, *GolS* 基因是否通过促进半乳糖醇和棉子糖等寡糖积累, 参与 ABA 应答过程尚需进一步验证。植物中的各种生理活动主要是通过细胞中的蛋白质进行调控和调节, 蛋白质功能的发挥不是凭借单个蛋白质独立执行, 而是依靠蛋白质与蛋白质相关作用执行其功能。本研究利用 SMART-Interactions 预测了 *AtGolS2* 蛋白互作网络, 发现网络中的互作蛋白可分成三类: 脂类代谢相关蛋白、半乳糖生物合成相关蛋白、棉子糖生物合成相关蛋白(图 3; 表 1), 在调控脂类代谢, 半乳糖、棉子糖的生物合成及分解过程中起到重要的作用。此外, 这些互作蛋白编码基因的表达均响应非生物胁迫(表 1)。其中 *RD20* 基因编码 Caleosin (油体钙)蛋白, 该基因表达受干旱、盐和 ABA 诱导, 与 WT 相比, *rd20* 敲除拟南芥突变体气孔开度增大, 表现出更高的蒸腾速率。在缺水条件下 *RD20* 通过控制植物气孔开度, 提高植物耐旱能力, 同时, *rd20* 敲除拟南芥突变体也表现出盐敏感表型(Aubert et al., 2010; Aubert et al., 2011; Sham et al., 2015; Park et al., 2018)。*DIN10* 基因编码糖基水解酶, 其表达响应冷胁迫及活

性氧胁迫, 在拟南芥中超量表达 *DIN10* 可提高拟南芥耐冷性(Maruyama et al., 2009; Lee et al., 2017)。*SIP2* 编码棉子糖特异性 α -半乳糖苷酶, 拟南芥中超量表达 *SIP2* 可提高耐旱性(Fujita et al., 2005)。*STS* 和 *RFSS* 编码棉子糖合酶, *sts* 和 *rfss* 拟南芥突变体体内棉子糖含量均降低, 表现出冷敏感表型(Nishizawa et al., 2008)。后续可通过酵母双杂交、pull down、免疫共沉淀等方法验证 *AtGolS2* 与上述蛋白间的相互作用, 为深入揭示 *AtGolS2* 耐苏打盐碱信号传导通路提供理论依据。

3 材料与方法

3.1 植物材料

atgols2 拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) T-DNA 插入突变体(SALK_101144)购买于拟南芥种子库 ABRC, WT 拟南芥(哥伦比亚生态型)由作物逆境分子生物学实验室保存。

3.2 *atgols2* 拟南芥突变体非生物胁迫耐性分析

WT 和 *atgols2* 突变体种子经 5% NaClO 消毒 10 min, 再用 ddH₂O 清洗 6~10 次, 4℃避光处理 3 d。将灭菌后的 WT 和突变体拟南芥种子播种在正常、或含有 10 mmol/L NaHCO₃ (苏打盐碱胁迫)、或含有 125 mmol/L NaCl (高盐胁迫)、或含有 250 mmol/L Mannitol (高渗胁迫)、或含有 0.6 μ mol/L ABA 的 1/2 MS 培养基中, 置于培养箱培养 7 d, 统计萌发率并拍照。每次实验每个株系 30 粒种子, 实验包括 3 次生物学重复和 3 组技术重复。培养箱设定温度 18~22℃, 湿度 50%~70%, 光周期 16 h 光照/8 h 黑暗。

3.3 拟南芥 *atgols2* T-DNA 插入突变体 PCR 鉴定

根据拟南芥数据库 TAIR 获得 *atgols2* 突变体 T-DNA 插入侧翼序列信息, 在 T-DNA 插入序列的前后位置分别设计基因特异引物, 标记为 P1 (5'-CGTG TCCACATAATAACCAATCAGA-3') 和 P2 (5'-CCC CTTTCACGTAGTCTCCAGTT-3')。利用 SALK 系列突变体 T-DNA 上的固定引物 LB (5'-ATTTTGCC GATTTCGGAAC-3'), 采用三引物法 PCR 鉴定拟南芥 *atgols2* 突变体是否为纯合 T-DNA 插入突变体。采用全式金公司 EasyPure 基因组 DNA 提取试剂盒提取拟南芥基因组 DNA, 以此为模板, 分别进行插入鉴定(P1+LB-anti)和纯和鉴定(P1+P2)的 PCR 反应。反应条件如下: 95℃ 5 min; 95℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 40 s, 共 30 个循环, 72℃ 10 min。PCR 反应体系: gDNA 模板 2 μ L, 2 \times EasyTaq[®] PCR SuperMix 7.5 μ L, Sense

primer 0.3 μ L、Anti-sense primer 0.3 μ L、ddH₂O 4.9 μ L。PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳分析。

3.4 *AtGolS2* 基因生物信息学分析

通过 Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>)在线获得 *AtGolS2* 的基因组序列、CDS 序列、氨基酸序列以及蛋白功能注释等基本信息,利用 SMART (<http://smart.embl.de/>)在线预测软件分析蛋白保守结构域。通过 NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)在线 Protein Blast, 筛选出拟南芥 *AtGolS2* 同源基因, 下载其氨基酸序列, 利用 Clustal X1.83 将 *AtGolS2* 与其同源基因进行蛋白氨基酸序列比对。利用 STRING (<https://version11.string-db.org/cgi/network>)分析 *AtGolS2* 蛋白可能参与的互作网络, 并通过 Uniprot (<https://www.uniprot.org/>)蛋白数据库获得互作蛋白功能注释, 进行聚类分析。

3.5 基于在线数据库 *AtGolS2* 基因非生物胁迫表达模式分析

基于在线数据库 Arabidopsis eFP Browser (<http://bar.utoronto.ca/eplant/>)获得 *AtGolS2* 基因在冷、渗透、盐、干旱、ABA、GA 和 ETH 处理下的表达数据(Kilian et al., 2007)。下载原始数据, 统计于 Excel, 按胁迫类型进行分类, 取胁迫处理 0 h、0.5 h、1 h、3 h、6 h 表达数据, 利用 Excel 绘制热图。

作者贡献

沈阳和贾博为是本研究的执行人; 王金玉、才晓溪和孙明哲负责完成 *atgols2* 表型观察和数据处理; 胡冰霜、陈悦和王研负责 *AtGolS2* 生物信息学分析; 孙晓丽是本研究的构思者和负责人, 指导实验设计, 数据分析, 论文撰写与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由黑龙江八一农垦大学研究生创新科研项目 YJSCX2019-Y06 和国家自然科学基金项目 31971826 共同资助。

参考文献

Aubert Y., Leba L.J., Cheval C., Ranty B., Vavasseur A., Aldon D., and Galaud J.P., 2011, Involvement of RD20, a member of caleosin family, in ABA-mediated regulation of germination in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Signal Behav.*, 6(4): 538-540

Aubert Y., Vile D., Pervent M., Aldon D., Ranty B., Simonneau T., Vavasseur A., and Galaud J.P., 2010, RD20, a stress-inducible caleosin, participates in stomatal control, transpiration and drought tolerance in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Cell Physiol.*, 51(12): 1975-1987

Aznar A., Chalvin C., Shih P.M., Maimann M., Ebert B., Birdseye D.S., Loque D., and Scheller H.V., 2018, Gene stacking of multiple traits for high yield of fermentable sugars in plant biomass, *Biotechnol. Biofuels.*, 11(1): 2

Bachmann M., and Keller F., 1995, Metabolism of the raffinose family oligosaccharides in leaves of *Ajuga reptans* L.: Inter- and Intracellular compartmentation, *Plant Physiol.*, 109 (3): 991-998

Decker D., and Kleczkowski L.A., 2017, Substrate specificity and inhibitor sensitivity of plant UDP-sugar producing pyrophosphorylases, *Front Plant Sci.*, 8: 1610

Dos Santos T.B., Budzinski I.G., Marur C.J., Petkowicz C.L., Pereira L.F., and Vieira L.G., 2011, Expression of three galactinol synthase isoforms in *Coffea arabica* L. and accumulation of raffinose and stachyose in response to abiotic stresses, *Plant Physiol. Biochem.*, 49(4): 441-448

Downie B., Gurusinge S., Dahal P., Thacker R.R., Snyder J.C., Nonogaki H., Yim K., Fukunaga K., Alvarado V., and Bradford K.J., 2003, Expression of a GALACTINOL SYNTHASE gene in tomato seeds is up-regulated before maturation desiccation and again after imbibition whenever radicle protrusion is prevented, *Plant Physiol.*, 131(3): 1347-1359

Fujita Y., Fujita M., Satoh R., Maruyama K., Parvez M.M., Seki M., Hiratsu K., Takagi M., Shinozaki K., and Yamaguchi-Shinozaki K., 2005, AREB1 is a transcription activator of novel ABRE-dependent ABA signaling that enhances drought stress tolerance in Arabidopsis, *Plant Cell.*, 17(12): 3470-3488

Gu L., Jiang T., Zhang C., Li X., Wang C., Zhang Y., Li T., Dirk M. A., Downie A.B., and Zhao T., 2019, Maize HSFA2 and HS-BP2 antagonistically modulate raffinose biosynthesis and heat tolerance in Arabidopsis, *Plant J.*, 100(1): 128-142

Himuro Y., Ishiyama K., Mori F., Gondo T., Takahashi F., Shinozaki K., Kobayashi M., and Akashi R., 2014, Arabidopsis galactinol synthase *AtGolS2* improves drought tolerance in the monocot model *Brachypodium distachyon*, *J. Plant Physiol.*, 171(13): 1127-1131

Hon na P.T., Fuganti-Pagliarini R., Ferreira L.C., Molinari M D.C., Marin S.R.R., Farias J.R.B., Neumaier N., Mertz-Henning L. M., Kanamori N., Nakashima K., Takasaki H., Urano K., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K., Desidério J.A., and Nepomuceno A.L., 2016, Molecular, physiological, and agronomical characterization, in greenhouse and in field conditions, of soybean plants genetically modified with *AtGolS2* gene for drought tolerance, *Mol. Breed.*, 36(11): 157

Ismail A.M., and Horie T., 2017, Genomics, Physiology, and

- Molecular breeding approaches for improving salt tolerance, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 68(1): 405-434
- Jin H., Kim H.R., Plaha P., Liu S.K., Park J.Y., Piao Y.Z., Yang Z.H., Jiang G.B., Kwak S.S., An G., Son M., Jin Y.H., Sohn J.H., and Lim Y.P., 2008, Expression profiling of the genes induced by Na₂CO₃ and NaCl stresses in leaves and roots of *Leymus chinensis*, *Plant Sci.*, 175(6): 784-792
- Kilian J., Whitehead D., Horak J., Wanke D., Weigl S., Batistic O., D'Angelo C., Bornberg-Bauer E., Kudla J., and Harter K., 2007, The AtGen Express global stress expression data set: protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light, drought and cold stress responses, *Plant J.*, 50(2): 347-363
- Kotake T., Hojo S., Yamaguchi D., Aohara T., Konishi T., and Tsumuraya Y., 2007, Properties and physiological functions of UDP-sugar pyrophosphorylase in Arabidopsis, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 71(3): 761-771
- La Mantia J., Unda F., Douglas C.J., Mansfield S.D., and Hamelin R., 2018, Overexpression of AtGolS3 and CsRFS in poplar enhances ROS tolerance and represses defense response to leaf rust disease, *Tree Physiol.*, 38(3): 457-470
- Lee D.H., Park S.J., Ahn C.S., and Pai H.S., 2017, MRF family genes are involved in translation control, especially under energy-deficient conditions, and their expression and functions are modulated by the tor signaling pathway, *Plant Cell.*, 29(11): 2895-2920
- Liu Y.W., Yu Y., and Fang J., 2018, Saline alkali stress and molecular mechanism of saline alkali tolerance in plants, *Turang Yu Zuowu (Soils and Crops)*, 7(2): 201-211 (刘奕斌, 于洋, 方军, 2018, 盐碱胁迫及植物耐盐碱分子机制研究, *土壤与作物*, 7(2): 201-211)
- Maruyama K., Takeda M., Kidokoro S., Yamada K., Sakuma Y., Urano K., Fujita M., Yoshiwara K., Matsukura S., Morishita Y., Sasaki R., Suzuki H., Saito K., Shibata D., Shinozaki K., and Yamaguchi-Shinozaki K., 2009, Metabolic pathways involved in cold acclimation identified by integrated analysis of metabolites and transcripts regulated by DREB1A and DREB2A, *Plant Physiol.*, 150(4): 1972-1980
- Nishizawa A., Yabuta Y., and Shigeoka S., 2008, Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage, *Plant Physiol.*, 147(3): 1251-1263
- Park K.Y., Kim W.T., and Kim E.Y., 2018, The proper localization of responsive to desiccation 20 in lipid droplets depends on their biogenesis induced by stress-related proteins in vegetative tissues, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 495(2): 1885-1889
- Salvi P., Kamble N.U., and Majee M., 2018, Stress-inducible galactinol synthase of chickpea (CaGolS) is implicated in heat and oxidative stress tolerance through reducing stress-induced excessive reactive oxygen species accumulation, *Plant Cell Physiol.*, 59(1): 155-166
- Saravitz D.M., Pharr D.M., and Carter T.E., 1987, Galactinol synthase activity and soluble sugars in developing seeds of four soybean genotypes, *Plant Physiol.*, 83(1): 185-189
- Selvaraj M.G., Ishizaki T., Valencia M., Ogawa S., Dedicova B., O-gata T., Yoshiwara K., Maruyama K., Kusano M., and Saito K., 2017, Overexpression of an Arabidopsis thaliana galactinol synthase gene improves drought tolerance in transgenic rice and increased grain yield in the field, *Plant Biotechnol J.*, 15(11): 1465-1477
- Sham A., Moustafa K., Al-Ameri S., Al-Azzawi A., Iratni R., and AbuQamar S., 2015, Identification of Arabidopsis candidate genes in response to biotic and abiotic stresses using comparative microarrays, *PLoS One*, 10(5): e0125666
- Shimosaka E., and Ozawa K., 2015, Overexpression of cold-inducible wheat galactinol synthase confers tolerance to chilling stress in transgenic rice, *Breed Sci.*, 65(5): 363-371
- Song C., Chung W.S., and Lim C.O., 2016, Overexpression of heat shock factor gene *HsfA3* increases galactinol levels and oxidative stress tolerance in Arabidopsis, *Mol Cells.*, 39(6): 477-483
- Sun Z., Qi X., Wang Z., Li P., Wu C., Zhang H., and Zhao Y., 2013, Overexpression of TsGolS2, a galactinol synthase, in *Arabidopsis thaliana* enhances tolerance to high salinity and osmotic stresses, *Plant Physiol Biochem.*, 69: 82-89
- Wang Y., Liu H., Wang S., Li H., and Xin Q., 2016, Overexpression of a common wheat gene GALACTINOL SYNTHASE3 enhances tolerance to zinc in Arabidopsis and rice through the modulation of reactive oxygen species production, *Plant Mol. Biol. Rep.*, 34(4): 794-806
- Wu Y., Gao Z.C., Zhang B.X., Zhang H.L., Wang Q.W., Ruan X.L., and Ma Y.S., 2017, Effects of 24-brassinolide on the fertility, physiological characteristics and cell ultra-structure of soybean under Saline-Alkali Stress, *Zhongguo Nongye Kexue (Scientia Agricultura Sinica)*, 50(5): 811-821 (吴杨, 高慧纯, 张必弦, 张海玲, 王全伟, 栾晓燕, 马岩松, 2017, 24-表油菜素内酯对盐碱胁迫下大豆生育, 生理及细胞超微结构的影响, *中国农业科学*, 50(5): 811-821)
- Yu X., Ohtani M., Kusano M., Nishikubo N., Uenoyama M., Umezawa T., Saito K., Shinozaki K., and Demura T., 2017, Enhancement of abiotic stress tolerance in poplar by overexpression of key Arabidopsis stress response genes, AtSRK2C and AtGolS2, *Mol. Breed.*, 37(5): 77
- Zhou M.L., Zhang Q., Zhou M., Sun Z.M., Zhu X.M., Shao J.R., Tang Y.X., and Wu Y.M., 2012, Genome-wide identification of genes involved in raffinose metabolism in Maize, *Glycobiology*, 22(12): 1775-1785