

• 药材与资源 •

珊瑚菜盐胁迫相关 *GIRTH* 基因的克隆和表达量分析徐 瑶¹, 任宏伟¹, 张馨方¹, 王 芳¹, 朱 丹¹, 谭玲玲¹, 袁 涛², 高 婷^{1*}

1. 青岛农业大学生命科学学院 山东省高校植物生物技术重点实验室, 山东 青岛 266109

2. 青岛农业大学建筑工程学院, 山东 青岛 266109

摘要: 目的 筛选得到珊瑚菜 *Glehnia littoralis* 抗盐相关基因 *GIRTH*, 并进行开放阅读框 (open reading frame, ORF) 全长克隆以及生物信息学和表达量分析。方法 从珊瑚菜转录组数据中筛选到 *GIRTH* 基因, 通过反转录聚合酶链反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 以及 cDNA 末端快速扩增 (rapid amplification of cDNA ends, RACE) 获得该基因全长 ORF 序列, 利用生物信息学分析方法分析其所编码蛋白质的理化性质, 预测该蛋白二、三级结构、保守结构域, 建立系统发育进化树; 利用实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 方法检测该基因组织表达特异性及其在 NaCl 和 1-氨基环丙烷羧酸 (1-aminocyclopropanecarboxylic acid, ACC) 处理下的表达差异。结果 *GIRTH* 基因序列全长 ORF 为 690 bp, 共编码 229 个氨基酸。系统进化分析表明, 珊瑚菜的 RTH 蛋白与黄胡萝卜 *Daucus carota* subsp. *sativus* 的 RTH 蛋白亲缘关系最近, 相似度达 88.65%; qRT-PCR 结果显示, *GIRTH* 基因在珊瑚菜的根、叶、花中均有表达, 在花中表达量较高, 叶和根中无显著差异; 200 mmol/L 的 NaCl 处理 3、6、12、24、36 h, *GIRTH* 基因表达量明显上调, 且处理 36 h 后 *GIRTH* 基因表达量上调最为显著; 100 mmol/L ACC 处理, *GIRTH* 基因的表达量呈先上升再下降的趋势, 在 3 h 时 *GIRTH* 基因表达量显著上调, 在 6 h 和 12 h 时 *GIRTH* 基因表达量下调。结论 *GIRTH* 蛋白是乙烯响应因子, 并且与珊瑚菜的耐盐性相关。为探究乙烯信号通路和药用植物抗盐反应的关系及改良珊瑚菜的耐盐能力奠定了基础。

关键词: 珊瑚菜; *GIRTH* 基因; 表达量分析; qRT-PCR; 生物信息学分析

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)11-3639-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.11.025

Cloning and expression quantity analysis of *GIRTH* gene related to salt stress in *Glehnia littoralis*XU Yao¹, REN Hong-wei¹, ZHANG Xin-fang¹, WANG Fang¹, ZHU Dan¹, TAN Ling-ling¹, YUAN Tao², GAO Ting¹

1. Shandong Provincial University Key Laboratory of Plant Biotechnology, College of Life Sciences, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China

2. College of Civil Engineering & Architecture, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China

Abstract: Objective The salt resistance related gene *GIRTH* of *Glehnia littoralis* was screened, and ORF (open reading frame) full-length cloning, bioinformatics and expression analysis were carried out. **Methods** The *GIRTH* gene was screened from the transcriptome data of *G. littoralis*, and the full-length ORF sequence of the gene was obtained by RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) and RACE (rapid-amplification of cDNA ends). The bioinformatics analysis method was used to analyze the physicochemical properties of the encoded protein, the protein secondary and tertiary structure, conserved domains were predicted, and a phylogenetic evolutionary tree was established. The tissue or organ expression specificity of this gene and the difference in expression under NaCl and ACC (1-aminocyclopropanecarboxylic acid) treatment were detected by real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR). **Results** The full length ORF of *GIRTH* sequence was 690 bp, encoding 229 amino acids. Phylogenetic analysis showed that the *GIRTH* was closely related to *DcRTH* of *Daucus carota* subsp. *sativus* with a similarity of 88.65%. RT-qPCR results showed that *GIRTH* gene was expressed in roots, leaves and flowers, with a high expression in flowers,

收稿日期: 2023-01-05

基金项目: 国家自然科学基金委员会青年基金项目 (81903748); 山东省教育厅山东省高校科技计划项目 (2019KJJE003)

作者简介: 徐 瑶, 硕士研究生, 研究方向为药用植物次生代谢。Tel: 17863978926 E-mail: 1192418803@qq.com

*通信作者: 高 婷, 博士, 副教授, 从事药用植物次生代谢研究。Tel: 13061236819 E-mail: 15189486@qq.com

but there was no significant difference between leaves and roots. *GIRTH* gene expression was significantly increased at 3, 6, 12, 24, 36 h after 200 mmol/L NaCl treatment, and the most significant increase was observed at 36 h after treatment. The expression of *GIRTH* gene increased first and then decreased after 100 mmol/L ACC treatment, and increased significantly at 3 h, while the expression of *GIRTH* gene was down-regulated at 6 and 12 h. **Conclusion** *GIRTH* is an ethylene responsive factor and related to the salt tolerance of *G. littoralis*. This study laid a foundation for exploring the relationship between ethylene signaling pathway and salt tolerance of medicinal plants and improving the salt tolerance of *G. littoralis*.

Key words: *Glehnia littoralis* Fr. Schmidt ex Miq.; *GIRTH*; expression analysis; qRT-PCR; bioinformatics analysis

珊瑚菜 *Glehnia littoralis* Fr. Schmidt ex Miq. 是伞形科 (Umbelliferae) 珊瑚菜属 *Glehnia* F. Schmidt 的多年生草本植物^[1]。其干燥根称为北沙参, 是我国重要的传统中药材, 药用价值较高, 具有益胃生津、养阴清肺、镇咳祛痰等功效^[2-3]。珊瑚菜属于盐生植物, 生长地主要在中国山东、福建、辽宁、河北省以及俄罗斯、朝鲜、日本、北美等的沿海沙滩和沙堤上, 对于海岸固沙及盐碱地改良均发挥了重要的作用^[4-5]。目前珊瑚菜野生资源越来越少, 已经列为我国渐危物种、国家二级重点保护植物^[1-2]。此外, 珊瑚菜的茎和根有很高的食用价值, 随着市场需求的不断扩大, 受到了越来越多的关注。

土壤盐碱化是目前人类面临的重要环境问题, 根据 2015 年联合国粮食及农业组织发布的世界土壤资源状况报告, 全球受盐碱影响的土壤总面积达 10 亿 hm^2 , 对农牧业的可持续发展构成了严重威胁^[6-7], 耐盐碱作物资源对扼制土地的盐渍化和提高盐荒地的利用具有重要意义, 培育耐盐碱性的植物资源就成为了当下急需解决的问题之一。目前, 对于耐盐碱植物的研究主要围绕着植物耐盐碱反应机制以及在抗逆反应机制有作用的因子^[8], 珊瑚菜中抗盐相关的基因尚未被研究。

植物激素乙烯影响着许多植物生长发育过程中的生物学过程^[9]。*RTE1* (reversal to ethylene-sensitivity 1) 基因是近年来发现的一个在植物、动物和某些原生生物中保守的新基因^[10]。研究表明乙烯受体 *ETR1* 存在于内质网 (endoplasmic reticulum, ER) 膜上, 跨膜蛋白 *RTE1* 定位于 ER 和高尔基体, 且 *ETR1* 受到 *RTE1* 的负调控^[11-12]。*RTE1-HOMOLOG* (*RTH*) 是拟南芥 *RTE1* 基因家族中唯一的同源蛋白, *RTH* 突变体对外源乙烯具有不敏感性, 过表达可导致乙烯过敏感^[12-13]。同时, 乙烯作为一种植物胁迫激素, 也可以提高植物的抗逆性。有研究显示水稻和拟南芥外施乙烯和乙烯前体 ACC 后对盐胁迫的敏感性明显降低, 显著增加了野生型拟南芥幼苗在高盐环境下的抗盐能力及成活率^[12]。通过

拟南芥盐胁迫下的转录组分析表明: 大量乙烯应答基因的表达式均发生了显著变化^[14]。大量研究显示: 乙烯信号途径中的重要组分 *EIN3* 等均参与了植物的盐胁迫反应^[15-17]。*RTH* 蛋白响应乙烯信号, 可能也在植物抗盐过程中发挥重要作用。

本研究在前期已完成的珊瑚菜转录组高通量测序数据 (GenBank 号 PRJNA387325) 的基础上, 使用关键词 *RTE1-HOMOLOG* (*RTH*) 对珊瑚菜转录组数据库进行筛选, 筛选到 1 条转录组序列 (c48547g1)。克隆获得了珊瑚菜 *GIRTH* 基因序列, 对分析了该基因在珊瑚菜不同部位及在 NaCl 和 1-氨基环丙烷羧酸 (1-aminocyclopropanecarboxylic acid, ACC) 不同处理时间的表达式变化。该研究结果有助于揭示乙烯信号通路分子和植物响应高盐胁迫的关系。

1 材料与仪器、试剂

1.1 材料

实验室培养的开花期珊瑚菜以及 2 个月珊瑚菜幼苗。由青岛农业大学高婷副教授鉴定为珊瑚菜 *G. littoralis* Fr. Schmidt ex Miq.。

1.2 仪器

SIM-F140AY65 型制冰机 (日本三洋公司), G154TW 型灭菌锅 (AUTO CLAVE 公司), Anke GL-20C-II 低温冷冻离心机 (飞鸽), DV215CD 型电子天平 (Ohaus Discovery), Tanon 500 凝胶成像分析系统 (上海领成公司), 核酸电泳系统 (美国 Bio-RAD 公司), S1000PCR 仪 (美国伯乐公司), 小型台式离心机 (德国 Eppendorff Centrifuge 5424), Milli-Q 型超纯水仪, Stratagene Mx3000P 实时荧光定量 PCR 仪 (美国安捷伦), 超微量分光光度计 (美国 Thermo NanoDropOne 公司)。

1.3 试剂

TaKaRa Ex Taq 酶, TaKaRa Taq™ 试剂盒, 胶回收试剂盒, pMD™18-T 质粒载体, 大肠杆菌 DH5 α 感受态, 天根多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒, 诺唯赞反转录试剂盒, TaKaRa SMARTer RACE 5'/3' Kit 试剂盒, 诺唯赞 TB Green®Premix Ex Taq™ II 荧光定量试剂盒。

2 方法

2.1 *GIRTH* 基因开放阅读框(open reading frame, ORF)的克隆和测序

以新鲜珊瑚菜幼苗为材料,使用多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒提取珊瑚菜幼苗总 RNA,使用超微量分光光度计检测 RNA 浓度及其在 260、280 nm 下的吸光度值(A)比值(A_{260}/A_{280}),并进行记录。通过反转录试剂盒对珊瑚菜幼苗总 RNA 进行反转录,从而获得珊瑚菜 cDNA。使用 1%琼脂糖凝胶进行 cDNA 检测,并放-20 °C 保存备用。

在前期已完成的珊瑚菜转录组高通量测序数据(GenBank 号 PRJNA387325)的基础上,使用关键词 RTE1-HOMOLOG (RTH)进行筛选得到的 1 条

转录组序列(c48547g1)。以此为模板设计引物,送青岛擎科生物技术公司合成引物 *GIRTH*-F 和 *GIRTH*-R。使用 Ex Taq 酶通过 qRT-PCR 进行克隆, TaKaRaTaq™ 试剂盒对 PCR 产物末端加入 A 尾,电泳后使用胶回收试剂盒对扩增正确的目的片段进行胶回收。将回收片段连接到 18-T 载体上。将构建完毕的 18-T 载体转入大肠杆菌感受态细胞中,随后涂布在氨苄青霉素(AMP)抗性的 LB 固体培养基中培养,37 °C 倒置黑暗培养过夜。次日挑取饱满圆形的大肠杆菌菌斑放入 AMP 抗性的 LB 液体培养基中培养 6 h,使用 Ex Taq 酶对挑取的大肠杆菌进行菌液 PCR 电泳检测。选取与目标基因片段处对应的菌液送至生物工程股份有限公司测序,引物见表 1。

表 1 *GIRTH* 基因克隆及 qRT-PCR 所用的引物序列

Table 1 Primer sequences of *GIRTH* gene cloning and qRT-PCR

名称	引物序列 (5'→3')	T_m 值/°C
c48547g1-F	CGGAATGGTGGATGGAATGTG	56.46
c48547g1-R	GGAAGGTGAAGAAGACCCAAA	54.62
GlActin-F	TGGTATTGTGCTGGATTCTGGT	59.50
GlActin-R	TGAGATCACGACCAGCAAGG	59.00
<i>GIRTH</i> -3'RACE long	TGCTGCTTCCCTCCAAATCCTGCTGCTC	67.32
<i>GIRTH</i> -3'RACE short	CCTGGGGATTAGTGTGGTTGG	58.34
<i>GIRTH</i> -F	ATGGAACAAAATGAAGAAGACC	56.87
<i>GIRTH</i> -R	CTTACAGGTGTATTAAATCTCGGAA	60.77

2.2 cDNA 末端快速扩增(rapid amplification of cDNA ends, RACE)

参考 TaKaRa SMARTer RACE 5'/3' Kit 试剂盒说明书进行操作。使用 DNAMAN6.0 软件对已知 *GIRTH* 基因的部分序列分别设计 3'RACE 特异性引物, *GIRTH*-3'RACE long 和 *GIRTH*-3'RACE short。对已知 *GIRTH* 基因的部分序列的 3'端进行 3' Race PCR。随后进行电泳、胶回收、连接、转化以及测序,与“2.1”项中的步骤一致。使用 DNAMAN 6.0 软件,将测序结果与原序列进行拼接,从而获得 *GIRTH* 基因的全长 ORF 序列。

2.3 *GIRTH* 基因荧光定量检测

2.3.1 样品的处理以及 cDNA 获取 选取开花期珊瑚菜植株的根、叶和花各 3 份,将样品迅速放于液氮中。从种植苗圃中挑选健康的刚生长出真叶的珊瑚菜幼苗以及一年生珊瑚菜全株,用蒸馏水洗净表面泥沙,吸干多余水分,分为 2 份备用。在培养皿中铺上干净的滤纸,并倒入 200 mmol/L 的 NaCl 溶液,另一份倒入 100 mmol/L 的 ACC 溶液,盖好培养皿盖子,放入黑暗培养箱中培养。NaCl 处理样本

在 0、3、6、12、24、36 h 各取样 1 次,每个样本 3 份重复,ACC 处理样本在 0、3、6、12 h 各取样 1 次,每个样品 3 份重复,样品全株及时放入液氮中,-80 °C 保存。根据“2.1”项中的步骤对所取得不同珊瑚菜样本进行 RNA 的提取以及反转录。

2.3.2 目的基因荧光定量 PCR 以高通量测序获得的序列为依据,以珊瑚菜 *Actin* 作为内参基因,利用 NCBI 软件设计荧光定量 PCR 的正反向引物 c48547g1-F、c48547g1-R、*GlActin*-F 以及 *GlActin*-R。构建 qRT-PCR 体系,以不同部位的即花、叶和根中提取出的 RNA 以及 200 mmol/L NaCl 处理 0、3、6、12、24、36 h 以及 100 mmol/L ACC 处理 0、3、6、12 h 的幼苗得到的 cDNA 为模板,每组 3 个重复。利用荧光定量 PCR 获得 C_t 值,使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 数据分析法对荧光定量数据进行分析。

2.4 生物信息学分析

使用生物信息学相关网站以及软件:NCBI, DNAMAN、Protparam、ProtScale、TMHMM、SOPMA、SWISS-MODLE、ClustalX、MEGA6 等,

对目的基因 *GIRTH* 进行 ORF 的识别和保守结构域分析、蛋白质理化性质及跨膜结构域分析、蛋白质二级及三级结构预测、同源蛋白比对以及分子发育系统分析。

3 结果与分析

3.1 *GIRTH* 基因的扩增检测和测序结果

为了获得珊瑚菜 *GIRTH* 基因全长 ORF 序列, 通过转录组已有 *GIRTH* 序列设计引物, 对珊瑚菜 *GIRTH* ORF 序列进行 PCR 扩增以及克隆、测序, 如图 1 电泳图 *GIRTH* 电泳条带位置与转录组 *GIRTH*

ORF 长度相一致, 对 *GIRTH* 电泳条带进行回收测序, 测序结果显示与转录组序列一致, 表明获得了珊瑚菜 *GIRTH* 的 ORF 序列, 见图 1。

3.2 RACE 结果

为了确定 *GIRTH* 基因的全长 ORF 序列, 对其进行 3'RACE PCR, 结果如图 2 所示, 推测 PCR 正确片段长度大约在 500~750 bp, 因此对图中正确的 DNA 条带(箭头所指)进行回收并测序。将 3'RACE 测序结果与 ORF 测序结果进行比对, 结果一致最终确定了 *GIRTH* 基因的全长 ORF 序列进行后续分析。

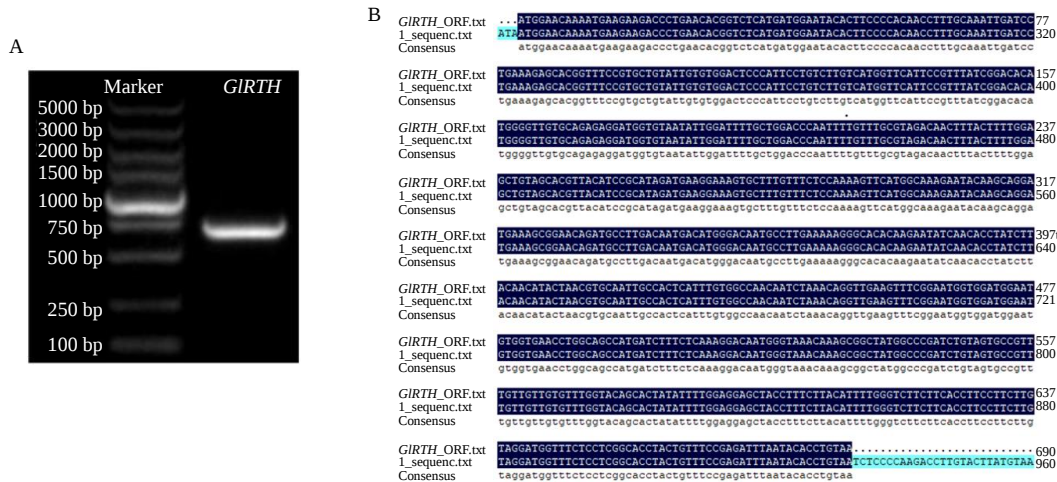
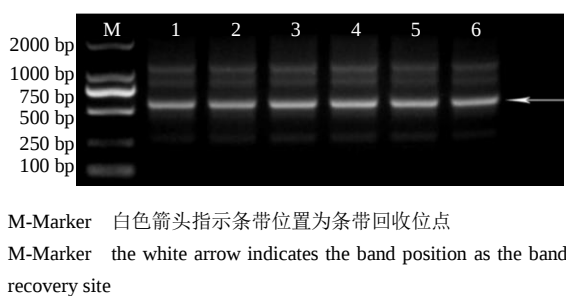


图 1 *GIRTH* 的 ORF 克隆电泳 (A) 及 *GIRTH* 的 ORF 克隆测序比对结果 (B)

Fig. 1 Electrophoresis of *GIRTH* ORF cloning (A) and *GIRTH* ORF cloning sequencing comparison results (B)



M-Marker 白色箭头指示条带位置为条带回收位点
M-Marker the white arrow indicates the band position as the band recovery site

图 2 *GIRTH* 3'RACE PCR 电泳图

Fig. 2 Electrophoresis of *GIRTH* gene 3' RACE PCR

3.3 生物信息学分析

3.3.1 ORF 的识别 利用 NCBI 提供的 ORF Finder 对得到的 *GIRTH* 序列进行分析, 如图 3 可知该序列 ORF 长为 690 bp, 共编码 229 个氨基酸。

3.3.2 保守结构域分析 将 *GIRTH* 蛋白序列于 NCBI 在线网站进行保守结构域预测。预测结果如图 4 所示, 40~173 氨基酸编码区属于 DUF778 超家族保守结构域。推测 *GIRTH* 蛋白行使转录调控因子的作用。

3.3.3 蛋白质理化性质及跨膜结构域分析 使用

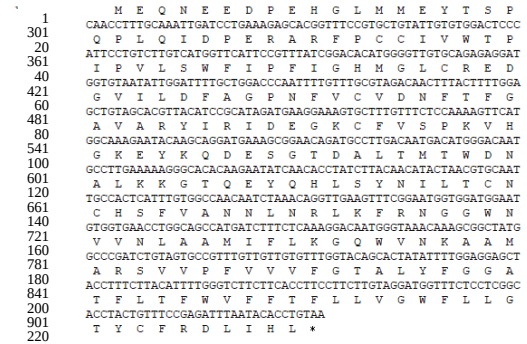


图 3 *GIRTH* 基因序列与氨基酸序列

Fig. 3 *GIRTH* gene sequence and amino acid sequence

ExPASy 对 *GIRTH* 蛋白进行了亲疏水性预测以及蛋白跨膜结构域预测, 如图 5 所示, *GIRTH* 蛋白相对分子质量为 26 150.28, 等电点为 6.05。不稳定系数为 30.08, 从而说明该蛋白稳定。总平均亲水性为 0.145, 为疏水性蛋白, *GIRTH* 蛋白在第 6 个氨基酸位点出现最低峰值, 最低峰值为-3.256, 在第 187 个氨基酸位点, 出现最高峰值, 最高峰值为 2.733。同时预测 *GIRTE1* 蛋白存在跨膜结构域。

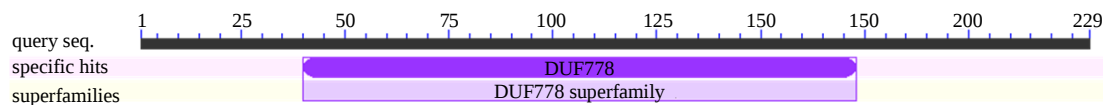


图 4 GIRTH 蛋白的保守结构预测

Fig. 4 Prediction of conserved structure of GIRTH protein

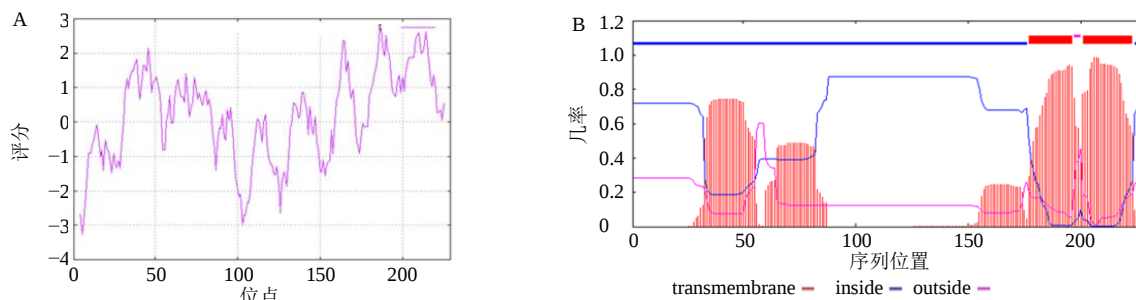


图 5 GIRTH 蛋白质亲疏水性预测 (A) 以及 GIRTH 蛋白质跨膜结构域分析 (B)

Fig. 5 Prediction of hydrophilicity and hydrophobicity of GIRTH protein (A) and GIRTH protein transmembrane domain (B)

3.3.4 蛋白质二级、三级结构预测 对 GIRTH 蛋白二级结构进行预测。结果如图 6-A 所示, GIRTH 二级结构中有 70 个氨基酸参与形成了 α -螺旋, 占 30.57%。55 个氨基酸参与了延伸链的形成, 占 24.02%。95 个氨基酸参与了无规卷曲的形成, 占 41.48%。GIRTH 主要结构均为 α -螺旋和无规卷曲, α -螺旋是最为稳定的蛋白质空间结构, 其中 α -螺旋的比例仅为 30.57%, 因此推测此蛋白稳定性一般。对 GIRTH 蛋白与 AtRTH

蛋白进行三级结构预测。结果如图 6-B 所示, 预测 AtRTH 蛋白使用模体为 4q95.1.B, 预测 GIRTE1 蛋白使用模体为 4q95.1.A, GIRTH 蛋白三级结构包含了 103 个氨基酸, 占编码氨基酸总数的 44.98%可信度较高。通过比对发现 GIRTH 与 AtRTH 预测蛋白空间结构较为相似, 普遍包含空间结构相似的无规则卷曲、 β -片层、 α -螺旋 3 种空间结构, 推测两者蛋白在功能上可能存在一定的保守型与相似性。

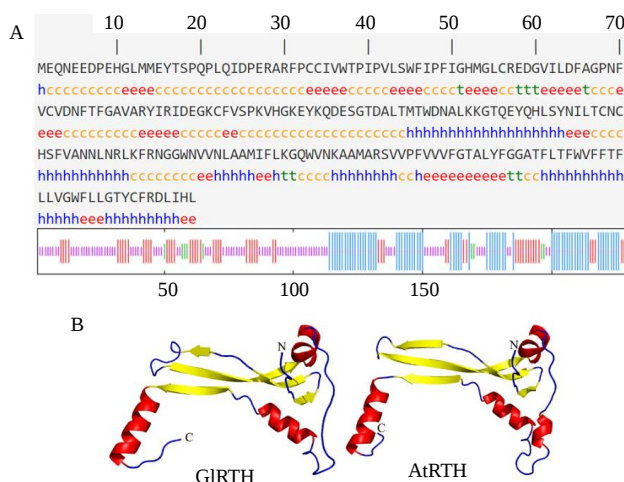


图 A 中蓝色线段部分为 α -螺旋, 红色线段部分为延伸链, 绿色线段部分为 β -转角, 紫色线段部分为无规则卷曲; 图 B 中蓝色部分为无规则卷曲, 红色部分为 α -螺旋, 黄色部分为 β -折叠, N、C 分别标注了珊瑚菜 RTH 蛋白的氮端和碳端

In figure A α -helix (blue line); Extension chain (red segment); β -turn (green segment); random coil (purple segment); In figure B blue part for random coil, red part is α -helix, yellow part is the β -sheet, N, C, respectively, marked the RTH protein nitrogen and carbon.

图 6 GIRTH 蛋白的二级结构预测 (A) 以及 GIRTH 与 AtRTH 蛋白三级结构预测 (B)

Fig. 6 Prediction of secondary structure of GIRTH protein (A) and tertiary structure of GIRTH protein and AtRTH protein (B)

3.3.5 GIRTH 蛋白系统进化分析与氨基酸比对 对不同物种的 RTH 蛋白进行了氨基酸序列比对与系统进化树分析, 如图 7-A 所示, GIRTH 蛋白与在这些序列中珊瑚菜的 RTH 蛋白与黄胡萝卜 *Daucus carota* subsp. *sativus* 的 RTH 蛋白亲缘关系最近, 而与豇豆 *Vigna unguiculate* L.、铁皮石斛 *Dendrobium catenatum* L.、拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. 的 RTH 蛋白亲缘关系较远, 因此符合进化关系。

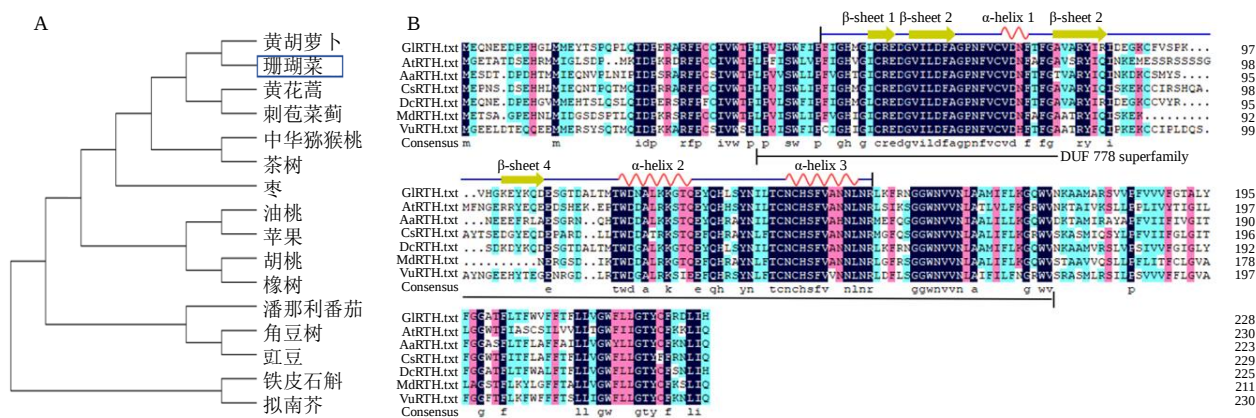
通过 GIRTH 蛋白与其他物种 RTH 蛋白氨基酸比对结果图 7-B 发现, 图中所有物种的 RTH 蛋白存在部分保守性基序, 从而说明图中各个物种的 RTH 蛋白存在一定的同源性。对图中所有物种 RTH 蛋白进行三级结构及保守结构域预测, 结果显示各蛋白结构均与 GIRTH 蛋白结构相似, 各蛋白氨基酸序列均包含 1 个 DUF778 超家族的蛋白

保守结构域。

3.4 GIRTH 基因的表达量分析

3.4.1 不同部位的表达量分析 以珊瑚菜花为对照, 分析根、叶、花不同部位的 GIRTH 基因表达量差异。图 8 可以看出, 在珊瑚菜的不同部位 GIRTH 基因的表达量存在明显差异, 该基因在花中的表达要明显高于叶和根, 而在根和叶中的表达没有显著差异。以上结果表明, GIRTH 在不同的部位功能有所差异。

3.4.2 盐胁迫和 ACC 处理后表达量分析 不同时间 200 mmol/L NaCl 以及 100 mmol/L ACC 处理叶片后得到的 GIRTH 基因表达结果如图 9 所示: 经过 200 mmol/L NaCl 处理后, 珊瑚菜 GIRTH 基因表达量有明显的变化, 整体均为上调趋势, 36 h 最为显著。由图 9-B 可以看出 ACC 处理 3 h 时 GIRTH 基因表达量上调显著, 而在 6 h 和 12 h 时 GIRTH 基因表达量下调, 整体呈先上升再下降的趋势。



在 7 个 RTH 蛋白比对序列中, 深紫色为相同氨基酸, 紫色、浅蓝色与白色表示存在差异氨基酸, 黑色直线表示 RTH 蛋白保守结构域
dark purple is the same amino acid, purple, light blue and white indicate the differential amino acid, and the black straight line indicates the conserved domain of RTH protein in seven RTH protein alignment sequences

图 7 GIRTH 蛋白系统进化树 (A) 以及 GIRTH 蛋白与其他物种氨基酸比对 (B)

Fig. 7 Phylogenetic tree of GIRTH protein (A) and comparison of GIRTH protein with amino acids of other species (B)

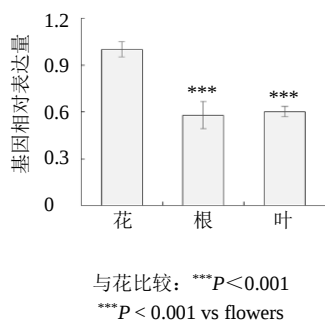


图 8 珊瑚菜 GIRTH 基因组织表达分析

Fig. 8 Differential expression analysis of GIRTH gene in leaves, roots and flowers of *G. littoralis*

4 讨论

珊瑚菜作为我国重要的传统中药材, 具有养阴清肺、镇咳祛痰等功效, 同时作为主要生长于沙质环境的盐生植物, 珊瑚菜在盐碱地改良上也起到了不容忽视的作用。本研究筛选得到了药用盐生植物珊瑚菜中响应盐胁迫的乙烯信号分子 GIRTH 基因, 首次克隆得到该基因的 ORF 全长, 并通过生物信息学以及表达量分析对该基因进行了初步研究, 为后续的研究奠定了基础。

有研究表明, 跨膜蛋白 RTE1 负向调节乙烯信号受体蛋白 ETR1 从而参与乙烯信号转导^[18], 如在

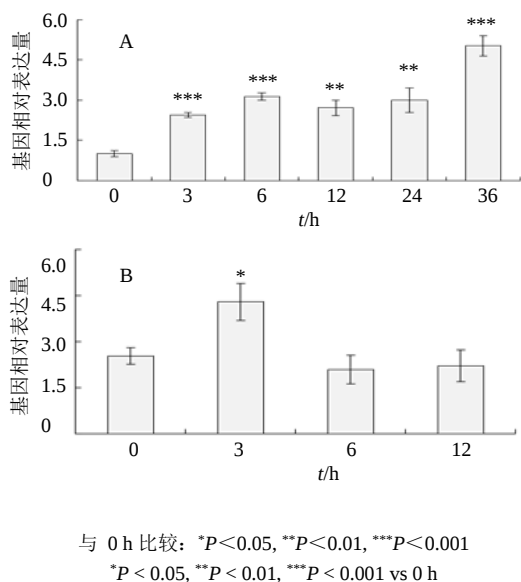


图9 NaCl (A) 以及 ACC (B) 处理不同时间 *GIRTH* 基因表达

Fig. 9 *GIRTH* gene expression at different NaCl (A) and ACC (B) treatment time

拟南芥中过表达月季的 *RhRTE1* 基因起到了降低乙烯敏感性的作用^[19]。在拟南芥中, *RTH* 作为 *RTE1* 基因家族的唯一同源基因同样是通过 *RTE1* 在调节乙烯反应和信号传导方面发挥作用, *RTH* 缺失突变体对外源性 ACC 的敏感性较低, 而 *RTH* 过表达导致乙烯超敏反应^[12]。水稻 *OsRTH1* 过表达回补了 *rte1-2* 功能缺失突变, 并以 *ETR1* 依赖的方式导致植株乙烯不敏感^[20]。

植物激素在抵御非生物胁迫中发挥了关键作用, 乙烯作为一种气态植物激素同样参与到了植物应对非生物胁迫中^[18,21], 当植物体接收到胁迫信号时, 体内乙烯含量发生改变, 乙烯信号通过相应的信号转导途径进行传递后, 可以对下游相关基因进行调控, 进而使植物细胞在生理水平发生变化, 以应对胁迫^[22]。乙烯信号转导途径中的各个组分均参与植物的盐胁迫反应。如拟南芥中乙烯信号传导的中心膜蛋白 *EIN2* 的突变导致极端的盐敏感性, 而 *EIN2* 的过表达抑制了 *ein2-5* 的盐敏感性, 这表明 *EIN2* 参与了拟南芥耐盐反应^[23]。*EIN3* 是乙烯信号转导中的正调控因子, 拟南芥中缺失突变体 *ein3-1* 对盐的敏感性明显增加而过表达株系则表现出低盐敏感性^[15]。拟南芥中乙烯信号通路下游组分 *AtNAC2* 的表达量受到盐和乙烯两者同时诱导, 而盐对该基因的诱导依赖于乙烯信号途径^[24]。过表达

乙烯受体 *NtHK1* 使烟草对盐胁迫更敏感^[25]。ERFs 作为 *EIN3* 的下游调控因子, 对植物响应盐胁迫也能起到一定的作用^[26]。

对珊瑚菜进行 NaCl 和 ACC 处理后表达量分析结果显示, 2 种处理后 *GIRTH* 基因表达量均变化明显, 在 3 h 时均呈现上调趋势, 说明 *GIRTH* 蛋白是乙烯的响应因子, 并且与珊瑚菜的耐盐性相关。*GIRTH* 基因的表达量在 ACC 处理后先于 NaCl 处理达到峰值。推测 *GIRTH* 可能通过响应乙烯信号对下游基因进行调控, 从而影响珊瑚菜的耐盐性。本实验室前期在拟南芥中对 *AtRTH* 基因的表达、亚细胞定位、蛋白互作、作用机制开展了一系列研究^[12]。根据前期研究, 推测珊瑚菜中响应盐胁迫的乙烯信号转导通路的大体途径可能如下: *RTH* 接受乙烯信号继而影响 *RTE1*, *RTE1* 负向调节受体蛋白 *ETR1*, 然后将其传递给受体 *CTR1* 和 *EIN3*, 最终影响下游 ERFs 家族, 诱导一些盐胁迫相关的基因表达, 从而引起珊瑚菜的耐盐反应。

本研究首次在药用植物珊瑚菜中对该基因开展分析, 有助于揭示乙烯信号通路和药用植物抗盐反应的关系, 后续将继续对此基因的具体功能及其在植物抗盐反应中的分子及生化机制开展研究。本研究为提高盐生植物珊瑚菜及其他药用植物耐盐性提供了一定研究依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Mathias M E. Studies in the Umbelliferae. II [J]. *Ann Mo Bot Gard*, 1928, 16: 393-398.
- [2] 单人骅, 余孟兰. 中国植物志 (第 55 卷第 3 分册) [M]. 北京: 科学出版社, 1992: 77-79.
- [3] 中国药典 [S]. 一部. 2022: 103-104.
- [4] 李彬, 王爱兰. 珊瑚菜 ITS 序列的 PCR 扩增与测序分析 [J]. 鲁东大学学报: 自然科学版, 2018, 34(4): 321-326.
- [5] 辛华. 珊瑚菜的发育解剖学及其主要化学成分研究 [D]. 南京: 南京林业大学. 2009.
- [6] Li H, Zhao Q Y, Huang H. Current states and challenges of salt-affected soil remediation by cyanobacteria [J]. *Sci Total Environ*, 2019, 669: 258-272.
- [7] 李宏博. 珊瑚菜耐盐生理机制及液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因的克隆与分析 [D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2012.
- [8] 刘奕嫩, 于洋, 方军. 盐碱胁迫及植物耐盐碱分子机制研究 [J]. 土壤与作物, 2018, 7(2): 201-211.
- [9] Abeles F B, Morgan P W, Saltveit M E. *Ethylene in Plant*

- Biology [M]. 2nd ed. San Diego: Academic Press, 1992: 23.
- [10] Chang C, Kwok S F, Bleecker A B, *et al.* *Arabidopsis* ethylene-response gene ETR1: Similarity of product to two-component regulators [J]. *Science*, 1993, 262(5133): 539-544.
- [11] Hua J, Sakai H, Nourizadeh S, *et al.* EIN4 and ERS2 are members of the putative ethylene receptor gene family in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 1998, 10(8): 1321-1332.
- [12] Zheng F F, Cui X K, Rivarola M, *et al.* Molecular association of *Arabidopsis* RTH with its homolog RTE1 in regulating ethylene signaling [J]. *J Exp Bot*, 2017, 68(11): 2821-2832.
- [13] Resnick J S, Rivarola M, Chang C R. Involvement of RTE1 in conformational changes promoting ETR1 ethylene receptor signaling in *Arabidopsis* [J]. *Plant J*, 2008, 56(3): 423-431.
- [14] 张弢, 董春海. 乙烯信号转导及其在植物逆境响应中的作用 [J]. *生物技术通报*, 2016, 32(10): 11-17.
- [15] Wang Y N, Liu C, Li K X, *et al.* *Arabidopsis* EIN2 modulates stress response through abscisic acid response pathway [J]. *Plant Mol Biol*, 2007, 64(6): 633-644.
- [16] Zhang L X, Li Z F, Quan R D, *et al.* An AP2 domain-containing gene, ESE1, targeted by the ethylene signaling component EIN3 is important for the salt response in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2011, 157(2): 854-865.
- [17] Asensi-Fabado M A, Cela J, Müller M, *et al.* Enhanced oxidative stress in the ethylene-insensitive (ein3-1) mutant of *Arabidopsis thaliana* exposed to salt stress [J]. *J Plant Physiol*, 2012, 169(4): 360-368.
- [18] Tao J J, Chen H W, Ma B, *et al.* The role of ethylene in plants under salinity stress [J]. *Front Plant Sci*, 2015, 6: 1059.
- [19] 孙翠慧, 刘道凤, 张帅, 等. 月季 RhRTE1 的克隆及其对乙烯响应特性分析 [J]. *园艺学报*, 2012, 39(10): 1975-1982.
- [20] Zhang W, Zhou X, Wen C K. Modulation of ethylene responses by OsRTH1 overexpression reveals the biological significance of ethylene in rice seedling growth and development [J]. *J Exp Bot*, 2012, 63(11): 4151-4164.
- [21] Kemal K. Diverse roles of jasmonates and ethylene in abiotic stress tolerance [J]. *Trends Plant Sci*, 2015, 20(4): 219-229.
- [22] 赵赫, 陈受宜, 张劲松. 乙烯信号转导与植物非生物胁迫反应调控研究进展 [J]. *生物技术通报*, 2016, 32(10): 1-10.
- [23] Lei G, Shen M, Li Z G, *et al.* EIN2 regulates salt stress response and interacts with a MA3 domain-containing protein ECIP1 in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell Environ*, 2011, 34(10): 1678-1692.
- [24] Balazadeh S, Siddiqui H, Allu A D, *et al.* A gene regulatory network controlled by the NAC transcription factor ANAC092/AtNAC2/ORE1 during salt-promoted senescence [J]. *Plant J*, 2010, 62(2): 250-264.
- [25] Cao W H, Liu J, Zhou Q Y, *et al.* Expression of tobacco ethylene receptor NTHK1 alters plant responses to salt stress [J]. *Plant Cell Environ*, 2006, 29(7): 1210-1219.
- [26] Cheng M C, Liao P M, Kuo W W, *et al.* The *Arabidopsis* ethylene response factor1 regulates abiotic stress-responsive gene expression by binding to different cis-acting elements in response to different stress signals [J]. *Plant Physiol*, 2013, 162: 1566-1582.

[责任编辑 时圣明]