

DOI:10.11937/bfyy.201711021

桃 *PpSnRK1 β 1* 基因的克隆及在拟南芥中异源转基因的功能分析

赵永飞, 陈晓璐, 彭福田, 罗静静, 赵鑫, 肖元松

(山东农业大学 园艺科学与工程学院, 作物生物学国家重点实验室, 山东 泰安 271018)

摘 要:以实生毛桃为试材,采用 PCR 和实时荧光定量技术,克隆桃树 SnRK1 蛋白激酶(蔗糖非发酵-1-型相关蛋白激酶-1)的调节亚基 β ,并分析其组织表达特性。构建 p35S:: *PpSnRK1 β 1* 重组载体,获得超表达 *PpSnRK1 β 1* 基因拟南芥植株用于分析其生物功能。结果表明:克隆获得桃树 *SnRK1 β 1*,命名为 *PpSnRK1 β 1*。该 cDNA 全长为 1 476 bp,编码 492 个氨基酸。序列分析表明,其包含 CBM 和 4 个 CBS 结构域;*PpSnRK1 β 1* 与果梅的 SnRK1 β 蛋白亲缘关系最近;*PpSnRK1 β 1* 基因在实生毛桃的根、茎、叶均有表达,其中在茎中表达量最低。超表达 *PpSnRK1 β 1* 基因拟南芥株系 A- β 1 的花期比野生型晚 2.19 d,单株莲座叶数量比野生型多 1.17 片;叶片的叶绿素、可溶性糖和可溶性蛋白质含量均显著高于野生型拟南芥,分别比野生型提高了 13.7%、12.9%和 23.3%,但淀粉含量却没有显著性差异。在氧化胁迫条件下,转基因植株与野生型的生长均受到抑制,但前者具有更好的萌发率和主根长度,以保证植株正常生长。因此,*PpSnRK1 β 1* 基因参与调控植株的碳氮代谢,并影响植物的花期,以及在防御氧化胁迫过程中起重要作用。

关键词:桃树; *PpSnRK1 β 1*; 基因克隆; 表达分析; 功能研究

中图分类号:S 662.103.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)11-0098-09

桃树(*Amygdalus persica* L.)属蔷薇科桃属木本植物,是重要的果树种类,在世界范围内被广泛栽培^[1-2],但桃树如何根据环境的变化来调整自身的代谢过程,其作用机理仍未知。因此,在桃树中挖掘与代谢相关基因,并探索分析关键基因功能,为桃树的高产优质栽培提供参考依据。SnRK1 蛋白激酶(蔗糖非发酵-1-型相关蛋白激酶-1)是植物体内的生理活动调控枢纽之一,参与调控植物代谢、生长发育和胁迫等多个生理过程^[3-6]。SnRK1 不仅可在转录水平上调控蔗糖合成酶(SS)^[7]和 α -淀粉酶^[8]基因的表达,而且可直接磷酸化蔗糖磷酸合成酶(SPS)^[9],这说明 SnRK1 参与调控碳代谢。反义表达 SnRK1 大

麦的花粉粒较小、呈梨形,基本不含淀粉^[10];将反义表达 SnRK1 马铃薯块茎储藏 5℃,块茎均不发芽,可能原因是作为储藏的淀粉无法移动^[11],可见 SnRK1 在植物的生长发育过程中起重要作用。SnRK1 也参与植物对胁迫的调控,比如在盐胁迫条件下,转反义 *StubGAL83* 马铃薯的根和块茎生长受到抑制,表现其对盐的超敏感性,说明 SnRK1 激活植物对盐胁迫的防卫系统^[12]。以上研究表明,SnRK1 蛋白激酶对调控植物的代谢、生长发育和胁迫过程起重要作用。

SnRK1 蛋白激酶是异源三复合物,是由催化亚基 α 和调节亚基 β 和 γ 组成^[13-15]。而 LUMBRERAS 等^[16]首次在玉米中发现 *ZmAKIN β 1* 和 *ZmAKIN β 2*,其结构是在调节亚基 γ 的 N 端融合 β 亚基的 CBM 结构域,与酵母 SNF4 和动物 AMPK γ 亚基同源。随后 RAMON 等^[17]发现 SnRK1 β 亚基只存在于植物界中,并且能与催化亚基 α 组成异源二聚体^[16],也能与催化亚基 α 、调节亚基 β 组成异源三聚体^[18-19],调节 SnRK1 复合物的活性。GAO

第一作者简介:赵永飞(1990-),女,硕士研究生,研究方向为果树分子生物学。E-mail:zhao781990zhaoliu@163.com.

责任作者:彭福田(1969-),男,博士,教授,博士生导师,研究方向为果树营养生理与施肥技术。E-mail:pft@sdau.cn.

基金项目:国家现代农业产业技术体系建设专项资金资助项目(CARS-31)。

收稿日期:2017-02-08

等^[20]发现拟南芥 *kin* 突变体的花粉无法在柱头表面萌发完成杂交过程,原因是线粒体和过氧化物酶体结构和数量发现异变,可见 *AKIN* 参与植物花粉杂交过程。GISSOT 等^[18]证明 *AKIN* 能与线虫抗性基因 *AtHSPRO1* 和 *AtHSPRO2* 互作,推测 *SnRK1* 可能参与植物与病原物的相互作用。因此, *SnRK1* 基因不仅参与植物的生长发育过程,而且也参与调控植物防御反应。 *PpSnRK1* 与拟南芥 *AKIN*、玉米 *ZmAKIN* 高度同源,属于典型的 *SnRK1* 亚基。目前关于 *SnRK1* 的研究主要是以拟南芥、玉米和苜蓿等草本植物为试材,而木本植物 *SnRK1* 尚鲜见其基因被克隆与鉴定的报道,其表达调控特征及在植物体内的生理功能尚不清楚。

该研究拟在毛桃中克隆 *PpSnRK1* 基因并进行序列分析,及在桃树不同组织中的表达特性;利用转基因技术,将桃树 *PpSnRK1* 基因通过农杆菌浸染花序法在拟南芥中进行过量表达,分析其生物学功能,并对 *PpSnRK1* 参与的信号途径进行初步分析,为提高桃树的抗逆性提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

毛桃种子 (*Prunus persica* (Linn.) Batsch.) 在山东省泰安市红庙桃树基地进行层积处理,种植条件为 22~25 °C,光强为 230~260 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$,相对湿度为 50%~60%。当桃苗生长至 9~10 片叶时,分别取其根、茎和叶,并用液氮冷冻,保存于 -80 °C。

将超表达 *PpSnRK1* 拟南芥株系 A- $\beta\gamma 1$ 与野生型拟南芥 (Columbia 型, WT) 的种子,经蒸馏水浸泡 2 h 后,于超净工作台上进行消毒后,播种于 MS 固体培养基,4 °C 冷处理 24 h 后,置于光照周期 16 h/8 h、温度 (21±2) °C、相对湿度为 (70±5)% 的条件下生长。拟南芥生长至 4~6 片真叶时,将其转移到含基质和蛭石的营养钵中继续生长。

1.2 试验方法

1.2.1 转化载体的构建和转化 以毛桃根系的 cDNA 为模板,使用扩增引物进行 PCR,其中扩增引物列见表 1。PCR 产物被克隆到 pMD 19T simply 载体上 (TaKaRa Co. Ltd., Dalian, China), 然后测序。*PpSnRK1* 被 *XbaI* 和 *EcoRI* 进行酶切,然后转化到 pBI121 表达载体上。重组载体被转化到农杆菌 LBA4404。利用花序法侵染拟南芥,方法参考 CLOUGH 等^[21]的方法。将待检测的拟南芥种子种植在含有 0.1% 卡那霉素 (kanamycin) 的 MS 培养基

进行筛选,当拟南芥植株生长至 10~12 片叶时,使用扩增引物进行 PCR 进一步的筛选。将筛选到转基因植株 T₃ 代进行后续试验。

1.2.2 RNA 提取和荧光定量 qPCR 使用从北京康为世纪公司购买的 Trizol 试剂提取桃树总 RNA,利用琼脂糖凝胶电泳检测其完整性和浓度。利用 Primescript RT Reagent Kit (TaKaRa) 说明书合成 cDNA。采用 qRT-PCR 对 *PpSnRK1* 进行组织表达特异性表达分析,每个处理至少 3 次重复。以上述反转录 cDNA 为模板,反应体系 A 为 20 μL ,包括 SYBR Real-time PCR Premixture (2×) 10 μL ,上游和下游引物 (表 1) 各为 0.5 μL ,cDNA 模板为 2 μL ,无菌水为 7 μL 。反应条件为 95 °C 预变性 5 min;95 °C 变性 30 s,55 °C 30 s,72 °C 延伸 30 s,共 45 个循环。循环结束后设置 65~95 °C 生成熔解曲线。在调整 baseline cycles 和计算阈值后,得出 Ct 值。

表 1 引物序列

Table 1	Primer sequences
引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence
<i>PpSnRK1</i> $\beta\gamma 1$ -F	5'-GGGTACCATGTTTGCTACCAACATGGATT-3'
<i>PpSnRK1</i> $\beta\gamma 1$ -R	5'-GGGTGACCTAACAAGCAAGAAGCTTGAAAAT-3'
<i>PpSnRK1</i> $\beta\gamma 1$ (RT)-S	5'-GTAAGTCCAGAGATAACTTC-3'
<i>PpSnRK1</i> $\beta\gamma 1$ (RT)-A	5'-TATCCTCGGTACTACATC-3'

1.2.3 克隆片段的生物信息学分析 采用软件 DNAMAN 对氨基酸序列进行多重比对,进行相似度比较;使用软件 MEGA 5.0^[22] 绘制系统进化树,分析其亲缘关系。利用 NCBI CDD^[23] 在线工具进行蛋白质的结构域分析。

1.3 项目测定

1.3.1 拟南芥花期和莲座叶的统计 拟南芥花期和莲座叶的统计参考刘杰^[24]的方法,每组不少于 25 株。

1.3.2 叶绿素、可溶性糖、淀粉和可溶性蛋白质含量的测定 叶绿素含量测定采用乙醇比色法;可溶性糖和淀粉含量测定采用蒽酮比色法;可溶性蛋白质含量测定采用考马斯亮蓝法。

1.3.3 氧化胁迫下拟南芥种子的萌发率和主根长

将超表达 *PpSnRK1* 拟南芥株系 A- $\beta\gamma 1$ 和野生型的种子,种植在含有 0.1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甲基紫精 (MV) 的 MS 固体培养基上,4 °C 冷处理 24 h 后转移至人工培养室中,进行垂直放置培养。当拟南芥的胚根出现时统计萌发率;当拟南芥生长 8 d 左右,统计拟南芥的主根长。统计参照 HAN 等^[25]的方法。

1.4 数据分析

采用 Excel 和 SPSS 19.0 软件进行数据分析处

理,采用 Duncan's 多重比较法进行统计。

2 结果与分析

2.1 *PpSnRK1 β 1* 基因的同源性分析

以实生毛桃根的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,获得的目的条带约 1 500 bp(图 1),经克隆、测序确定,其 cDNA 全长为 1 476 bp,编码 492 个氨基酸,与桃基因组中的 *ppa004800m* 基因的开放阅读框(ORF)序列一致。利用 NCBI CDD 在线工具,预测扩增片段的氨基酸序列的结构域,如图 2 所示,其含有 CBM 和 4 个 CBS 保守结构域,该结构域家族被认为与 AKIN β -like 家族,即 FCD-1a 家族^[17];同时通过与拟南芥、玉米和番茄的 *SnRK1 β* 进行氨基酸序列比(图 3),相似性达到 78.67%。因此推测扩增片段为 *SnRK1 β* 基因,命名为 *PpSnRK1 β 1*。

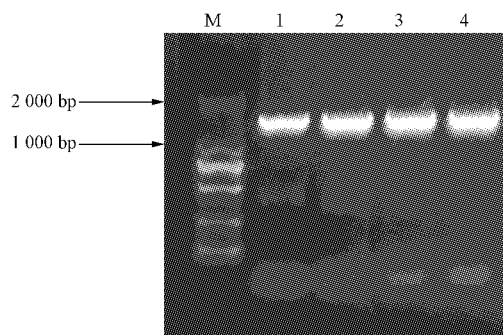
利用 MEGA 5.0 软件通过 Neighbor-Joining (NJ)法构建氨基酸序列的进化树,研究 *PpSnRK1 β 1* 与其它植物 *SnRK1 β 1* 的亲缘关系,图 4 结果显示, *PpSnRK1 β 1* 与果梅、草莓和苹果的 *SnRK1 β* 聚为一类,其与果梅 *SnRK1 β* 关系最近。从进化树上看,相同科属的植物聚为一类,但不同科属的植物间 *SnRK1 β* 也有很高的同源性,因此推测 *SnRK1 β* 在进化过程中是相当保守的。

2.2 不同组织 *PpSnRK1 β 1* 基因表达量分析

利用实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)技术,以桃 β -actin 为内参,分析了 *PpSnRK1 β 1* 基因在实生毛桃的根、茎、叶片的表达情况。结果表明 *PpSnRK1 β 1* 基因在桃树的各个组织中均有表达,但不同组织间的表达量存在明显差异。在实生毛桃中, *PpSnRK1 β 1* 基因在根中表达量是茎中的 7.73 倍(图 5)。

2.3 超表达 *PpSnRK1 β 1* 拟南芥植株的获得与鉴定

重组载体 p35S:: *PpSnRK1 β 1* 转化到农杆菌 LBA4404,利用花序法侵染拟南芥。将待检测的拟南芥种子种植在抗性培养基上,能正常生长的是转化成功的植株,而黄化死亡的是未转化成功的植株。将初筛得到的幼苗移栽到培养钵中继续培养,当生长至 10~12 片时,剪取叶片进行基因组 DNA 的提取,使用目的片段扩增引物进行 PCR 检测,电泳结果出现目的条带(图 6A),表明 *PpSnRK1 β 1* 基因已经整合到拟南芥基因组中。提取植株 RNA,再次进行 PCR 检测,电泳结果出现目的条带(图 6B),结果显示 *PpSnRK1 β 1* 基因能够在拟南芥中进行转录表达。



注: M, Marker 2 000; 1~4. *PpSnRK1 β 1* 扩增条带。

Note: M, Marker 2 000; 1~4. *PpSnRK1 β 1* amplification bands.

图 1 *PpSnRK1 β 1* 基因的克隆

Fig. 1 Cloning of *PpSnRK1 β 1* gene

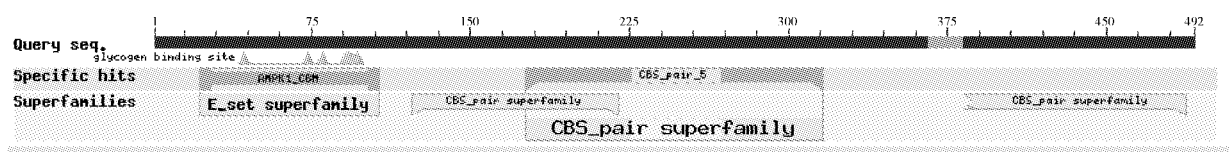


图 2 *ppa004800m* 编码蛋白质结构预测

Fig. 2 Protein structure prediction of *ppa004800m*

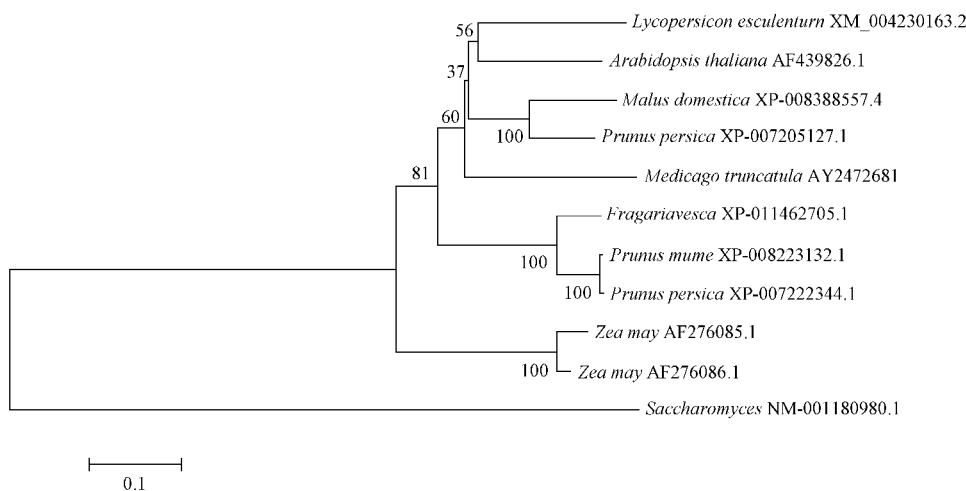
AF276086	MFSHGADSAHDAGAVGVSSSGATVPTTRFVWPYGGKRVFVS	40
AF439826	MEGSTLDSRGNSAA...SQQLITPRFVWPYGGKRVFVS	37
ppa004800m	MPATNMDSARLVGGA...PSTVLIIMRFVWPYGGKRVFVS	37
XM-004230163	MESGSDSGGNHTGV...AGAVIMPTTRFVWPYGGKRVFVS	37
Consensus	mf ds p rfvwp ygg v s	
AF276086	GSETRWSEHLEMSPIEGCPTVFCAICSLSPGTHSYKFFVD	80
AF439826	GSETRWTEHVEMLPIEGCPTVFQVVICNLTPGYHGYKFFVD	77
ppa004800m	GSETRWSELIEPTVEGCPTEVFCAIYSVTIPGYHGYKFFVD	77
XM-004230163	GSETRWQDHITMSEMEGCPTEVFVVCNIVPGYHGYKFFVD	77
Consensus	gsf rw m p egcptvfq pg h ykffvd	
AF276086	GEWRHDERQPTTISGEHGIIVNTILYLTREYNQINTLSSESTP	120
AF439826	GEWRHDERQHFVSCNGGVVNTIFITG.PDMVPAGESPEILL	116
ppa004800m	GEWRHDERQHYVSGENGIVNTIVLLATDPNFFHENVTEIT	117
XM-004230163	GEWRHDERQFVSGNYGIVNTIFLPRESDTIPELLSHDVP	117
Consensus	gew hde qp sg g vnt p	
AF276086	GSRNMMEVDNENFCRTVTLSGTVSEGTIRVSEAAICISLR	160
AF439826	GSRNMMEVDVFLRTAD....PSQEAVERMSGVDLELSR	150
ppa004800m	GSRNMMEIDEAFHRLVRIIDGNLTDVVPRIITEGDLQCSR	156
XM-004230163	GSRNMMEVDNDELH.....LDAVEQISCAEIELSR	146
Consensus	nm d sr	
AF276086	CRVSEYLSLSTCYLLLETSKGVIALDLNLPVKQAFHILYE	200
AF439826	HRISVILLSTHTAYELLRESKGVIALDLNLPVKQAFHILYE	190
ppa004800m	HRISVFLSANTTYELLRESKGVIALDLNLPVKQAFHILYE	196
XM-004230163	CRISAFLLSTHTAYELLRESKGVIALDLNLPVKQAFHILYE	186
Consensus	r s ls t y llp sgkv ald lpvkq fh l e	
AF276086	QGIEVAPLWDSFRGQFVGILSPIDFILIILRELETHGNSNLT	240
AF439826	QGIEPLAPLWDEGKGQFVGVLGPIIDFILIILRELGTGHSNLT	230
ppa004800m	QGIEPLAPLWDSFRGQFVGVLTAIDFILIILRELGNHGSNLT	236
XM-004230163	QGIEVAPLWDEGKGQFVGVLTAIDFILIILRELGTGHSNLT	226
Consensus	qgi aplwd gqfvg l dfilil el hgsnlt	
AF276086	EEGLETHSISAWKELKQTINGRNDGQWRPQ.QHIVHATPY	279
AF439826	EEGLETHSISAWKELKRAHISRCYLDGSGRPYPRFIVQVGPY	270
ppa004800m	EEGLETHSISAWKELKRAYLNGQILGHGRALPRFIIHACPY	276
XM-004230163	EEGLETHSISAWKELKRLINRQILCNLSYSRSLVGGGPY	266
Consensus	ee leth i awk k d py	
AF276086	ESLHDIAVAILQNGISTVFVYSSSSDGSFPQLLHLASLS	319
AF439826	ENLHDVALKILQNKVAIVYSSSLQDGSFPQLLHLASLS	310
ppa004800m	ENMDIVVLKILLQNEVATVPIHSSSEDGTFPQLLHLASLS	316
XM-004230163	ESLHLLALRLILQNVSTLPIHSSSHDGSFPQLLHLATLS	306
Consensus	d lqn p i ss dg pqlhlh ls	
AF276086	GILKCICTRYEKSTGNLPIILNCEVCSIPILGSWVEKIGDLN	359
AF439826	GILKCICTRYERHSSSLPIILCCHICSIPILGTWVPRIGESS	350
ppa004800m	GILKCICTRYERHSSSLPIILQAFIGELHVGITWVFEIGESN	356
XM-004230163	GILKCICTRYERHSSSLPIILCCHICSIPILGTWVPRIGESS	346
Consensus	gilkcicr f s lpil p g wvp ig	
AF276086	SREILAMLRNASISALNMLVQAGVSSIPIVDDNDSILIT	399
AF439826	SREILATLRNASISALAILVQAGVSSIPIVDDNDSILIT	390
ppa004800m	CRILAMLRNASISALNMLVQAGVSSIPIVDDNDSILIT	396
XM-004230163	GARVAMLRNASISALAILVQAGVSSIPIVDDNDSILIT	386
Consensus	p a lrp asl al lvqa vs ip vddndsl d	
AF276086	YRSRDITALAKAYVYTHVRLDMLHQAQLGQDANTFFG	439
AF439826	YRSRDITALAKAYVYTHVRLDMLHQAQLGQDASFFYG	430
ppa004800m	YCRSDITALAKAYAHININEMTHQAQLGQDYSYHFE	436
XM-004230163	YCRSDITALAKAYVYTHVRLDMLHQAQLGQDASFFHG	426
Consensus	y rsditalak y l hqa qlgqd p	
AF276086	IFNGQRCQCMCLRSDELKVMERLAPGVRRVIVEAGSKR	479
AF439826	IFNGQRCQCMCLRSDELKVMERLAPGVRRVIVEAGSKR	470
ppa004800m	FRS.QRCQCMCLRSDELKVMERLAPGVRRVIVEAGSKR	475
XM-004230163	IFNGQRCQCMCLRSDELKVMERLAPGVRRVIVEAGSKR	466
Consensus	qrc mclrsd l kvmerla pg rr iveagskr	
AF276086	VEGILSISLIEFFLLS	495
AF439826	VEGILSISLIEFFLLS	486
ppa004800m	VEGILSISLIEFFLLS	491
XM-004230163	VEGILSVLIEFFLLS	482
Consensus	vegi s d f lll	

注: AF439826. 拟南芥; AF276086. 玉米; XM-004230163. 番茄。

Note: AF439826. *Arabidopsis thaliana*; AF276086. *Zea mays*; XM-004230163. *Lycopersicon esculentum*.

图3 桃 *PpSnRK1 β 1* 编码基因与其它物种的 *SnRK1 β* 编码基因的氨基酸序列对比

Fig. 3 Multiple alignment of conserved region of amino acid sequences of the *PpSnRK1 β 1* with other species *SnRK1 β*



注:各节点处数值表示 bootstrap 值(1 000)。

Note: The numbers next to the nodes give 1 000 bootstrap.

图 4 *PpSnRK1βγ1* 与其它物种 SnRK1βγ 氨基酸序列的系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic relationship of amino acid sequences between *PpSnRK1βγ1* and other SnRK1βγ proteins

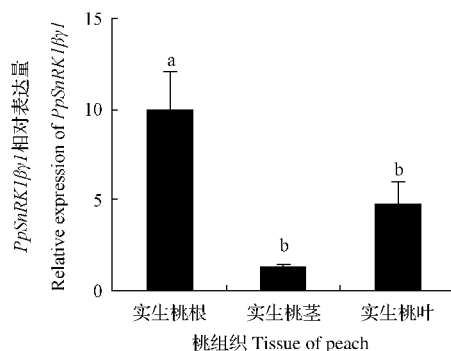
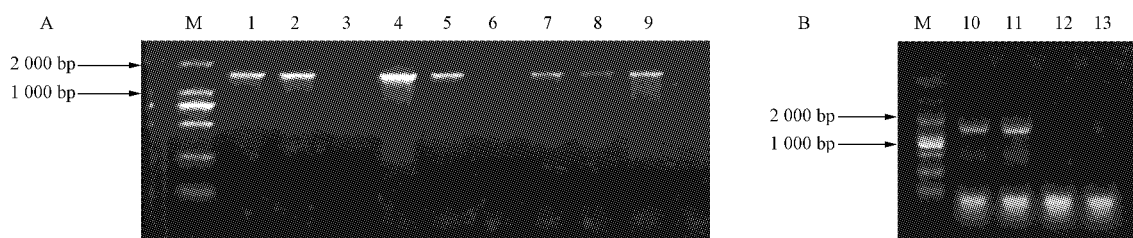


图 5 桃不同组织中 *PpSnRK1βγ1* 基因的相对表达量

Fig. 5 Relative expression of *PpSnRK1βγ1* gene in different tissue of peach



注: M. Marker 2 000; 1~13. 待检测的超表达 *PpSnRK1βγ1* 拟南芥植株。

Note: M. Marker 2 000; 1-13. The undetected overexpression *PpSnRK1βγ1* in *Arabidopsis* plant.

图 6 基因组(A)和转录物(B)水平超表达 *PpSnRK1βγ1* 拟南芥植株 PCR 检测

Fig. 6 PCR detection of overexpression *PpSnRK1βγ1* in *Arabidopsis* plant from gene (A) and transcription (B) level

2.4 超表达 *PpSnRK1βγ1* 基因对拟南芥的花期和莲座叶的影响

试验获得多个转基因拟南芥株系,通过表达水平的检测,选取表达水平高的株系进行后续的试验。将转基因植株种子播种于 MS 固体培养基上,幼苗

生长至 4~6 片时移栽至营养钵中,置于人工培养箱中培养。结果显示,超表达 *PpSnRK1βγ1* 基因拟南芥株系 A-βγ1 的花期比野生型晚 2.19 d(图 7A),单株莲座叶数量比野生型多 1.17 片(图 7B)。

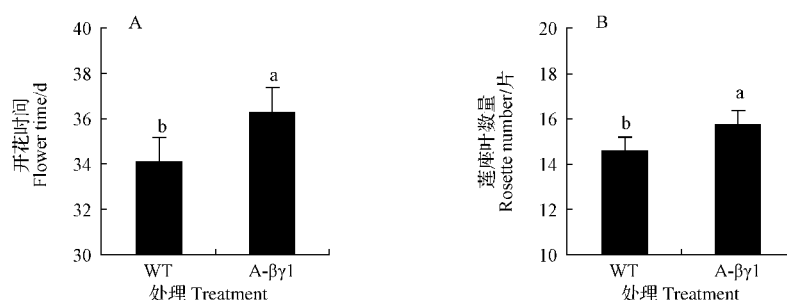
图7 超表达 *PpSnRK1βγ1* 拟南芥的花期和莲座叶数量统计

Fig. 7 The statistical analysis of flowering time and rosette number of overexpression *PpSnRK1βγ1* in *Arabidopsis* plant

2.5 超表达 *PpSnRK1βγ1* 基因对拟南芥的叶绿素、可溶性糖、淀粉和可溶性蛋白质含量的影响

叶绿素是一类与光合作用有关的最重要色素,其含量的变化直接影响着植株的光合作用,从而影响植株的光合产物,即可溶性糖和淀粉含量。在相同培养条件下,超表达 *PpSnRK1βγ1* 拟南芥 A-βγ1 和 WT 型的叶绿素含量有显著差异 ($P < 0.05$), A-βγ1 比 WT 型高 13.7% (图 8A); 超表达

PpSnRK1βγ1 拟南芥 A-βγ1 和 WT 型的可溶性糖含量有显著差异 ($P < 0.05$), A-βγ1 比 WT 型高 12.9% (图 8B); 超表达 *PpSnRK1βγ1* 拟南芥 A-βγ1 和 WT 型的可溶性蛋白质含量有显著差异 ($P < 0.05$), A-βγ1 比 WT 型高 23.3% (图 8D); 但是超表达 *PpSnRK1βγ1* 拟南芥 A-βγ1 和 WT 型的淀粉含量无显著性差异 (图 8C)。

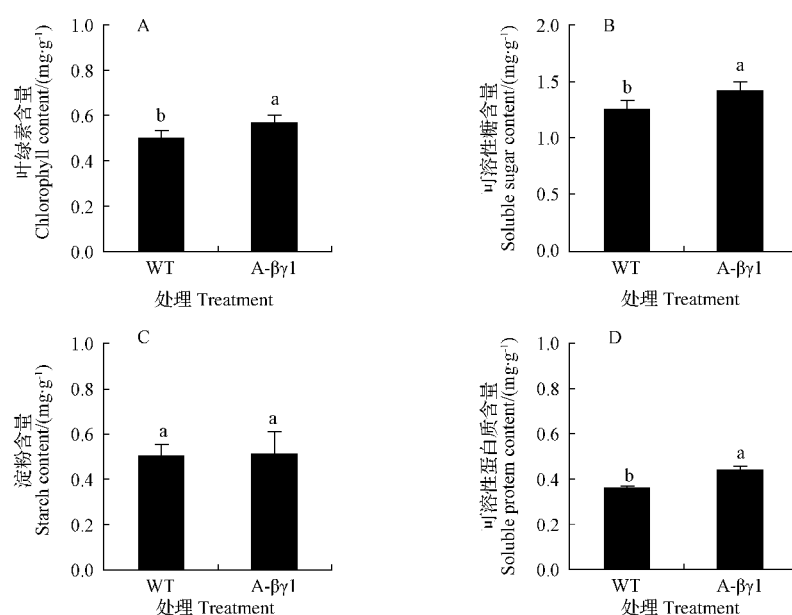
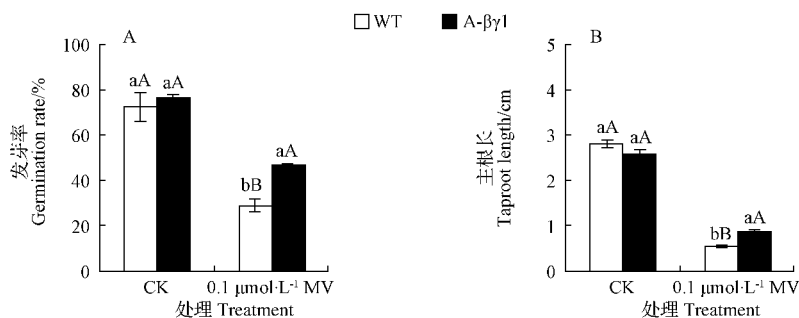
图8 超表达 *PpSnRK1βγ1* 拟南芥的叶绿素、可溶性糖、淀粉和可溶性蛋白质含量

Fig. 8 The contents of chlorophyll, soluble sugar, starch and soluble proteins in overexpression *PpSnRK1βγ1* in *Arabidopsis* plant

2.6 氧化胁迫条件下超表达 *PpSnRK1βγ1* 基因对拟南芥的萌发率和主根长的影响

相同培养条件下,不含甲基紫精(MV)的平板上, A-βγ1 和 WT 型的发芽率和主根长没有明显的差异; 0.1 μmol · L⁻¹ MV 的平板上, A-βγ1 和 WT 型的萌发率存在显著差异, A-βγ1 的萌芽率为 47.13%,

与对照相比降幅为 38.48%, 而 WT 型的萌芽率为 27.55%, 较对照下降 64.49% (图 9A), WT 型的萌发受抑制程度比转基因植株重。在含 0.1 μmol · L⁻¹ MV 的平板上, A-βγ1 的主根长均值为 0.88 cm, 降幅为 1.70 cm, 而 WT 型的主根长均值为 0.56 cm, 降幅为 2.24 cm (图 9B), WT 型的主根长受抑制幅度大。

图9 超表达 *PpSnRK1βγ1* 拟南芥的萌发率和主根长Fig. 9 Seed germination rate and taproot length of overexpression *PpSnRK1βγ1*

3 讨论

自从 LUMBRERAS 等^[16]发现 *ZmAINβγ-1* 和 *ZmAINβγ-2* 以后,人们分别在拟南芥、番茄、苜蓿等物种中进行对 *SnRK1βγ* 的功能分析,但是对于果树的 *SnRK1βγ* 的功能分析尚鲜见研究报道。该研究中,利用生物信息学对桃树 *PpSnRK1βγ1* 预测的氨基酸序列进行结构预测,发现其包括 CBM 和 4 个 CBS 结构域,这与已报道的拟南芥 *AINβγ* 和玉米 *ZmAINβγ-1* 与 *ZmAINβγ-2* 的结构一样^[16,18]; 同源性分析显示桃树 *PpSnRK1βγ1* 氨基酸序列与其它物种的 *SnRK1βγ* 具有很高的同源性,进化树分析发现相同科或类群的植物聚为一类, *PpSnRK1βγ1* 与果梅的 *SnRK1βγ* 亲缘关系最近,同时发现不同植物间 *SnRK1βγ* 也有很高的同源性,推测 *SnRK1βγ* 在进化过程中保持了遗传稳定性。

组织特异性表达结果分析, *PpSnRK1βγ1* 在实生毛桃的根、茎和叶中均有表达,在根中表达量最大(图 5)。拟南芥 *AINβγ* 在各个组织均有表达,主要在根和角果中表达^[18]。同时有研究发现,玉米 *ZmAINβγ-1* 与 *ZmAINβγ-2* 在开花后 30 d 即胚胎发育早期表达量较高,而在开花 60 d 后即胚胎成熟后期表达量几乎检测不到^[16]; 番茄 *LeSNF4* 在种子形成过程中及种子完成休眠之前,表达量保持较高,当种子完成休眠, *LeSNF4* 的表达量几乎检测不到^[26]。综合前人的研究与该研究可见, *SnRK1βγ* 基因有广泛的组织表达特异性,但不同时期的表达特性可能参与的代谢途径不同。

尽管常常使用生物学信息推测基因功能,但是通过对其进行功能分析,才能说明它在植物发育过程中的作用。通过对超表达 *PpSnRK1βγ1* 拟南芥株系的生理形态进行观察,即花期比野生型晚 2.19 d (图 7A),单株莲座叶数量比野生型多 1.17 片(图 7B)。BAENA-GONZÁLEZ 等^[28]发现在长日照条件

下,与野生型拟南芥相比,超表达 *KIN10* 的拟南芥花期推迟,并延迟衰老进程。该实验室早期也证明超表达 *PpSnRK1α* 拟南芥株系和超表达 *PpSnRK1β2* 拟南芥株系,也表现为开花时期延迟和衰老延缓的现象^[29]。由以上研究可见, *SnRK1* 蛋白激酶在调控拟南芥花期及衰老进程中起重要的作用。

SnRK1 是植物体内生理活动调控枢纽之一,调控植物的碳氮代谢过程。MCKIBBIN 等^[30]发现将马铃薯中 *SnRK1* 基因超表达后,块茎中淀粉含量比未转化植株显著提高; TIESSEN 等^[31]在反义表达 *SnRK1* 马铃薯块茎中, *AGPase* 的氧化还原状态消失了,淀粉含量降低,由此可见 *SnRK1* 参与调控植物的碳代谢与淀粉代谢。RADCHUK 等^[32]在反义表达 *SnRK1* 大豆胚胎中,自由氨基酸含量降低,而糖和糖酵解中间物的含量升高或保持不变,这说明在反义表达 *SnRK1* 大豆胚胎中,抑制碳骨架用于氨基酸合成。由以上研究说明 *SnRK1* 在碳氮互作中起重要作用。在该研究中,超表达 *PpSnRK1βγ1* 拟南芥叶片中叶绿素、可溶性糖和可溶性蛋白质的含量分别升高了 13.7%、12.9% 和 23.3%,但淀粉含量与 WT 型无明显差异(图 8),推测可能的原因:一是蛋白质的合成需要碳源,而淀粉作为储藏的碳源,被分解成可溶性糖,从而合成蛋白质;二是 *PpSnRK1βγ1* 基因可能参与植物碳氮互作相关基因的调控。

氧化胁迫的产生,是植物体内活性氧的平衡受到破坏,未及时清除的活性氧就会攻击核酸、叶绿素等生物大分子,影响植物的生长^[33-34]。该研究中,氧化胁迫条件下,超表达 *PpSnRK1βγ1* 基因拟南芥的萌发率比对照野生型提高了 51.7%,主根长比对照野生型提高了 57.1%(图 9)。与该试验现象类似的是: XU 等^[35]发现超表达 *AtGSTU19* 拟南芥植株的

种子种植在含 $1.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ MV 的 MS 培养基上, 萌发率和主根长均优于 WT 型。BRADFORD 等^[26] 发现番茄种子使用 ABA 浸泡, 或者远红光照射, *Le-SNF4* 的表达量上升; BUITINK 等^[27] 苜蓿胚芽中 *MiAKIN β* 基因在 PEG 诱导下, 短时间内其表达量明显升高; GUJJAR 等^[36] 发现当番茄叶片受到干旱胁迫时, *SlSNF4-15* 表达量升高。因此 *SnRK1 β* 基因能对多种胁迫响应。

4 结论

通过 PCR 技术克隆获得桃树 *PpSnRK1 β 1* 基因, 包含 CBM 和 4 个 CBS 结构域, 与其它植物 *SnRK1 β* 高度同源; *PpSnRK1 β 1* 基因在实生毛桃的各个组织均表达, 为组成型表达。超表达 *PpSnRK1 β 1* 基因拟南芥花期延迟, 与叶片中的叶绿素、可溶性糖和可溶性蛋白质含量升高, 以及提高对氧化胁迫的耐受力。课题组推测 *PpSnRK1 β 1* 基因参与调控植物的碳氮代谢, 并影响植物的花期, 以及在防御氧化胁迫中起重要作用。

参考文献

- [1] 崔津卫. 桃树栽培与管理技术浅析[J]. 黑龙江科技信息, 2016(12):292.
- [2] 王东升, 夏国海, 刘长书. 我国桃树设施栽培的现状、存在问题及对策[J]. 果树学报, 1999(1):32-36.
- [3] POLGE C, THOMAS M. SNF1/AMPK/SnRK1 kinases, global regulators at the heart of energy control? [J]. Trends in Plant Science, 2007, 12(1):20-28.
- [4] HEY S J, BYRNE E, HALFORD N G. The interface between metabolic and stress signaling[J]. Annals of Botany, 2010, 105(2):197-203.
- [5] HALFORD N G, HARDIE D G. SNF1-related protein kinases: global regulators of carbon metabolism in plants? [J]. Plant Molecular Biology, 1998, 37(5):735-748.
- [6] LE G L, THOMAS M, BIANCHI M, et al. Structure and expression of a gene from *Arabidopsis thaliana* encoding a protein related to snf1 protein kinase[J]. Gene, 1992, 120(2):249-254.
- [7] PURCELL P C, SMITH A M, HALFORD N G. Antisense expression of a sucrose non-fermenting-1-related protein kinase sequence in potato results in decreased expression of sucrose synthase in tubers and loss of sucrose-inducibility of sucrose synthase transcripts in leaves [J]. Plant Journal, 1998, 14(2):195-202.
- [8] LAURIE S, HALFORD N G. Antisense SNF1-Related (SnRK1) protein kinase gene represses transient activity of an α -amylase (α -Amy2) gene promoter in cultured wheat embryos [J]. Journal of Experimental Botany, 2003, 54(383):739-747.
- [9] HALFORD N G, HARDIE D G. Two SNF1-related protein kinases from spinach leaf phosphorylate and inactivate 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, nitrate reductase and sucrose phosphate synthase *in vitro* [J]. Plant Physiology, 1999, 120(1):257-274.
- [10] HALFORD N G, HEY S, JHURREEA D, et al. Metabolic signaling and carbon partitioning: role of Snf1-related (SnRK1) protein kinase [J]. Journal of Experimental Botany, 2003, 54(382):467-475.
- [11] HALFORD N G, HEY S, JHURREEA D, et al. Dissection and manipulation of metabolic signaling pathways [J]. Annals of Applied Biology, 2003, 142(1):25-31.
- [12] ÁGNES L, BIMBÓ A, SZABÓ L, et al. Antisense repression of *StuGAL83* affects root and tuber development in potato [J]. Plant Journal for Cell and Molecular Biology, 2003, 33(1):139-147.
- [13] HEY S J, BYRNE E, HALFORD N G. The interface between metabolic and stress signaling [J]. Annals of Botany, 2010, 105(2):197-203.
- [14] HULSMANS S, RODRIGUEZ M, CONINCK B, et al. The SnRK1 energy sensor in plant biotic interactions [J]. Trends in Plant Science, 2016, 21(8):648-661.
- [15] EMANUELLE S, DOBLIN M S, STAPLETON D I, et al. Molecular insights into the enigmatic metabolic regulator, SnRK1 [J]. Trends in Plant Science, 2015, 21(4):341-353.
- [16] LUMBRERAS V, ALBÀ M, KLEINOW T, et al. Domain fusion between SNF1-related kinase subunits during plant evolution [J]. Embo Reports, 2001, 2(1):55-60.
- [17] RAMON M, RUELENS P, LI Y, et al. The hybrid four-CBS-domain KIN β subunit functions as the canonical γ subunit of the plant energy sensor SnRK1 [J]. Plant Journal, 2013, 75(1):11-25.
- [18] GISSOT L, POLGE C, JOSSIER M, et al. AKIN β contributes to SnRK1 heterotrimeric complexes and interacts with two proteins implicated in plant pathogen resistance through its KIS/GBD sequence [J]. Plant Physiology, 2006, 142(3):931-944.
- [19] JIANG R, CARLSON M. The Snf1 protein kinase and its activating subunit, Snf4, interact with distinct domains of the Sip1/Sip2/Gal83 component in the kinase complex [J]. Molecular and Cellular Biology, 1997, 17(4):2099-2106.
- [20] GAO X Q, LIU C Z, LI D D, et al. The *Arabidopsis* KIN β subunit of the SnRK1 complex regulates pollen hydration on the stigma by mediating the level of reactive oxygen species in pollen [J/OL]. Plos Genetics, 2016, 12(7):e1006228.
- [21] CLOUGH S J, BENT A F. Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* [J]. The Plant Journal, 1998, 16(6):735-743.
- [22] TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28(10):2731-2739.
- [23] MARCHLERBAUER A, DERBYSHIRE M K, GONZALES N R. CDD: NCBI's conserved domain database [J]. Nucleic Acids Research, 2015, 43(Database issue):222-226.
- [24] 刘杰. 拟南芥晚花突变体 *lafl* 的表型分析及基因鉴定 [D]. 开封: 河南大学, 2014.
- [25] HAN H J, PENG R H, ZHU B, et al. Gene expression profiles of *Arabidopsis* under the stress of methyl viologen: A microarray analysis [J]. Molecular Biology Reports, 2014, 41(11):7089-7102.
- [26] BRADFORD K J, DOWNIE A B, GEE O H, et al. Absciscic acid and gibberellin differentially regulate expression of genes of the SNF1-

- related kinase complex in tomato seeds[J]. *Plant Physiology*, 2003, 132(3):1560-1576.
- [27] BUITINK J, THOMAS M, GISSOT L, et al. Starvation, osmotic stress and desiccation tolerance lead to expression of different genes of the regulatory β , and γ , subunits of the SnRK1 complex in germinating seeds of *Medicago truncatula*[J]. *Plant Cell and Environment*, 2004, 27(1):55-67.
- [28] BAENA-GONZÁLEZ E, SHEEN J. Convergent energy and stress signaling[J]. *Trends in Plant Science*, 2008, 13(9):474-482.
- [29] 王贵芳, 桃 SnRK1 蛋白激酶 α 和 β 亚基编码基因的克隆及功能分析[D]. 泰安: 山东农业大学, 2014.
- [30] MCKIBBIN R S, MUTTUCUMARU N, PAUL M J, et al. Production of high-starch, low-glucose potatoes through over-expression of the metabolic regulator SnRK1[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2006, 4(4):409-418.
- [31] TIESSEN A, PRESCHA K, BRANSCHIED A, et al. Evidence that SNF1-related kinase and hexokinase are involved in separate sugar-signaling pathways modulating post-translational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase in potato tubers[J]. *Plant Journal*, 2003, 35(4):490-500.
- [32] RADCHUK R, EMERY R J N, WEIER D, et al. Sucrose non-fermenting kinase 1 (SnRK1) coordinates metabolic and hormonal signals during pea cotyledon growth and differentiation[J]. *Plant Journal*, 2010, 61(2):324-338.
- [33] YANG G, WANG Y, XIA D, et al. Overexpression of a GST gene (ThGSTZ1) from *Tamarix hispida* improves drought and salinity tolerance by enhancing the ability to scavenge reactive oxygen species[J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 2014, 117(1):99-112.
- [34] LIANG Y, FENG H, YANG M, et al. Antioxidative defenses and water deficit-induced oxidative damage in rice (*Oryza sativa* L.) growing on non-flooded paddy soils with ground mulching[J]. *Plant and Soil*, 2003, 257(2):407-416.
- [35] XU J, TIAN Y S, XING X J, et al. Over-expression of AtGSTU19 provides tolerance to salt, drought and methyl viologen stresses in *Arabidopsis*[J]. *Physiologia Plantarum*, 2016, 156:164-175.
- [36] GUJJAR R S, AKHTAR M, RAI A, et al. Expression analysis of drought-induced genes in wild tomato line (*Solanum habrochaites*) [J]. *Current Science*, 2014, 107(16):1299-1301.

Cloning and *Arabidopsis* Ectopic Expression of *PpSnRK1 β 1* From *Prunus persica*

ZHAO Yongfei, CHEN Xiaolu, PENG Futian, LUO Jingjing, ZHAO Xin, XIAO Yuansong

(College of Horticulture Science and Engineering, Shandong Agricultural University/State Key Laboratory of Crop Biology, Tai'an, Shandong 271018)

Abstract: Wild peach was used as test material, *PpSnRK1 β 1*, the regulatory subunit β of SnRK1 (Sucrose non-fermenting-1-related protein kinase-1), was cloned and its expressions in different organs was analyzed. And to assay its function, transgenic plants were obtained successfully by transgenic technology. The results indicated that the reading frame of *PpSnRK1 β 1* possessed 1 476 bp and encoded 492 amino acid residues deduced from the DNA sequence. *PpSnRK1 β 1* contained CBM and four CBS domain. The deduced *PpSnRK1 β 1* protein was highly homologous to other *PpSnRK1 β 1* proteins from different species, and *PpSnRK1 β 1* was very closely related to SnRK1 β of GuoMei. Real-time PCR results showed that the *PpSnRK1 β 1* expressed in root, stalk and leaf of peach seedling. The expression level of *PpSnRK1 β 1* was very low in stalk of peach seedling. Via statistical studies, the results indicated that transgenic plant flowered 2.19 days later than WT, and produced around 1.17 rosette leaves than WT. The contents of chlorophyll, soluble sugar, and soluble proteins of transgenic plant were significantly higher than WT, which increased by 13.7%, 12.9% and 23.3%, respectively. There was no difference between transgenic plant and WT in starch content. Under the condition of oxidative stress, the growth rate of the wild-type *Arabidopsis* was severely suppressed, while the transgenic *Arabidopsis* showed less impact. Transgenic plants showed better seed germination rate and relatively longer root length than wild type, which could support plant growth under stress condition. In a word, the results of study indicated that *PpSnRK1 β 1* participated in regulating carbon and nitrogen metabolism and had effect on flower time, and played a role in the resistant of oxidative stress.

Keywords: peach (*Prunus persica*); *PpSnRK1 β 1*; gene clone; expression analysis; functional study