

# 干旱过程中 ‘M9T337’ 苹果砧木苗光合特性及MdCP2与MdGLK1互作分析

赵文哲<sup>1,2,3,#</sup>, 刘晓<sup>1,2,3,#</sup>, 姜珊<sup>1,2,3</sup>, 陈敏<sup>4</sup>, 王旭旭<sup>1,2,3</sup>, 刘金宝<sup>1,2,3</sup>, 谭梅<sup>5</sup>, 王宇<sup>6</sup>, 李玲<sup>1,2,3</sup>, 高东升<sup>1,2,3</sup>, 陈修德<sup>1,2,3,\*</sup>, 肖伟<sup>1,2,3,\*</sup>

<sup>1</sup>作物生物学国家重点实验室, 山东泰安271018

<sup>2</sup>山东果蔬优质高效生产协同创新中心, 山东泰安271018

<sup>3</sup>山东农业大学园艺科学与工程学院, 山东泰安271018

<sup>4</sup>中国科学院烟台海岸带研究所, 山东烟台264003

<sup>5</sup>山东省临朐县五井镇农业综合服务中心, 山东潍坊262603

<sup>6</sup>山东省生态林业发展中心, 山东泰安271000

#并列第一作者

\*共同通信作者: 陈修德(chenxiude@163.com)、肖伟(gulight986918@163.com)。

**摘要:** 苹果半胱氨酸蛋白酶基因*MdCP2*在植株干旱过程中发挥着重要的作用。本研究以一年生‘M9T337’苹果砧木苗为试材,从生理和分子生物学水平分析了苹果砧木苗在自然干旱及复水过程中叶片光合特性、植株含水量、半胱氨酸蛋白酶基因*MdCP2*及相关基因的表达分析以及*MdCP2*基因的生物学功能。结果表明,水分胁迫使植物的光合速率、气孔导度和蒸腾速率下降。在自然干旱后期,植株光合作用的主要限制因素由气孔限制转变为非气孔限制。实时荧光定量PCR发现,在正常培养的苹果树中,*MdCP2*基因主要在根中表达;且在干旱过程中,*MdCP2*的表达水平呈上升趋势,而在复水后降低。*MdRCA*、*MdCAB*和*MdRBCS*表达在干旱时降低,复水后上调。通过酵母双杂交和BiFC试验证明,*MdCP2*与*MdGLK1*存在相互作用,为进一步研究半胱氨酸蛋白酶基因*MdCP2*提供了理论基础。

**关键词:** 苹果砧木; 干旱胁迫; 半胱氨酸蛋白酶; *MdCP2*; *MdGLK1*

## Photosynthetic characteristics of ‘M9T337’ apple rootstock seedlings and interaction between *MdCP2* and *MdGLK1* during drought stress

ZHAO Wenzhe<sup>1,2,3,#</sup>, LIU Xiao<sup>1,2,3,#</sup>, JIANG Shan<sup>1,2,3,#</sup>, CHEN Min<sup>4</sup>, WANG Xuxu<sup>1,2,3</sup>, LIU Jinbao<sup>1,2,3</sup>, TAN Mei<sup>5</sup>, WANG Yu<sup>6</sup>, LI Ling<sup>1,2,3</sup>, GAO Dongsheng<sup>1,2,3</sup>, CHEN Xiude<sup>1,2,3,\*</sup>, XIAO Wei<sup>1,2,3,\*</sup>

<sup>1</sup>State Key Laboratory of Crop Biology, Taian, Shandong 271018, China

<sup>2</sup>Shandong Collaborative Innovation Center for Fruit and Vegetable Production with High Quality and Efficiency, Taian, Shandong 271018, China

<sup>3</sup>College of Horticulture Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Taian, Shandong 271018, China

<sup>4</sup>Yantai Institute of Coastal Zone Reseach, Chinese Academy of Sciences, Yantai, Shandong 264003, China,

<sup>5</sup>Wujing Town Agricultural Comprehensive Service Center, Linju County, Weifang, Shandong 262603, China

<sup>6</sup>Shandong Ecological Forestry Development Center, Taian, Shandong 271000, China

#Co-first authors

\*Co-corresponding authors: Chen XD (chenxinde@163.com), Xiao W (gulight986918@163.com)

收稿 2020-06-08 修定 2021-05-21

资助 重大自然灾害监测预警与防范重点专项(2017YFC1502805)和山东省重大科技创新工程(2018CXGC0209)。

**Abstract:** The cysteine protease gene *MdCP2* plays an important role in responding to drought stress. In this study, the experimental materials were one-year-old 'M9T337' apple seedlings subjected to natural drought treatment. We determined the photosynthetic characteristics, plant water content, differentially expressed genes and the function of cysteine protease gene *MdCP2* in leaves of apple seedlings during natural drought and rehydration process at physiological and molecular biological levels. The results showed that the photosynthetic rate, stomatal conductance and transpiration rate decreased under drought stress. In the later stage of natural drought, the major limiting factors of photosynthesis changed from stomatal restriction to non-stomatal restriction. The qRT-PCR results showed that *MdCP2* had the higher expression level in roots and its expression had a significant positive correlation with the degree of drought. The expression levels of *MdRCA*, *MdCAB* and *MdRBCS* were negative correlation with the degree of drought. Yeast two-hybrid and BiFC techniques were further used to demonstrate that *MdCP2* interacts with *MdGLK1*. These results provide a theoretical basis for further study of cysteine protease *MdCP2* gene.

**Key words:** apple rootstock; drought stress; cysteine protease; *MdCP2*; *MdGLK1*

苹果作为我国栽培面积最大的果树品种,种植面积主要集中于降雨量较少的地区,果树生长发育和产量受干旱胁迫影响很大(程亮2011)。干旱胁迫是指当植物遭受水分胁迫,体内水分消耗大于吸收水分时,组织出现水分亏缺,细胞组织紧张度下降,植物正常生理活动及功能受到影响的现象(冉应龙2017)。即使植物遭受短时间的水分胁迫,植物也能在生理或者是分子水平上迅速做出响应(Chaves等2009)。

其中干旱胁迫对植物的光合作用产生多方面的影响,干旱会导致气孔关闭,影响光合底物二氧化碳的吸收,从而导致光合作用的减弱;严重的干旱胁迫还能够导致叶肉细胞损伤、降低光合酶的活性,从而使植物的光合速率降低(韩瑞宏2007)。另外,在遭受水分胁迫而衰老的植物叶片中,半胱氨酸蛋白酶(caspases, CP)起着主要作用(Renu等1999)。蛋白酶几乎参与到所有的生物现象,它不仅仅是将蛋白质水解成氨基酸以便机体循环,还可以激活蛋白质或使蛋白质失活。1,5-二磷酸核酮糖羧化/加氧酶(ribulose 1,5-bisphosphate carboxylation/oxygenase, Rubisco)是光合作用过程中的必需酶。在光合作用过程中,核基因*rbcS*编码Rubisco的小亚基,*RCA*编码Rubisco激活酶,*CAB*编码光系统II中收获光能的叶绿素a/b结合蛋白,这些基因直接影响Rubisco的酶活性从而保证光合作用的正常

进行。*CP2*编码的半胱氨酸蛋白酶则可以降解Rubisco的大亚基,从而导致Rubisco活性的降低,进而影响植物光合作用。

Liu等(2012)发现,当‘嘎啦’嫁接到苹果抗旱砧木上时,改善了植株的水分利用率,砧木的适应性直接影响嫁接品种的适应能力。所以,研究苹果砧木的抗旱性对于干旱地区的苹果生产具有重要意义。本研究以一年生‘M9T337’苹果砧木苗为试材,分析其干旱复水过程中光合特性,克隆苹果半胱氨酸蛋白酶基因*MdCP2*,测定该基因在不同组织及不同干旱时期的表达,并通过酵母双杂交及BiFC试验,为进一步探讨*MdCP2*在干旱胁迫中的调控机理奠定基础,也为苹果抗逆机理提供新的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验在山东农业大学作物生物学国家重点实验室及园艺实验站进行。供试品种为一年生‘M9T337’苹果(*Malus domestica* Borkh.)砧木苗,选取生长状况良好、长势基本一致的苹果砧木苗进行试验。用于组织特异性表达分析的试验材料为八年生‘嘎啦’苹果树,对八年生‘嘎啦’苹果树的根、茎、叶、花、果肉和果皮等6个组织部位取样,用液氮速冻备用。

将试材移入避雨棚内统一进行处理, 试验共设2个处理: (1)正常培养: 每2 d浇一次水; (2)自然干旱及复水处理: 浇水后持续断水处理, 断水第18天, 供试植株叶片均出现萎蔫, 此时进行统一复水处理。试验设计每100棵为一个处理。处理期间, 每隔5 d在上午9:00~10:00点测定光合指标, 并取样, 取新梢中部功能叶片, 迅速放入冰盒, 带回实验室进行指标测定。同时取土样进行土壤含水量的测定。

### 1.2 土壤含水量的测定

采用烘干法。用土钻取样装入铝盒, 每盆取3个重复。在室内将装有土样的铝盒称重, 称量出铝盒(质量:  $W$ )加湿土的质量( $W_1$ )。揭开铝盒盖, 放入烘箱中, 在105°C下烘至恒重(约12 h), 从烘箱中取出铝盒, 盖好盒盖, 称量, 即铝盒加烘干土的重量( $W_2$ )。土壤含水量( $\%$ )= $(W_1 - W_2) / (W_2 - W) \times 100\%$

### 1.3 光合参数的测定

采用CIRAS-3型便携式光合仪(PP-Systems, 美国), 选择晴朗无云的天气, 各处理生长一致且完全展开的中部叶片, 于上午9:00~11:00, 测定净光合速率( $P_n$ )、蒸腾速率( $T_r$ )、气孔导度( $G_s$ )和胞间CO<sub>2</sub>

浓度( $C_i$ )。测定时采用LED红蓝光源, 光强设为1 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , 采用开放式气路系统, 叶室温度为25°C, 叶室的窗口尺寸为18 mm×25 mm。

### 1.4 植株含水量的测定

剪取植株各组织, 立即用清水冲洗干净, 用纱布擦净水分后快速放入已知重量的铝盒中, 称出鲜重(FW), 将植物组织连同铝盒放入已升温至105°C的烘箱中, 杀青30 min, 然后于80°C下烘至恒重, 称出干重(DW)。植株含水量( $\%$ )= $(FW - DW) / FW \times 100$ 。

### 1.5 叶片叶绿素含量测定

叶绿素含量测定采用乙醇浸提法测定(赵世杰和苍晶2016), 总叶绿素含量=叶绿素a含量+叶绿素b含量。

### 1.6 总RNA提取及定量PCR分析

采用天根RNAprep pure多糖多酚植物总RNA提取试剂盒, 利用反转录试剂盒PrimeScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit获得用qRT-PCR的cDNA。试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司。通过对苹果基因组中MdCP2家族基因序列分析, 设计定量引物(表1)。

表1 基因克隆和表达检测引物

Table 1 Primers used in cloning and expression analysis

引物名称	序列(5'→3')	用途
<i>MdCP2-F</i>	GGATCCATGCGGCCGTACCG	基因扩增
<i>MdCP2-R</i>	GTCGACAGCACTGCTCTTTCCA	基因扩增
<i>MdGLK1-F</i>	CATATGATGCTTATTTTATCACCTTTGCGG	基因扩增
<i>MdGLK1-R</i>	GTCGACGGCACAGGAGAGTGGTATG	基因扩增
<i>MdGLK1 (1~300 aa)-F</i>	CATATGATGCTTATTTTATCACCTTTGCGG	基因扩增
<i>MdGLK1 (1~300 aa)-R</i>	GTCGACCCGTCTCTGGGTCCAGCTA	基因扩增
<i>MdGLK1 (301~536 aa)-F</i>	CATATGCAAATGTATGGGGCAGCAG	基因扩增
<i>MdGLK1 (301~536 aa)-R</i>	GCGTCCATGTGATTGTCGAA	基因扩增
<i>MdCP2-F</i>	ATGGAGGTCTTATGGACTATG	实时荧光定量PCR扩增
<i>MdCP2-R</i>	GTAGGAACATCTTCGTAATCG	实时荧光定量PCR扩增
<i>MdRBCS-F</i>	CAGGATACTATGATGGAAGGT	实时荧光定量PCR扩增
<i>MdRBCS-R</i>	GATGATACGGATGAAGGATTG	实时荧光定量PCR扩增
<i>MdCAB-F</i>	TCATACCTCACTGGAGAATT	实时荧光定量PCR扩增
<i>MdCAB-R</i>	CCATTACGGACAAGAGTTC	实时荧光定量PCR扩增
<i>MdRCA-F</i>	AGTGAGGAAGTGGATTACG	实时荧光定量PCR扩增
<i>MdRCA-R</i>	ACATTCTCTTGCTCTTGGGA	实时荧光定量PCR扩增
<i>Mdactin-F</i>	TGACCGAATGAGCAAGGAAATTACT	实时荧光定量PCR扩增
<i>Mdactin-R</i>	TACTCAGCTTTGGCAATCCACATC	实时荧光定量PCR扩增

用Takara SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II (Tli RNaseH Plus)试剂盒进行qRT-PCR分析。该反应体系为25  $\mu$ L: SYBR Premix Ex Taq<sup>™</sup> II (2 $\times$ ) 12.5  $\mu$ L、上游引物(10  $\mu$ mol $\cdot$ L<sup>-1</sup>) 0.5  $\mu$ L、下游引物(10  $\mu$ mol $\cdot$ L<sup>-1</sup>) 0.5  $\mu$ L、cDNA 1.0  $\mu$ L和ddH<sub>2</sub>O 10.5  $\mu$ L。每样本3次重复。qRT-PCR反应条件: 95 $^{\circ}$ C预变性30 s; 95 $^{\circ}$ C变性5 s, 58 $^{\circ}$ C退火30 s, 65 $^{\circ}$ C延伸5 s, 40次循环, 每次循环第3步进行荧光采集; 最后采用2<sup>- $\Delta\Delta$ C<sub>t</sub></sup>法进行定量数据分析(冀美玲等2017)。

### 1.7 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶(Rubisco)测定

称取大约1 g样品在液氮中充分研磨, 后加入9 mL的匀浆液1 $\times$ PBS (pH 7.2~7.4), 使匀浆液与组织充分混匀, 进行离心, 离心机转速800 $\times$ g, 离心时间30 min, 充分匀浆完成后离心取上清。采用Plant Rubisco ELISA Kit试剂盒进行Rubisco活性测定, 在450 nm波长处测定各孔的OD值, 重复3次。标准曲线 $Y=0.3167\times OD_{450}-0.4386$ ; Y: 标准品的浓度值(U $\cdot$ L<sup>-1</sup>)。

### 1.8 MdCP2酵母双杂交载体的构建

以1.5节获得的cDNA为模板, 在苹果基因组数据库中检索序列XM\_008395554.1和XM.008-383362.2设计特异性引物(表1)进行MdCP2、MdGLK1、MdGLK1 (1~300 aa)和MdGLK1 (301~536 aa)克隆。按照Phusion高保真DNA扩增酶(F530)说明书进行PCR, 用1%的琼脂糖凝胶对PCR产物进行电泳。

利用引入BamHI和SalI 2个酶切位点的引物扩增MdCP2的编码框序列, 之后连接到PLB克隆载体。用BamHI和SalI对克隆载体和表达载体pGBKT7分别进行双酶切, 构建表达载体pGBKT7-MdCP2。利用引入NdeI和BamHI 2个酶切位点的引物扩增MdGLK1的编码框序列, 之后连接到PLB克隆载体。用NdeI和BamHI对克隆载体和表达载体pG-ADT7分别进行双酶切, 构建表达载体pGADT7-MdCP2。

利用引入NdeI和SalI 2个酶切位点的引物扩增MdGLK1、MdGLK1 (1~300 aa)、MdGLK1 (301~536 aa)的编码框序列, 之后连接到PLB克隆载体。用NdeI和SalI对克隆载体和表达载体pGBKT7分别进行双酶切, 构建表达载体pGBKT7-MdGLK1、

pGBKT7-MdGLK1 (1~300 aa)和pGBKT7-MdGLK1 (301~536 aa)。

### 1.9 酵母双杂交回转互作验证

将pGADT7-MdCP2、pGADT7分别与pGBKT7-MdGLK1 (301~536 aa)共转入酵母感受态Y2H Gold, 涂布于QDO/X/(SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X- $\alpha$ -gal)和DDO/X/(SD/-Leu/-Trp), 28 $^{\circ}$ C, 培养3~5 d。

### 1.10 BiFC表达载体的构建及根癌农杆菌LBA4404感受态细胞的转化

利用引入BamHI和SalI 2个酶切位点的引物扩增MdCP2的编码框序列, 引入NdeI和SalI 2个酶切位点的引物扩增MdGLK1, 之后分别连接到PLB克隆载体。用BamHI和SalI对克隆载体MdCP2和表达载体pSPYNE分别进行双酶切, 构建表达载体MdCP2-Y<sup>N</sup>。用NdeI和SalI对克隆载体MdGLK1和表达载体pSPYCE分别进行双酶切, 构建表达载体MdGLK1-Y<sup>C</sup>, 将重组质粒MdCP2-Y<sup>N</sup>和MdGLK1-Y<sup>C</sup>导入农杆菌LBA4404感受态, 得到重组农杆菌。

#### 1.10.1 BiFC

构建MdCP2-Y<sup>N</sup>和MdGLK1-Y<sup>C</sup>载体, 选取测序正确质粒转化农杆菌GV3101, 分试验组和对照组侵染预培养好的新鲜洋葱内表皮细胞, 暗培养1~2 d, 激光共聚焦显微镜观察。

#### 1.10.2 洋葱表皮细胞的遗传转化

取洋葱的鳞茎, 用手术刀剥取洋葱的内表皮, 将其切成1 cm $\times$ 1 cm的小块放在MS固体培养基上, 28 $^{\circ}$ C暗培养12~24 h; 用30 mL含50 mg $\cdot$ L<sup>-1</sup>利福平和50 mg $\cdot$ L<sup>-1</sup>卡那霉素的YEP液体培养基28 $^{\circ}$ C振荡培养重组农杆菌, 至OD<sub>600</sub>=0.6~0.8, 3 000 $\times$ g离心10 min, 收集菌体, 用30 mL ddH<sub>2</sub>O悬浮, 加入乙酰丁香酮并使其浓度为100  $\mu$ mol $\cdot$ L<sup>-1</sup>, 得到侵染液。将预培养好的洋葱内表皮, 浸入制备好的侵染液, 28 $^{\circ}$ C轻摇30 min, 无菌滤纸吸干洋葱内表皮上的菌液转入MS固体培养基中, 28 $^{\circ}$ C暗培养1~2 d。取洋葱内表皮, 置于载玻片上, 在激光扫描共聚焦显微镜下观察目的基因荧光, 收集照片。

### 1.11 数据处理与分析

采用Excel 2010进行数据处理与统计分析, Graphpad Prism 6作图。

## 2 实验结果

### 2.1 干旱及复水处理下土壤含水量的变化

土壤干旱直接导致植株相对含水量下降,使砧木受害,因此测定土壤含水量的变化是干旱胁迫试验设计的一个定量标准。随干旱胁迫时间的增加,土壤含水量逐渐下降,处理第1~6天下降速度较缓,第6~18天下降速度较快,复水之前达到最低值,为2%左右,复水后急剧回升至对照水平。土壤含水量的减少主要取决于土壤的蒸发量和苗木蒸腾量,在正常供水状态和复水条件下,土壤含水量基本保持一致(图1),保证了干旱胁迫及复水条件的一致性和数据分析的可靠性。

### 2.2 干旱及复水处理对植物含水量的影响

由图2可以看出,在停止浇水后1~6 d,植物含水量变化不大,之后植物含水量呈下降趋势,在干旱处理第18天达到最低值,为53.6%;复水后第6天,植物含水量略有上升趋势,为57.03%,但仍显著低于对照。在整个干旱复水过程中,‘M9T337’砧木苗含水量呈先下降后上升的变化趋势。

### 2.3 干旱及复水处理对叶片光合参数的影响

测定结果(图3)表明,在干旱复水过程中叶片净光合速率( $P_n$ )、蒸腾速率( $T_s$ )和气孔导度( $G_s$ )从第6天之后呈下降趋势,处理第12天与对照相比分

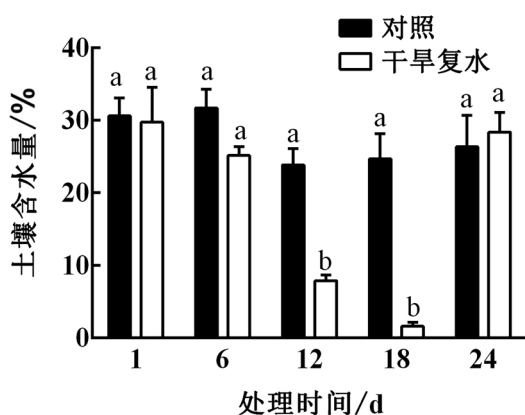


图1 干旱及复水处理下土壤含水量的变化

Fig. 1 Changes of soil moisture content under drought and rewater treatment

不同小写字母表示同一时间不同处理间差异显著( $P < 0.05$ )。图2、3、4和7同此。

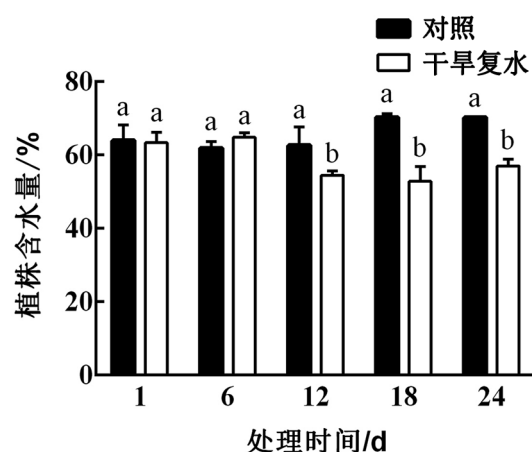


图2 干旱及复水处理对‘M9T337’砧木苗含水量的影响

Fig. 2 Effects of drought and rewater treatment on water content of leaves of ‘M9T337’ apple rootstock

别下降78.7%、74.1%和74.4%;处理第18天达到最低值,分别比对照低111.0%、81.2%和74.4%;复水6 d后呈正常水平。干旱处理第18天细胞间隙 $CO_2$ 浓度( $C_i$ )与对照相比提高了46.0%,复水6 d后呈正常水平。在整个干旱复水过程中, $C_i$ 呈先上升后下降的变化趋势。

### 2.4 干旱及复水处理对叶片叶绿素含量的影响

干旱处理导致叶片叶绿素含量的上升,干旱及复水处理过程中叶绿素含量呈上升-下降趋势。图4表明,干旱处理的第12天叶绿素含量最高,处理第18天至复水6 d叶绿素含量略有下降,但仍高于对照。

### 2.5 MdCP2基因克隆与组织特异性表达

在苹果基因组中发现一个半胱氨酸蛋白酶基因,命名为MdCP2 (XM\_008395554.1)。从Pfam (<http://pfam.xfam.org>)发现该基因具有半胱氨酸蛋白酶保守结构域探针(PF00112)。序列分析表明,MdCP2基因编码475个氨基酸,分子质量为52.14 kDa,等电点为5.14。对其进行染色体定位分析发现,MdCP2位于第15条染色体上。

为了研究MdCP2基因在苹果中的表达部位,对其进行了组织特异性表达分析。结果显示,在正常生长的苹果树中,MdCP2在根中表达量最高,其它部位表达量较低(图4)。

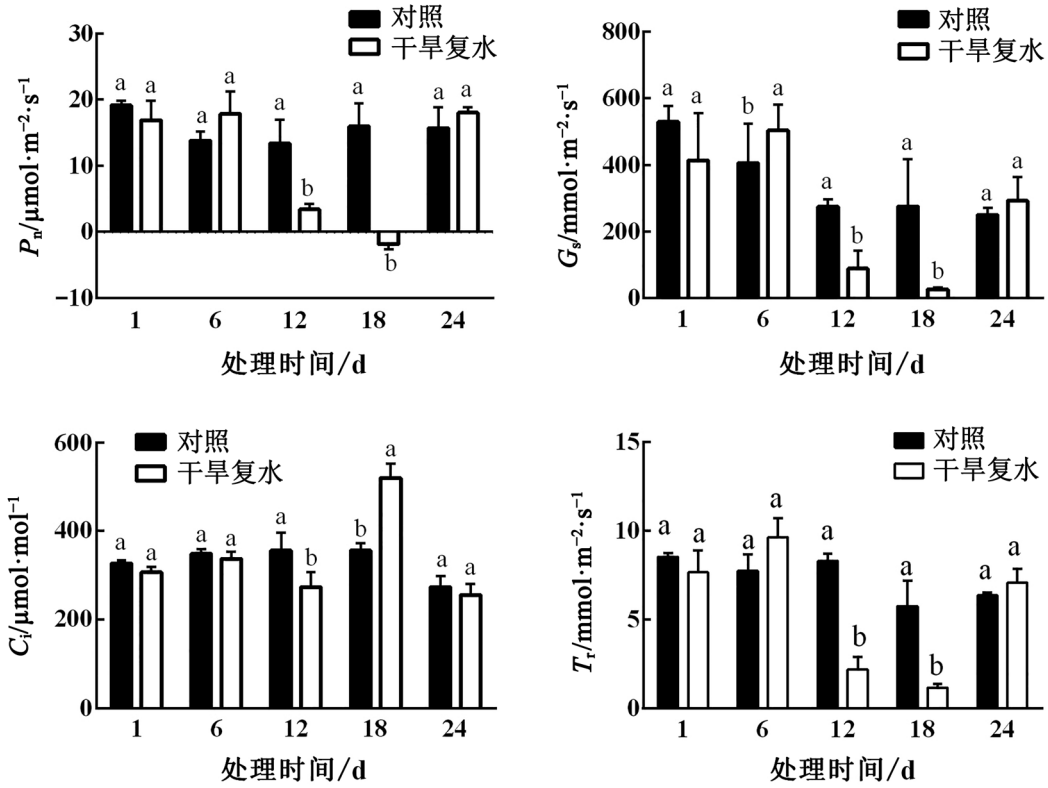


图3 干旱及复水处理对'M9T337'砧木苗叶片光合参数的影响  
Fig. 3 Effects of drought and rewater treatment on photosynthetic parameters of leaves of 'M9T337' apple rootstock

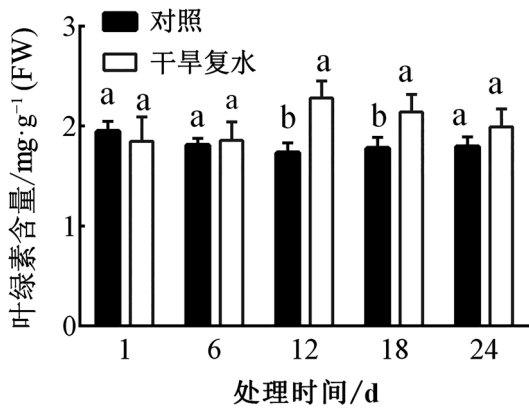


图4 干旱及复水处理下叶片叶绿素含量的变化  
Fig. 4 Changes of chlorophyll content in leaves under drought and rewater treatment

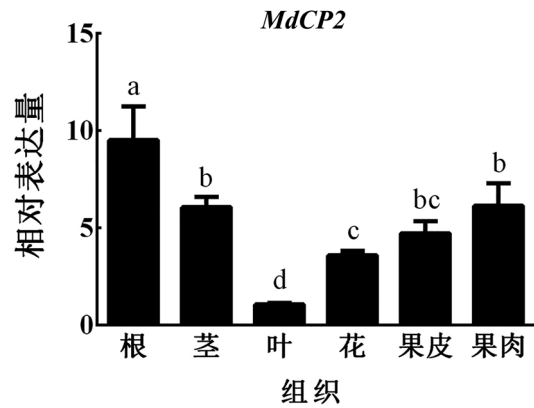


图5 MdCP2基因的组织特异性表达  
Fig. 5 Tissue-specific expression of MdCP2  
不同小写字母表示差异显著(P < 0.05)。图6同此。

2.6 干旱及复水处理对MdCP2及相关基因的表达分析的影响

对半胱氨酸蛋白酶基因MdCP2、Rubisco酶小

亚基基因MdRBCS、Rubisco活化酶基因MdRCA以及叶绿素a/b结合蛋白基因MdCAB进行了定量分析,发现干旱能诱导MdCP2的表达且在干旱处理

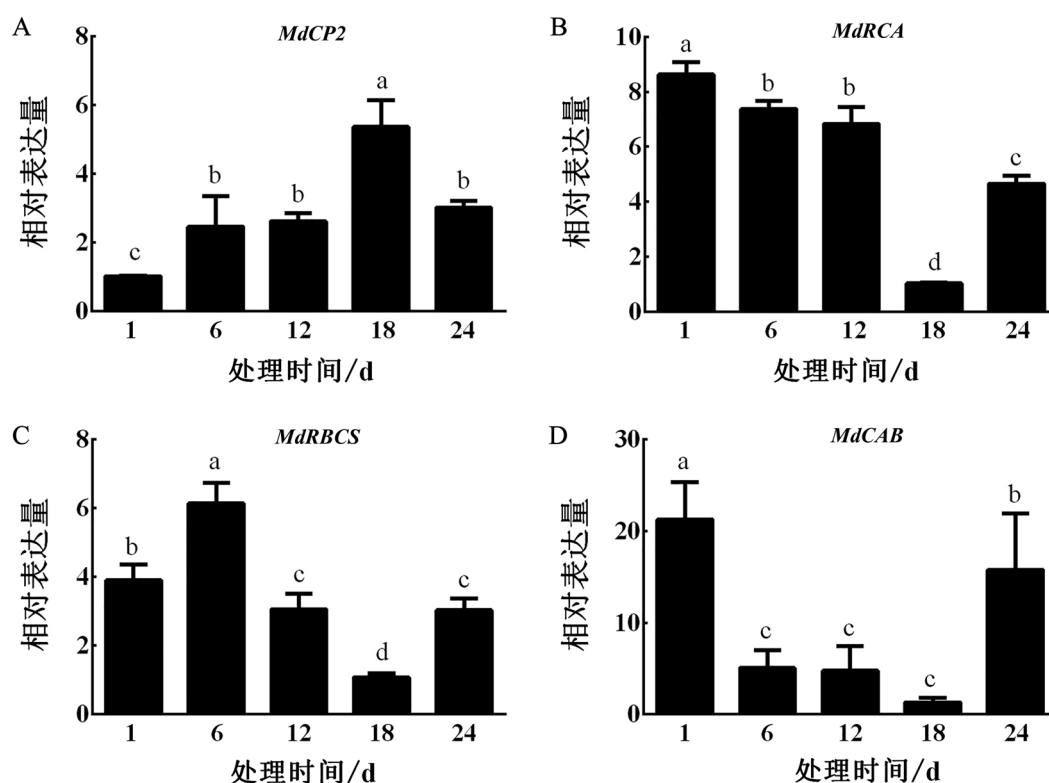


图6 MdCP2及相关基因在干旱及复水处理下的表达分析

Fig. 6 Expression analysis of MdCP2 and related genes under drought and rewater treatment

第18天表达量最高, 在复水后MdCP2基因的表达量显著下降。干旱抑制MdRCA、MdCAB和MdRBCS的表达, 且在干旱处理第18天表达量最低, 复水后表达量上调(图5)。

## 2.7 干旱及复水处理对‘M9T337’苹果砧木叶片Rubisco活性影响

图7显示, Rubisco活性在干旱及复水过程中呈现先上升后下降的趋势, 在停止浇水后第12天活性最高, 这和叶片叶绿素含量(图4)的变化大体一致, 在停止浇水第18天活性最低。这表明, 严重的干旱胁迫可能会促进植物叶绿体内Rubisco降解。

## 2.8 MdCP2能够与MdGLK1互作

### 2.8.1 诱饵载体的自激活检测

将构建好的诱饵载体pGBKT7-MdCP2、pGBKT7-MdGLK1及pGBKT7载体转化酵母Y2H感受态, 涂布于SD/-Trp、SD/-Trp/X- $\alpha$ -gal和SD/-Trp/X- $\alpha$ -gal/AbA固体培养基上。试验结果表明, 转入pGBKT7-MdCP2、pGBKT7-MdGLK1与pGBKT7质粒

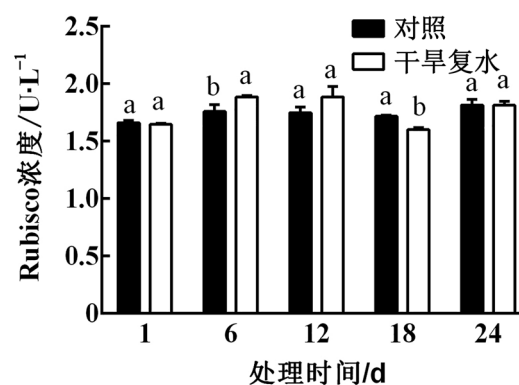


图7 干旱及复水处理下叶片Rubisco活性的变化

Fig. 7 Changes of Rubisco activity in leaves under drought stress and rewater treatment

对酵母菌Y2H生长没有毒害作用。pGBKT7-MdCP2、pGBKT7-MdGLK1在SD/-Trp/X- $\alpha$ -gal培养基上长出蓝色菌斑, pGBKT7在SD/-Trp/X- $\alpha$ -gal培养基上没有变蓝(图8), 该试验结果表明MdCP2和MdGLK1全长都具有自激活作用。

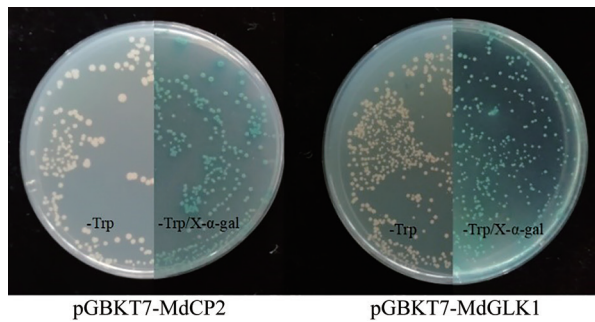


图8 MdCP2和MdGLK1的转录活性

Fig. 8 The transcription activity of MdCP2 and MdGLK1

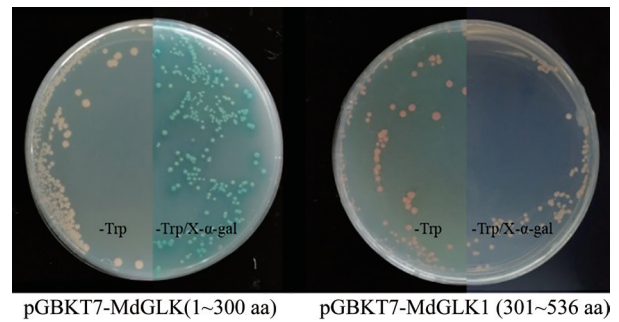


图9 MdGLK1的转录活性

Fig. 9 The transcription activity of MdGLK1

将pGBKT7-MdGLK1分为两段(1~300 aa和301~536 aa), 分别验证其自激活作用。研究表明, 自激活结构域存在于1~300 aa中, 301~536 aa序列不存在自激活现象, 可以用来进行酵母双杂交试验(图9)。

### 2.8.2 酵母双杂交回转互作验证

试验结果表明, 试验组和对照组在DDO/X/(SD/-Leu/-Trp)培养基上均长出正常状态菌株, 只有试验组在QDO/X/(SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X-α-gal)培养基上长出蓝色菌斑, 对照组未见明显菌斑(图10)。因此, 推测pGADT7-MdCP2和pGBKT7-MdGLK1 (301~536 aa)在Y2H酵母感受态中存在互作。

### 2.9 MdCP2与MdGLK1的BiFC互作验证

观察结果(图10)显示, MdCP2-Y<sup>N</sup>和MdGLK1-Y<sup>C</sup>共侵染的洋葱表皮细胞能够观察到黄色荧光信号, 而MdCP2-Y<sup>N</sup>和Y<sup>C</sup>共侵染以及Y<sup>N</sup>和MdGLK1-Y<sup>C</sup>共侵染的洋葱表皮细胞没有荧光, 该结果表明, MdCP2-Y<sup>N</sup>和Y<sup>C</sup>以及Y<sup>N</sup>和MdGLK1-Y<sup>C</sup>不能互作, MdCP2和MdGLK1在体内能够发生互作。

## 3 讨论

水分是活细胞的代谢活动和细胞组成必要物质, 植物保水能力的强弱可以用叶片含水量高低反映。项雯慧(2018)在通过不同浓度PEG-6000模拟干旱处理甘草过程中发现, 随着处理浓度的增

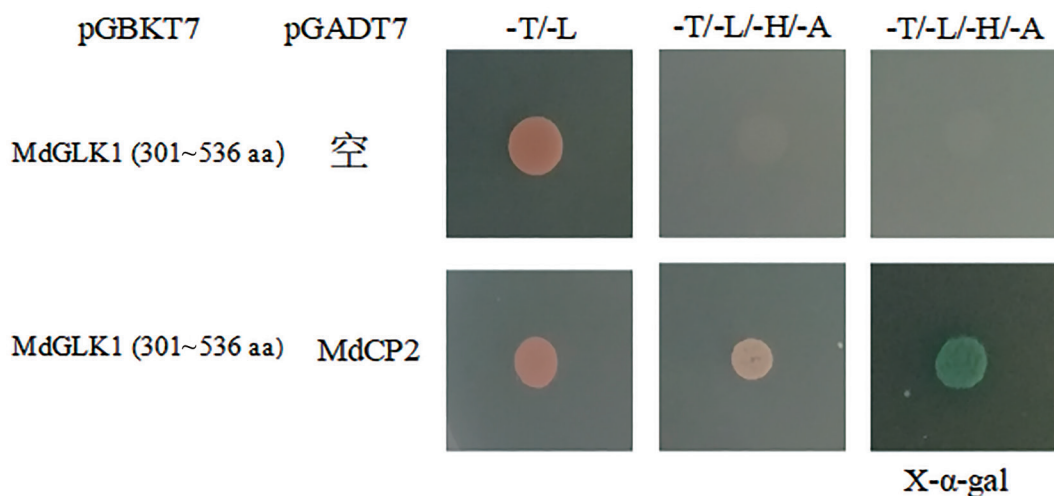


图10 酵母双杂交验证pGADT7-MdCP2和pGBKT7-MdGLK1 (301~536 aa)互作

Fig. 10 The interaction between pGADT7-MdCP2 and pGBKT7-MdGLK1 (301~536 aa) verified by yeast two-hybrid



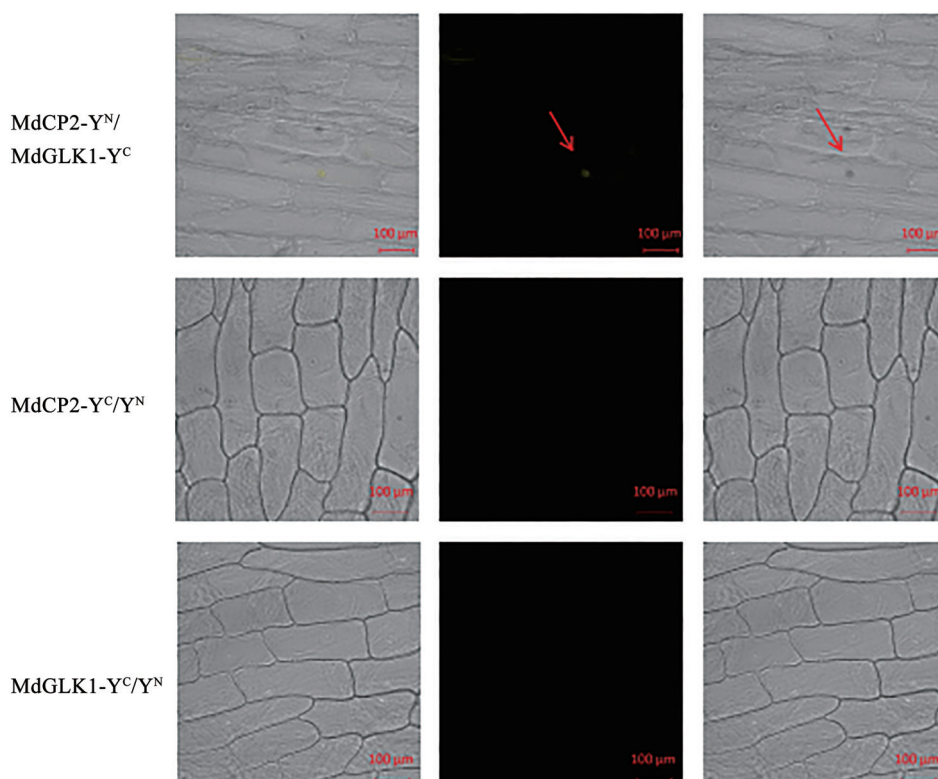


图11 MdCP2与MdGLK1的BiFC互作验证

Fig. 11 Interaction between PMdCP2 and MdGLK1 by BiFC assay

加, 处理时间的延长, 甘草叶片相对含水量呈逐渐下降趋势。本试验中苹果砧木叶片含水量随着干旱天数的增加也出现逐渐下降的变化趋势。在干旱复水过程中, 植物叶片有明显的变化, 包括新叶的出现、叶片轻微受损的展开和严重受损叶片的脱落(Vanková等2012; Xu等2013)。

水分胁迫抑制果树的光合作用, 使植物的光合速率下降, 气孔阻力增加, 蒸腾速率下降, 王斌等(2013)研究表明光合参数等可作为评价木本植物抗旱性的有效指标, 其中 $P_n$ 、 $T_r$ 、 $G_s$ 和 $C_i$ 是判断植物在逆境胁迫下光合作用的代表性常规指标。在干旱胁迫下, 通常认为植物在干旱胁迫下光合作用降低的原因包括两个方面(徐俊增等2010): 一方面是外部环境影响。由于水分减少, 植物通过关闭气孔来降低蒸腾作用, 减少水分散失, 保持自身含水量, 气孔导度的降低, 使进入气孔的 $CO_2$ 量减少, 不能满足植物体光合作用的要求, 导致植物光合作用的下降。另一方面是因为植物光合器官受

到损伤, 属于光合作用的非气孔限制, 叶肉细胞损伤使叶绿体活性和Rubisco活性降低、导致叶片光合作用能力降低, 这种情况多发生在干旱程度较严重的情况下。我们研究发现在停止浇水后第18天, 土壤含水量下降到2%时, 植株叶片Rubisco活性最低, 与前人研究结果一致。说明严重的干旱会降解植物叶绿体, 从而破坏Rubisco。

综合研究表明: 水分胁迫状态下, 植物光合能力下降不管是由于气孔限制还是非气孔限制, 或是两者的共同作用, 不仅与试验植物的年龄、种类、生长状况等有关, 而且与试验处理方式(水分胁迫强度和时间的长短)有关(Zhang等2010; Wu等2008; Flexas和Medrano 2002)。

Farquhar和Sharkey (1982)认为, 干旱导致植物光合速率降低的气孔和非气孔限制因素一般根据胞间 $CO_2$ 浓度( $C_i$ )和气孔限制值( $L_s$ )的变化来判断。当干旱引起光合速率下降,  $C_i$ 降低和 $L_s$ 升高时, 此时是气孔限制占主导地位;  $C_i$ 升高或者不变, 同时

$L_s$ 降低时,此时是非气孔限制导致光合速率下降。庞杰等(2013)研究发现干旱胁迫下,沙芥幼苗的 $P_n$ 呈下降趋势,而 $C_i$ 呈上升趋势,表明沙芥幼苗在干旱胁迫下光合速率降低的原因是由于非气孔限制导致。杨素苗等(2008)研究表明,随着水分胁迫程度的加重,红富士苹果 $G_s$ 、 $P_n$ 与 $T_r$ 均呈下降趋势,其中 $P_n$ 和 $T_r$ 的下降与 $G_s$ 的下降有直接关系,所以说气孔限制是水分胁迫下红富士苹果光合作用下降的主要原因。裴斌等(2013)研究沙棘发现:在土壤RWC<38.9%时,土壤发生严重水分胁迫,此时PSII系统和抗氧化酶系统受到损伤,沙棘光合作用的主要限制因素由气孔限制转变为非气孔限制。

在本试验中,停止浇水后第12天到第18天期间,此时土壤含水量在2%~8%之间,叶片在 $P_n$ 和 $G_s$ 都呈现下降趋势过程中, $C_i$ 呈现上升趋势,这期间属于叶片光合作用气孔与非气孔因素限制的转折点。在停止浇水后第18天,叶片 $P_n$ 达到最低,说明此时的植物呼吸速率大于光合速率,若长期处于这种状态,植株最终会死亡,故我们选择在干旱处理第18天后进行复水处理。控水处理在复水后都产生一定的补偿效应,刘吉利等(2011)研究发现 $T_r$ 对水分胁迫的敏感性小于 $P_n$ ,但对复水的敏感性大于光合速率。通过试验探究发现,在干旱过程中, $T_r$ 的下降幅度小于 $P_n$ ,但是 $T_r$ 和 $P_n$ 在复水过程中的敏感性相差不大。

在植物体内,半胱氨酸蛋白酶作为植物体内水解酶的一种,是叶片衰老过程中比较活跃的一类蛋白,它们参与叶片衰老过程中很多的蛋白水解反应,可降解光合作用必需酶Rubisco (Masclaux-Daubresse等2010; Carrión等2013)。研究发现烟草*NtCP2*基因在干旱胁迫下表达水平明显提高(Beyene等2006),本试验同样发现干旱能够诱导苹果*MdCP2*基因表达,说明在遭受水分胁迫植物叶片中,半胱氨酸蛋白酶起着主要作用,能够影响植物叶绿体发育,进而影响植物光合。另外发现干旱能够抑制编码Rubisco小亚基基因(*RBCS*)表达, Ali和Komatsu (2006)在研究了干旱胁迫下两周龄的水稻幼苗的叶鞘蛋白质组的变化,发现Rubisco大、小亚基都呈下调表达,并认为Rubisco含量的减少是由于叶绿体受干旱胁迫所致。Rubisco的活化酶

是一种可以调节Rubisco活性的酶,能使Rubisco在植株体内条件下达到最大活化程度,在光合速率的调节中起着重要作用(Rokka等2001)。研究发现干旱能抑制编码Rubisco活化酶基因(*RCA*)表达,与前人研究结果相似。

Liu等(2018)研究花生时发现, *AhGLK1*可以提高植株抗旱性,并在恢复生长过程中发挥重要作用, *AhGLK1*基因导入*glk1glk2*双突变体显示出比*glk1glk2*植物高约2倍的存活率,与WT相当,观察到的叶绿素含量和PSII效率的降低与双突变体中涉及叶绿素生物合成和光捕获基因的下调一致。说明它调节叶绿素生物合成和光捕获功能所需的基因,对干旱恢复期间的生长具有积极影响,并且它促进叶绿素生物合成和诱导PSII活性的基因。另外, GLK蛋白的过表达诱导叶绿素相关基因的强烈表达,非光合器官如水稻愈伤组织,根细胞和果实中的异位叶绿素积累(Nakamura等2009; Kobayashi等2012; Powell等2012)。在研究白桦黄叶表型试验中发现, *BpGLK1*抑制表达株系叶片中的叶绿素含量和叶绿体发育均受到了影响。*BpGLK1*基因的功能缺失还会影响植物的光合作用(Gang等2019)。我们研究表明,苹果中*MdCP2*与*MdGLK1*存在相互作用,半胱氨酸蛋白酶能够水解光合作用必需酶Rubisco, *GLK1*直接调节与叶绿体功能和质体编码基因相关的一组核编码基因的表达(Nakamura等2009; Waters等2009)。所以, *MdCP2*与叶绿体的生物合成可能存在联系,而*MdCP2*与*MdGLK1*在干旱过程中具体的作用规律等细节仍有待确定,因此需要在干旱调控的背景下更详细地探索这种相互作用的重要性。

### 参考文献(References)

- Ali GM, Komatsu S (2006). Proteomic analysis of rice leaf sheath during drought stress. *J Proteome Res*, 5 (2): 396–403
- Beyene G, Foyer CH, Kunert KJ (2006). Two new cysteine proteinases with specific expression patterns in mature and senescent tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leaves. *J Exp Bot*, 57: 1431–1443
- Carrión CA, Costa ML, Martínez DE, et al (2013). In vivo inhibition of cysteine proteases provides evidence for the involvement of ‘senescence associated vacuoles’ in

- chloroplast protein degradation during dark-induced senescence of tobacco leaves. *J Exp Bot*, 64: 4967–4980
- Chaves MM, Flexas J, Pinheiro C (2009). Photosynthesis under drought and salt stress regulation mechanisms from whole plant to cell. *Ann Bot-London*, 103 (4): 551–560
- Cheng L (2011). Morphological difference in leaves of various apple (*Malus domestica*) cultivars and its correlation with water-use efficiency under drought stress (dissertation). Yangling, Shaanxi: Northwest A&F University (in Chinese with English abstract) [程亮(2015). 干旱胁迫下不同苹果品种叶片形态结构和水分利用效率的关系研究(学位论文). 陕西杨凌: 西北农林科技大学]
- Farquhar GDF, Sharkey TD (1982). Stomatal conductance and photosynthesis. *Ann Rev Plant Physiol*, 33 (1): 317–345
- Flexas J, Medrano H (2002). Drought-inhibition of photosynthesis in C3 plants: stomatal and non-stomatal limitations revisited. *Ann Bot*, 89 (2): 183–189.
- Gang HX, Li RH, Zhao YM, et al (2019). Loss of GLK1 transcription factor function reveals new insights in chlorophyll biosynthesis and chloroplast development. *J Exp Bot*, doi: 10.1093/jxb/erz128
- Han RH, Lu XS, Gao GJ, et al (2007). Photosynthetic physiological response of alfalfa (*Medicago sativa*) to drought stress. *Acta Ecol Sin*, 27 (12): 5229–5237 (in Chinese with English Abstract) [韩瑞宏, 卢欣石, 高桂娟等(2007). 紫花苜蓿(*Medicago sativa*)对干旱胁迫的光合生理响应. *生态学报*, 27 (12): 5229–5237]
- Ji ML, Li L, Chen M, et al (2017). Identification and expression analysis of PME1 gene family in peach. *Plant Physiol J*, (11): 1988–1996 (in Chinese with English abstract) [冀美玲, 李玲, 陈敏等(2017). 桃果胶甲酯酶抑制因子PME1基因家族的鉴定及表达分析. *植物生理学报*, (11): 1988–1996]
- Kobayashi K, Baba S, Obayashi T, et al (2012). Regulation of root greening by light and auxin/cytokinin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 24 (3): 1081–1095
- Liu BH, Cheng L, Liang D, et al (2012). Growth, gas exchange, water-use efficiency, and carbon isotope composition of ‘Gala’ apple trees grafted onto 9 wild Chinese rootstocks in response to drought stress. *Photosynthetica*, 50 (3): 401–410
- Liu JL, Zhao CX, Wu N, et al (2011). Effects of drought and rewatering at seedling stage on photosynthetic characteristics and water use efficiency of peanut. *Sci Agric Sin*, 44 (3): 469–476 (in Chinese with English abstract) [刘吉利, 赵长星, 吴娜等(2011). 苗期干旱及复水对花生光合特性及水分利用效率的影响. *中国农业科学*, 44 (3): 469–476]
- Liu X, Li L, Li M, et al (2018). Ahglk1 affects chlorophyll biosynthesis and photosynthesis in peanut leaves during recovery from drought. *Sci Rep*, (1): 2250
- Masclaux-Daubresse C, Daniel-Vedele F, Dechorgnat J, et al (2010). Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. *Ann Bot-London*, 105: 1141–1157
- Nakamura H, Muramatsu M, Hakata M, et al (2009). Ectopic overexpression of the transcription factor OsGLK1 induces chloroplast development in non-green rice cells. *Plant Cell Physiol*, 50: 1933–1949
- Pang J, Zhang FL, Hao LZ, et al (2013). Effect of drought stress on anatomical structure and photosynthesis of *Pugionium cornutum* gaertn leaves in seedling. *Ecol Environ Sci*, 22 (4): 575–581 (in Chinese with English abstract) [庞杰, 张凤兰, 郝丽珍等(2013). 沙芥幼苗叶片解剖结构和光合作用对干旱胁迫的响应. *生态环境学报*, 22 (4): 575–581]
- Pei B, Zhang GC, Zhang SY, et al (2013). Effects of soil drought stress on photosynthetic characteristics and antioxidant enzyme activities in *Hippophae rhamnoides* Linn. seedlings. *Acta Ecol Sin*, 33 (5): 1386–1396 (in Chinese with English abstract) [裴斌, 张光灿, 张淑勇等(2013). 土壤干旱胁迫对沙棘叶片光合作用和抗氧化酶活性的影响. *生态学报*, 33 (5): 1386–1396]
- Powell ALT, Nguyen CV, Hill T, et al (2012). Uniform ripening encodes a Golden 2-like transcription factor regulating tomato fruit chloroplast development. *Science*, 336: 1711–1715
- Ran YL (2017). Effects of drought stress on water physiology and AQPs expression in two apple rootstocks (dissertation). Lanzhou: Gansu Agricultural University (in Chinese with English abstract) [冉应龙(2017). 干旱胁迫对2个苹果砧木水分生理及AQPs表达水平的影响(学位论文). 兰州: 甘肃农业大学]
- Renu KC, Srivalli B, Ahlawat YS (1999). Drought induces many forms of cysteine proteases not observed during natural senescence. *Biochem Biophys Res Commun*, 255 (2): 324–327
- Rokka A, Zhang L, Aro EM (2001). Rubisco activase: an enzyme with a temperature-dependent dual function? *Plant J*, 25 (4): 9
- Vanková R, Dobrá J, Štorchová H (2012). Recovery from drought stress in tobacco. *Plant Sign Behav*, 7: 19–21
- Wang B, Yang XZ, Dai SL (2013). Comprehensive analysis in drought resistance of four landscape trees. *J Beijing For Univ*, 35 (11): 95–102 (in Chinese with English abstract) [王斌, 杨秀珍, 戴思兰(2013). 4种园林树木抗旱性的综合分析. *北京林业大学学报*, 35 (11): 95–102]
- Waters MT, Wang P, Korkaric M, et al (2009). GLK transcription factors coordinate expression of the photosynthetic

- apparatus in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 21: 1109–1128
- Wu FZ, Bao WK, Li FL, et al (2008). Effects of water stress and nitrogen supply on leaf gas exchange and fluorescence parameters of *SOPHORA DAVIDII* seedlings. *Photosynthetica* (Prague), 46 (1): 40–48
- Xiang WH (2018). Study on the physiological and biochemical characteristics of glycyrrhiza young seedlings responding in drought stress (dissertation). Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University (in Chinese with English abstract) [项雯慧(2018). 甘草幼苗响应干旱胁迫生理生化特征研究(学位论文). 呼和浩特: 内蒙古农业大学]
- Xu JZ, Peng SZ, Wei Z, et al (2010). Intercellular CO<sub>2</sub> concentration and stomatal or non-stomatal limitation of rice under water saving irrigation. *J Agric Engin*, 26 (7): 76–80 (in Chinese with English abstract) [徐俊增, 彭世彰, 魏征等(2010). 节水灌溉水稻叶片胞间CO<sub>2</sub>浓度及气孔与非气孔限制. *农业工程学报*, 26 (7): 76–80]
- Xu LX, Yu JJ, Han, LB, et al (2013). Photosynthetic enzyme activities and gene expression associated with drought tolerance and post-drought recovery in Kentucky bluegrass. *Environ Exp Bot*, 89: 28–35
- Yang SM, Zheng H, Qi GH, et al (2008). Effects of soil water content on leaf photosynthetic characteristics of Fuji apple in pot culture. *Hebei J For Orchard Res*, 23 (2): 179–181 (in Chinese with English abstract) [杨素苗, 郑辉, 齐国辉等(2008). 土壤含水量对盆栽红富士苹果叶片光合特性的影响. *河北林果研究*, 23 (2): 179–181]
- Zhang SY, Zhang GC, Gu SY, et al (2010). Critical responses of photosynthetic efficiency of goldspur apple tree to soil water variation in semiarid loess hilly area. *Photosynthetica* (Prague), 48 (4): 589–595
- Zhao SJ, Cang J (2016). *Experimental Guidance of Plant Physiology*. Beijing: China Agriculture Press (in Chinese) [赵世杰, 苍晶(2016). *植物生理学实验指导*. 北京: 中国农业出版社]