

DOI: 10.11913/PSJ.2095-0837.2016.50765

苏杰, 郭荣起, 李国婧, 王瑞刚. 过表达 VHA-c4 和 VHA-c5 基因对拟南芥根长的影响[J]. 植物科学学报, 2016, 34(5): 765~774
 Su J, Guo RQ, Li GJ, Wang RG. Effect on root length of the overexpression of *Arabidopsis* VHA-c4 and VHA-c5 genes[J]. Plant Science Journal, 2016, 34(5): 765~774

过表达 VHA-c4 和 VHA-c5 基因对拟南芥根长的影响

苏杰^{1,2}, 郭荣起^{2,3}, 李国婧², 王瑞刚^{2*}

(1. 内蒙古农业大学职业技术学院, 内蒙古土右旗 014109; 2. 内蒙古农业大学生命科学学院, 呼和浩特 010018;
 3. 内蒙古呼伦贝尔市农业科学研究所, 内蒙古牙克石 162650)

摘要: 为研究液泡 H⁺-ATPase c 亚基 VHA-c4 和 VHA-c5 基因在植物生长发育过程中的作用, 本研究构建了拟南芥 VHA-c4 和 VHA-c5 过表达载体并转化野生型拟南芥, 分别获得 9 个和 7 个 T2 代转基因纯合体株系。采用半定量 RT-PCR 方法对过表达 VHA-c4 和 VHA-c5 的转基因纯合体进行阳性鉴定, 发现其 mRNA 表达量均高于对照。对转基因纯合体进行暗培养和正常光照培养, 结果显示, 黑暗条件下, 所有 VHA-c4 转基因株系的主根变短, 而在正常光照下, 所有 VHA-c5 转基因株系的主根变短, 推测 VHA-c4 和 VHA-c5 分别在黑暗和光照条件下影响植物根的生长。用 ABA 和糖(葡萄糖和蔗糖)处理转基因纯合体, 结果显示它们与野生型的表型无明显差异, 表明 VHA-c4 和 VHA-c5 基因的过表达没有影响拟南芥对 ABA 和糖的响应。

关键词: 拟南芥; VHA-c4; VHA-c5; 黑暗; 正常光照; ABA; 糖

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2016)05-0765-10

Effect on Root Length of the Overexpression of *Arabidopsis* VHA-c4 and VHA-c5 Genes

SU Jie^{1,2}, GUO Rong-Qi^{2,3}, LI Guo-Jing², WANG Rui-Gang^{2*}

(1. Vocational and Technical College of Inner Mongolia Agricultural University, Tuyouqi, Inner Mongolia 014109, China;
 2. College of Life Sciences Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China;
 3. Agricultural Sciences of Hulunbeier, Yakeshi, Inner Mongolia 162650, China)

Abstract: To study the role of vacuole H⁺-ATPase subunit c genes on plant growth and development, over-expression vectors of VHA-c4 and VHA-c5 from *Arabidopsis thaliana* were constructed and introduced into wild-type *A. thaliana*, and 9 and 7 homozygous T2 generations of VHA-c4 and VHA-c5 overexpressed transgenic lines were obtained, respectively. Semi-quantitative RT-PCR methods were used for identification of the positive VHA-c4 and VHA-c5 transgenic homozygotes, and their corresponding transcript levels were increased in every transgenic line. When cultivated under different light conditions, the VHA-c4 transgenic plants exhibited a reduction in primary root length compared with that of the wild-type when cultivated in the dark, whereas the VHA-c5 transgenic plants showed reduced primary root length under normal light conditions. These results indicated that VHA-c4 and VHA-c5 affected the growth of roots during light/dark cycles. Following ABA and sugar (glucose and sucrose) treatment, no significant differences were found between the transgenic homozygote phenotype and wild

收稿日期: 2016-03-24, 退修日期: 2016-05-10。

基金项目: 国家自然科学基金项目(30460018); 内蒙古自治区科技创新团队项目(201503004)。

This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (30460018) and the Technology Innovation Team of Inner Mongolia Autonomous Region (201503004).

作者简介: 苏杰(1983-), 女, 硕士, 讲师, 研究方向为植物生物化学与分子生物学(E-mail: sujie_1546@163.com)。

* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: ruigangwang@126.com)。

type, indicating that VHA-c4 and VHA-c5 overexpression did not affect the response of *Arabidopsis* to ABA or sugar.

Key words: *Arabidopsis thaliana*; VHA-c4; VHA-c5; Dark; Normal light; ABA; Sugar

液泡 H⁺-ATPase (Vacuolar-type H⁺-ATPase, 简称 V-ATPase) 是由多个亚基构成的高度保守的内膜质子泵，在真核生物的囊泡运输、蛋白质降解和离子平衡等生命活动过程中起重要作用^[1]。植物中，V-ATPase 广泛分布于液泡、高尔基体和内涵体等内膜系统^[2-4]。V-ATPase 是一个由 13 个亚基组成的复合体酶，这些亚基又组成了两大亚复合体，即 V₁ 亚复合体 (由 A ~ H 8 个亚基组成) 和 V₀ 亚复合体 (由 a, c, c'', d, e 5 个亚基组成)^[2] (图 1)。

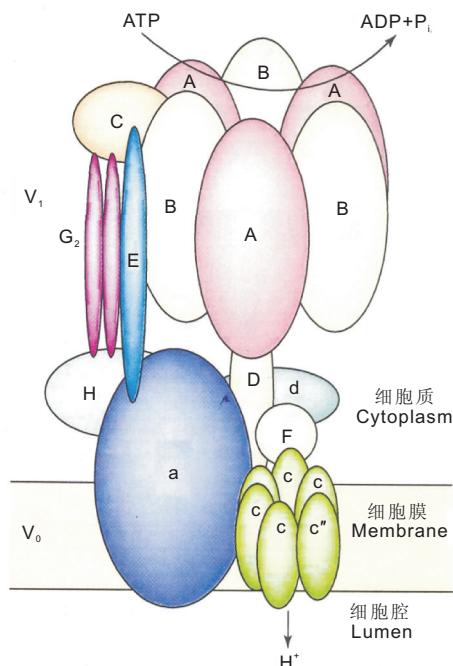


图 1 V-ATPase 的结构模型 (引自 Sze 等^[2])

Fig. 1 Structural model of V-ATPase
(Cited from reference^[2])

V-ATPase 可将 H⁺ 泵入膜内，从而调节细胞和细胞器的 pH 值，产生的质子电化学梯度可以驱动离子及代谢物的转运，从而影响膨压和细胞的伸长和扩展^[5,6]。V-ATPase 还可参与植物生长发育的调控，其中 A 亚基和 E 亚基可分别调控胡萝卜 (*Daucus carota* L.) 和大麦 (*Hordeum vulgare* L.) 叶片的生长^[7,8]；C 亚基能影响拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh) 植株的高度及根长^[9]。此外，V-ATPase 还能应对各种非生物胁迫 (如冷害、

干旱和盐胁迫等)。冷胁迫下，绿豆 (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) 下胚轴的 V-ATPase 活性被抑制 (可逆)^[10]；干旱胁迫下，玉米 (*Zea mays* L.) VATPase 的 B 亚基对花期干旱胁迫有响应^[11]；盐胁迫下，冰叶日中花 (*Mesembryanthemum crystallinum* L.) 的 A、B、E、c 亚基的转录水平均升高^[5]；受盐胁迫的烟草 (*Nicotiana tabacum* L.) 悬浮细胞的 A 亚基的转录水平增加了 2 ~ 4 倍^[12]。

V-ATPase 的 c 亚基 (VHA-c) 是 V₀ 亚复合体的主要组成元件，它以 4 或 5 拷贝的形式呈对称分布，分子量约为 16 kD，是质子转运的通道，且对 V₁ ~ V₀ 的装配起关键作用^[13,14]。VHA-c 包含 TM1 ~ TM4 4 个跨膜转运区域，这些区域包含的氨基酸数目约占 VHA-c 氨基酸总数的一半。TM4 中的谷氨酸 (Glu) 残基是质子结合位点。酵母的 VHA-c 由单基因 *Vma3* 编码，破坏 *Vma3* 基因或用其它氨基酸 (如谷氨酰胺、缬氨酸或赖氨酸) 替换 Glu 均会降低 V-ATPase 活性，表明其主要通过 VHA-c 发挥作用^[15]。

研究发现，VHA-c 与植物的生长发育及抗非生物胁迫有关。例如，在正常培养和盐胁迫条件下，过表达星星草 (*Puccinellia tenuiflora* (Griseb.) Scribn. & Merr.) VHA-c 基因的拟南芥与野生型相比，在根长、鲜重、植株高度及种子数量方面都具有更好的表型^[16]；盐胁迫可诱导冰叶日中花 VHA-c 基因的表达^[17]；盐和干旱胁迫可增加御谷 (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) VHA-c 基因的转录水平^[18]；过表达互花米草 (*Spartina alterniflora* Loisel.) VHA-c 基因可增强水稻的耐盐性^[19]；VHA-c 基因与野生玫瑰 (*Rosa rugosa* Thunb.) 的耐盐性密切相关^[20]。

在参与生长发育及抗非生物胁迫方面，模式植物拟南芥的 VHA-c 亚基也不例外。该亚基由 5 个同源基因 (即 VHA-c1 ~ VHA-c5) 编码，这些基因的氨基酸序列高度保守 (> 98%)^[2]。关于拟南芥 VHA-c 的研究已有很多，如 Perera 等^[21]证实光照、盐和营养胁迫等均参与了拟南芥 VHA-c 亚基同源基因的表达调节；王瑞刚^[22]对拟南芥 VHA-c

亚基部分同源基因的调控序列进行了研究, 发现其指导的 GUS 基因在转基因烟草内的表达水平与组织、器官及发育状态相关, 且不同程度地受光照、温度、pH 值、NaCl 浓度、植物激素、糖类物质以及矿物质含量等的调控; Padmanaban 等^[23]通过 RNAi 抑制 VHA-c1 或 VHA-c3 基因的表达, 发现 V-ATPase 的活性降低并抑制根的生长; 徐萍等^[24]发现 VHA-c 基因对高盐、水分和 ABA 胁迫有响应; 郭荣起^[25]利用 RNAi 技术发现 VHA-c1 沉默纯合体的根和下胚轴都变短; 于秀敏等^[26]揭示 VHA-c2、VHA-c3 和 VHA-c5 可被光照促进表达; Zhou 等^[16]研究表明, 正常培养条件下拟南芥突变体 *atvha-c5* 的 V-ATPase 活性降低、主根变短且鲜重减少。本实验室曾研究发现暗培养条件下 VHA-c1 和 VHA-c3 过表达纯合体的主根变短, 推断 VHA-c1 和 VHA-c3 可能影响拟南芥根细胞的扩展^[27-29]。

以上研究证明, 拟南芥 VHA-c 亚基在植物生长发育和响应非生物胁迫过程中具有重要的作用。它们由 5 个同源性很高的基因编码, 但这 5 个基因所编码亚基的特定功能及在植物生长发育过程中是如何相互协调发挥作用的目前尚不清楚。为进一步探明拟南芥 VHA-c 基因的功能, 本实验构建了拟南芥 VHA-c4 和 VHA-c5 基因的过表达载体, 并转化野生型拟南芥; 采用半定量 RT-PCR 方法对这两个基因的转基因纯合体进行了阳性鉴定; 在暗培养和正常光照培养条件下, 采用不同浓度的 ABA 和渗透胁迫物质(葡萄糖和蔗糖)处理转基因纯合体植株的培养基, 并检测其生长表型, 以期为阐明 VHA-c 基因在调控植物生长发育方面的机制提供线索。

1 材料与方法

1.1 植物材料

野生型拟南芥(Ecotype Columbia, Col-0)由

内蒙古农业大学植物分子生物学实验室提供。在温室内培养拟南芥幼苗, 培养温度 22℃, 湿度 65%, 光照周期为 16 h/8 h。

1.2 菌株和质粒

根癌农杆菌 GV3101、大肠杆菌 DH5α 和 pCHF3 载体由内蒙古农业大学植物分子生物学实验室保藏。

1.3 基因克隆和过表达载体的构建

用 CTAB 法^[30]提取拟南芥基因组 DNA, 然后以其为模板, 分别扩增拟南芥 VHA-c4(GenBank 号: At1g75630) 和 VHA-c5(GenBank 号: At2g16510) 目的片段, 引物分别为 Clone-VHA-c4 和 Clone-VHA-c5(表 1)。

VHA-c4 的 PCR 扩增条件为: 98℃ 预变性 1 min, 98℃ 变性 10 s, 58℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 2 min, 共 30 个循环; 然后 72℃ 延伸 6 min。VHA-c5 的 PCR 扩增条件为: 98℃ 预变性 1 min, 98℃ 变性 10 s, 60℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min 30 s, 共 30 个循环; 然后 72℃ 延伸 5 min。

PCR 产物经纯化和回收后连接到 pGM-T 载体(天根公司), 进行测序。测序结果鉴定无误后, 利用限制性内切酶 *Kpn* I 和 *Sal* I 共酶切 pGM-T-c4、pGM-T-c5 及目的载体 pCHF3, 将酶切获得的两个目的片段分别与载体 pCHF3 连接并转化大肠杆菌 DH5α, 获得目标过表达载体 pCHF3-c4 和 pCHF3-c5。

采用电击法^[31]将过表达质粒载体 pCHF3-c4 和 pCHF3-c5 转化到农杆菌 GV3101 细胞中, 取 50 μL 转化产物涂于含 25 μg/mL 庆大霉素(Gent)和 100 μg/mL 壮观霉素(Spect)的固体培养基上, 28℃ 培养 36~48 h, 筛选阳性克隆并进行菌落 PCR 和双酶切验证。

1.4 拟南芥转化及转基因植株的筛选

采用浸花法^[32]转化野生型拟南芥, 转化后将植株于正常条件下继续培养 3~4 周, 成熟后收取

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

引物名称 Primers	正向引物 Forward primers (5'-3')	反向引物 Reverse primers (5'-3')
Clone-VHA-c4	CAGGTACCGGAGCAACAGTCATCAAAGAG(<i>Kpn</i> I)	GTCGACATGATGATAATAACAATAAGTCTCC(<i>Sal</i> I)
Clone-VHA-c5	GGTACCGAGAAGATGTCTACGTTAG(<i>Kpn</i> I)	GTCGACGGCTCCGATACTACATAC(<i>Sal</i> I)
RT-PCR-actin ^[23]	ATGGCAGATGGTGAAGACATTAG	GAAGCACTCCTGTGGACTATTGA
RT-PCR-VHA-c4 ^[23]	CTCATCGGAGCAACAGTCATCAAAGAGCCA	TCACCGACGATTCCAATAGCCATACCAGCA
RT-PCR-VHA-c5	TGTCTACGTTCAGCGCGATG	TTAGGCCGTATAGAGCGAGCG

种子。将种子播种于含 30 μg/mL 卡那霉素 (Kan) 的 1/2MS 选择培养基 (pH 5.8) 上, 22℃ 培养 10 ~ 12 d 后挑选阳性植株, 待其成熟后分单株收取种子 (T1 代); T1 代种子继续按单株播种于含 Kan 的选择培养基上 (同上), 22℃ 培养 10 ~ 12 d 后, 选择出现 3:1 性状分离的株系, 将幼苗移至蛭石上培养, 单株收取种子 (T2 代); T2 代种子继续按上述条件培养, 不再发生性状分离的即为转基因纯合体株系, 用于本研究的各项分析。

1.5 转基因纯合体的阳性鉴定

以拟南芥 *actin* (GenBank 号: At3g12110) 为内参基因, 采用半定量 RT-PCR 方法, 对转基因纯合体的基因表达量进行阳性鉴定。提取拟南芥野生型、*VHA-c4* 和 *VHA-c5* 过表达转基因纯合体的总 RNA, 反转录得到 cDNA。再分别以这些 cDNA 为模板, 对 *actin*、*VHA-c4* 和 *VHA-c5* 基因进行 PCR 扩增。

PCR 反应条件均为: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 50℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 90 s, 25 个循环; 72℃ 延伸 5 min^[23]。

1.6 转基因植株暗培养

将转基因纯合体和野生型拟南芥种子同时种植于 1/2MS 培养基上, 4℃ 春化 3 d, 再进行暗培养 5 d 后, 统计根的长度。

1.7 转基因植株正常光照培养

将转基因纯合体和野生型拟南芥种子同时种植在 1/2MS 培养基中, 4℃ 春化 3 d, 再于 22℃ 正常光照条件下培养 9 d 后, 观察表型。

1.8 转基因植株 ABA 处理

(1) 转基因纯合体和野生型拟南芥种子同时种植在 1/2MS 培养基中, 4℃ 春化 3 d, 再于 22℃、16 h 光照/8 h 黑暗条件下培养 48 h, 然后转移至含不同浓度 ABA (0、4、8、12 μmol/L) 的 1/8MS 培养基 (pH 5.8) 上, 16 h 光照/8 h 黑暗培养 4 d, 统计主根长度。

(2) 转基因纯合体和野生型拟南芥种子同时种植在含有不同浓度 ABA (0、0.5、1、2 μmol/L) 的 1/2MS 培养基 (pH 5.8) 中, 4℃ 春化 3 d 后于 22℃、16 h 光照/8 h 黑暗条件下培养 2 d, 统计萌发率。

1.9 转基因植株糖处理

转基因纯合体和野生型种子分别种植在含

0%、4%、5% 和 6% 的葡萄糖以及含 0%、4%、5% 和 6% 蔗糖的 1/2MS 培养基 (pH 5.8) 中, 4℃ 春化 3 d 后于 22℃、16 h 光照/8 h 黑暗条件下培养 3 d, 统计萌发率。

2 结果与分析

2.1 基因克隆和过表达载体的构建

以拟南芥基因组 DNA 为模板, 分别以两对引物进行 PCR 扩增, 获得 *VHA-c4* 和 *VHA-c5* 基因的目的片段大小分别为 1430 bp (图 2: A) 和 900 bp (图 2: B), 二者分别与 pGM-T 载体连接后测序。经验证无误后, 将阳性质粒 pGM-T-c4、pGM-T-c5 和表达载体 pCHF3 用 *Kpn* I 和 *Sal* I 双酶切, 胶回收 *VHA-c4*、*VHA-c5* 基因和 pCHF3 载体, 分别将两个基因的目的片段与 pCHF3 载体连接后转化 DH5α, 提取阳性转化子的质粒, 进行 *Kpn* I 和 *Sal* I 的双酶切验证 (图 2: C, D), 证明重组表达载体 pCHF3-c4 和 pCHF3-c5 构建成功。

用电击法将重组质粒 pCHF3-c4 和 pCHF3-c5 分别转化农杆菌 GV3101, 通过菌落 PCR 检测呈阳性, 证明重组质粒 pCHF3-c4 和 pCHF3-c5 均已转入农杆菌 GV3101 中。

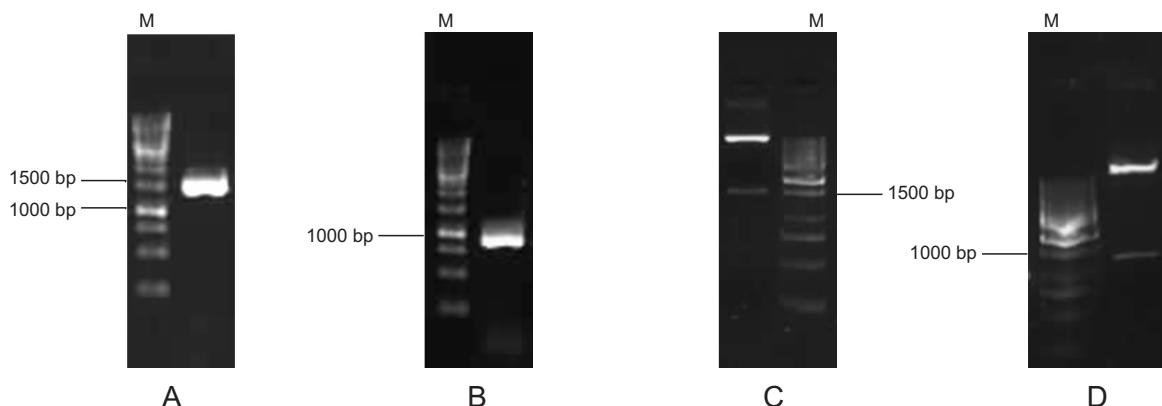
2.2 转基因植株的筛选

重组质粒 pCHF3-c4 和 pCHF3-c5 经农杆菌介导转入野生型拟南芥。经筛选获得的 *VHA-c4* 和 *VHA-c5* T1 代转基因株系分别为 22 和 26 个。进一步筛选获得 9 个 *VHA-c4* T2 代转基因纯合体株系, 分别是: c4-1-1、c4-2-3、c4-9-1、c4-10-4、c4-11-6、c4-15-2、c4-18-2、c4-21-4 和 c4-22-1; 获得 *VHA-c5* T2 代转基因纯合体株系 7 个, 分别是: c5-3-2、c5-5-5、c5-8-5、c5-14-6、c5-15-10、c5-16-4 和 c5-33-8。

2.3 转基因纯合体的阳性鉴定

以野生型为对照, 采用半定量 RT-PCR 法对 *VHA-c4* 转基因纯合体进行检测 (图 3: A)。将 WT 的 *VHA-c4* 的转录水平定为 100%, c4-1-1、c4-2-3、c4-9-1、c4-10-4、c4-11-6、c4-15-2、c4-22-1 的 mRNA 表达水平较强, c4-21-4 的 mRNA 表达水平居中, 而 c4-18-2 的 mRNA 表达水平较弱。

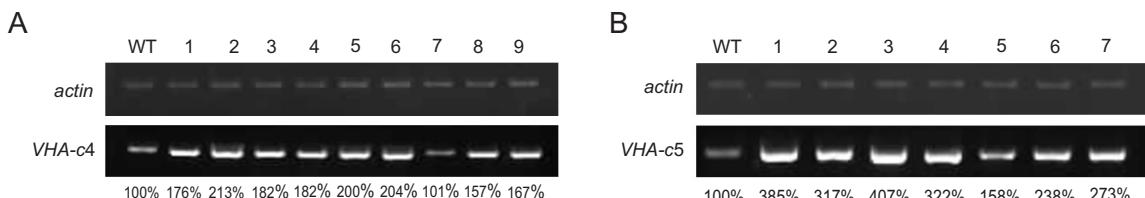
采用相同方法检测 *VHA-c5* 转基因纯合体 (图 3: B), 结果显示 c5-3-2、c5-5-5、c5-8-5、c5-14-6、c5-16-4 和 c5-33-8 的 mRNA 表达水平较



A: VHA-c4 目的片段扩增; B: VHA-c5 目的片段扩增; C: 重组质粒 pCHF3-c4 的酶切鉴定; D: 重组质粒 pCHF3-c5 的酶切鉴定。
A: Amplified product of VHA-c4 fragment; B: Amplified product of VHA-c5 fragment; C: Identification of the recombinant pCHF3-c4 plasmid digested with *Kpn* I and *Sal* I; D: Identification of the recombinant pCHF3-c5 plasmid digested with *Kpn* I and *Sal* I.

图 2 VHA-c4 和 VHA-c5 基因扩增和重组载体的验证

Fig. 2 Gene amplification of VHA-c4 and VHA-c5 and verification of the recombinant plasmids



WT 野生型(对照)。A: VHA-c4 转基因纯合体 mRNA 表达水平, 1 ~ 9 分别是转基因系 c4-1-1、c4-2-3、c4-9-1、c4-10-4、c4-11-6、c4-15-2、c4-18-2、c4-21-4、c4-22-1; B: VHA-c5 转基因纯合体 mRNA 表达水平, 1 ~ 7 分别是转基因系 c5-3-2、c5-5-5、c5-8-5、c5-14-6、c5-15-10、c5-16-4、c5-33-8。

WT: Wild type (control). A: Transcript level of VHA-c4 gene in transgenic plants. 1 ~ 9: Transgenic plants c4-1-1, c4-2-3, c4-9-1, c4-10-4, c4-11-6, c4-15-2, c4-18-2, c4-21-4 and c4-22-1, respectively; B: Transcript level of VHA-c5 gene in transgenic plants. 1 ~ 7: Transgenic plants c5-3-2, c5-5-5, c5-8-5, c5-14-6, c5-15-10, c5-16-4 and c5-33-8, respectively.

图 3 转基因纯合体中 VHA-c4 和 VHA-c5 的 mRNA 表达水平

Fig. 3 Transcript level of VHA-c4 and VHA-c5 in transgenic plants

强; c5-15-10 的 mRNA 表达水平居中。

以上结果表明, 与野生型相比, VHA-c4 和 VHA-c5 过表达转基因纯合体拟南芥 mRNA 的表达水平均有不同程度增加。

2.4 过表达转基因纯合体主根变短

2.4.1 VHA-c4 过表达纯合体在黑暗条件下主根变短

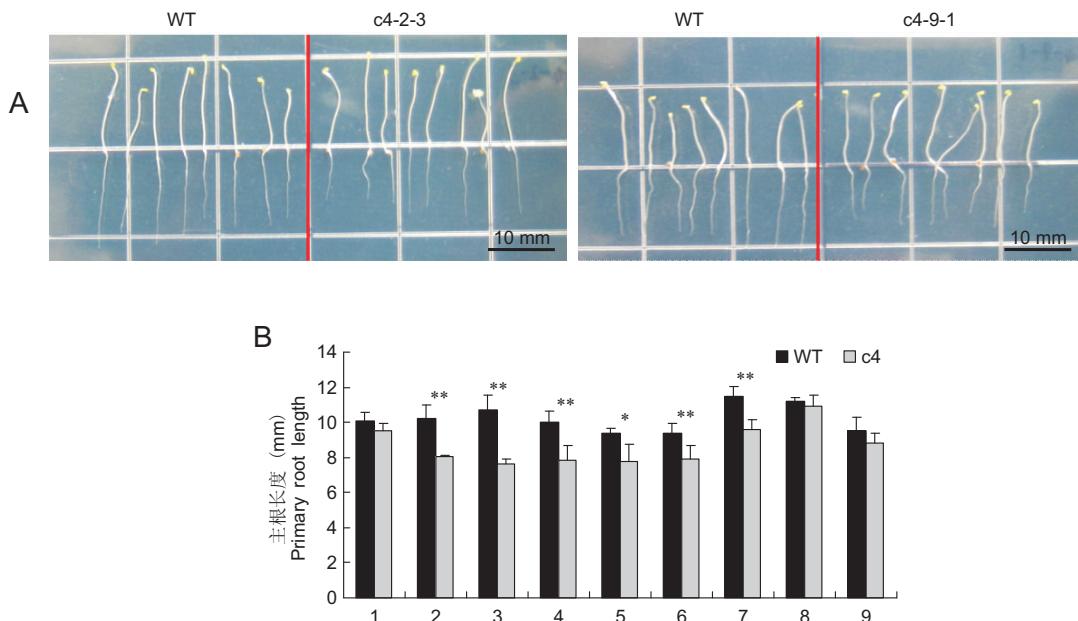
在正常光照培养下, VHA-c4 过表达纯合体与野生型差异不明显。暗培养条件下, VHA-c4 过表达纯合体与野生型种子的萌发状况无差异。暗培养 5 d 后, 所有株系的主根都比对照短, 分别比对照减少 5%、21%、29%、22%、17%、16%、29%、2% 和 8%, 其中 c4-11-6 与对照之间主根长度的差异达到显著水平; c4-2-3、c4-9-1、c4-10-4、c4-15-2、c4-18-2 与对照之间主根长度的差异达到极显著水平(图 4: A, B)。

2.4.2 VHA-c5 过表达纯合体在正常光照下主根变短

正常光照培养下, 所有 VHA-c5 过表达纯合体的主根均比对照短, 而侧根与对照无明显差异。7 个株系的平均主根长度分别比对照短 10%、5%、15%、16%、13%、11% 和 6%, 其中 c5-3-2 和 c5-16-4 与对照的差异达到显著水平, c5-8-5、c5-14-6、c5-15-10 与对照之间达到极显著水平(图 5: A, B)。而在黑暗条件培养下, VHA-c5 过表达纯合体的表型与野生型(对照)无明显差异。

2.5 VHA-c4 和 VHA-c5 过表达纯合体经 ABA 和糖处理后无明显变化

研究发现 VHA-c1 和 VHA-c3 过表达纯合体对 ABA、葡萄糖和蔗糖的抑制不敏感^[27,28]。本实验将 VHA-c4 和 VHA-c5 过表达纯合体用 ABA 处理后, 所有的纯合体幼苗与野生型相比无明显差异。

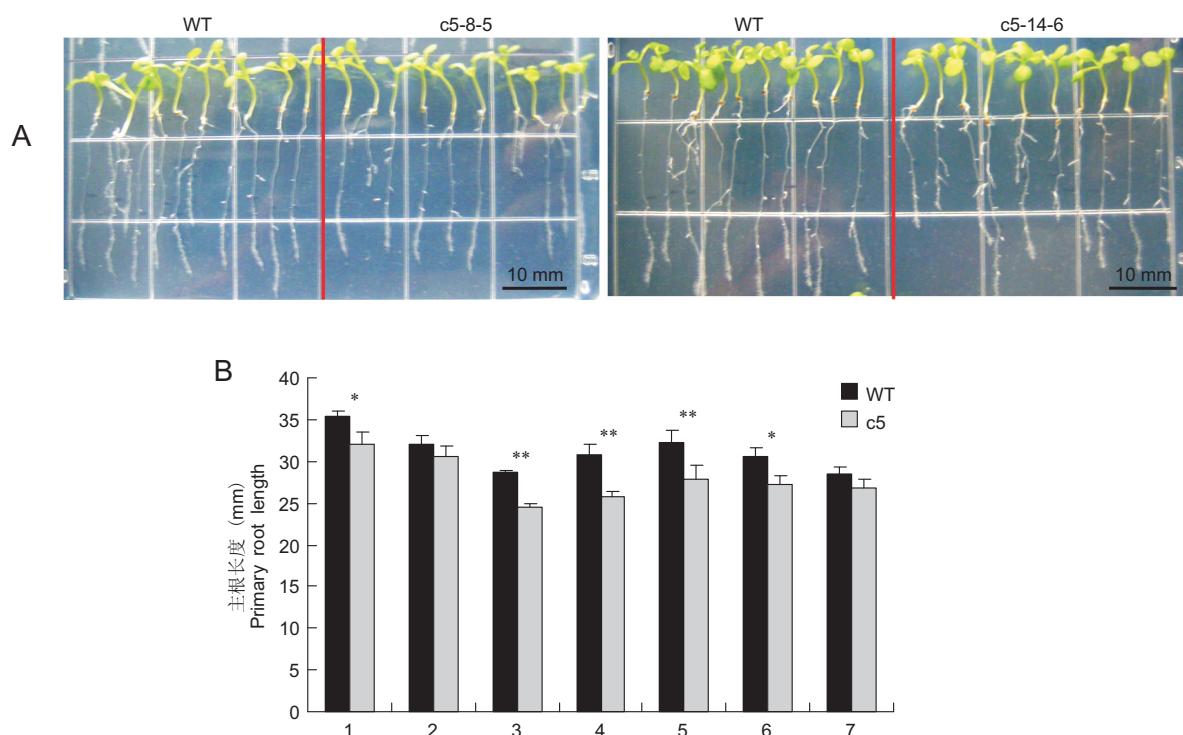


A: 对照和转基因株系。B: 根长统计; 1 ~ 9 分别是转基因株系 c4-1-1、c4-2-3、c4-9-1、c4-10-4、c4-11-6、c4-15-2、c4-18-2、c4-21-4、c4-22-1。* 表示显著性差异 ($P < 0.05$)，** 表示极显著差异性 ($P < 0.01$)。下同。

A: Control and transgenic homozygote lines. B: Root length statistics; 1 ~ 9: Transgenic homozygote lines c4-1-1, c4-2-3, c4-9-1, c4-10-4, c4-11-6, c4-15-2, c4-18-2, c4-21-4 and c4-22-1. * indicates significant difference ($P < 0.05$); ** indicates markedly significant difference ($P < 0.01$). Same below.

图 4 暗培养条件下 VHA-c4 转基因纯合体主根变短

Fig. 4 Reduction in primary root length of different *VHA-c4* transgenic homozygote lines grown in the dark



A: 对照和转基因株系。B: 根长统计; 1 ~ 7 分别是转基因株系 c5-3-2、c5-5-5、c5-8-5、c5-14-6、c5-15-10、c5-16-4、c5-33-8。

A: Control and transgenic homozygote lines. B: Root length statistics; 1 ~ 7. Transgenic plants c5-3-2, c5-5-5, c5-8-5, c5-14-6, c5-15-10, c5-16-4 and c5-33-8, respectively.

图 5 *VHA-c5* 不同转基因纯合体在正常光照下主根变短

Fig. 5 Reduction in primary root length of different *VHA-c5* transgenic homozygote lines

(图6), 其主根相对伸长量与对照相比差异不明显; 同时, 过表达纯合体种子的萌发率也与对照基本一致; 当用不同浓度的葡萄糖或蔗糖处理过表达纯合体的种子后, 种子萌发率也与野生型无明显差异(图7)。这些结果表明, VHA-c4 和 VHA-c5 基因的过表达没有改变拟南芥对ABA和糖的响应。

3 讨论

3.1 VHA-c4 和 VHA-c5 基因对拟南芥根生长的影响及可能机制

植物V-ATPase通过运输质子而使细胞器酸

化^[13]。作为V₀亚复合体的重要成员, VHA-c亚基对质子的转运起关键作用^[1]。V-ATPase活性的抑制剂—吉他霉素, 可与VHA-c特异性结合抑制质子的转运, 表明VHA-c亚基对于维持V-ATPase活性并行使其功能起重要作用^[33]。

很多关于V-ATPase其它亚基的研究证实, V-ATPase活性对植物生长起关键作用。例如, 棉花(*Anemone vitifolia* Buch)纤维细胞的伸长过程中A亚基的转录水平增加^[34]; 通过抑制A亚基的表达, 转基因胡萝卜的叶片细胞变小^[7]; 拟南芥突变株*atvha-C* (*det 3*)的C亚基表达量的减少使

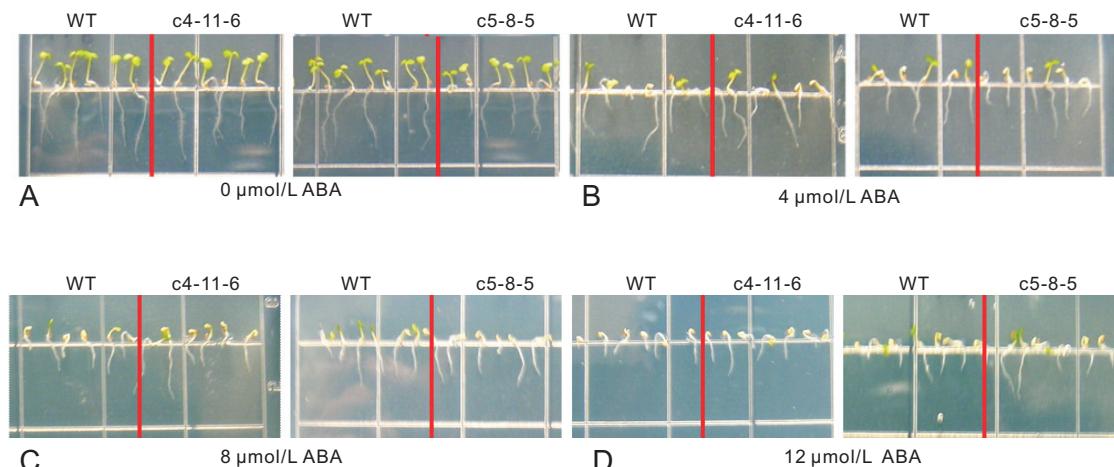


图6 ABA处理后转基因株系c4-11-6和c5-8-5的表型
Fig. 6 Phenotype of the transgenic lines c4-11-6 and c5-8-5 treated by ABA.

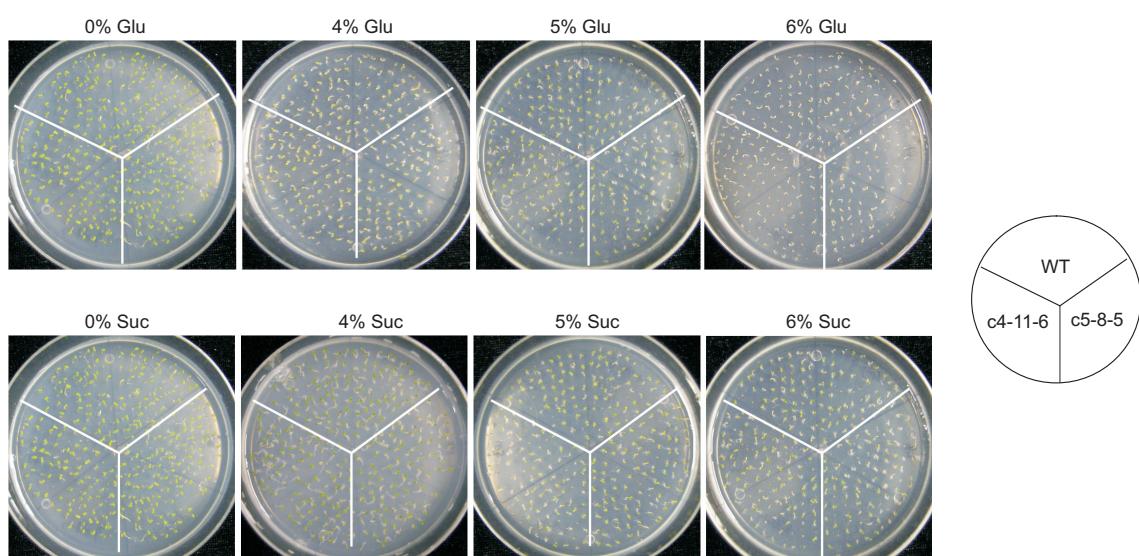


图7 不同浓度葡萄糖(Glu)和蔗糖(Suc)处理下的c4-11-6和c5-8-5的种子萌发
Fig. 7 Seed germination of c4-11-6 and c5-8-5 treated by different concentrations of glucose (Glu) and sucrose (Suc)

V-ATPase 活性显著下降，导致根变短且植株矮小^[9]；在扩展的大麦叶片中 E 亚基的转录水平增加^[8]等。

有关 VHA-c 亚基的研究也证明其通过影响 V-ATPase 活性对植物根的生长起关键作用。例如，RNAi 抑制 *AtVHA-c1* 或 *AtVHA-c3* 基因表达，使 V-ATPase 活性降低，并使拟南芥根变短^[23]。利用吉他霉素抑制 V-ATPase 活性使野生型和 *PutVHA-c* 转基因植株的根变短；拟南芥 T-DNA 插入的突变体 *atvha-c5* 表现出 V-ATPase 活性降低和根变短；而过表达 *PutVHA-c* 拟南芥的 V-ATPase 活性增强、根变长^[16]。我们的研究虽没有验证 V-ATPase 活性的变化，但同样发现过表达 *VHA-c4* 和 *VHA-c5* 基因使拟南芥的主根分别在黑暗和正常光照下变短，这表明 VHA-c 可能对植物根的生长发育起重要作用。

研究表明，*VHA-c4* 和 *VHA-c5* 过表达纯合体的 V-ATPase 可以影响根的生长。Zhou 等^[16]的发现，星星草 VHA-c 亚基通过影响 V-ATPase 依赖的内涵体运输而在植物生长方面起重要作用。同时，通过生物信息学分析已经确定，*VHA-c4* 和 *VHA-c5* 基因的调控区存在光调控元件，如 AE-box、GATA、ACE 等，光照/暗信号可能直接或间接影响 c 亚基的表达，进而使根细胞的 V-ATPase 活性发生改变^[35]，推测其原因可能是由于光照/黑暗信号影响了拟南芥 *VHA-c4* 和 *VHA-c5* 过表达纯

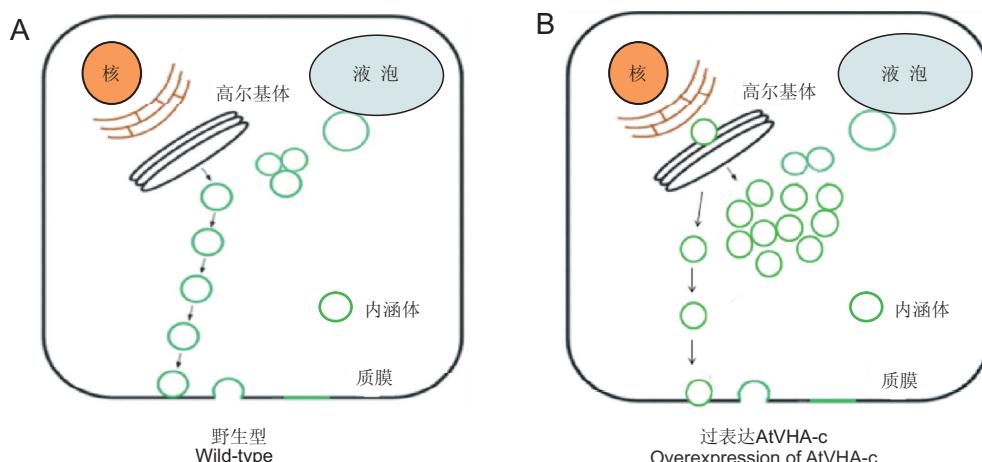
合体 VHA-c 亚基的表达，限制了拟南芥根细胞中 V-ATPase 依赖的内涵体运输，最终影响根细胞的扩展(图 8)。

3.2 过表达 *VHA-c* 基因拟南芥表型的比较

拟南芥 VHA-c 亚基由 *VHA-c1* ~ *c5* 五个基因编码，这些基因的氨基酸序列高度保守(>98%)^[2]，但它们在植物生长发育方面所发挥的作用却不同。虽然 *VHA-c1*、*VHA-c3* 和 *VHA-c5* 具有相同的氨基酸序列，但 *VHA-c1* 和 *VHA-c3* 在不同的组织中表达，表明 *VHA-c* 基因的功能取决于它们在特定组织和细胞中的表达^[23]。

本研究揭示 *VHA-c* 基因可能在参与植物生长发育和细胞信号转导方面起不同的作用。我们已对过表达 *VHA-c1* 和 *VHA-c3* 基因的拟南芥进行了研究^[27~29]，本实验采用与之相似的方法研究过表达 *VHA-c4* 和 *VHA-c5* 基因的拟南芥。

通过对 4 个基因过表达纯合体的表型进行比较和分析发现，正常光照培养下，只有 *VHA-c5* 过表达纯合体的主根变短。暗培养下，*VHA-c1*、*VHA-c3* 和 *VHA-c4* 过表达纯合体的主根变短，而 *VHA-c5* 过表达纯合体却与对照基本一致。这说明，*VHA-c1*、*VHA-c3*、*VHA-c4* 和 *VHA-c5* 对光照/黑暗有不同的响应。虽然 *VHA-c1*、*VHA-c3* 和 *VHA-c5* 具有相同的氨基酸序列，但是过表达 *VHA-c1*、*VHA-c3* 与 *VHA-c5* 对主根生长的影响却相反。推测其原因可能是持续过表达上述基因后，不同部位



AtVHA-c 主要分布于内涵体；过表达 AtVHA-c 可能通过降低 V-ATPase 活性减缓了内涵体的转运。
AtVHA-c is mainly localized to the endosomal compartment; Overexpression of AtVHA-c may retard endosomal trafficking by reducing V-ATPase activity.

图 8 AtVHA-c 参与的内涵体运输模型 (引自 Zhou 等^[16])

Fig. 8 Model of AtVHA-c involvement in endosomal trafficking (cited from reference^[16])

的细胞微环境(如 pH 值)以及下游依赖于 V-ATPase 的催化反应等发生改变所致。

ABA 处理下, 大部分 VHA-c1 和 VHA-c3 过表达纯合体种子萌发率增大, 根变短且子叶的展开程度增加; 糖(葡萄糖和蔗糖)处理下, 大部分 VHA-c1 和 VHA-c3 过表达纯合体种子的萌发率增大。而 VHA-c4 和 VHA-c5 过表达纯合体却在 ABA 和糖处理下没有类似表型。表明 VHA-c1 和 VHA-c3 过表达纯合体对 ABA 和糖的抑制不敏感, 而 VHA-c4 和 VHA-c5 的过表达却没有影响拟南芥对 ABA 和糖的响应。我们推测拟南芥 VHA-c1 和 VHA-c3 可能参与了 ABA 和糖介导的信号转导途径。

综上所述, 本实验利用过表达对拟南芥 VHA-c4 和 VHA-c5 基因进行了研究, 对过表达纯合体进行了正常光照培养、黑暗培养以及 ABA、葡萄糖和蔗糖的处理, 将其表型与之前研究的 VHA-c1 和 VHA-c3 过表达纯合体进行了比较, 可为深入理解 VHA-c 亚基以及 V-ATPase 在植物生长发育、细胞信号转导及抗非生物胁迫方面的功能奠定基础。

参考文献:

- [1] Forgac M. Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(11): 917–929.
- [2] Sze H, Schumacher K, Müller LM, Padmanaban S, Taiz L. A simple nomenclature for a complex proton pump: VHA genes encode the vacuolar H⁺-ATPase [J]. *Trends Plant Sci*, 2002, 7: 157–161.
- [3] Krebs M, Beyhl D, Gorlich E, Al-Rasheid KAS, Marten I, Stierhof YD, Hedrich R, Schumacher K. *Arabidopsis* V-ATPase activity at the tonoplast is required for efficient nutrient storage but not for sodium accumulation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 3251–3256.
- [4] Herman EM, Li X, Su RT, Larsen P, Hsu H, Sze H. Vacuolartype H⁺-ATPases are associated with the endoplasmic reticulum and provacuoles of root tip cells [J]. *Plant Physiol*, 1994, 106: 1313–1324.
- [5] Dietz KJ, Tavakoli N, Kluge C, Mimura T, Sharma SS, Harris GC, Chardonnens AN, Golldack D. Significance of the V-type ATPase for the adaptation to stressful growth conditions and its regulation on the molecular and biochemical level [J]. *J Exp Bot*, 2001, 52: 1969–1980.
- [6] Hirata T, Iwamoto-Kihara A, Sun-Wada GH, Okajima T, Wada Y, Futai M. Subunit rotation of vacuolar-type proton pumping ATPase: relative rotation of the G as to C subunit [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278: 23714–23719.
- [7] Gogarten JP, Fichmann J, Braun Y, Morgan L, Styles P, Taiz SL, DeLapp K, Taiz L. The use of antisense mRNA to inhibit the tonoplast H⁺-ATPase in carrot [J]. *Plant Cell*, 1992, 4: 851–864.
- [8] Dietz KJ, Rudloff S, Ageorges A, Eckerskorn C, Fischer K, Arbinger B. Subunit E of the vacuolar H⁽⁺⁾-ATPase of *Hordeum vulgare* L: cDNA cloning, expression and immunological analysis [J]. *Plant J*, 1995, 8(4): 521–529.
- [9] Schumacher K, Vafeados D, McCarthy M, Sze H, Wilkins T, Chory J. The *Arabidopsis* det3 mutant reveals a central role for the vacuolar H⁺-ATPase in plant growth and development [J]. *Genes Dev*, 1999, 13: 3259–3270.
- [10] Yoshida S. Chilling-induced inactivation and its recovery of tonoplast H-ATPase in mung bean cell suspension cultures [J]. *Plant Physiol*, 1991, 95(2): 456–460.
- [11] 毛毅辉, 王天宇, 荣廷昭, 石云素, 宋燕春, 黎裕. 玉米 V-ATPase B 亚基基因(*ZmVHA-B*)的克隆及其表达分析 [J]. 玉米科学, 2009, 17(2): 19–23.
Mao YH, Wang TY, Rong TZ, Shi YS, Song YC, Li Y. Cloning and expressional analysis of V-ATPase B subunit gene (*ZmVHA-B*) on Maize [J]. *Journal of Maize Sciences*, 2009, 17(2): 19–23.
- [12] Narasimhan ML, Binzel ML, Perez-Prat E, Chen Z, Nelson DE, Singh NK, Bressan RA, Hasegawa PM. NaCl regulation of tonoplast ATPase 70-Kilodalton subunit mRNA in tobacco cells. *Plant Physiol*, 1991, 97(2): 562–568.
- [13] Kluge C, Lahr J, Hanitzsch M, Bolte S, Golldack D, Dietz KJ. New insight into the structure and regulation of the plant vacuolar H⁺-ATPase [J]. *J Bioenerg Biomembr*, 2003, 35(4): 377–388.
- [14] Omri D, Felix F, Nelson N. Crystal structure of yeast V-ATPase subunit C reveals its stator function [J]. *EMBO Rep*, 2004, 5(12): 1148–1152.
- [15] Noumi T, Beltran C, Nelson H, Nelson N. Mutational analysis of yeast vacuolar H⁽⁺⁾-ATPase [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88: 1938–1942.
- [16] Zhou A, Bu Y, Takano T, Zhang X, Liu S. Conserved V-ATPase c subunit plays a role in plant growth by influencing V-ATPase-dependent endosomal trafficking [J]. *Plant Biotechnol J*, 2015, 14: 271–283.
- [17] Tsiantis MS, Bartholomew DM, Smith JA. Salt regulation of transcript levels for the c subunit of a leaf vacuolar H⁽⁺⁾-ATPase in the halophyte *Mesembryanthemum crystallinum* [J]. *Plant J*, 1996, 9(5): 729–736.
- [18] Tyagi W, Rajagopal D, Singla-Pareek SL, Reddy MK, Sopory SK. Cloning and regulation of a stress-regulated *Pennisetum glaucum* vacuolar ATPase c gene and characterization of its promoter that is expressed in shoot hairs and

- floral organs[J]. *Plant Cell Physiol*, 2005, 46(8): 1411–1422.
- [19] Baisakh N, RamanaRao MV, Rajasekaran K, Subudhi P, Janda J, Galbraith D, Vanier C, Pereira A. Enhanced salt stress tolerance of rice plants expressing a vacuolar H⁺-ATPase subunit c1 (*SaVHAc1*) gene from the halophyte grass *Spartina alterniflora* Löisel [J]. *Plant Biotechnol J*, 2012, 10(4): 453–464.
- [20] Feng L, Ding H, Wang J, Wang M, Xia W, Zang S, Sheng L. Molecular cloning and expression analysis of *RrNHX1* and *RrVHA-c* genes related to salt tolerance in wild *Rosa rugosa*[J]. *Saudi J Biol Sci*, 2015 22(4): 417–423.
- [21] Perera IY, Li X, Sze H. Several distinct genes encode nearly identical to 16 kDa pmtenlipids of the vacuolar H⁺-ATPase from *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Mol Biol*, 1995, 29: 227–244.
- [22] 王瑞刚. 植物启动子的筛选, 调控及外源蛋白的表达调控研究[D]. 上海: 华东师范大学, 2002: 1–27.
Wang RG. Search for new promoters for the expression of exogenous genes in plants [D]. Shanghai: East China Normal University, 2002: 1–27.
- [23] Padmanaban S, Lin X, Perera I, Kawamura Y, Sze H. Differential expression of vacuolar H⁺-ATPase subunit c genes in tissues active in membrane trafficking and their roles in plant growth as revealed by RNAi[J]. *Plant Physiol*, 2004, 134: 1514–1526.
- [24] 徐萍, 李小方, 曾卫军, 王水平. 拟南芥 VHA-c3 基因的特异性表达和调节[J]. 华东师范大学学报: 自然科学版, 2006 (2): 98–104.
Xu P, Li XF, Zeng WJ, Wang SP. Regulation and tissue specific expression of VHA-c3 of *Arabidopsis Thaliana* [J]. *Journal of East China Normal University: Natural Science*, 2006(2): 98–104.
- [25] 郭荣起. 利用 RNAi 技术对拟南芥液泡 H⁺-ATPase c 亚基功能的初步研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2008: 35–37.
Guo RQ. Primary study on the function of subunit c genes of vacuolar H⁺-ATPase in *Arabidopsis thaliana* by RNAi [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2008: 35–37.
- [26] 于秀敏, 武燕, 王瑞刚. 温度和光照对拟南芥 VHA-c 基因启动子活性的调节[J]. 河南师范大学学报: 自然科学版, 2013, 41(4): 120–123.
Yu XM, Wu Y, Wang RG. Temperature and light regulates the promoter activity of VHA-c genes of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Journal of Henan Normal University: Natural Science Edition*, 2013, 41(4): 120–123.
- [27] 苏杰. 利用过表达对拟南芥液泡 H⁺-ATPase c 亚基功能的初步研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2009: 20–33.
Su J. Primary study on the function of subunit c genes of vacuolar H⁺-ATPase in *Arabidopsis thaliana* by overexpression[D]. Hohhot : Inner Mongolia Agricultural University, 2009: 20–33.
- [28] 苏杰, 郭荣起, 姜树原, 邸娜, 李国婧, 王瑞刚. 过表达 VHA-c1 基因对拟南芥根长及 ABA 与糖响应的影响[J]. 西北植物学报, 2015, 35(5): 865–871.
Su J, Guo RQ, Jiang SY, Di N, Li GJ, Wang RG. Effect on root length , responses to ABA and sugar by overexpressing *Arabidopsis VHA-c1*[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2015, 35(5): 865–871.
- [29] 苏杰, 郭荣起, 李国婧, 王瑞刚. 过表达 VHA-c3 基因拟南芥对黑暗、ABA 与糖的响应[J], 生物技术通报, 2016, 32 (6): 89–95.
Su J, Guo RQ, Li GJ, Wang RG. Responses of oerex-pressed *Arabidopsis VHA-c3* to dark, ABA and sugar[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2016, 32(6): 89–95.
- [30] Murray MG, Thompson WF. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA[J]. *Nucleic Acids Res*, 1980, 8 (19): 4321–4325.
- [31] Mersereau M, Pazour GJ, Das A. Efficient transformation of *Agrobacterium tumefaciens* by electroporation [J]. *Gene*, 1990, 90(1): 149–151.
- [32] Clough SJ, Bent AF. Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant J*, 1998, 16(6): 735–743.
- [33] Huss M, Ingenhorst G, Konig S, Gassel M, Drose S, Zeeck A, Altendorf K, Wieczorek H. Concanamycin A, the specific inhibitor of V-ATPases, binds to the V(₀) subunit c[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(43): 40544–40548.
- [34] Smart LB, Vojdani F, Maeshima M, Wilkins TA. Genes involved in osmoregulation during turgor-driven cell expansion of developing cotton fibers are differentially regulated [J]. *Plant Physiol*, 1998, 116(4): 1539–1549.
- [35] Brux A, Liu TY, Krebs M, Stierhof YD, Lohmann JU, Miersch O, Wasternack C, Schumacher K. Reduced V-ATPase activity in the trans-Golgi network causes oxylipin-dependent hypocotyl growth inhibition in *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell*, 2008, 20(4): 1088–1100.