

拟南芥*AMP1*基因RNAi表达载体的构建及转基因株系的抗旱性分析

游丽娟*, 李祥*, 金尚卉, 刘萍, 衣艳君, 董春海, 刘家尧**

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

摘要: 利用Gateway克隆技术构建*AMP1*基因的RNAi表达载体pK7GWIWG2-*AMP1*转化拟南芥, 获得*AMP1*下调表达的转基因株系, 以拟南芥野生型为对照, 研究*AMP1*基因在干旱胁迫中的作用。结果表明, 甘露醇模拟干旱能提高RNAi株系的萌发率, 增加相对根长, 表现出了一定的干旱耐受性; 丙二醛(MDA)、脯氨酸(Pro)、过氧化物酶(POD)、超氧化物歧化酶(SOD)的测定结果可以看出, 与野生型相比, RNAi株系的MDA含量降低, Pro含量升高和POD、SOD酶活性增强; 外源ABA可抑制RNAi株系种子萌发, 减小叶片气孔开度。另外, Real-time PCR分析表明, 正常条件下RNAi株系中*AREB1*基因表达上调。可见通过下调*AMP1*基因表达, 可以提高转基因拟南芥株系抗干旱胁迫能力。

关键词: *AMP1*; 拟南芥; 干旱胁迫; ABA

Construction of RNAi Vector for *Arabidopsis AMP1* and Functional Analysis of the Transgenic Plants in Drought Resistance

YOU Li-Juan*, LI Xiang*, JIN Shang-Hui, LIU Ping, YI Yan-Jun, DONG Chun-Hai, LIU Jia-Yao**

University Key Laboratory of Plant Biotechnology in Shandong Province, College of Life Sciences, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109, China

Abstract: The RNAi vector for *Arabidopsis AMP1* (pK7GWIWG2-*AMP1*) was constructed by Gateway gene cloning, and transgenic plants were obtained. Drought resistance and abscisic acid (ABA) sensitivity of the transgenic plants were examined in this study. Under mannitol treatment, the increase of seed germination and enhanced seedling root growth were observed in the transgenic plants of *AMP1*. In further, the decrease level of malondialdehyde (MDA) but increase of proline (Pro) was detected in the transgenic lines. As expected, higher activities of peroxidase (POD) and superoxide dismutase (SOD) were observed in the *AMP1* transgenic plants compared to the wild type. These results suggested that the down-regulation of *AMP1* gene expression significantly improved drought tolerance in the transgenic plants. In addition, it was found that the ABA sensitivity and the seed germination rate of *AMP1* RNAi transgenic lines were lower than that of wild-type plants, and the leaf stomatal aperture of the transgenic plants was smaller than control plants. By analyzing the expression of ABA responsive genes, we found that the *AREB1* gene was up-regulated in the transgenic lines under normal growth condition. These observations provide new evidence supporting the conclusion that plant drought tolerance could be enhanced when the expression of *AMP1* is down-regulated in transgenic plants.

Key words: *AMP1*; *Arabidopsis*; drought stress; ABA

目前干旱是影响全球农业生产和生态环境的重要因素之一, 仅旱地就占陆地面积的47.2%, 我国则尤为严重, 干旱和半干旱区几乎占国土面积的52% (张晓煜等2011)。植物抗旱问题尤其是植物抗旱机理的研究和抗旱新品种的培育已成为各国政府和科学家最关注的前沿热点问题, 通过基因工程等生物高新技术提高植物抗旱性、培育抗逆性强的新品种已经成为植物抗逆生理及分子生物学的研究热点和植物基因工程重要的研究方向。

脱落酸(abscisic acid, ABA)是植物体内一种重

要的信号调节因子, 它在种子萌发(Marin等1996)、植物生长发育(Cheng等2002; Sharp和LeNoble 2002)、气孔开闭及抗逆胁迫响应如调控脯氨酸含量(邓凤飞等2015)、活性氧水平(张瓚等2014)等方面具有重要作用。但ABA诱导胁迫相关基因表达

收稿 2015-01-04 修定 2015-03-27

资助 国家自然科学基金项目(31270314)和山东省泰山学者岗位项目。

* 同等贡献。

** 通讯作者(E-mail: qdliujiayao@163.com; Tel: 0532-86080631)。

及参与信号传导过程的机制还不十分清楚, 所以利用ABA突变体研究ABA在植物抗逆中的作用是揭示这些问题的有效途径。

*AMP1*基因位于拟南芥3号染色体, 编码一个推测的谷氨酸羧肽酶(Helliwell等2001)。*amp1*拟南芥突变体表现出子叶和叶片增生、主根长变短, 侧根增生, 体内细胞分裂素含量增加等表型(Hou等1993; Chin-Atkins等1996)。一些研究还表明AMP1调控ABA、氧化胁迫和非生物胁迫反应, 并参与碳和氨基酸代谢(Shi等2013b)。Yao等(2014)发现, *amp1-31*突变体内源ABA含量增加, 同时表现出了部分干旱耐受性。因此, 我们希望通过构建AMP1的RNAi表达载体, 下调拟南芥中AMP1基因表达, 研究其在干旱胁迫中的作用。

材料与amp1方法

1 实验材料

拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)野生型(生态型为Col-0)。拟南芥培养过程: 拟南芥种子用10% NaClO (V/V)消毒液消毒10 min, 吐温水漂洗6次, 晾干后点种于1/2MS固体培养基上。封口后在4 °C下春化3 d, 于光照培养箱中23 °C培养1周, 挑选壮苗移栽到土中进行长日照(16 h光照/8 h黑暗)培养(温度20~24 °C, 相对湿度50%~60%)。

2 实验方法

2.1 pK7GWIWG2-AMP1表达载体的构建及转化

参照Invitrogen公司Gateway BP Clonase™ II Enzyme Mix说明书, 在1.5 mL EP管中加入如下组分: 测序正确的目的基因回收产物(50~150 ng) 3 μL, 入门载体质粒DONR221 1 μL, TE buffer (pH 8.0) 4 μL, BP Clonase II Enzyme Mix 2 μL, 涡旋混匀后25 °C孵育过夜, 待反应完全后加入1 μL蛋白酶K于37 °C 10 min终止反应。取2 μL反应液42 °C热激转化大肠杆菌DH5α后涂布在含有Kan (50 mg·L⁻¹)的平板上, 培养过夜后进行菌液PCR鉴定, 将得到的阳性克隆测序, 测序验证正确的阳性克隆即为所需要的pDNOR221-AMP1入门载体。

参照 Invitrogen公司Gateway LR Clonase™ II Enzyme Mix说明书, 在1.5 mL EP管中加入如下组分: 入门载体质粒pDONR221-AMP1 3 μL, 表达载体质粒pK7GWIWG2 1 μL, TE buffer (pH 8.0) 4 μL,

LR Clonase II Enzyme Mix 2 μL, 涡旋混匀后25 °C孵育过夜, 待反应完全后加入1 μL蛋白酶K于37 °C 10 min终止反应。不经回收直接转化大肠杆菌DH5α后涂布在含有Spe (50 mg·L⁻¹)的平板上, 通过菌液PCR筛选, 将得到的阳性克隆测序, 测序完全正确的阳性克隆即为所需要的表达载体, 转化农杆菌GV3101。

2.2 干旱胁迫处理及相关生理指标测定

2.2.1 干旱处理

将同时期收获的野生型与转基因株系的种子点种于1/2MS培养基, 4 °C春化3 d, 再在光照培养箱中培养7 d后, 分别转移到含0、100和300 mmol·L⁻¹甘露醇的1/2MS培养基上继续生长5 d。

2.2.2 生理活性物质测定

丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量采用硫代巴比妥酸(TBA)法、脯氨酸(proline, Pro)含量采用酸性茚三酮法测定、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性采用氮蓝四唑(NBT)法、过氧化物酶(peroxidase, POD)活性采用愈创木酚法、过氧化氢酶(catalase, CAT)活性采用高锰酸钾滴定法测定。

2.2.3 气孔开度测定

生长4周的野生型和转基因植株取相同部位叶片, 用镊子撕下靠近中脉处的下表皮, 悬浮在MES缓冲液中(100 μmol·L⁻¹ CaCl₂, 50 mmol·L⁻¹ KCl, 10 mmol·L⁻¹ MES-KOH, pH 6.15, 25 °C), 于光下处理2 h (150 μmol·m⁻²·s⁻¹)后, 在光学显微镜下观察不同叶片的气孔数量、形态、开度大小等方面的差异并拍照记录。然后再加入不同浓度的ABA溶液(0和50 μmol·L⁻¹)分别处理2 h后, 显微镜下分别观察测量各处理组的气孔开度。每组实验重复3次(每次每个株系测量50~60个气孔)。

2.2.4 干旱反应相关的转录因子实时定量RT-PCR检测

不同株系生长1周, 分别用镊子小心将幼苗从培养基中取出(尽量不损伤根), 蒸馏水洗净根部残留物, 将幼苗置于配置好的50 μmol·L⁻¹ ABA溶液中, 分别处理0、6、12和24 h后, 清水洗净, 液氮速冻并贮存于-80 °C冰箱中留用。RT-PCR所用引物设计如表1。PCR反应体系: SYBR Premix Ex Taq II 10 μL; 10 μmol·L⁻¹正向引物0.8 μL; 10 μmol·L⁻¹反

表1 RT-PCR所用引物

Table 1 The primers for RT-PCR

引物名称	序列(5'→3')
AREB1-F	GGCAGCAAACATTAGGTGAAG
AREB1-R	CCAGCGGCAACAACCTCG
MYB2-F	ACGCCAATCATTACCCAC
MYB2-R	TAACCTGACCCGTTACCCAC
MYC2-F	AGGTGACGGATACGGAATGG
MYC2-R	GCCGAAGGAATACACGCAAT
RD29A-F	TGCACCAGGCGTAACAGG
RD29A-R	AATCGGAAGACACGACAGGA
Tubulin-F	ATCCGTGAAGAGTACCCAGAT
Tubulin-R	AAGAACCATGCACTCATCAGC

向引物0.8 μL ; cDNA模板2 μL ; ddH₂O 6.4 μL 。
PCR程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 40个循环。以*Tubulin*为内参对基因进行相对定量。

实验结果

1 转基因拟南芥筛选及鉴定

选取*AMP1*基因CDS序列1 000~1 500 bp之间的片段作为RNA干扰区段, 利用Gateway技术, 通过BP反应和LR反应, 构建得到pK7GWIWG2-*AMP1*表达载体, 转化农杆菌GV3101, 并利用花浸染法侵染拟南芥。收获种子, 消毒后在含草铵膦(50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)的MS固体平板上筛选, 选取抗性苗移栽到土中, 成熟后单株收种再进行以上的草铵膦筛选, T₂代筛选出抗性分离比为3:1的单拷贝转基因株系。将绿苗移至营养土中生长, 单株收获种子后, 再进行一次草铵膦抗性筛选, 筛出全绿的植株(T₃代), 收集T₃代植株的种子, 即为转基因纯合体株系。

将收获的种子, 表面消毒后播种于1/2MS固体培养基培养上, 待幼苗2周大, 提取幼苗总RNA, 反转录后的cDNA作为RT-PCR的模板。如图1所示, 筛选到的4个转基因纯合株系, 有3个株系*AMP1*基因表达量明显下调, 可用于后续实验。

2 *AMP1* RNAi转基因植株对甘露醇模拟干旱胁迫的响应

2.1 甘露醇模拟干旱对*AMP1* RNAi株系种子萌发的影响

将同时期收获的野生型与转基因植株种子,

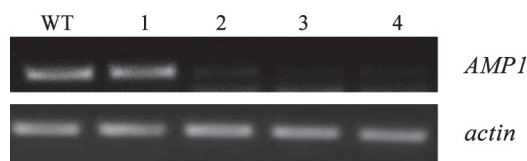


图1 pK7GWIWG2-*AMP1*转基因株系中*AMP1*基因的表达
Fig.1 *AMP1* gene expression of pK7GWIWG2-*AMP1* in the transgenic lines

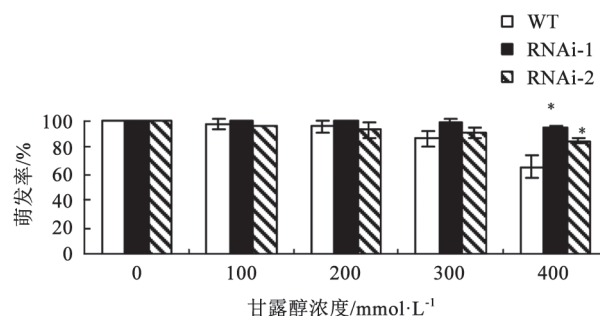


图2 甘露醇胁迫对RNAi株系萌发率的影响

Fig.2 Effects of mannitol stress on germination rate in RNAi lines

图中数据为平均值 \pm 标准误, $n=3$; *: $P<0.05$; **: $P<0.01$ (Student t -test), 图3~8同此。

点种子含有不同浓度甘露醇(0、100、200、300和400 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)的1/2MS培养基上进行模拟干旱处理, 3 d后统计不同株系萌发率, 结果如图2所示, 在正常条件(1/2MS, 0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘露醇)下, 野生型与RNAi株系的萌发率没有差别, 均能正常萌发。随着甘露醇处理浓度的升高, 野生型与RNAi株系萌发率均开始下降, 但RNAi株系的萌发率始终高于野生型。尤其在400 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理下, 野生型萌发率下降明显, 而RNAi株系下降幅度相对较小。

2.2 甘露醇模拟干旱对*AMP1* RNAi株系根长的影响

将野生型、RNAi株系拟南芥种子播种在含有0、100、200、300和400 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 不同浓度甘露醇的培养基上, 垂直培养7 d后, 观察并测定甘露醇模拟干旱对RNAi株系根生长的影响(图3)。随着培养基中甘露醇浓度不断升高, 野生型和RNAi株系主根生长逐渐被抑制, 但在相同甘露醇浓度下, RNAi株系主根延伸受到的抑制程度较野生型减弱。

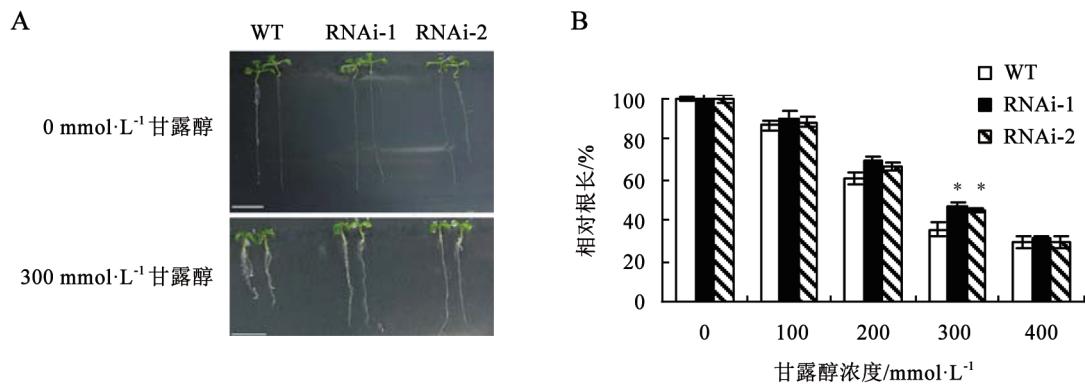


图3 甘露醇胁迫对RNAi株系根长的影响

Fig.3 Effects of mannitol stress on roots length in RNAi lines

A: 300 mmol·L⁻¹甘露醇对拟南芥根生长的影响, 标尺=1 cm; B: 幼苗在不同浓度培养基上根长的统计, 数值为平均值±标准误, n=12, 重复3次。

2.3 甘露醇模拟干旱对*AMP1* RNAi株系丙二醛、脯氨酸含量及抗氧化酶活性的影响

不同浓度甘露醇模拟干旱条件下, 拟南芥野

生型和RNAi株系丙二醛、脯氨酸含量及抗氧化酶活性测定结果(图4)可以看出, 随着甘露醇处理浓度逐渐升高, 野生型和RNAi株系中MDA含量均呈

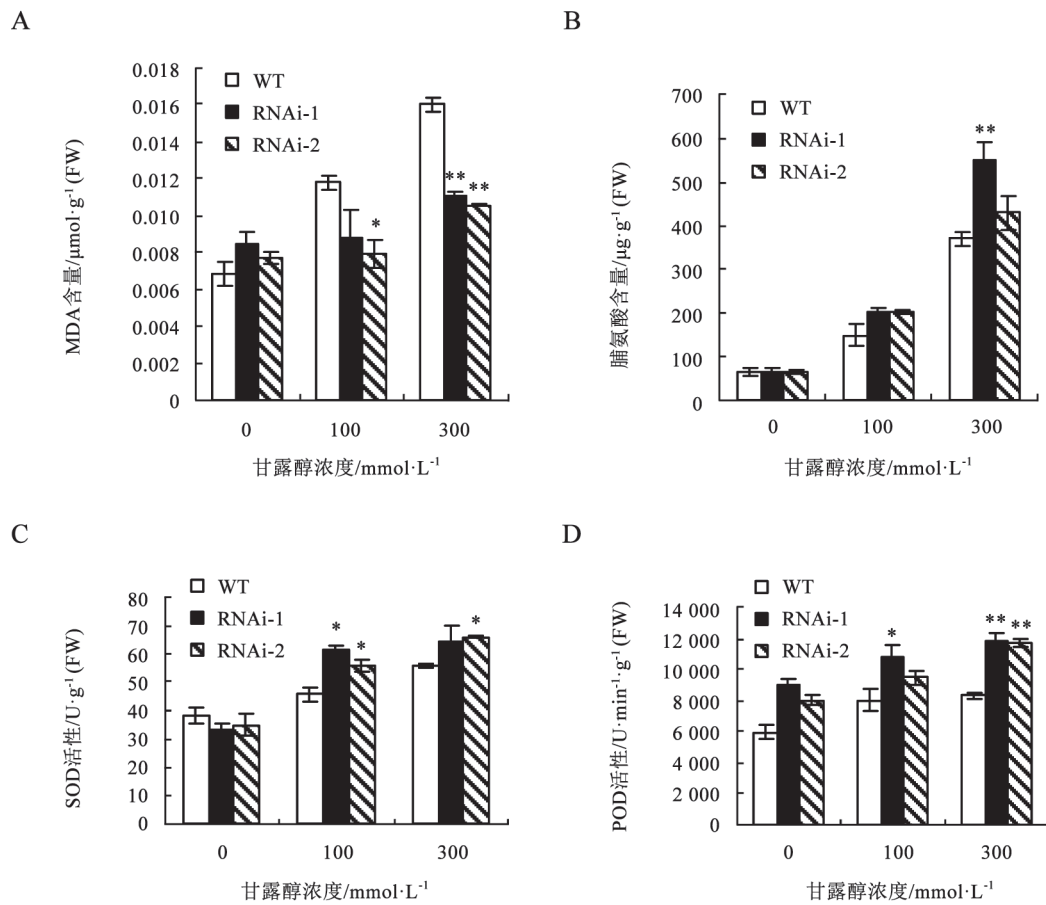


图4 甘露醇胁迫对RNAi株系MDA、脯氨酸含量和抗氧化酶活性的影响

Fig.4 Effects of mannitol stress on MDA, Pro contents and antioxidant enzyme activity in RNAi lines

图中数据为平均值±标准误, n=3。

上升趋势, 但RNAi株系中MDA含量只有小幅度增加, 而野生型中MDA含量上升趋势明显(图4-A); 脯氨酸含量变化在 $0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘露醇处理条件下, 野生型与RNAi株系大致相同, 随着甘露醇含量升高, 野生型与RNAi株系脯氨酸含量均明显上升, 但RNAi株系中脯氨酸含量始终高于野生型(图4-B)抗氧化酶(SOD和POD)活性变化有些区别, 在对照(甘露醇浓度 $0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)处理时, RNAi株系中SOD活性略低于野生型。随着甘露醇处理浓度的升高, RNAi株系和野生型SOD活性均有升高, 但RNAi株系中SOD活性上升幅度明显高于野生型(图4-C), 但对照($0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘露醇) RNAi株系中POD活性却明显高于野生型, 而在100和300 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘露醇处理下, 野生型和RNAi株系中POD活性均有升高, 并且RNAi株系中POD活性始终高于野生型(图4-D)。

3 *AMP1* RNAi转基因植株对ABA的应答反应

3.1 ABA对*AMP1* RNAi株系萌发率的影响

外源ABA对RNAi株系萌发率的影响如图5所示, 在正常条件($1/2\text{MS}$, $0 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA)下, 野生型与RNAi株系的萌发率基本一致, 均能正常萌发。由于ABA具有抑制种子萌发的作用, 随着ABA处理浓度的升高, 野生型和RNAi株系萌发率均开始下降, 但野生型的萌发率始终高于RNAi株系。尤其在 $1 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA处理下, RNAi株系萌发率下降明显, 而野生型萌发率下降相对不明显。

3.2 ABA对*AMP1* RNAi株系根长的影响

野生型、RNAi株系种子播种在含有不同浓度ABA (0 、 10 、 20 、 30 和 $50 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的培养基上, 垂直培养3 d根生长情况如图6所示。外源ABA处理, 正常条件($1/2\text{MS}$, $0 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA), RNAi株

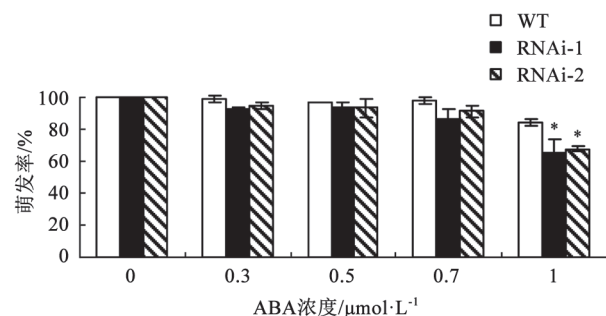


图5 ABA对RNAi株系萌发率的影响

Fig.5 Effects of ABA on germination rate in RNAi lines

图中数据为平均值 \pm 标准误, $n=3$ 。

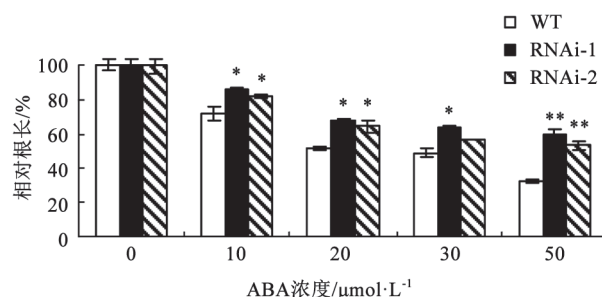


图6 不同浓度ABA对RNAi株系根长的影响

Fig.6 Effects of ABA on root length in RNAi lines

图中数据为平均值 \pm 标准误, $n=3$ 。

系与野生型主根生长没有差异, 但外源添加ABA后, 由于ABA具有抑制主根伸长的作用, RNAi株系与野生型主根生长均受抑制, 但与野生型相比, RNAi株系主根生长对ABA的抑制作用更不敏感, 在 $50 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA处理条件下, 野生型只有正常条件下根长的31%, 而RNAi株系则是正常条件下根长的59%。

3.3 ABA对*AMP1* RNAi株系气孔开度的影响

野生型、RNAi株系叶表皮在 $50 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA处理下的气孔开度统计结果(图7)表明, 在对照($0 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA处理)中RNAi株系的气孔开度比野生型变小, 而在 $50 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA处理后, 野生型气孔开度大幅减小, 而RNAi株系的气孔开度与ABA处理前(对照)相比差异不明显。

3.4 *AMP1* RNAi转基因株系干旱反应相关转录因子的表达分析

外源ABA处理野生型和*AMP1* RNAi株系后, 初步检测各株系中参与ABA调控的干旱反应相关的4种转录因子的表达情况, *MYB2* (图8-B)、*MYC2*

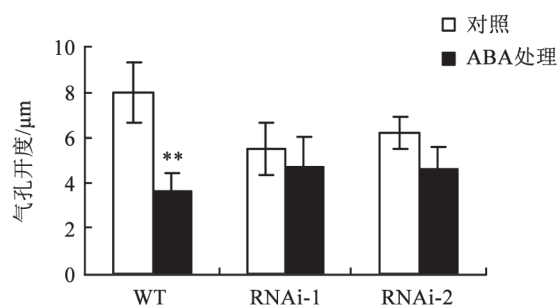


图7 ABA对RNAi株系气孔开度的影响

Fig.7 Effects of ABA on stomatal aperture in RNAi lines

数值为平均值 \pm 标准差, $n=12$, 重复3次。

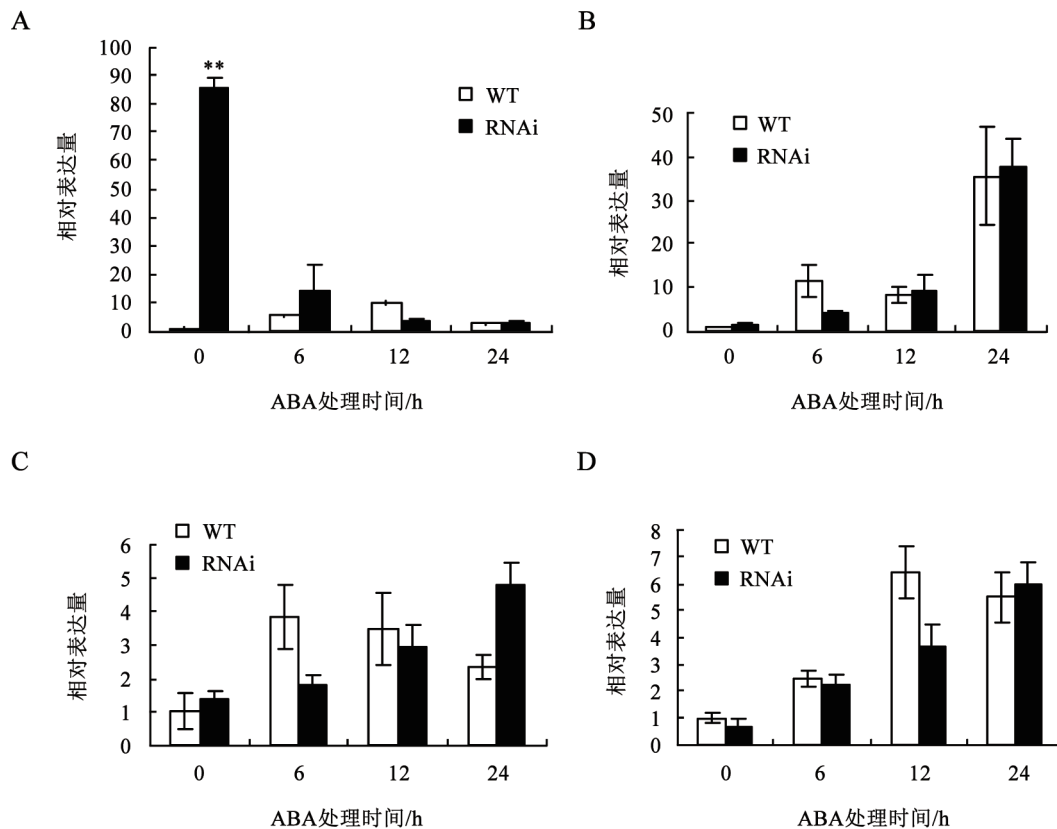


图8 ABA对RNAi株系相关基因表达的影响

Fig. 8 Effects of ABA on *AREB1*, *MYB2*, *MYC2* and *RD29A* genes express in RNAi lines

A: *AREB1*基因的相对表达量; B: *MYB2*基因的相对表达量; C: *MYC2*基因的相对表达量; D: *RD29A*基因的相对表达量。图中数据为平均值±标准误, $n=3$ 。

(图8-C)、*RD29A* (图8-D)基因在ABA处理后均表达上调, 但野生型和RNAi株系间表达量差异不明显。而RNAi株系中的*AREB1* (图8-A)基因的表达量在正常条件下比野生型高出85倍。

讨 论

*AMP1*是拟南芥体内一个重要编码基因, 它编码一个未知蛋白, 与谷氨酸羧肽酶具有高度同源性。其拟南芥突变体*amp1*表现出许多奇特表型, 包括子叶、叶片数目增生, 主根变短, 侧根增生(Hou等1993), 因而受到研究者广泛关注。Shi等(2013a)研究发现, *amp1*表现出对ABA的高度敏感性及干旱耐受性, Yao等(2014)对*amp1-31*进行了部分抗旱性分析, 发现其在模拟干旱胁迫下, 与野生型拟南芥相比, 表现出了更高的种子萌发率, 同时, 通过对*amp1-31*叶绿素荧光及蒸腾速率的测定, 表

明*amp1-31*具有一定的干旱耐受性, 此外, 研究还发现突变体内ABA的含量明显比野生型拟南芥的高, 推测*AMP1*基因可能是ABA响应的负调控因子, 所以本实验希望通过下调*AMP1*基因表达, 提高植物对ABA的响应, 从而提高植株的耐旱性。

通过构建pK7GWIWG2-*AMP1* RNAi表达载体, 利用花浸染法侵染拟南芥并用草铵膦筛选后获得*AMP1*基因表达下调的RNAi转基因株系。甘露醇是一种常用的渗透调节剂, 我们利用甘露醇模拟干旱处理, 测定野生型与RNAi株系种子萌发率、主根根长及幼苗的生长情况, 发现在高浓度甘露醇处理下, 相比与野生型, RNAi株系萌发率更高, 根长更长。这些结果都表明, RNAi转基因株系比野生型具有更强的干旱耐受性。

MDA是膜脂过氧化的分解产物, 其含量可以反映植物遭受逆境的受伤害程度(Heath和Packer

1965)。在高浓度甘露醇处理下,野生型拟南芥中的MDA含量显著升高,而RNAi株系中的MDA含量则只有少量提高,这表明,在干旱胁迫下, RNAi株系比野生型膜稳定性更高,受到的膜损伤要比野生型更小。

脯氨酸是植物中调节渗透压的一种重要溶质,增加植物细胞中脯氨酸的含量能提高其抗渗透胁迫的能力(Troll和Lindsley 1955)。通过对野生型和RNAi株系中脯氨酸含量对比发现,在干旱胁迫情况下,相比与野生型, RNAi株系积累了更多的脯氨酸,从而能更好地对抗由于干旱胁迫所导致的渗透胁迫。

另外,干旱胁迫不仅能引发渗透胁迫,还能造成植物体内活性氧(ROS)的积累,从而引发氧化胁迫。实验结果表明, RNAi株系抗氧化胁迫的能力也要高于野生型,在甘露醇处理下,过氧化物酶(POD)、超氧化物歧化酶(SOD)的酶活性均明显高于野生型。

相关研究表明(Shi等2013a, b), *AMP1*基因调节ABA响应基因及ROS代谢过程,同时, ABA处理后, *AMP1*基因表达下调。Yao等(2014)实验也发现, *amp1-31*中内源ABA含量升高,且*AMP1*基因突变导致ABA合成的关键酶基因表达量提高。因为ABA具有抑制种子萌发的作用,通过计算不同浓度的ABA处理下野生型和RNAi株系的种子萌发率,来验证*AMP1*基因下调表达能否提高植株对ABA的敏感性。结果发现,与野生型相比, ABA处理后RNAi株系的种子萌发率较低,可能是因为*AMP1*基因表达下调导致了RNAi株系内源ABA升高,使其对ABA更具有敏感性。

但通过测定ABA处理后的野生型和RNAi各株系的根长发现, 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA处理下, RNAi株系根长要明显长于野生型, RNAi株系的根部表现出了对ABA的相对不敏感性, Thompson等(2007)用四环素诱导*LeNCED1*基因表达后发现, *NCED*的mRNA在根和叶片中的表达相似,但叶片中ABA的含量却高达根中的10倍以上,可能因为根中ABA的合成还受到其他步骤所限制。所以我们推测*AMP1*基因表达下调后,可能对根中ABA的含量影响不大,但却调控了根对外源ABA的敏感性。

通过比较野生型和RNAi株系的气孔开度发

现,正常生长条件下, RNAi株系气孔开度要明显小于野生型,因为气孔开闭受ABA信号调控,所以推测可能是*AMP1*基因表达下调,导致内源ABA含量发生变化,从而引发RNAi株系中的气孔开度变化。

Shinozaki和Yamaguchi-Shinozaki (2007)研究表明,转录因子*AREB1*、*MYB2*、*MYC2*和*RD29A*在干旱胁迫条件下受ABA诱导表达,能够与抗逆相关基因启动子结合,诱导下游抗逆相关基因表达,从而提高植株干旱耐受性。我们用外源ABA处理野生型和RNAi株系后,测定这四种转录因子表达情况,结果表明, *MYB2*、*MYC2*和*RD29A*基因在ABA处理后均表达上调,但野生型和RNAi株系间表达量差异不明显。但RNAi株系中的*AREB1*基因表达量在正常条件下比野生型高出很多,推测可能是*AMP1*基因表达下调,导致内源ABA发生变化,引起*AREB1*基因表达上调。

综上所述, *AMP1*基因可能是一个参与ABA响应的负调控因子,通过下调*AMP1*基因表达,可以增强转基因拟南芥株系抗干旱胁迫的能力。

参考文献

- 邓凤飞, 杨双龙, 龚明(2015). 外源ABA对低温胁迫下小桐子幼苗脯氨酸积累及其代谢途径的影响. 植物生理学报, 51 (2): 221~226
- 张晓煜, 杨晓光, 李茂松, 张学艺, 韩颖娟(2011). 农业干旱预警研究现状及发展趋势. 干旱区资源与环境, 25 (11): 18~22
- 张璜, 王萃铂, 房伟民, 陈发棣, 蒋甲福, 管志勇, 陈素梅(2014). ABA喷施提高菊花抗蚜性及其生理机理. 植物生理学报, 50 (12): 1857~1862
- Cheng WH, Endo A, Zhou L, Penney J, Chen HC, Arroyo A, Leon P, Nambara E, Asami T, Seo M et al (2002). A unique short-chain dehydrogenase/reductase in *Arabidopsis* glucose signaling and abscisic acid biosynthesis and functions. *Plant Cell*, 14: 2723~2743
- Chin-Atkins AN, Craig S, Hocart CH, Dennis ES, Chaudhury AM (1996). Increased endogenous cytokinin in the *Arabidopsis amp1* mutant corresponds with de-etiolation responses. *Planta*, 198: 549~556
- Heath RL, Packer L (1965). Effect of light on lipid peroxidation in chloroplast. *Biochem Biophys Res Commun*, 19: 716~720
- Helliwell CA, Chin-Atkins AN, Wilson IW, Chapple R, Dennis ES, Chaudhury A (2001). The *Arabidopsis AMP1* gene encodes a putative glutamate carboxypeptidase. *Plant Cell*, 13: 2115~2125
- Hou YM, von Arnim AG, Deng XW (1993). A new class of *Arabidopsis* constitutive photomorphogenic genes involved in regulating cotyledon development. *Plant Cell*, 5: 329~339
- Marin E, Nussaume L, Quesada A (1996). Molecular identification of zeaxanthin epoxidase of *Nicotiana plumbaginifolia*, a gene

- involved in abscisic acid biosynthesis and corresponding to the ABA locus of *Arabidopsis thaliana*. *EMBO J*, 15 (10): 2331~2342
- Sharp RE, LeNoble ME (2002). ABA, ethylene and the control of shoot and root growth under water stress. *J Exp Bot*, 53: 33~37
- Shi H, Ye T, Wang Y, Chan Z (2013a). *Arabidopsis ALTERED MERISTEM PROGRAM 1* negatively modulates plant responses to abscisic acid and dehydration stress. *Plant Physiol Biochem*, 67: 209~216
- Shi Y, Wang Z, Meng P, Tian S, Zhang X, Yang S (2013b). The glutamate carboxypeptidase AMP1 mediates abscisic acid and abiotic stress responses in *Arabidopsis*. *New Phytol*, 199: 135~150
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2007). Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *J Exp Bot*, 58: 221~227
- Thompson AJ, Mulholland BJ, Jackson A, Mckee JMT, Hilton HW, Symonds RC, Sonneveld T, Burbidge A, Stebenson P, Taylor AB et al (2007). Regulation and manipulation of ABA biosynthesis in roots. *Plant Cell Environ*, 30: 67~78
- Troll W, Lindsley J (1955). A photometric method for the determination of proline. *Biol Chem*, 215: 655~660
- Yao YY, Dong CH, Yi YJ, Li X, Zhang XM, Liu JY (2014). Regulatory function of AMP1 in ABA biosynthesis and drought resistance in *Arabidopsis*. *J Plant Biol*, 57: 117~126