

## 桃*PpSnRK1βγ1*在拟南芥中超表达提高植株氧化胁迫耐性

赵永飞, 陈晓璐, 彭福田\*, 罗静静, 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:** 以超表达桃(*Prunus persica*) SnRK1调节亚基 $\beta\gamma$ 编码基因*PpSnRK1βγ1*的拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)为试材, 使用甲基紫精(MV)模拟氧化胁迫条件, 探讨超表达*PpSnRK1βγ1*对拟南芥植株抗氧化能力的影响及响应机制。结果表明, 在 $0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  MV氧化胁迫条件下, 超表达植株与野生型种子的萌发和根系生长均受到抑制, 但前者具有较高的萌发率和较长的主根;  $2\sim 8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  MV喷施拟南芥植株叶片, 超表达植株保留更多的绿色叶片。在 $2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  MV喷施3 h后, 超表达植株丙二醛(MDA)含量显著低于野生型, 四种抗氧化酶过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽S-转移酶(GSTs)和过氧化物酶(POD)活性均高于野生型植株, 说明超表达*PpSnRK1βγ1*基因能提高拟南芥植株的抗氧化能力。在氧化胁迫条件下, 超表达植株的SnRK1酶活性高于野生型植株, 定量PCR结果显示, 在超表达*PpSnRK1βγ1*拟南芥中, 胁迫响应基因*AtHSPRO1*和*AtHSPRO2*的表达量也均较野生型植株明显升高。因此, 超表达*PpSnRK1βγ1*能够增强拟南芥的抗氧化能力, 可能是通过*PpSnRK1βγ1*参与HSPRO基因的表达及抗氧化酶活性调控发挥作用的。

**关键词:** 桃; *PpSnRK1βγ1*; 氧化胁迫; 抗氧化酶; HSPRO

蔗糖非发酵-1-相关蛋白激酶1 (sucrose non-fermenting 1-related protein kinase 1, SnRK1)是植物体内生理活动调控枢纽之一, 参与调控植物代谢、发育、胁迫应答等多种过程(Polge和Thomas 2007; Crozet等2014; Hulsmans等2016)。SnRK1通过磷酸化修饰代谢酶活性的方式参与植物代谢与发育调控, 比如3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶A还原酶(3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A reductase, HMG-CoA还原酶)、蔗糖磷酸合成酶(sucrose phosphate synthase, SPS)、硝酸还原酶(nitrate reductase, NR)和海藻糖磷酸合成酶5 (trehalose phosphate synthase 5, TPS5) (Bachmann等1996; Harthill等2006; 王贵芳2014)。除参与植物代谢和生长发育调控外, SnRK1在植物应对环境胁迫响应中也有明显的反应。甘蓝曲叶病毒(*cabbage leaf curl virus*)的AL2蛋白能与拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的GRIKs蛋白互作(Shen等2014), 而GRIKs蛋白作为SnRK1蛋白的上游激酶(Shen和Hanley-Bowdoin 2006), 能激活SnRK1酶活性。SnRK1蛋白激酶是三聚复合物, 由一个催化亚基 $\alpha$ 和两个调节亚基 $\beta$ 与 $\gamma$ 组成(Emanuelle等2015)。SnRK1 $\beta\gamma$ 亚基是植物特有的SnRK1调节亚基, 与动物的AMPK $\gamma$ 和酵母SNF4同源, 其结构是在 $\gamma$ 亚基的N端融合了CBM结构域(Lumbreras等2001; Ramon等2013)。 $\beta\gamma$ 亚基能与 $\alpha$ 亚基组成异源二聚体(Lumbreras等2001), 也能与催化亚基 $\alpha$ 、调节亚基 $\beta$ 组成异源三聚体(Emanuelle等2015), 从而形成完整的

SnRK1复合物, 参与植物的生理过程。SnRK1 $\beta\gamma$ 亚基调控植物多个生长发育进程, Gao等(2016)发现拟南芥突变体*kinβγ*的花粉中, 线粒体和过氧化物酶体的结构被破坏, 花粉在柱头上的萌发率降低, 影响花粉杂交。近来的研究表明SnRK1 $\beta\gamma$ 亚基参与胁迫响应, Bradford等(2003)发现, 使用脱落酸(abscisic acid, ABA)浸泡或者远红光照射的番茄(*Solanum lycopersicum*)种子*LeSNF4*的表达量上升, 种子萌发受抑制; Gujjar等(2014)证明, 受干旱胁迫时番茄叶片*SISNF4~15*表达量均升高, 推测*SISNF4~15*参与番茄对于干旱胁迫的响应。

植株在生长发育过程中, 会受到环境中各种生物和非生物胁迫, 而这些胁迫均会引起植物的氧化胁迫(Bowler等1992)。因此, 研究植物应对氧化胁迫的抗氧化反应, 能更好地理解植物应对各种逆境胁迫的响应机制。在氧化胁迫条件下, 植物细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平升高, 为清除细胞内多余的ROS, 植物细胞内抗氧化剂含量以及抗氧化酶活性升高, 例如过氧化氢酶(catalase, CAT)、过氧化物酶(peroxidase, POD)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和谷胱甘肽S-转移酶(glutathione S-transferases, GSTs)。此外, 在胁迫条件下, 植株一些特殊的胁迫基因参

收稿 2016-12-14 修定 2017-04-05

资助 国家自然科学基金(31672099)、山东省“双一流”建设奖补资金(SYL2017YSTD10)和国家现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-31)。

\* 通讯作者(E-mail: pft@sdau.edu.cn)。

与表达, 比如HSPRO (Baena-González和Sheen 2008)。甲基紫精(methyl viologen, MV)是典型的光合系统I抑制剂, 诱导植物细胞ROS含量升高, 因此常被用作植物氧化胁迫的诱导剂(Ekmekci和Terzioglu 2005)。桃(*Prunus persica*)是重要的多年生果树, 在水果产业中占重要地位。在较长的生长期中, 各种环境胁迫条件都会影响桃的产量和品质。鉴于SnRK1在植物代谢调控及抗逆方面的重要作用, 且尚未有木本植物以及桃SnRK1 $\beta\gamma$ 亚基在应对氧化胁迫中的研究, 本研究以超表达*PpSnRK1 $\beta\gamma$ 1*基因拟南芥株系为试材, 探究MV诱导的氧化胁迫条件下, *PpSnRK1 $\beta\gamma$ 1*基因在植物抵御氧化胁迫过程中的作用及其对氧化胁迫可能的响应机理, 从而为桃树的分子抗逆育种提供理论依据。

## 材料与方 法

### 1 植物材料生长

将非转基因拟南芥[*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.] (Columbia型, WT)及第3代超表达桃[*Prunus persica* (L.) Batsch] SnRK1 $\beta\gamma$ 亚基编码基因*PpSnRK1 $\beta\gamma$ 1*的拟南芥株系OE- $\beta\gamma$ 1的种子, 经蒸馏水浸泡2 h, 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)%的人工培养箱中生长。当拟南芥生长至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。

当拟南芥植株生长至14~18片真叶时, 用8 mL 2  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  MV分别喷洒OE- $\beta\gamma$ 1及WT型的叶片, 于1、3、6 h取样, 液氮冷冻, 用于RNA提取和酶活测定。每个处理至少重复3次。

### 2 氧化胁迫处理和表型分析

拟南芥OE- $\beta\gamma$ 1和WT种子种植在含有0.1  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  MV的MS固体培养基中, 4°C冷处理24 h后转移至人工培养箱内, 并垂直放置, 当胚根出现时统计拟南芥的萌芽率; 当拟南芥种子萌发7 d后, 统计拟南芥主根长度。

当拟南芥OE- $\beta\gamma$ 1及WT长至14~16片真叶时, 分别使用8 mL 0、2、4、8  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  MV喷洒OE- $\beta\gamma$ 1及WT型的叶片, 4 d后观察植株的长势, 并统计保持绿色的叶片数。

### 3 生理指标的测定

参考郑世英(2010)采用硫代巴比妥酸(glucosinolates barbituric acid, TBA)法测定MDA含量, 考马斯亮蓝G-250法测定可溶性蛋白含量, 氮蓝四唑(nitroblue tetrazolium, NBT)光还原法测定SOD活性, 紫外吸收法测定CAT活性, 愈创木酚法测定POD活性, GSTs活性测定参考郭玉莲等(2008)的方法, SnRK1活性测定参考王贵芳等(2014)的方法。

### 4 拟南芥总RNA提取

采用RNAplant plus Reagent 试剂盒提取样品RNA, 利用反转录试剂盒(Perfect Real Time, TaKaRa)获得用于荧光定量PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR)的cDNA。试剂盒购自康为世纪生物科技(北京)有限公司。通过分析桃基因组*SnRK1 $\beta\gamma$* 的基因序列, 设计*PpSnRK1 $\beta\gamma$ 1*定量引物, 并且以拟南芥微管蛋白(tubulin)作为内参(表1)。实时qRT-PCR实验使用宝生物的SYBR Green PCR *Premix Ex Taq*进行。所有步骤按照各试剂盒的说明书进行。

表1 本研究所用的引物

Table 1 Primers and sequences used in this study

引物名称	引物序列(5'→3')
<i>PpSnRK1<math>\beta\gamma</math>1</i> -F	GGGTACCATGTTTGCTACCAACATGGATT
<i>PpSnRK1<math>\beta\gamma</math>1</i> -R	GCGTCGACCTAACCAAGCAAGAACTTGAAAAT
<i>PpSnRK1<math>\beta\gamma</math>1</i> (RT)-S	GTAACCTCCAGAGATAAAGTTC
<i>PpSnRK1<math>\beta\gamma</math>1</i> (RT)-A	TATCCTCGGTACTACATC
<i>AtHSPRO1</i> (RT)-S	TTGGGAATGCAGAGGCGAAT
<i>AtHSPRO1</i> (RT)-A	CTCGGGTAATACGGTGGCTC
<i>AtHSPRO2</i> (RT)-S	GCGATGAAGCTTTACGCGAG
<i>AtHSPRO2</i> (RT)-A	GTTCACTCCGCACTTCCCA
<i>AKIN<math>\beta\gamma</math></i> (RT)-S	ACGCCTCTTTGGGTCTGTC
<i>AKIN<math>\beta\gamma</math></i> (RT)-A	GAGCAGTCTATCACTTCCGAGA

## 实验结果

### 1 超表达*PpSnRK1βγ1*拟南芥株系OE-βγ1的PCR检测

如图1所示, 超表达*PpSnRK1βγ1*拟南芥株系OE-βγ1纯合植株, 使用目的基因的扩增引物进行PCR扩增, 获得一条1 476 bp的条带, 而野生型拟南芥未扩增出目的条带。

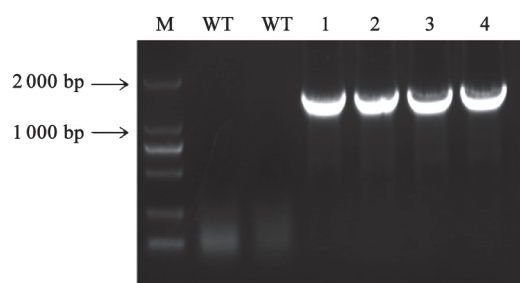


图1 超表达*PpSnRK1βγ1*拟南芥株系OE-βγ1的PCR检测  
Fig.1 PCR identification of overexpression *PpSnRK1βγ1* line OE-βγ1

M: DNA marker (DL2000); WT: 野生型拟南芥; 1~4: 待检测的超表达植株。

### 2 MV胁迫下超表达*PpSnRK1βγ1*拟南芥株系表型分析

#### 2.1 超表达*PpSnRK1βγ1*拟南芥株系种子萌发率和主根长

在不含MV的正常培养基上, 超表达*PpSnRK1βγ1*拟南芥种子发芽率和主根长与野生型植株

种子之间无显著差异, 但在含 $0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  MV的平板上, OE-βγ1和WT型种子的萌发率有显著差异, 两者的萌发率都受到明显的抑制, 但OE-βγ1型植株种子萌发所受抑制较轻。此时OE-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2-A)。在含 $0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  MV的培养基平板上, OE-βγ1的主根要长于野生型, 种子萌发7 d后, OE-βγ1的主根长均值为0.88 cm, 与对照相比缩短1.70 cm, 而WT型的主根长均值为0.56 cm, 缩短2.24 cm (图2-B), 两者的主根长都受到抑制, 但OE-βγ1型的主根长受抑制程度较轻。

#### 2.2 超表达*PpSnRK1βγ1*拟南芥株系叶片抗氧化能力

分别使用0、2、4、 $8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  MV喷洒拟南芥植株3 d后, 观察超表达*PpSnRK1βγ1*植株与WT型植株叶片受害情况。在0和 $2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  MV处理后, OE-βγ1和WT拟南芥叶片生理形态和叶片受害情况没有显著差异。随着MV浓度的升高, WT型叶片受害情况要明显重于OE-βγ1植株(图3-A)。当MV的浓度达到 $4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, OE-βγ1保持绿色型叶片数为13.55片·株<sup>-1</sup>, 此时WT型绿色型叶片为12.00片·株<sup>-1</sup>; 当MV的浓度为 $8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, OE-βγ1叶片存活率高于WT型, OE-βγ1保持绿色的叶片数为8.33片·株<sup>-1</sup>, 此时WT型保持绿色的叶片数为4.00片·株<sup>-1</sup> (图3-B)。

#### 2.3 MV胁迫下超表达*PpSnRK1βγ1*拟南芥株系CAT、SOD、GSTs、POD活性和丙二醛含量

丙二醛(malondialdehyde, MDA)是膜脂过氧

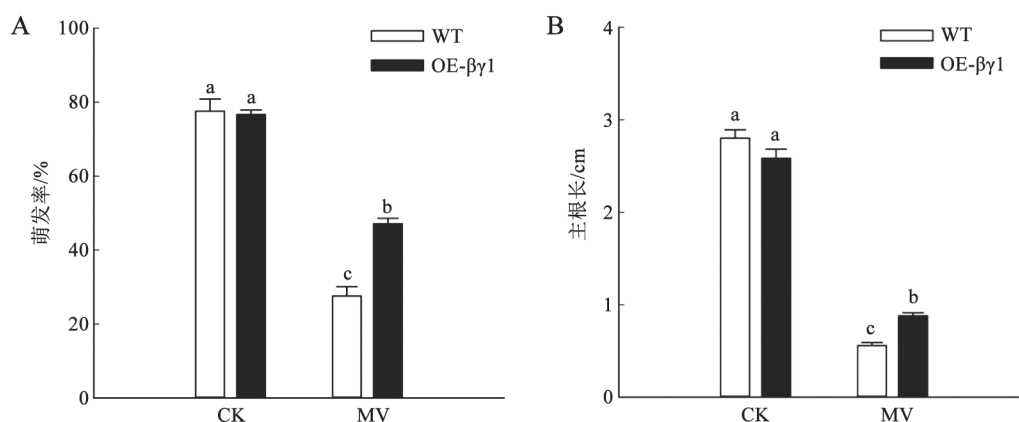


图2 MV胁迫下超表达*PpSnRK1βγ1*拟南芥株系OE-βγ1的种子萌发率(A)和主根长(B)

Fig.2 Germination percentage (A) and root length (B) of overexpression *PpSnRK1βγ1* line OE-βγ1 under MV stress  
同一检测指标各柱形上用不同小写字母标识表示数据间差异显著( $P < 0.05$ ), 下同。



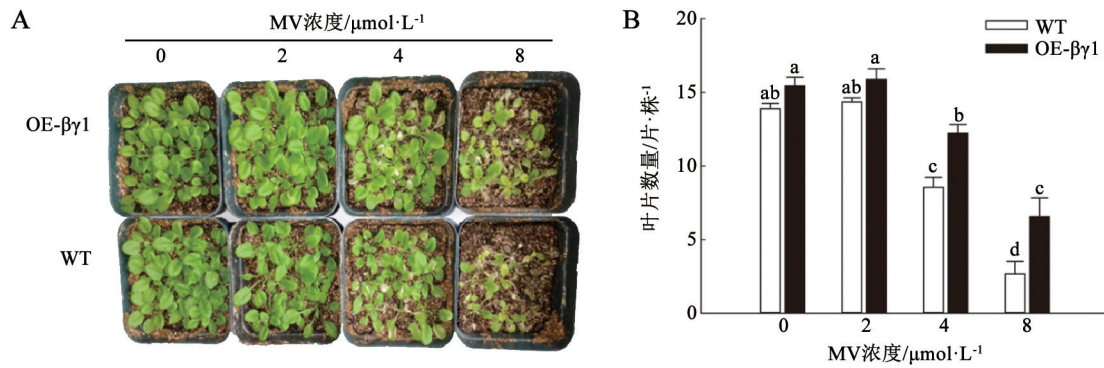


图3 不同MV浓度下超表达*PpSnRK1βγ1*拟南芥株系OE- $\beta\gamma 1$ 的长势(A)和保持绿色叶片数量(B)  
Fig.3 Growth (A) and number remaining green leaves (B) of overexpression *PpSnRK1βγ1* line OE- $\beta\gamma 1$  under different MV concentrations

化最重要的产物之一, 可通过检测其含量了解膜脂过氧化程度, 从而间接测定膜系统受损程度以及植物的抗逆性。本实验中, 在正常生长条件下, OE- $\beta\gamma 1$ 与WT型植株MDA水平没有显著差异, 尽管数值上WT型植株MDA含量略高于转基因型。在 $2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  MV处理6 h内, OE- $\beta\gamma 1$ 和WT型的MDA含量先增加后降低, OE- $\beta\gamma 1$ 植株MDA含量均要低于WT型植株。MV胁迫3 h时, OE- $\beta\gamma 1$ 和WT型的MDA含量达到最高, WT型的MDA含量比OE- $\beta\gamma 1$ 型高40.7% (图4)。

CAT、POD、GSTs和SOD均为植物体内重要的抗氧化酶类。在本实验中, 正常条件下OE- $\beta\gamma 1$ 和WT的SOD、GSTs、POD活性没有显著差异, 但是OE- $\beta\gamma 1$ 的CAT活性比WT的高41.1%。在 $2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  MV处理6 h内, OE- $\beta\gamma 1$ 和WT型的CAT活

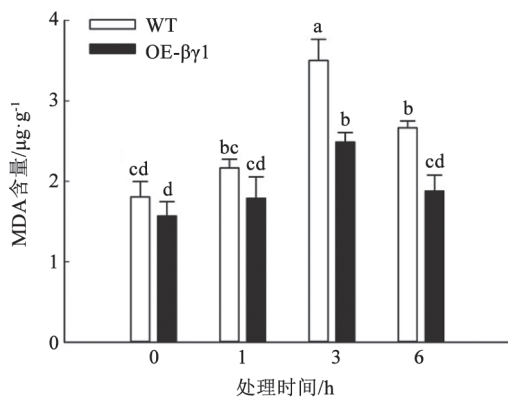


图4 MV胁迫下超表达*PpSnRK1βγ1*拟南芥株系OE- $\beta\gamma 1$ 的MDA含量

Fig.4 MDA content of overexpression *PpSnRK1βγ1* line OE- $\beta\gamma 1$  under MV stress

性均是先降低后升高再降低, 但OE- $\beta\gamma 1$ 的CAT活性均高于WT型, MV胁迫3 h时, OE- $\beta\gamma 1$ 的CAT活性比WT高30.0%。OE- $\beta\gamma 1$ 和WT型的GSTs活性一直升高, OE- $\beta\gamma 1$ 的SOD和GSTs活性均高于WT, MV胁迫3 h时, OE- $\beta\gamma 1$ 的SOD和GSTs活性比WT分别高23.1%和20.2%; MV处理3 h时, OE- $\beta\gamma 1$ 的POD活性比WT提高了26.7% (图5)。

#### 2.4 MV胁迫下超表达*PpSnRK1βγ1*拟南芥株系*PpSnRK1βγ1*基因相对表达量和SnRK1活性

在0和 $2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  MV处理3 h后, OE- $\beta\gamma 1$ 和WT型中*PpSnRK1βγ1*的相对表达量无显著变化, 但对拟南芥体内的*AKINβγ*基因表达量有影响。当 $2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  MV处理3 h后, OE- $\beta\gamma 1$ 和WT型中的*AKINβγ*基因表达量均升高, OE- $\beta\gamma 1$ 的*AKINβγ*基因表达量比对照OE- $\beta\gamma 1$ 提高了2.46倍, WT的*AKINβγ*基因表达量比对照WT提高了2.16倍, 而此时OE- $\beta\gamma 1$ 的*AKINβγ*基因表达量是WT的2.45倍(图6-A和B)。

在正常培养条件下, OE- $\beta\gamma 1$ 的SnRK1活性显著高于WT型, 为WT型的1.56倍; 当 $2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  MV处理3 h后, WT与OE- $\beta\gamma 1$ 的SnRK1酶活性均升高, 但后者酶活性提升水平要显著高于前者, OE- $\beta\gamma 1$ 的SnRK1活性比对照OE- $\beta\gamma 1$ 提高了106.6%, 而此时WT的SnRK1活性比对照WT提高了50.99%。MV胁迫3 h时OE- $\beta\gamma 1$ 植株的SnRK1酶活性是WT的2.12倍(图6-C)。

#### 2.5 MV胁迫下超表达*PpSnRK1βγ1*拟南芥株系*AtHSPRO1*相对表达量

*AtHSPRO1*和*AtHSPRO2*是最近发现的植物响

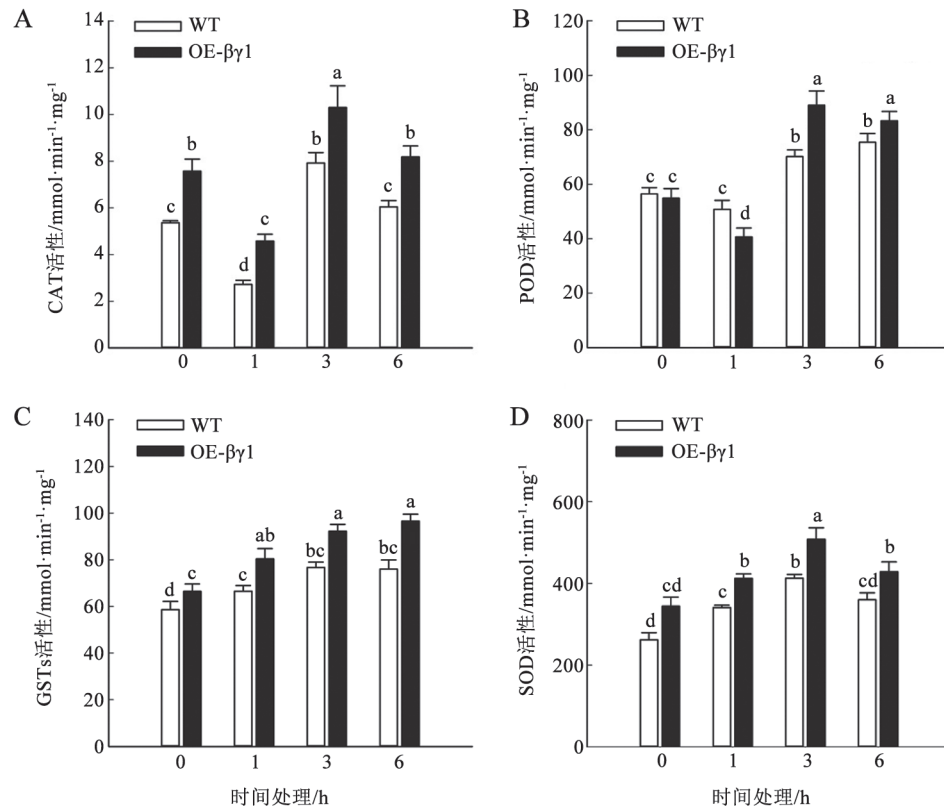


图5 MV胁迫下超表达*PpSnRK1βγ1*拟南芥株系OE-βγ1的CAT (A)、POD (B)、GSTs (C)、SOD (D)活性  
Fig.5 CAT (A), POD (B), GSTs (C) and SOD (D) activities of overexpression *PpSnRK1βγ1* line OE-βγ1 under MV stress

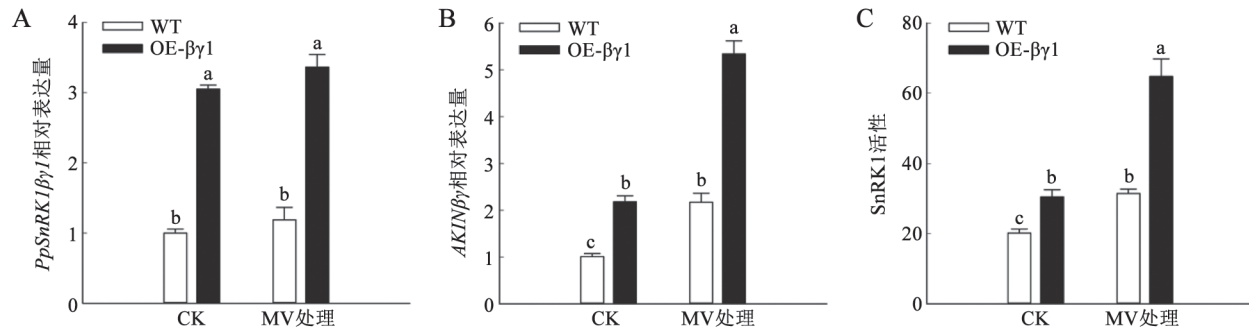


图6 MV胁迫下超表达*PpSnRK1βγ1*拟南芥株系OE-βγ1的*PpSnRK1βγ1* (A)、*AKINβγ* (B)相对表达量和SnRK1活性(C)  
Fig.6 Relative expressions of *PpSnRK1βγ1* (A) and *AKINβγ* (B) and SnRK1 activity (C) of overexpression *PpSnRK1βγ1* line OE-βγ1 under MV stress

应环境胁迫重要的胁迫抗性相关蛋白基因。在正常条件下, OE-βγ1的*AtHSPRO1*和*AtHSPRO2*表达量均高于WT型, 分别是WT型的2.43倍和2.55倍; 当2 μmol·L<sup>-1</sup> MV处理3 h后, OE-βγ1与WT型中两基因的表达量均明显升高, 但OE-βγ1植株两基因的表达量依然要显著高于WT型。OE-βγ1的*AtHSPRO1*和*AtHSPRO2*表达量分别是对照OE-βγ1的3.39倍和2.79倍, WT型的*AtHSPRO1*和*AtHSPRO2*

表达量分别是对照WT型的3.23倍和2.28倍。MV胁迫3 h, OE-βγ1植株*AtHSPRO1*和*AtHSPRO2*表达水平分别是WT的2.56和3.12倍(图7)。

## 讨 论

SnRK1是一类Ser/Thr蛋白激酶, 参与新陈代谢、各种胁迫等多个生理生化过程的信号传导途径, 对植物抵御不良环境起重要作用(孔伟胜等

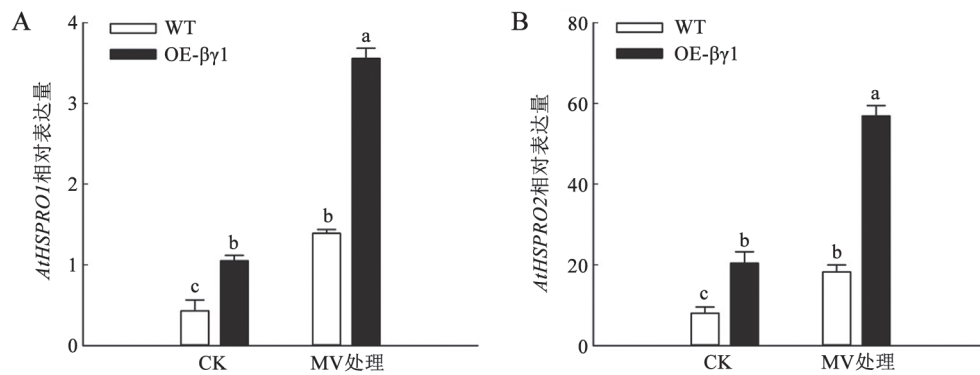


图7 MV胁迫下超表达*PpSnRK1βγ1*拟南芥株系OE-βγ1的*AtHSPRO1* (A)和*AtHSPRO2* (B)相对表达量

Fig.7 Relative expressions of *AtHSPRO1* (A) and *AtHSPRO2* (B) in overexpression *PpSnRK1βγ1* line OE-βγ1 under MV stress

2016), 根据现有的研究结果(Bradford等2003; Gujjar等2014; Gao等2016), 我们推测SnRK1βγ作为SnRK1的调控亚基, 可能参与了植物的胁迫响应。本研究证实了这一推测, 结果显示*SnRK1βγ*过表达能提高SnRK1酶活性, 并提高植物对胁迫的耐受性。

植物中SnRK1是与SNF1/AMPK同源的, 是植物体内的生理活动调控枢纽之一, Hong和Carlson (2007)发现将酵母暴露到氧化胁迫的环境下, SNF1催化亚基活性升高; Wu和Wei (2012)证明在培养人类纤维母细胞时, 加入半致死浓度的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>后, AMPK活性增加。结合上述例证推测在胁迫条件下, 植物SnRK1活性也会增加, 而本文首次验证了这一推测, 即在氧化胁迫条件下, 超表达*PpSnRK1βγ1*拟南芥中SnRK1活性显著高于WT型(图6); 并且超表达*PpSnRK1βγ1*拟南芥从种子萌发率、根长、植株长势等方面(图2和3)与野生型植株相比, 均表现出对氧化胁迫较强的耐受力。Cho等(2012)发现将拟南芥幼苗完全置于水下黑暗培养37 d后, 野生型拟南芥的生长全部停止, 但转基因*OsSnRK1*拟南芥叶片保持绿色, 且SnRK1活性被激活, 说明SnRK1基因在植株应对饥饿胁迫时有明显的应答反应。结合我们的实验结果, 证明SnRK1的确参与了植物应对胁迫反应。

SnRK1能对各种胁迫进行响应, 通过调控相关胁迫基因的表达, 保护植物避免胁迫伤害。*AtHSPRO1*和*AtHSPRO2*能对各种胁迫进行响应, 归类为一般胁迫信号基因(Baena-González和Sheen 2008)。在本文中, MV胁迫3 h后, 超表达*PpSn-*

*RK1βγ1*拟南芥植株内*AtHSPRO1*和*AtHSPRO2*被诱导表达(图6), Baena-González和Sheen (2008)证明拟南芥遭受低温胁迫时, *AtHSPRO1*和*AtHSPRO2*基因表达受SnRK1调节。此外, Gissot等(2006)通过筛库证明拟南芥AKINβγ蛋白与*AtHSPRO1*、*AtHSPRO2*蛋白互作。可见, *SnRK1βγ*参与*HSPRO*基因的信号途径。Song等(2008)发现在氧化胁迫条件下, 超表达*AtHSPRO2*拟南芥具有更长的主根, 表明*AtHSPRO2*基因参与了氧化胁迫信号途径。本研究中, MV胁迫3 h后, 超表达*PpSnRK1βγ1*拟南芥植株MDA含量水平低于野生型, 说明在同等胁迫处理下, 超表达*PpSnRK1βγ1*拟南芥植株受到氧化损伤程度低。此外超表达*PpSnRK1βγ1*拟南芥植株CAT、SOD、GSTs、POD活性均高于野生型, 说明超表达*PpSnRK1βγ1*拟南芥植株对ROS的清除能力要强于野生型, 这一点能直接说明转*PpSnRK1βγ1*拟南芥植株抗氧化能力强。与此同时, 超表达*PpSnRK1βγ1*拟南芥SnRK1活性升高, 但是目前尚没有关于SnRK1与抗氧化酶之间作用关系的研究, 我们推测两者之间在应对胁迫条件时有一定的相关性, 但这一点须进一步研究。

总而言之, 在氧化胁迫条件下, 超表达*PpSnRK1βγ1*拟南芥植株中SnRK1酶活性升高, 可能通过诱导*HSPRO*基因表达, 开启了植株ROS清除机制, 提高了CAT、SOD、GSTs、POD活性, 增强了植株对氧化胁迫的耐受力。

#### 参考文献

Bachmann M, Shiraishi N, Campbell WH, Yoo BC, Harmom AC, Huber SC (1996). Identification of Ser-543 as the major regulatory

- phosphorylation site in spinach leaf nitrate reductase. *Plant Cell*, 8 (3): 505–517
- Baena-González E, Sheen J (2008). Convergent energy and stress signaling. *Trends Plant Sci*, 13 (9): 474–482
- Bowler C, Van Montagu M, Inzé D (1992). Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 43: 83–116
- Bradford KJ, Downie AB, Gee OH, Alvarado V, Yang H, Dahal P (2003). Abscisic acid and gibberellin differentially regulate expression of genes of the SNF1-related kinase complex in tomato seeds. *Plant Physiol*, 132 (3): 1560–1576
- Cho YH, Hong JW, Kim EC, Yoo SD (2012). Regulatory functions of SnRK1 in stress-responsive gene expression and in plant growth and development. *Plant Physiol*, 158 (4): 1955–64
- Crozet P, Margalha L, Confraria A, Rodrigues A, Martinho C, Adamo M, Elias CA, Baena-González E (2014). Mechanisms of regulation of SNF1/AMPK/SnRK1 protein kinases. *Front Plant Sci*, 5 (2): 190
- Drira M, Hanin M, Masmoudi K, Brini F (2016). Comparison of full-length and conserved segments of wheat dehydrin DHN-5 overexpressed in *Arabidopsis thaliana* showed different responses to abiotic and biotic stress. *Funct Plant Biol*, 43: 1048–1060
- Ekmekci Y, Terzioglu S (2005). Effects of oxidative stress induced by paraquat on wild and cultivated wheats. *Pestic Biochem Phys*, 83: 69–81
- Emanuelle S, Doblin MS, Stapleton DI, Bacic A, Gooley PR (2015). Molecular insights into the enigmatic metabolic regulator, SnRK1. *Trends Plant Sci*, 21 (4): 341–353
- Gao XQ, Liu CZ, Li DD, Zhao TT, Li F, Jia XN, Zhao XY, Zhang XS (2016). The *Arabidopsis* KIN $\beta$  $\gamma$  subunit of the SnRK1 complex regulates pollen hydration on the stigma by mediating the level of reactive oxygen species in pollen. *PLoS Genet*, 12 (7): e1006228
- Gissot L, Polge C, Jossier M, Girin T, Bouly JP, Kreis M, Thomas M (2006). AKIN $\beta$  $\gamma$  contributes to SnRK1 heterotrimeric complexes and interacts with two proteins implicated in plant pathogen resistance through its KIS/GBD sequence. *Plant Physiol*, 142 (3): 931–944
- Gujjar RS, Akhtar M, Rai A, Singh M (2014). Expression analysis of drought-induced genes in wild tomato line (*Solanum habrochaites*). *Curr Sci*, 107 (3): 1299–1301
- Guo YL, Tao B, Gao XW (2008). Characteristic of maize glutathione S-transferase (GSTs) and induction action of acetochlor. *J Maize Sci*, 16 (1): 122–125 (in Chinese with English abstract) [郭玉莲, 陶波, 高希武(2008). 玉米谷胱甘肽转移酶(GSTs)特性及除草剂的诱导作用. *玉米科学*, 16 (1): 122–125]
- Han HJ, Peng RH, Zhu B, Fu XY, Zhao W, Shi B, Yao QH (2014). Gene expression profiles of *Arabidopsis* under the stress of methyl viologen: a microarray analysis. *Mol Bio Rep*, 41 (11): 7089–7102
- Harthill JE, Meek S, Nick M, Peggie MW, Borch J, Wong BHC, MacKintosh C (2006). Phosphorylation and 14-3-3 binding of *Arabidopsis* trehalose-phosphate synthase 5 in response to 2-deoxyglucose. *Plant J*, 47 (2): 211–223
- Hong SP, Carlson M (2007). Regulation of Snf1 protein kinase in response to environmental stress. *J Biol Chem*, 282 (23): 16838–16845
- Hulsmans S, Rodriguez M, De Coninck B, Rolland F (2016). The SnRK1 energy sensor in plant biotic interactions. *Trends Plant Sci*, 21 (8): 648–661
- Kong WS, Liu Y, Wang LJ, Li SF, Zhang HR (2016). Research progress of plant family of SnRK. *Plant Physiol J*, 52 (4): 413–422 (in Chinese with English abstract) [孔伟胜, 刘言, 王林娟, 李胜飞, 张海荣(2016). 植物SnRK家族的研究进展. *植物生理学报*, 52 (4): 413–422]
- Lu Z, Liu D, Liu S (2007). Two rice cytosolic ascorbate peroxidases differentially improve salt tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep*, 26 (10): 1909–1917
- Lumbreras V, Albà MM, Kleinow T, Koncz C, Pagès M (2001). Domain fusion between SNF1-related kinase subunits during plant evolution. *EMBO Rep*, 2 (1): 55–60
- Polge C, Thomas M (2007). SNF1/AMPK/SnRK1 kinases, global regulators at the heart of energy control? *Trends Plant Sci*, 12: 1360–1385
- Ramon M, Ruelens P, Li Y, Sheen J, Geuten K, Rolland F (2013). The hybrid Four-CBS-Domain KIN $\beta$  $\gamma$  subunit functions as the canonical  $\gamma$  subunit of the plant energy sensor SnRK1. *Plant J*, 75: 11–25
- Shen W, Dallas MB, Goshe MB, Hanley-Bowdoin L (2014). SnRK1 phosphorylation of AL2 delays *cabbage leaf curl virus* infection in *Arabidopsis*. *J Virol*, 88 (18): 10598–10612
- Shen W, Hanley-Bowdoin L (2006). Geminivirus infection up-regulates the expression of two *Arabidopsis* protein kinases related to yeast SNF1- and mammalian AMPK-activating kinases. *Plant Physiol*, 142 (4): 1642–1655
- Song LH, Ciftci-Yilmaz S, Harper J, Cushman J, Mittler R (2008). Enhanced tolerance to oxidative stress in transgenic *Arabidopsis* plants expressing proteins of unknown function. *Plant Physiol*, 148: 280–292
- Su T, Wei XH, Ding XZ, Li Y (2008). Protective effect of NO and sucrose on oxidative damage in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) seedling leaves under NaCl stress. *Acta Ecol Sin*, 28 (4): 1558–1564 (in Chinese with English abstract) [苏桐, 魏小红, 丁学智, 李源(2008). 外源NO与蔗糖对盐胁迫下番茄(*Lycopersicon esculentum* Mill)幼苗氧化损伤的保护效应. *生态学报*, 28 (4): 1558–1564]
- Wang GF (2014). Cloning and functional analysis of prunus SnRK1  $\alpha$  and  $\beta$  subunits genes (PhD Thesis). Taian: Shandong Agricultural University (in Chinese with English abstract) [王贵芳(2014). 桃SnRK1蛋白激酶 $\alpha$ 和 $\beta$ 亚基编码基因的克隆及功能分析(博士论文). 泰安: 山东农业大学]
- Wang GF, Peng FT, Zhang YF, Dang ZQ, Wang NN (2014). Effects of overexpressing Pingyi Tiancha *MhSnRK1* on carbohydrate metabolism in tomato. *Acta Horti Sin*, 41 (11): 2188–2195 (in Chinese with English abstract) [王贵芳, 彭福田, 张亚飞, 党祝庆, 王娜娜(2014). 平邑甜茶*MhSnRK1*在番茄中超表达对植株碳代谢的影响. *园艺学报*, 41 (11): 2188–2195]
- Wu SB, Wei YH (2012). AMPK-mediated increase of glycolysis as an adaptive response to oxidative stress in human cells: implication



of the cell survival in mitochondrial diseases. *Biochim Biophys Acta*, 1822 (2): 233–247  
Zhen S, Shang X, Wang J (2010). Determination of antioxidant enzyme activity and contents of MDA in maize seedlings under

salt stress with visible spectrophotometry. *Biotechnol Bull*, (7): 106–109 (in Chinese with English abstract) [郑世英, 商学芳, 王景平(2010). 可见分光光度法测定盐胁迫下玉米幼苗抗氧化酶活性及丙二醛含量. *生物技术通报*, (7): 106–109]

## Over expression of a peach *PpSnRK1β1* gene improving oxidative stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*

ZHAO Yong-Fei, CHEN Xiao-Lu, PENG Fu-Tian\*, LUO Jing-Jing, XIAO Yuan-Song

*College of Horticulture Science and Engineering, Shandong Agricultural University / State Key Laboratory of Crop Biology, Taian, Shandong 271018, China*

**Abstract:** *PpSnRK1β1*, one of the regulatory subunits of SnRK1 (sucrose non-fermenting 1-related kinase 1) in peach, was overexpressed in *Arabidopsis thaliana* and was used to investigate the function of *PpSnRK1β1* on oxidative stress tolerance of *A. thaliana*. Compared to wide type (WT) plants, *PpSnRK1β1*-overexpressing plants showed better seed germination rate and relatively longer root length under oxidative stress. After treated with 2 μmol·L<sup>-1</sup> methyl viologen (MV) for 3 h, compared to WT, MDA contents in transgenic plants were significantly lower, and the activities of CAT (catalase), SOD (superoxide dismutase), GSTs (glutathione *S*-transferases) and POD (peroxidase) were higher, which indicated that overexpressing *PpSnRK1β1* could improve the oxidative stress tolerance of *A. thaliana*. Besides, under oxidative stress condition, the activity of SnRK1 in transgenic plants was more than two times higher than WT. The relative expressions of *AtHSPRO1* and *AtHSPRO2*, the stress-responsive genes, were 2.56 and 3.12 times higher than WT. Therefore, *PpSnRK1β1* could improve the oxidative stress tolerance of *A. thaliana* via participating in regulating the expression of *HSPRO*.

**Key words:** peach; *PpSnRK1β1*; oxidative stress; antioxidant enzymes; *HSPRO*

Received 2016-12-14 Accepted 2017-04-05

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 31672099), Funds of Shandong “Double Tops” Program (Grant No. SYL2017YSTD10), and Modern Agricultural Industry Technology System (Grant No. CARS-31).

\*Corresponding author (E-mail: pft@sda.edu.cn).