

DOI: 10.11686/cyxb2024106

http://cyxb.magtech.com.cn

汪欣瑶, 彭亚萍, 姚立蓉, 等. 盐生草 *HgS5* 基因的克隆与抗旱性鉴定. 草业学报, 2025, 34(2): 184—195.

WANG Xin-yao, PENG Ya-ping, YAO Li-rong, et al. Gene cloning and drought resistance identification of the gene *HgS5* in *Halogeton glomeratus*. Acta Prataculturae Sinica, 2025, 34(2): 184—195.

## 盐生草 *HgS5* 基因的克隆与抗旱性鉴定

汪欣瑶<sup>1,3</sup>, 彭亚萍<sup>1,3</sup>, 姚立蓉<sup>1,3</sup>, 汪军成<sup>1,3</sup>, 司二静<sup>1,3</sup>, 张宏<sup>1,3</sup>, 杨轲<sup>1,3</sup>, 马小乐<sup>1,3</sup>,  
孟亚雄<sup>1,3</sup>, 王化俊<sup>1,3\*</sup>, 李葆春<sup>1,2</sup>

(1. 甘肃农业大学省部共建旱生境作物学国家重点实验室, 甘肃省作物遗传改良与种质创新重点实验室, 甘肃兰州 730070; 2. 甘肃农业大学生命科学技术学院, 甘肃兰州 730070; 3. 甘肃农业大学农学院, 甘肃兰州 730070)

**摘要:** 为应对日益严峻的干旱环境问题, 发掘植物体内的抗旱基因具有重要意义。基于前期盐生草转录组测序数据分析结果, 盐胁迫后 *HgS5* 基因的表达量与差异倍数最高, 故选其为研究对象, 对目的基因编码的蛋白进行生物信息学分析并进行亚细胞定位; 通过 qRT-PCR 检测目的基因在拟南芥植株叶片和根系的相对表达量, 并利用农杆菌完成拟南芥异源表达, 以验证目的基因的抗旱能力。结果表明, *HgS5* 基因中碱基对的数量为 1738, 编码 370 个氨基酸, 编码蛋白为酸性亲水性蛋白且没有跨膜区; 具有 116 个启动子顺式作用元件; *HgS5* 基因和巨人柱、苋菜和甜菜相关同源基因拥有相同的 *A\_thal\_3526* 保守结构域; 亚细胞定位显示 *HgS5* 基因主要在细胞膜上表达; 荧光定量结果显示 *HgS5* 基因主要在拟南芥根系表达, 处理第 6 天表达量与其他组别差异显著 ( $P < 0.05$ ); 抗旱鉴定结果显示过表达拟南芥的抗旱性明显增强, 具体表现为植株枯萎程度减缓; 基因 *HgS5* 通过影响酶活性来对抗干旱环境, 过表达拟南芥根系超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化物酶 (POD) 和过氧化氢酶 (CAT) 活性在干旱胁迫后期整体高于野生型。综上所述, 基因 *HgS5* 在抗旱过程中起到了积极的调控作用。研究结果旨在为进一步探索 *HgS5* 基因应对干旱胁迫的分子响应机制提供理论依据。

**关键词:** 盐生草; 基因家族; 生物信息学分析; 基因克隆; 抗旱性鉴定

## Gene cloning and drought resistance identification of the gene *HgS5* in *Halogeton glomeratus*

WANG Xin-yao<sup>1,3</sup>, PENG Ya-ping<sup>1,3</sup>, YAO Li-rong<sup>1,3</sup>, WANG Jun-cheng<sup>1,3</sup>, SI Er-jing<sup>1,3</sup>, ZHANG Hong<sup>1,3</sup>,  
YANG Ke<sup>1,3</sup>, MA Xiao-le<sup>1,3</sup>, MENG Ya-xiong<sup>1,3</sup>, WANG Hua-jun<sup>1,3\*</sup>, LI Bao-chun<sup>1,2</sup>

1. State Key Laboratory of Aridland Crop Science by Gansu Agricultural University, Gansu Key Laboratory of Crop Improvement and Germplasm Enhancement, Lanzhou 730070, China; 2. College of Life Sciences and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China; 3. College of Agronomy, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China

**Abstract:** To address environmental challenges involving escalating frequency and severity of drought, it is of utmost importance to develop a deep understanding of drought-resistance genes in plant genomes. Based on our initial laboratory analysis of transcriptome sequencing data from *Halogeton glomeratus*, the *HgS5* gene exhibited the

收稿日期: 2024-04-02; 改回日期: 2024-06-04

基金项目: 甘肃省优秀研究生“创新之星”项目(2022CXZXS-020), 国家自然科学基金项目(31960072, 32001514), 财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系项目(CARS-05-04B-2), 甘肃省教育厅: 产业支撑计划项目(2021CYZC-12), 甘肃省青年基金项目(22JR5A880), 甘肃省自然基金项目(20JR10RA507), 甘肃农业大学伏羲青年英才计划(Ganfx-04Y11, Ganfx-03Y06)和甘肃农业大学国家级大学生创新创业训练计划重点支持领域项目(202110733001)资助。

作者简介: 汪欣瑶(1998—), 女, 甘肃兰州人, 在读博士。E-mail: 921032613@qq.com

\* 通信作者 Corresponding author. E-mail: huajunwang@sina.com

highest expression level and differential fold change following salt stress. This study focused on the *HgS5* gene, conducting bioinformatics analysis and subcellular localization of the protein encoded by this target gene. We employed qRT-PCR to assess the relative expression of the target gene in the leaves and roots of *Arabidopsis thaliana*, and achieved heterologous expression in *A. thaliana* using *Agrobacterium* as a vector. In this experiment, we cloned the *HgS5* gene from *H. glomeratus* and validated its drought resistance in *A. thaliana*. It was found that the *HgS5* gene comprises 1738 base pairs, encoding 370 amino acids. The encoded protein is acidic and hydrophilic, lacking a transmembrane region. Featuring 116 promoter *cis*-acting elements, the *HgS5* gene shares a *A\_thal\_3526* conserved domain with homologous genes related to *Carnegieia gigantea*, *Amaranthus tricolor*, and *Beta vulgaris*. Subcellular localization indicated that the *HgS5* gene is primarily expressed on the cell membrane. Fluorescence quantitative analysis showed that the *HgS5* gene is predominantly expressed in the roots of *A. thaliana*, with a significantly increased expression level compared to other groups at 6 days ( $P < 0.05$ ). The drought resistance assessment revealed a notable enhancement in drought tolerance in *A. thaliana* overexpressing the *HgS5* gene, evident in a slower wilting rate of the plants. The *HgS5* gene conferred resistance to dry conditions by influencing enzyme activity, initially increasing and subsequently decreasing the activities of superoxide dismutase, peroxidase, and catalase in the roots of *A. thaliana*. To summarize, the gene *HgS5* plays a pivotal role in the process of drought resistance. The aim of this study was to provide a theoretical basis for further exploration of the molecular response mechanism of the *HgS5* gene to drought stress.

**Key words:** *Halogeton glomeratus*; gene families; bioinformatics analysis; gene cloning; drought resistance identification

土壤干旱是影响植物最不利的环境因素之一,导致全球化的农业生产损失<sup>[1]</sup>。在干旱和半干旱地区,植物根系的蒸发和向上吸水导致盐分集中在土壤表层,从而提高了近地表土壤的含盐量。因此土壤盐度通常会与干旱成为叠加的负面环境影响因素<sup>[2]</sup>。有研究认为干旱逆境会使细胞膜首先受到伤害,导致植物体内大量富集活性氧,防御系统无法及时清除导致自体平衡被破坏,膜上出现孔隙增加胞内大分子电解质外渗<sup>[3-4]</sup>,造成剧烈的活性反应,氧化还原酶类中超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)<sup>[5]</sup>活性变化最明显。

盐生草(*Halogeton glomeratus*),一年生藜科(Chenopodiaceae)草本植物,广泛分布于中亚和中国西北干旱地区<sup>[6]</sup>。其在盐渍化土壤生态系统中具有天然生存优势,广泛分布于我国西北地区的荒漠戈壁地带。这种植物以其细长而有蜡质结构的叶片著称,这些叶片表面光滑,不易受到病虫害侵袭,并且能有效减少水分蒸发,展现出卓越的耐盐、耐高温和抗旱特性<sup>[7]</sup>。盐生草作为极具潜力的耐旱植物,其蕴藏的与干旱相关的基因若得到有效挖掘和应用,将推动抗旱作物的研究进程,从而为应对干旱环境挑战提供更多解决方案。

植物为抵御逆境而产生的抗逆反应,受环境与植物体内激素的调控,调控的源头正是抗性基因的表达。关于抗性基因的挖掘,其试验体系目前已成熟运用在各作物之中,马铃薯(*Solanum tuberosum*)<sup>[8]</sup>、大豆(*Glycine max*)<sup>[9]</sup>、玉米(*Zea mays*)<sup>[10]</sup>、烟草(*Nicotiana tabacum*)<sup>[11]</sup>、水稻(*Oryza sativa*)<sup>[12]</sup>和棉花(*Gossypium* spp)<sup>[13]</sup>中均有报道;同时基因挖掘也是培育具有优良抗性种质的重要手段。基因的表达情况随着逆境的不同而出现差异,目前有水通道蛋白、渗透调节蛋白等基因<sup>[14]</sup>受干旱胁迫诱导。盐生草作为耐盐耐旱优良植物,目前已报道的基因多集中于盐胁迫机理研究,包括盐生草叶中分时段影响钠钾离子泵转运的 *HgNHX1* 和 *HgSOS1* 基因<sup>[15-17]</sup>;还有一种在盐生草中高度保守的管家基因“*Actin* 基因”<sup>[18]</sup>;还有具有调节盐生草耐盐性功能的 *HgAKR6C* 基因<sup>[19]</sup>等,对于盐生草干旱胁迫响应基因及其分子调控机制研究还有待补充。课题组前期以盐生草盐胁迫转录组数据为基础(BioProject ID: PRJNA388267),筛选表达量与差异倍数最高<sup>[20]</sup>的候选基因,发现 *HgS5* 基因在盐胁迫下上调表达,为了进一步验证盐生草 *HgS5* 基因是否正向调控植物干旱胁迫,本研究通过生物信息学分析和亲缘关系初步了解该基因的基础特性,并进行了基因表达量差异分析和亚细胞定位,同时结合拟南芥异源表达分析初步研究该

基因的功能,对转基因拟南芥进行抗旱表型评价和相关酶活性指标测定,结果显示 *HgS5* 基因在拟南芥和盐生草响应干旱胁迫中具有正向调控作用。以期为后期 *HgS5* 基因的耐旱调控机制研究提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料及种植方法

试验材料中盐生草种子来自甘肃省会宁县盐碱地(35°26' N、104°31' E),2022年4月点播于无菌水浸透的培养基质(蛭石:细沙=1:1)中,每天浇灌一次 Hoagland's 营养液,保持土壤湿润。

野生型拟南芥 Col-0(wild type, WT)种子保存于实验室种子柜,同年种植,步骤参照盐生草播种方法,培养基为添加吡虫啉溶液的全营养土,培养至抽薹前期用于遗传转化。

本氏烟草(*Nicotiana benthamiana*)于2022年4月点播在甘肃农业大学人工气候室盆栽中,具体方法参照盐生草播种方法。

### 1.2 *HgS5* 基因克隆及生物信息学分析

以基因 *HgS5* 的 cDNA 为模板(1738 bp),设计引物见表1。采集盐生草 45 d 叶片和根系样本,试剂盒提取 RNA(TIANGEN RNAsimple Total RNA Kit),反转录步骤参考说明书(天根反转录试剂盒)。PCR 反应体系:2  $\mu$ L dNTP Mixture 2.5 mmol·L<sup>-1</sup>、2.5  $\mu$ L 10×Ex Taq Buffer Mg<sup>2+</sup> Plus、正反向引物(10  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>)各 1  $\mu$ L、0.2  $\mu$ L Ex Taq 酶、1  $\mu$ L cDNA、17.3  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O。PCR 反应程序:95 °C 5 min、94 °C 50 s、59 °C 50 s、72 °C 90 s(Go To Step 2 循环 36 次)、72 °C 10 min、4 °C 取出。电泳后选择合格条带,进行胶回收(大连宝生物工程有限公司 Gel Extraction Mini Kit 试剂盒),将回收产物与 pMD19-T Vector(大连宝生物工程有限公司)载体连接。转化大肠杆菌(*Escherichia coli*)感受态细胞 DH5 $\alpha$ ,蓝白斑筛选后送至上海生工生物工程技术服务有限公司测序。采用在线软件 ProtParam、NovoPro 分析目的基因蛋白的理化性质和一、二级结构;采用 NetPhos 3.1 和 Signalp 预测磷酸位点和信号肽跨膜区等。

### 1.3 系统进化树分析

使用 NCBI 在线网站 CD Search 确定目的基因保守结构域,筛选前 50 个具有相同保守结构域的基因,整理汇总 Faste 格式;使用软件 MEGA 11 对前 50 个同源蛋白进一步比对,输入 Muscle 命令,利用 TBtools 软件中 trimAL Wrapper 进行修剪,采用最大似然法(bootstrap replications 默认 500)构建系统发育进化树,使用 ITOL 在线软件进行可视化展示。

### 1.4 启动子顺式作用元件分析

使用 Plant CARE 软件预测分析启动子顺式作用元件。

### 1.5 亚细胞定位分析

使用克隆得到的目的基因,用 pCambia2301 作为表达载体,设计表 1 中亚细胞定位载体引物,提取质粒(天根质粒提取试剂盒,反应见说明书),双酶切过夜,反应体系:质粒 8  $\mu$ L、*Xba* I 和 *Kpn* I 各 1  $\mu$ L、10 倍 M Buffer 3  $\mu$ L 和 dd H<sub>2</sub>O 7  $\mu$ L。通过 T4 连接酶连接载体 PBI-121-GFP,转化 DH5 $\alpha$ ,筛选蓝白斑,PCR 检测步骤同 1.2。双酶切验证(*Xba* I 和 *Kpn* I),电泳筛选合适的质粒,制备 LBA 4404 农杆菌并活化,将重组质粒 PBI-121-GFP-*HgS5* 转入感受态农杆菌 LBA 4404 中,PCR 验证同 1.2。合适的菌液按 1% 添加进 100  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup> 卡那霉素 LBA 培养基,每 h 测一次 OD 值,OD 值为 0.45~0.55 时离心 30 s,弃上清,制备农杆菌浸染液。注射转化烟草叶片,使用激光共聚焦扫描显微镜(蔡司 ZEISS LSM 800 3D,德国)观察亚细胞定位。

### 1.6 遗传转化拟南芥

使用 1.5 中的方法将 *HgS5* 基因连接到 pCambia2301 载体上,构建重组载体 pCambia2301-*HgS5*。双酶切体系:10  $\mu$ L 质粒 DNA、*Kpn* I 和 *Bam*H I 各 1  $\mu$ L、3  $\mu$ L 10×T 和 5  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O。双酶切验证(*Kpn* I 和 *Bam*H I)后,转入农杆菌 LBA4404,挑菌进行 PCR 验证,同 1.2。检测合适的菌液制备农杆菌浸染液,用浸花法<sup>[21]</sup>浸染刚抽薹的拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)植株,间隔一周二次浸染,收获的种子消毒后培养于 MS 培养平板上(含 40 mg·L<sup>-1</sup> 卡那霉素),长出真叶后用 1.2 的方法进行 PCR 鉴定,条带明亮清晰的为阳性植株,鉴定引物见表 1。继续培养至

收获单株种子 T<sub>2</sub> 代。

### 1.7 组织特异性分析

在自然干旱 0、3、6、9、12 d 取样转基因和野生型拟南芥叶片和根系各 0.5 g。用柱式法 RNA 提取试剂盒 TaKaRa MiniBEST Universal RNA Extraction Kit 提取总 RNA (具体步骤参考说明书), 反转录 cDNA 进行荧光定量 PCR (real-time PCR) 检测, 3 次重复。qRT-PCR 检测通过天根 Super Real 荧光定量预混试剂盒进行, 体系与反应程序参考两步法。待扩增完成后绘制熔解曲线, 基因相对表达量以  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算<sup>[22]</sup>。

表 1 试验所用引物序列

Table 1 Primer sequence used in the experiment

引物名称 Name of primers	引物序列 Sequence of primers (5'-3')	用途 Function
HgS5-F1	CGTTGTTTCCAGCCCACTTC	克隆基因
HgS5-R1	AATGTTAAACACTTTACAATAC	Gene cloning
HgS5-F1	GGGGTACCGACGTTGTTTCCAGCCCACTTC	表达载体
HgS5-R1	CGGGATCCAGAATGTTAAACACTTTACAATAC	Expression vector
35s-F	GACGCACAATCCCCTATCC	鉴定引物
HgS5-R	CGGGATCCAGAATGTTAAACACTTTACAATAC	Identification primer
HgS5-F1	GCTCTAGAGACGTTGTTTCCAGCCCACT	亚细胞定位
HgS5-R1	GGGGTACCAGAATGTTAAACACTTTACAATAC	Subcellular localization
HgS5-F1	ACCCTGTCCTACAACCACCT	荧光定量 PCR
HgS5-R1	TGGGAGCAGGGACTCCATTA	Real-time PCR
Actin-F1	GGTGATGGTGTGTCTCACACTG	
Actin-R1	GAGGTTTCCATCTCCTGCTCGTAG	
Actin-F2	ACACAAGGTCTATGTCGGAAAT	
Actin-R2	TAACACTCTCGTGCTTACGATT	

注: 下划线为酶切位点。

Note: The underscore is the enzymatic cleavage site.

### 1.8 干旱胁迫下转 HgS5 基因拟南芥发芽率测定

将消毒后的 T<sub>2</sub> 代转基因与野生型拟南芥种子在 MS 培养平板上萌发, PEG (聚乙二醇 polyethylene glycol) 浓度设置: 0%、5%、10%、15% 和 20%, 在 0、3、5、7 和 9 d 采样, 取 3 次重复, 统计发芽率。

### 1.9 转 HgS5 基因拟南芥生理指标和土壤含水量测定

T<sub>2</sub> 代转基因拟南芥盆栽两周后进行自然干旱处理, 第 0、3、6、9 和 12 天测定盆栽中拟南芥生理指标, 同时测定土壤含水量 (VM-210S 便携式土壤水分仪, 中国)。用氮蓝四唑光还原法测定 SOD 活性; 用愈创木酚法测定 POD 活性; 用紫外吸收法测定 CAT 活性<sup>[23]</sup>, 测定拟南芥样品根部的 SOD、POD 和 CAT 活性, 设计 3 次重复。

### 1.10 数据处理

使用 Microsoft Excel 2017 对试验数据进行统计并作图, 利用 SPSS 26 进行显著性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 HgS5 基因的克隆及生物信息学分析

本研究克隆得到目的基因 HgS5, PCR 扩增产物符合测序结果 (图 1A), HgS5 基因序列的全长是 1738 个碱基对, 编码 370 个氨基酸, 其目的基因编码区 (coding sequences, CDS) 编码蛋白分子式为: C<sub>1749</sub>H<sub>2729</sub>N<sub>473</sub>O<sub>569</sub>S<sub>16</sub>, 相对分子质量为 39999.70。不存在信号肽和跨膜区 (图 1B); 编码蛋白是酸性亲水性蛋白 (图 1C); 蛋白质的二、三级结构预测如图 1D, E 所示, 含有 64.05% 无规则卷曲结构和 1.62% 的  $\beta$ -转角结构。

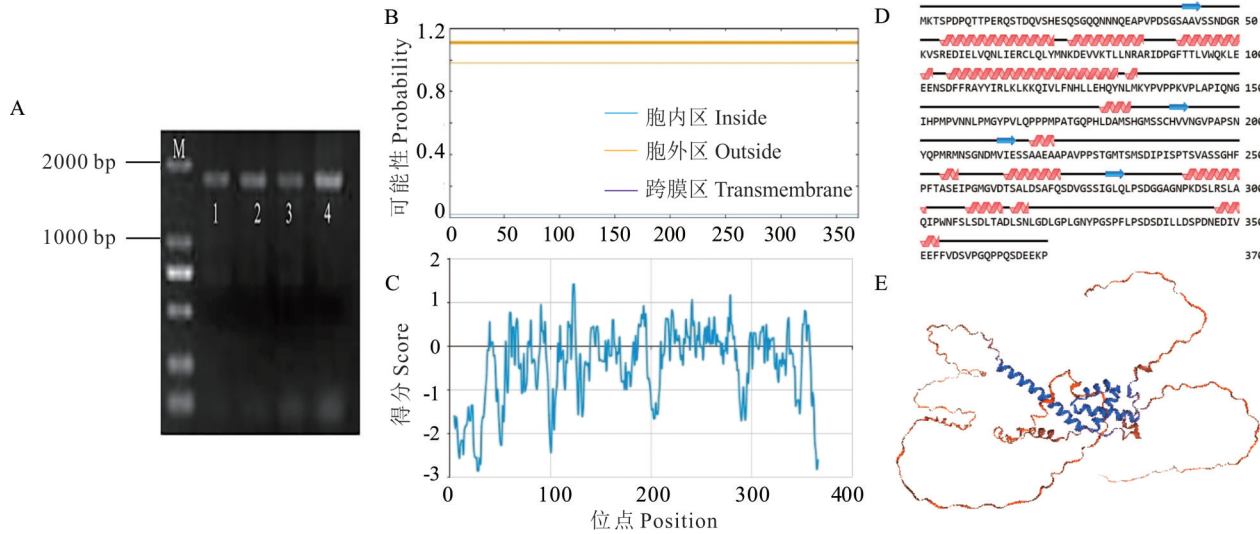


图1 *HgS5* 基因生物信息学分析

Fig. 1 Bioinformatics analysis and prediction of *HgS5*

A: PCR 扩增; 泳道 1~4 为 *HgS5* 基因的 PCR 扩增产物电泳图 (Marker 为 2000 bp); B: 蛋白跨膜区分析图; C: 蛋白亲疏水性预测; D: 蛋白二级结构预测图; E: 蛋白质三级结构预测。A: PCR amplification; Lane 1-4 is the PCR product amplification electrophoresis image of gene *HgS5* (M: DL 2000 DNA Marker); B: Analysis diagram of protein transmembrane region; C: Protein hydrophobicity prediction; D: Protein secondary structure prediction diagram; E: Protein tertiary structure prediction.

## 2.2 系统进化树分析

根据自展值可信度范围隐藏不足 70 的进化分支,对拥有相同保守结构域的盐生草 *HgS5* 基因和其他物种基因采用 ML(bootstrap replications 默认 500)最大似然法构建系统发育树。通过构建聚类树展示同源性最高的前 50 个样本 (图 2), 结果显示, *HgS5* 基因与仙人掌科、巨人柱属中唯一的物种巨人柱 (*Carnegiea gigantea*, KAJ8444719.1) 同属一个分支, 图中自展值为 87, 属于可信范围。此同源区间内还包括苋科苋属一年生草本植物苋菜 (*Amaranthus tricolor*, XP\_057531325.1) 和甜菜 (*Beta vulgaris*, XP\_010668228.1), 都具有一致的保守结构域 *A\_thal\_3526*, 该保守结构域有 57 个残基, 大多数在蛋白质 N 端被发现, 该结构域属于未表征的植物特异性结构域, 功能未知, 初步推测参与抗旱机制。

## 2.3 启动子顺式作用元件分析

盐生草 *HgS5* 基因启动子区域含有 116 个顺式作用元件 (图 3), 除未命名和无功能的调控元件外, 其转录因子都存在核心元件 TATA-box 和增强元件 CAAT-box, 具备真核生物基因启动子的基本结构特征<sup>[24]</sup>。目的 *HgS5* 基因内含与分生组织表达相关的元件 CAT-box、赤霉素响应元件 TATC-box 和光响应元件 G-box, 其同时具有 3 个干旱诱导相关 MYB 结合位点 MBS, 推测该基因在抗旱性方面存在重要作用。

## 2.4 亚细胞定位分析

软件预测结果表明细胞核内无定位, 推测主要在细胞膜上表达, 为进一步验证亚细胞定位, 将目的基因表达载体 PBI121-GFP-*HgS5* 转化烟草, 使用空载体 PBI121-GFP 为对照, 由图 4 可以看出绿色荧光蛋白在细胞膜表达, 未见其他位置表达, 明场通道显示细胞状态良好, 符合预测结果。得出结论: *HgS5* 基因定位在细胞膜。

## 2.5 *HgS5* 基因遗传转化

利用目的基因从 mRNA 反转录而得到的 DNA 和表达载体 pCambia2301, 成功构建表达载体 pCambia2301-*HgS5* (图 5A), 双酶切得到 *HgS5* 基因和质粒骨架 (图 5B)。转化农杆菌后浸花法浸染拟南芥, 收获过表达拟南芥 T<sub>0</sub> 代种子, 平铺在卡那霉素 MS 抗性平板上, 筛选后得到 10 株 T<sub>1</sub> 代阳性转化株, 将抗性苗移栽长大后进行 PCR 阳性鉴定, 选取条带清晰明亮的单株 (图 5C) 继续种植, 用相同的方法筛选 T<sub>2</sub> 代过表达植株。



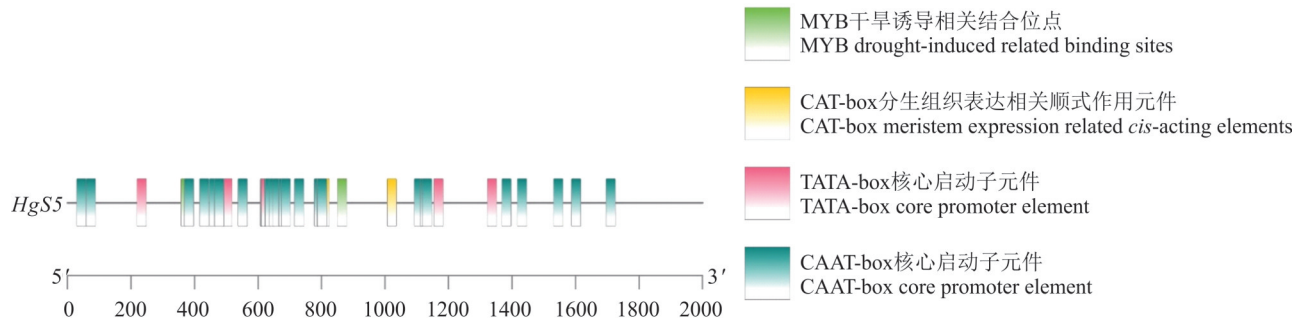
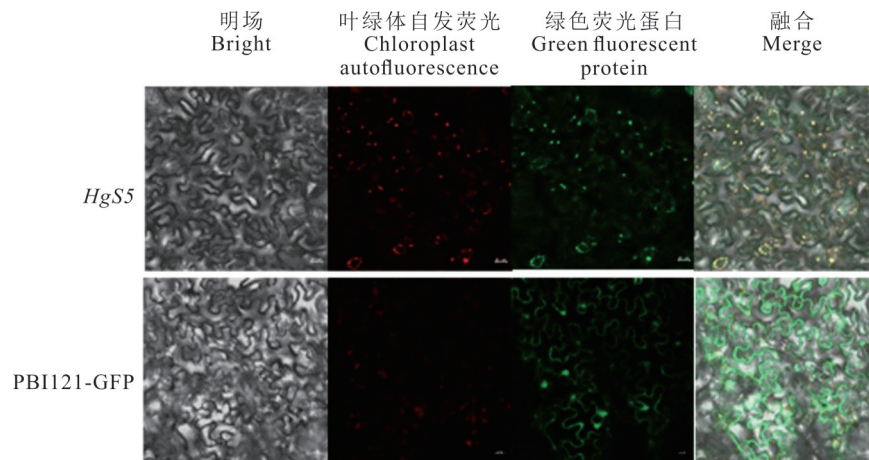
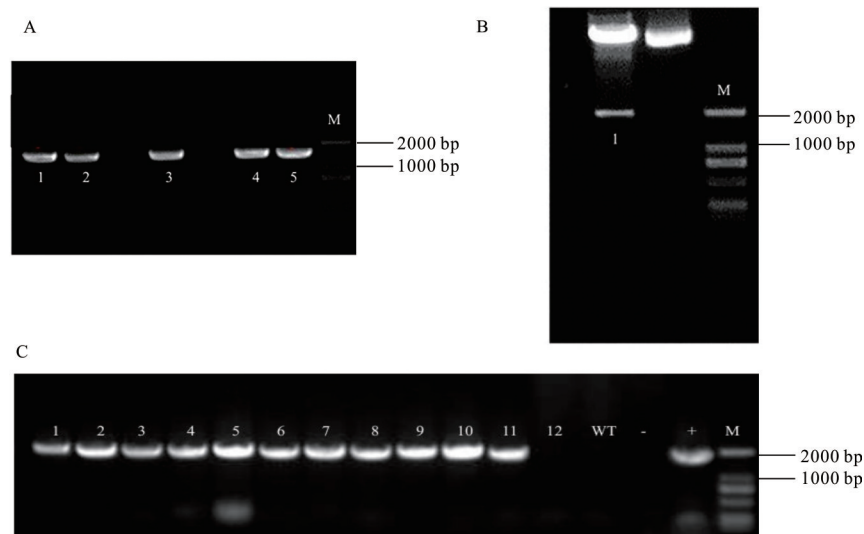
图3 *HgS5* 基因启动子顺式作用元件分析Fig. 3 Analysis of promoter acting elements of the gene *HgS5*图4 *HgS5* 基因的亚细胞定位分析Fig. 4 Subcellular localization analysis of the *HgS5* gene

图5 遗传转化拟南芥 PCR 胶图汇总

Fig. 5 Summary of PCR gel map of genetic transformation *A. thaliana*

A: pCambia2301-*HgS5* 表达载体 PCR 验证, M 为 Marker, 泳道 1~5 为 *HgS5* 基因的单克隆 PCR 验证; B: pCambia2301-*HgS5* 表达载体双酶切验证, M 为 Marker, 泳道 1 为 *HgS5* 基因的单克隆 PCR 验证; C:  $T_0$  代阳性株检验, M 为 Marker, 泳道 1~12 为 *HgS5* 基因的单克隆 PCR 验证, “WT” 为野生型, “-” 为 ddH<sub>2</sub>O, “+” 为质粒。Marker 为 2000 bp。A: pCambia2301-*HgS5* expression vector PCR verification, M as Marker, lanes 1-5 as *HgS5* gene monoclonal PCR verification; B: pCambia2301-*HgS5* expression vector was verified by double restriction enzyme digestion, M was the Marker, and lane 1 was the monoclonal PCR verification of *HgS5* gene; C:  $T_0$  generation positive plant test, M is Marker, lanes 1-12 are confirmed by monoclonal PCR of *HgS5* gene, “WT” is wild type, “-” is ddH<sub>2</sub>O, and “+” is plasmid. Marker is 2000 bp.

2.7 功能验证

**2.7.1 干旱胁迫下的萌发分析** 由图 7 可知,在第 3 天无论是野生型(WT)还是过表达型(OE),在未经特殊处理的情况下均开始发芽。然而,当 PEG 处理浓度 20% 时,两者均未能成功发芽。第 5 天在 PEG 处理浓度为 0 和 5% 的条件下,WT 和 OE 的发芽情况几乎无差异;但在 10%~20% 的 PEG 浓度下,情况开始发生变化,OE 的发芽数量显著增加( $P < 0.05$ ),这一差异在 15% 的 PEG 浓度下达到峰值。当处理时间延长至 7 d 时,在 20%PEG 浓度下,OE 的发芽率达到了 63.33%,而 WT 的发芽率仅为 9.89%,这一差异达到了显著水平( $P < 0.05$ )。其他浓度下的差异则相对不明显。经过 9 d 的处理后,在 20%PEG 浓度下,OE 的发芽率相较于 WT 高出了 21.00%,这一显著差异再次证明了 OE 的抗旱性更强( $P < 0.05$ )。综上所述,在干旱胁迫的条件下,OE 的发芽率普遍高于 WT,并且随着干旱程度的增加,OE 表现出更强的抗旱能力。目的基因 *HgS5* 的过表达确实能够增强拟南芥在干旱处理下的发芽能力,从而证明了该基因具有显著的抗旱能力。

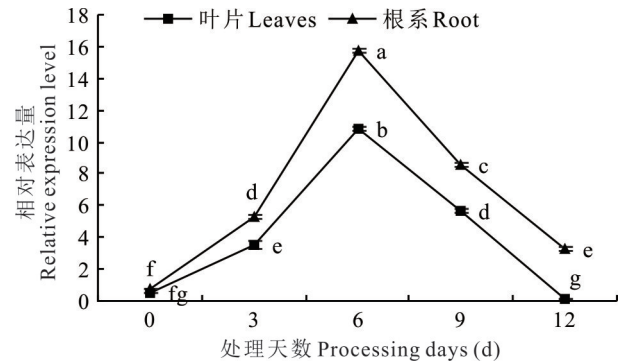


图 6 基因相对表达量分析

Fig. 6 Gene relative expression analysis

不同小写字母表示不同处理间差异显著 ( $P < 0.05$ ), 下同。Different lowercase letters indicate significant differences among different treatments ( $P < 0.05$ ), the same below.

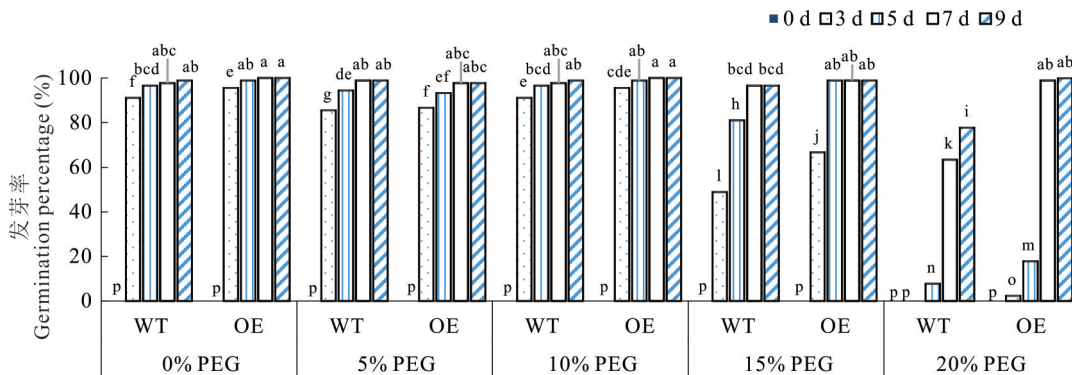


图 7 PEG 胁迫处理下种子萌发情况

Fig. 7 Seed germination under different PEG stress treatments

WT:野生型;OE:过表达株系;PEG:聚乙二醇;下同。WT: Wild type; OE: Overexpression plants; PEG: Polyethylene glycol; The same below.

**2.7.2 转 *HgS5* 基因拟南芥耐旱性表型鉴定**

经测定初始土壤含水量,WT 为 50.82%,OE 为 50.82%(表 2),处理 3 d 时 WT 土壤含水量为 44.50%,OE 为 44.44%,WT 抗旱性与 *HgS5* 保持一致;处理第 6 天,WT 土壤含水量减少约 14%,OE 土壤含水量同样减少约 14%,WT 植株叶片开始蜷缩,OE 株系未发生明显变化,表明 OE 抗性更强;处理 9 d,土壤含水量继续下降约 23%,WT 已经呈严重缺水,部分叶片出现坏死,转基因拟南芥叶片仍保持活跃状态;处理第 12 天时,土壤含水量下降至 5% 左右,WT 完全死亡,OE 组叶片萎缩但仍保持生命活动,由此得出,  $T_2$  代转基因拟南芥植株具有更强抗旱性(图 8)。

**2.7.3 转 *HgS5* 基因拟南芥干旱生理指标分析**

处理当天,WT 和 OE 根系中 SOD 活性基本一致;处理 3 d 后发生变化,变化幅度较弱;处理 6 d,WT 的 SOD 活性达到峰值,OE 中 SOD 活性还在持续增加;处理 9 d,WT 中 SOD 活性急剧减少至  $35.67 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FW}$ ,OE 的 SOD 活性达到最大值,差异显著 ( $P < 0.05$ );处理 12 d,WT 中 SOD 活性降至最低点  $12.67 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FW}$ ,小于初始值,OE 中 SOD 活性虽然是下降趋势,但测定数值  $47.00 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FW}$  仍高于初始值(图 9)。

处理 3 d,WT 中 POD 活性每 min 从  $24.00 \Delta\text{OD}_{470} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FW}$  上升到  $40.50 \Delta\text{OD}_{470} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FW}$ ,对比 OE 上升趋势

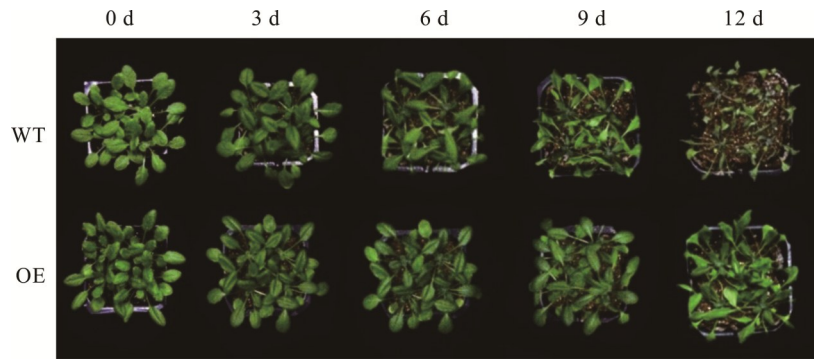


图8 干旱处理下拟南芥表型鉴定

Fig. 8 Identification of phenotype of *A. thaliana* under drought stress

明显;处理第6天时,两者体内POD活性均达到最高点;处理第9天,WT中POD活性开始减少,而OE仍为 $74.17 \Delta OD_{470} \cdot g^{-1} FW \cdot min^{-1}$ ,与3 d前保持一致;在处理的第12天,OE体内的POD活性高于WT( $P < 0.05$ )。

CAT活性在根系中整体变化趋势为先增加后减少,但在野生型和OE中增幅不同。干旱胁迫处理的第3~9天,OE体内CAT活性整体低于WT,并在第6天达到显著水平( $P < 0.05$ ),处理的第6天,OE和WT体内的CAT活性均达到最高,分别是215.00和391.33  $mg H_2O_2 \cdot g^{-1} FW \cdot min^{-1}$ ;在处理的第9天和12天,OE根系内的CAT活性均高于WT,差异显著( $P < 0.05$ )。

表2 干旱处理下的土壤含水量

Table 2 Soil moisture content under drought stress (%)

项目 Item	0 d	3 d	6 d	9 d	12 d
WT-1	50.52	45.99	30.22	7.13	5.98
WT-2	50.94	43.08	30.98	7.15	5.87
WT-3	50.99	44.44	30.45	7.12	5.88
OE-1	50.87	45.35	30.45	7.14	5.56
OE-2	50.83	44.42	30.35	7.33	5.78
OE-3	50.76	43.55	30.57	7.25	5.88

注: WT:野生型拟南芥;OE:过表达H<sub>g</sub>S5基因拟南芥。

Note: WT: Wild type *A. thaliana*; OE: Overexpressing *HgS5* gene of *A. thaliana*.

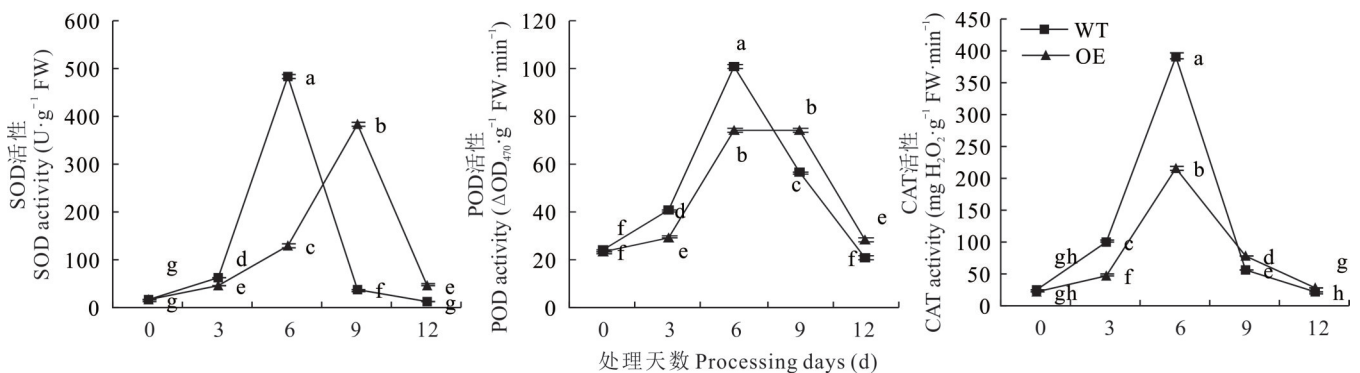


图9 干旱处理下SOD、POD和CAT活性

Fig. 9 Activities of SOD, POD and CAT under drought treatment

### 3 讨论

盐逆境通过影响植物体内的离子平衡、造成水分胁迫、增加活性氧自由基的产生、调节资源分配以及渗透调节等方式,产生大量的活性氧自由基伤害细胞膜,间接引发细胞失水,从而产生内部干旱胁迫<sup>[25-26]</sup>。这种交互作用使得植物在遭受盐胁迫时,也面临着干旱胁迫的挑战。盐生草作为西北盐碱地改良的代表植物之一,关于其形态特征及生理生化特性的研究已趋于完善,但对于相关抗旱基因的发掘尚显单调,新基因的挖掘工作仍存在着较

大的空白领域。通过转录组数据筛选盐生草 *HgS5* 基因,其在盐胁迫下基因表达量差异最大,为了进一步研究 *HgS5* 基因抵御干旱的能力,对其进行克隆,利用分子生物技术探究了盐生草的耐旱分子机制,并通过软件分析,初步了解其结构特征;其编码蛋白属于酸性、亲水性蛋白;相较于稳定的  $\alpha$ 螺旋和  $\beta$ 转角结构,分析其二级结构无规则卷曲占比最多,属于不稳定蛋白,且没有信号肽和跨膜区;亚细胞软件预测细胞核内无定位,烟草叶片亚细胞定位试验中,在激光共聚焦显微镜下观察到了明显的细胞膜定位,符合分析软件结果,预测 *HgS5* 基因在细胞膜具有清除活性氧自由基的可能性。

启动子逆境胁迫响应顺式作用元件通过与转录因子结合调控靶基因转录表达,植物体内渗透胁迫发生时,跨膜蛋白感受胁迫会氧化猝发双组分系统,  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{IP}_3$ (肌醇三磷酸 inositol 1,4,5-trisphosphate)和 CDPK(钙依赖性蛋白激酶 calcium-dependent protein kinase)会在 MAPK(丝裂原活化蛋白激酶 mitogen-activated protein kinase)信号通路收到脱落酸(abscisic acid, ABA)途径作用信号,进而引发相关抗逆基因的表达,如 MYB/MYC 的干旱响应调控途径<sup>[27]</sup>。目前在苜蓿(*Medicago sativa*)中 *MvDREB1* 基因存在启动子 DRE 元件,推测在干旱逆境中结合转录因子,影响下游基因表达<sup>[28]</sup>。系统进化树分析得出 *HgS5* 基因与巨人柱、苋菜和甜菜等抗旱植物的同源基因具有相同保守结构域 *A\_thal\_3526*,该结构尚未表征功能,初步推测参与抗旱性调控。*HgS5* 基因的保守结构域结合预测到的特异性干旱响应顺式元件 MYB,进一步说明 *HgS5* 基因在应对干旱胁迫中具有重要作用。

研究表明,植物抵御干旱的方法之一是调节自身形态变化<sup>[29]</sup>,其中根部的变化对其生长发育具有重大意义。陈倩等<sup>[30]</sup>通过对不同时间不同浓度盐胁迫下的盐生草叶片和根系进行检测发现,盐生草 *HgWRKYs* 家族的基因表达量会随着胁迫加深而随之变化。本研究采集了自然干旱胁迫下的盐生草叶片和根系,进行实时荧光定量 PCR 检测组织特异性表达,发现在不同时期(0、3、6、9、12 d),目的基因在根系中表达量均高于叶片,作为水分吸收最敏感的部位,植物的根部变化与干旱程度呈正相关,符合前人研究;处理第6天时达到显著差异水平( $P < 0.05$ ),表明此时 *HgS5* 基因在干旱条件下的调控作用尤为显著,并且在盐生草根部分发挥主要作用,具有组织特异性。这一发现进一步验证了 *HgS5* 基因能够增强植物抗旱能力,但具体作用机制仍需更深入研究。

干旱胁迫会诱发植物氧化应激反应,进而产生大量的活性氧(reactive oxygen species, ROS),次级代谢物主要清除 ROS,以保护植物细胞免受脂质过氧化影响,并在其他防御相关活动中发挥重要作用<sup>[31]</sup>。本试验遗传转化表明,  $T_2$ 代转基因拟南芥对比野生型拟南芥,表型萎蔫程度更轻,其抗旱性明显增强。在酶活性的研究中,植物的抗逆性体现在对于造成细胞氧化损伤的清除能力<sup>[32]</sup>,为消除因干旱在植物体内积累的大量自由基,植物会迅速提升3种关键酶的活性(SOD、CAT和POD)。但是,当胁迫条件变得更为严峻时,植物中的其他代谢过程将逐渐减弱,而这3种酶的活性也会随之下降,下降幅度变化略有差异<sup>[33]</sup>。在本研究中,随着干旱处理天数的增加,拟南芥根系中3种氧化还原酶活性均先增加后减少,符合前人研究结论<sup>[34-35]</sup>。使用PEG模拟干旱处理的后期,与野生型拟南芥相比,转基因拟南芥发芽率远高于前者,同时长出真叶的植株在遭受干旱胁迫时表现出了更低的受害程度;在SOD、CAT、POD活性变化中,OE整体变化时间晚于WT,且第12天三者含量均高于WT,说明初期OE受到干旱抑制的程度优于WT,后期OE酶活性更高,证明 *HgS5* 转基因拟南芥抗旱性增强;综上所述,说明 *HgS5* 基因能增强植物耐旱性,为盐生草根基因在抗旱研究方向提供了理论基础和事实依据。

#### 4 结论

本研究从盐生草盐胁迫转录组数据中筛选出候选 *HgS5* 基因,对其生物信息学进行初步分析得出:该编码蛋白为酸性亲水性蛋白,不存在跨膜区,存在38个磷酸化位点,亚细胞定位在细胞膜;系统发育树表明同源基因出现在巨人柱和苋菜等相关物种,具有相同保守结构域 *A\_thal\_3526*,初步推测该蛋白家族参与干旱胁迫;具特异性干旱响应顺式作用元件 MYB,初步推测 *HgS5* 基因具抗旱性功能。用qPCR验证候选基因的组织特异性,发现 *HgS5* 基因主要在根系表达;遗传转化拟南芥,并检测相关氧化还原酶活性,转基因拟南芥在处理后期酶活性均优于野生型。本研究初步探究了盐生草 *HgS5* 基因在干旱胁迫应答过程中的功能,可为进一步挖掘耐旱植物干旱响应功能基因提供理论基础。

**参考文献 References:**

- [1] Tian L X, Yang Y, Song Y H, *et al.* Rehydration under extreme drought conditions affected rhizosphere microorganisms more than bulk soil in broomcorn millet farmland. *Agricultural Water Management*, 2024, 295(1): 108781–108794.
- [2] Corwin D L. Climate change impacts on soil salinity in agricultural areas. *European Journal of Soil Science*, 2020, 72(2): 842–862.
- [3] Sun M, Peng F, Xiao Y, *et al.* Exogenous phosphatidylcholine treatment alleviates drought stress and maintains the integrity of root cell membranes in peach. *Scientia Horticulturae*, 2020, 259(6): 108821–108829.
- [4] Zhang H O. An analysis of the distribution and evolutionary characteristics of saline soils in China. *Agriculture and Technology*, 2022, 42(5): 104–107.
- [5] Yang S S, Gao J F. Influence of active oxygen and free radicals on plant senescence. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2001, 21(2): 36–41.  
杨淑慎, 高俊凤. 活性氧、自由基与植物的衰老. *西北植物学报*, 2001, 21(2): 36–41.
- [6] Zhang J, Mao C L, Khan A, *et al.* Enhanced methane production by using phytoremediated *Halogeton glomeratus* as substrate via anaerobic digestion. *Renewable Energy*, 2022, 194(1): 28–39.
- [7] Wang J C, Yang K, Yao L R, *et al.* Metabolomics analyses provide insights into nutritional value and abiotic stress tolerance in halophyte *Halogeton glomeratus*. *Frontiers in Plant Science*, 2021(12): 703255–703264.
- [8] Eggers E J, Burtg A, Heusden S, *et al.* Neofunctionalisation of the *Sli* gene leads to self-compatibility and facilitates precision breeding in potato. *Nature Communications*, 2021(12): 4141–4151.
- [9] Cheng Q, Gan Z, Wang Y, *et al.* The soybean gene *J* contributes to salt stress tolerance by up-regulating salt-responsive genes. *Frontiers in Plant Science*, 2020(11): 272–281.
- [10] Gálvez R L. The application of metabolomics for the study of cereal corn (*Zea mays* L.). *Metabolites*, 2020(10): 300–308.
- [11] Ren X M, Hu Z R, Jiang X Z, *et al.* Analysis of physiological characteristics and related gene expression in response to low-temperature stress in different tobacco varieties. *Molecular Plant Breeding*, 2024(1): 10–15.  
任晓敏, 户正荣, 姜习振, 等. 低温胁迫对不同烟草品种的生理特性及相关基因表达分析. *分子植物育种*, 2024(1): 10–15.
- [12] Wang Q, Tang J, Han B, *et al.* Advances in genome-wide association studies of complex traits in rice. *Theoretical and Applied Genetics*, 2020, 133(1): 1415–1425.
- [13] Zafar M M, Rehman A, Razaq A, *et al.* Genome-wide characterization and expression analysis of *Erf* gene family in cotton. *BMC Plant Biology*, 2022, 134(1): 22–43.
- [14] Patel J, Mishra A. Plant aquaporins alleviate drought tolerance in plants by modulating cellular biochemistry, root-architecture, and photosynthesis. *Physiologia Plantarum*, 2021, 172(2): 1030–1044.
- [15] Xu X L. Cloning of tonoplast and plasma membrane  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter gene and isolating of 5' flanking sequence of *HgNHX1* from *Halogeton glomeratus*. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2014.  
徐先良. 盐生草  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  逆向转运蛋白基因的克隆及 *HgNHX1* 基因 5' 端侧翼序列的分离. 兰州: 甘肃农业大学, 2014.
- [16] Zhang Y, Li B C, Hu Y L, *et al.* Functional verification of *HgNHX1* gene derived from *Halogeton glomeratus* in barley. *Journal of Triticeae Crops*, 2018, 38(8): 929–934.  
张燕, 李葆春, 胡有良, 等. 盐生草 *HgNHX1* 基因在大麦株系中的功能验证. *麦类作物学报*, 2018, 38(8): 929–934.
- [17] Zou L, Yang K, Xu X L, *et al.* Cloning and functional analysis of halophyte *Halogeton glomeratus* *HgNHX1* promoter. *Acta Prataculturae Sinica*, 2017, 26(11): 57–68.  
邹兰, 杨轲, 徐先良, 等. 盐生草 *HgNHX1* 基因启动子的克隆及功能验证. *草业学报*, 2017, 26(11): 57–68.
- [18] Ma Y H, Xu X L, Wang J C, *et al.* Cloning and expression analysis of *Actin* gene fragment from halophyte *Halogeton glomeratus*. *Pratacultural Science*, 2015, 32(9): 1432–1437.  
马艳红, 徐先良, 汪军成, 等. 盐生草 *Actin* 基因片段的克隆及表达. *草业科学*, 2015, 32(9): 1432–1437.
- [19] Hu S Q, Wang J C, Yao L R, *et al.* Cloning and preliminary functional analysis of the root gene *HgAKR6C* of *Halogeton glomeratus*. *Acta Prataculturae Sinica*, 2024, 33(1): 61–74.  
胡尚钦, 汪军成, 姚立蓉, 等. 盐生草根基因 *HgAKR6C* 的克隆与初步功能分析. *草业学报*, 2024, 33(1): 61–74.
- [20] Wang J C, Li B C, Meng Y X, *et al.* Transcriptomic profiling of the salt-stress response in the halophyte *Halogeton glomeratus*. *BMC Genomics*, 2015, 16(1): 169.
- [21] Wang J C, Wang H J, Yao L R, *et al.* Salt-tolerant gene *HgS3* of *Halogeton glomeratus* and its application: CN107287212B.

- 2020-10-30.  
汪军成, 王化俊, 姚立蓉, 等. 盐生草耐盐基因 *HgS3* 及其应用: CN107287212B. 2020-10-30.
- [22] Zhou M. Effects of exogenous calcium on physiological characteristics of *Rhododendron ovatum* Planch seed germination under drought stress. *Beijing Agriculture*, 2014(21): 11–12.  
周敏. 干旱胁迫下外源钙对马缨杜鹃种子萌发生理特性的影响. *北京农业*, 2014(21): 11–12.
- [23] Ma J W, Ma Z K, Yao L R, *et al.* Regulating effect of exogenous melatonin on root growth of barley seedling under phosphorus stress. *Journal of Triticeae Crops*, 2023, 43(8): 1020–1028.  
马静玮, 马增科, 姚立蓉, 等. 低磷胁迫下外源褪黑素对大麦幼苗根系发育的调控作用. *麦类作物学报*, 2023, 43(8): 1020–1028.
- [24] Yao H. Cloning of DFR, FLS promoters and RNAi vector construction of *LYCE* and *LYCB* in *Narcissus tazetta* var. *chinensis*. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2024.  
姚红. 中国水仙DFR和FLS启动子克隆及LYCE和LYCB RNAi表达载体的构建. 福州: 福建农林大学, 2024.
- [25] Li G, Bai Y, Jia Z Y, *et al.* Phosphorus altered the response of ionomics and metabolomics to drought stress in wheat seedlings. *Scientia Agricultural Sinica*, 2022, 55(2): 280–294.  
李刚, 白阳, 贾子颖, 等. 两种磷素水平下小麦苗期对干旱胁迫的离子组和代谢组响应. *中国农业科学*, 2022, 55(2): 280–294.
- [26] Zeng F L, Li Y F. Generation of active oxygen free radicals and its injury to microsome membranes in wheat leaves under drought stress. *Chinese Bulletin of Botany*, 1997, 39(12): 1105–1109.  
曾福礼, 李玉峰. 干旱胁迫下小麦叶片微粒体活性氧自由基的产生及其对膜的伤害. *植物学报*, 1997, 39(12): 1105–1109.
- [27] Li D, Peng S, Chen S, *et al.* Identification and characterization of 5 walnut MYB genes in response to drought stress involved in ABA signaling. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 2021, 27(6): 1323–1335.
- [28] Yang Y Y, Ren Y P, Su Y M, *et al.* Cloning and analysis of two promoters of stress-related genes in *Medicago varia* Xinmu-1. *Pratacultural Science*, 2012, 29(12): 1887–1893.  
杨云尧, 任燕萍, 苏豫梅, 等. 新牧1号苜蓿两个抗逆相关基因启动子的克隆及分析. *草业科学*, 2012, 29(12): 1887–1893.
- [29] Wang K, Nan L L, Guo Q E, *et al.* Effects of drought stress on root architecture of different root-type alfalfa. *Acta Ecologica Sinica*, 2022, 42(20): 8365–8373.  
汪堃, 南丽丽, 郭全恩, 等. 干旱胁迫对不同根型苜蓿根系构型的影响. *生态学报*, 2022, 42(20): 8365–8373.
- [30] Chen Q, Xu X Y, Wang J C, *et al.* Identification of a WRKY gene family based on full-length transcriptome sequences and analysis of response patterns under salt stress in *Halogeton glomeratus*. *Acta Prataculturae Sinica*, 2022, 31(12): 146–157.  
陈倩, 徐晓芸, 汪军成, 等. 基于全长转录组的盐生草WRKY基因家族的鉴定及其盐胁迫响应模式分析. *草业学报*, 2022, 31(12): 146–157.
- [31] Wu Y H, Liu W H, Liu K Q, *et al.* Effects of drought stress on leaf senescence and the active oxygen scavenging system of oat seedlings. *Acta Prataculturae Sinica*, 2022, 31(10): 75–86.  
吴雨涵, 刘文辉, 刘凯强, 等. 干旱胁迫对燕麦幼苗叶片光合特性及活性氧清除系统的影响. *草业学报*, 2022, 31(10): 75–86.
- [32] Bogati K, Walczak M. The impact of drought stress on soil microbial community, enzyme activities and plants. *Agronomy*, 2022(12): 189–199.
- [33] Wang W B, Kim Y H, Lee H S, *et al.* Analysis of antioxidant enzyme activity during germination of alfalfa under salt and drought stresses. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2009, 47(7): 570–577.
- [34] Han G, Dang Q, Zhao Z, *et al.* Responses of antioxidation protective system of *Caragana korshinskii* Kom. to drought stress. *Acta Agrestia Sinica*, 2010, 18(4): 528–532.  
韩刚, 党青, 赵忠, 等. 柠条抗氧化保护系统对干旱胁迫的响应. *草地学报*, 2010, 18(4): 528–532.
- [35] Jia H T, Hu X J, Qiu F T, *et al.* The effects of compound anti-drought seed soaking agent and seed coating agent on SOD, POD and CAT isozyme expression in wheat seedlings. *Journal of Triticeae Crops*, 2016, 36(5): 647–652.  
贾洪涛, 胡晓君, 邱奉同, 等. 小麦专用复方抗旱型浸种剂和包衣剂对小麦幼苗SOD、POD和CAT同工酶表达的影响. *麦类作物学报*, 2016, 36(5): 647–652.