



DELLA 蛋白缺失对拟南芥 干旱胁迫耐受性的影响

王 玮¹, 冯 起², 张莉环¹, 杨 宁^{1*}

(1 西北师范大学 生命科学学院, 兰州 730070; 2 中国科学院 西北生态环境资源研究院, 内陆河流域生态水文重点实验室, 兰州 730000)

摘 要: 为探索 DELLA 蛋白缺失对拟南芥耐旱能力的影响, 对拟南芥野生型 *Ler* 和 DELLA 蛋白缺失突变体 *della* 进行干旱处理, 测定存活率、萌发率、离体叶片的失水率、脯氨酸、可溶性糖和丙二醛含量, 并对发挥植物细胞脱水保护功能的胚胎晚期丰富蛋白编码基因 *LEA* 和 ABA 应答基因 *LOX3*、*COR15b*、*COR413* 的表达量进行了检测。结果表明: (1) 干旱 21 d 后复水, *della* 突变体的存活率明显高于野生型 *Ler*; (2) *della* 突变体在含甘露醇的固体培养基上的萌发率显著高于 *Ler*; (3) *della* 突变体离体叶片的失水速率明显低于 *Ler*; (4) 干旱胁迫后, *della* 突变体脯氨酸、可溶性糖和丙二醛含量的积累低于 *Ler*; (5) 干旱胁迫后, *della* 突变体的 *LEA* 基因上调表达程度高于 *Ler*, 而 ABA 应答基因上调表达程度低于 *Ler*。研究表明, DELLA 蛋白的缺失有助于提高植物抗旱能力。

关键词: DELLA 蛋白; 干旱胁迫; 赤霉素; 脱落酸

中图分类号: Q789 **文献标志码:** A

Drought Tolerance of DELLA Proteins Deficiency in *Arabidopsis*

WANG Wei¹, FENG Qi², ZHANG Lihuan¹, YANG Ning^{1*}

(1 College of Life Science, Northwest Normal University, Lanzhou 730070, China; 2 Key Laboratory of Ecohydrology in Inland River Basin, Northwest Institute of Eco-Environment and Resources, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China)

Abstract: To explore the effects of DELLA protein deficiency on drought tolerance in *Arabidopsis*, we treated DELLA proteins deficient mutant *della* by drought stress. The survival rate, germination rate, water loss rate, and contents of proline, soluble sugar, and malondialdehyde were measured. Meanwhile, the gene expression patterns of the late embryogenesis abundant protein coding genes *LEAs*, which play important roles in dehydration protection of plant cell, and ABA responsive genes, such as *LOX3*, *COR15b*, and *COR413*, were investigated by qPCR. The results showed that: (1) after 21 days of drought stress and re-watering treatment, the survival rate of *della* mutant was significantly higher than that of wild type *Ler*; (2) the germination rate of *della* mutant was markedly higher than that of *Ler* on 1/2 MS with mannitol; (3) the water loss speed of leaves detached from *della* mutant was distinctly slower than that of *Ler*; (4) the contents of proline, soluble sugar, and malondialdehyde in *della* mutant were lower than that of *Ler*; (5) the up-regulated expression of *LEA* genes in *della* mutant was higher than that of *Ler*, while the up-regulated expression of ABA responsive genes was lower. These results suggest that the deficiency of DELLA proteins improves the drought resistance in *Arabidopsis*.

收稿日期: 2018-01-15; 修改稿收到日期: 2018-04-10

基金项目: 国家自然科学基金(31660116); 甘肃省自然科学基金(1606RJYA243); 中国科学院内陆河流域生态水文重点实验室开放基金(KLEIRB-ZS-16-04); 西北师范大学青年教师科研基金(NWNU-LKQN-15-14)

作者简介: 王 玮(1983—), 女, 博士, 讲师, 主要从事植物激素信号转导研究。E-mail: wangwei5020@126.com

* 通信作者: 杨 宁, 博士, 教授, 主要从事植物细胞生物学和逆境生理生态学研究。E-mail: xbsd-yn@163.com

Key words: DELLA protein; drought tolerance; gibberellin; ABA

赤霉素(gibberellins, GAs)属四环二萜类化合物,作用于植物整个生命周期,调节和控制着高等植物生长发育、分化开花和繁殖的不同过程^[1-4],是一类生长促进类植物激素。在拟南芥的赤霉素信号转导通路中,GA 与受体 GID(gibberellin insensitive dwarf)和 DELLA 蛋白结合,在去磷酸酶 TOPP4 和 E3 泛素连接酶 SLY1(sleepy1)作用下将 DELLA 去磷酸化并泛素化,随后进入降解途径降解,从而解除 DELLA 蛋白对 GA 应答基因的阻遏作用,启动应答基因表达^[5-7]。因此 DELLA 蛋白作为转录抑制因子,在赤霉素信号传导途径发挥着重要的负调控作用。

赤霉素在干旱胁迫方面的作用机制研究还比较少^[8],赤霉素作为植物体内促进发育的激素之一,其含量在水分缺失条件下的降低,是植物为了应对干旱而降低生长速率所进行的适应策略,并且赤霉素与脱落酸具有拮抗作用,因此植物在干旱胁迫下赤霉素应该被负调控^[8-9]。一系列研究表明,冷、盐、干旱等非生物胁迫通过 DREB1/CBF 家族(dehydration-responsive element binding protein/c-repeat binding factor)转录因子上调 GA 代谢酶 GA2ox(gibberellin 2-oxidase)基因表达,降低有生物活性的 GA 的含量,促进 DELLA 蛋白积累,抑制植物生长,从而提高植物对逆境胁迫的耐受能力^[8, 10-11]。在土豆中过表达拟南芥赤霉素甲基转移酶基因,虽然降低了土豆中赤霉素的活性,但增加了植株对干旱的胁迫耐受能力^[12]。干旱胁迫下,外源施加 GA 降低了拟南芥的耐受能力,提高了植株死亡率^[13]。与此一致的是,在拟南芥中过表达 GA 合成酶基因,植株表现出 GA 过量的表型,同样降低了拟南芥对干旱胁迫的耐受能力;相反,GA 合成酶基因缺失突变体却提高了其在干旱胁迫下的存活能力^[8]。然而,拟南芥 *spy*,一个表现出赤霉素过量表型的赤霉素负调控因子 SPINDLY 蛋白缺失突变体,却表现出对高盐和干旱较强的耐受能力^[13],这一发现使得赤霉素相关突变体在干旱胁迫中的抗逆机制值得进一步研究。

本研究以表现出 GA 过量表型的拟南芥 DELLA 蛋白五缺突变体 *gai-t6 rga-t2 rga1-1 rga2-1 rga3-1*(简称 *della*)为研究对象,观察其在干旱胁迫下的存活率、失水率、萌发率等表型,检测脯氨酸、可溶性糖和丙二醛含量等生理指标,对发挥植物细胞

脱水保护功能的胚胎晚期丰富蛋白编码基因 *LEA* (late embryogenesis abundant protein)和 ABA(abscisic acid)应答基因表达水平进行了定量分析,初步确定 *della* 突变体抗旱能力提高的表型及原因,为后期深入研究 *della* 突变体抗逆机制和选育抗旱植物的新方向奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

本实验所用拟南芥野生型 *Ler* (Landsberg *erecta*, CS20)和 *della* 突变体(CS16298)均订购于 Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC)。种子用 0.1% HgCl₂ 表面消毒 5~8 min,然后用无菌水冲洗 6~8 次,点播于 1/2 MS 固体培养基(MS 盐+1%蔗糖+0.8%琼脂, pH 5.8)上。在 4℃ 条件下春化 3 d,放于培养间培养,光周期为 16 h 光照/8 h 黑暗,温度 22℃,光照强度 300 μmol·m⁻²·s⁻¹,相对湿度 80%。

1.2 方法

1.2.1 生存率 参考 Qin 等的方法^[13],分 3 个生物学平行,每个平行的 *Ler* 和 *della* 种植到同一个花盆中,正常生长 14 d 后停止浇水,干旱胁迫 21 d 后重新浇水,复水 7 d 后统计 2 种实生苗的生存率。

1.2.2 萌发率 参考 Xu 等的方法^[14],*Ler* 和 *della* 种植到分别含 0、200 mmol/L 甘露醇的 1/2 MS 固体培养基中,春化后每 24 h 统计一次萌发率,连续统计 7 d。实验分 3 个重复进行,每个平行 100 颗种子。

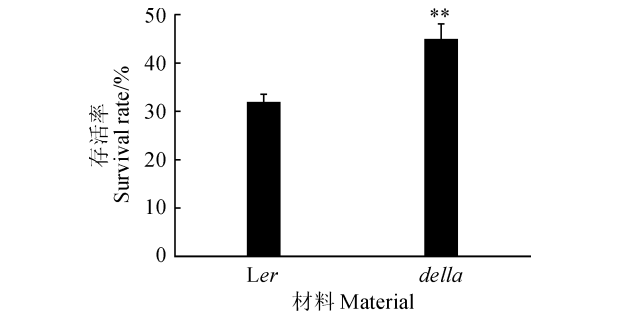
1.2.3 叶片失水率 参考 Qin 等的方法^[13],摘取土壤中生长 14 d 的 *Ler* 和 *della* 幼苗绿色组织,随机分成 3 个生物学重复,置于 22℃ 环境下的无盖培养皿中自然风干,分别在 0、10、20、30、40、60、90、120、150、180 min 时间点测量材料重量。叶片失水率=[(鲜重-风干后重量)/鲜重]×100%。

1.2.4 生理指标检测 干旱胁迫按照 1.2.1 的方法处理,分别于第 3、6、9、12、15 d 取样并分为 3 个重复。脯氨酸、可溶性糖、丙二醛含量检测按照试剂盒说明书进行。

1.2.5 基因定量表达分析 干旱胁迫按照 1.2.2 的方法处理,0.1 g 植物材料用 Trozol 法提取总 RNA,1 μg 总 RNA 按照 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)说明书方法去除基因组 DNA 并反转录。荧光定量 PCR 加

表 1 本研究所用到的引物
Table 1 All primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 Sequence (5'→3')	参考文献 Reference
At2g03850F	CCGACAGCCGTCAAAGGT	[10]
At2g03850R	GCATCATCGAGCCATTTGG	[10]
At2g36640F	GAAGGCGTCGGATCAAATGA	[10]
At2g36640R	TCATCCATCCGTCCAACGT	[10]
At3g17520F	GGTTTGGTTATGGTATCTTTGGTACTT	[10]
At3g17520R	CGATCGTAGCTTGACACAACA	[10]
LOX3-F	TGCCGATCTAATTTCGCAGAG	[12]
LOX3-R	GTTCGGGTTTGATAGTAGC	[12]
COR15b-F	AAAGTGACGGCAACATCCTC	[12]
COR15b-R	CTCAGTCGCAGTTTCATTGG	[12]
COR413-F	GTGGAGAAGCGGCGAAAGAG	[12]
COR413-R	GGTGCGTGGAGAGCGAATAG	[12]
GAPC-F	ACCACACGGGAAGTGTAAACC	[7]
GAPC-R	GGCTATCAAGGAGGAATCCG	[7]



** 表示 0.01 显著性水平,下同

图 1 干旱胁迫对 Ler 和 della 存活率的影响

** indicate significant differences $P < 0.01$, the same as below

Fig.1 The effect of drought stress on survival rate of Ler and della mutant

样体系与仪器程序参考 SYBR Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus)说明书。每一个基因的相对表达量通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算,用 GAPC 作为内参基因。数据至少 3 次生物学重复。荧光定量 PCR 所需的引物如表 1 所示。

2 结果与分析

2.1 干旱胁迫对 Ler 和 della 生长的影响

为比较 Ler 和 della 在相同干旱胁迫下生长状态的差异,2 种拟南芥种植在同一个花盆中,以确保干旱处理条件的一致性。经 21 d 干旱胁迫后,野生型和突变体都表现出多数叶片干枯萎蔫的胁迫症状,但突变体的叶片颜色较绿。复水 7 d 后,统计 Ler 的生存率约为 31.7%,而 della 的生存率约为 44.9%,显著高于野生型对照(图 1)。结果说明表

现出生长快、开花早等 GA 过量表型的 della 突变体耐受干旱胁迫的能力比野生型强。

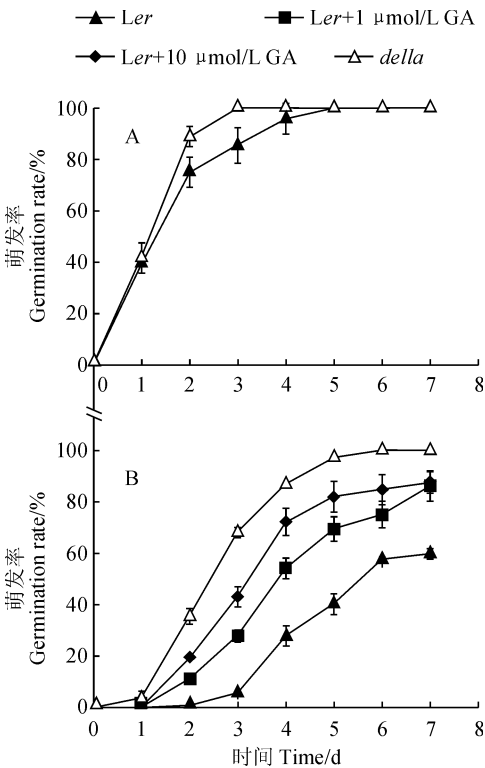
萌发率结果如图 2 所示,正常生长条件下,della 的萌发率略高于野生型,在第 3 天即可达到 100%萌发,而 Ler 在第 3 天的萌发率约为 85.4%,在第 5 天才能够 100%萌发。200 mmol/L 甘露醇模拟干旱胁迫时,野生型 Ler 和突变体 della 的萌发率都受到明显影响,但 della 的萌发率显著高于野生型,并且在第 6 天完全萌发,此时 Ler 的萌发率仅为 57.6%。外源施加 GA 能够增加野生型植株在甘露醇胁迫下的萌发率,但仍无法达到 della 萌发率水平。这些结果表明 della 突变体耐受渗透胁迫的能力比野生型强,并且萌发能力提高的表型特征可能不完全是 GA 信号通路持续激活引起的。

2.2 干旱胁迫对 Ler 和 della 叶片失水率的影响

野生型和突变体离体叶片的失水速度的检测结果如图 3 所示,随着干旱处理时间的增加,2 种植物失水率都逐渐增大,但 della 的失水速度显著低于野生型,处理 180 min 后,della 的失水率达到 44.9%,而 Ler 的失水率则高达 54.2%。说明较低的植株失水速度是 della 突变体较野生型耐旱的原因之一。

2.3 干旱胁迫对 Ler 和 della 脯氨酸、可溶性糖和丙二醛含量的影响

对 Ler 和 della 的脯氨酸和可溶性糖含量检测结果显示,正常生长条件下,与 Ler 相比 della 的脯氨酸和可溶性糖含量没有显著性差异,干旱胁迫后



A. 对照,正常水分供应;B. 200 mmol/L 甘露醇模拟干旱胁迫
图 2 干旱胁迫对 *Ler* 和 *della* 萌发率的影响
A. Control; B. 200 mmol/L Mannitol
Fig. 2 The effect of drought stress on germination rate of *Ler* and *della* mutant

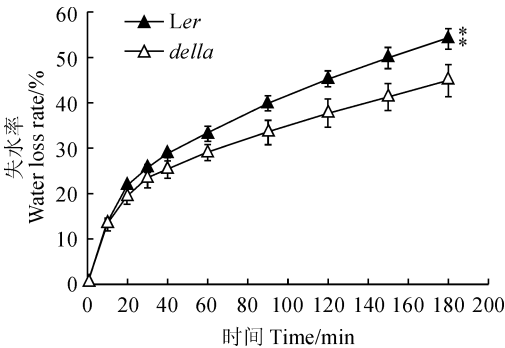
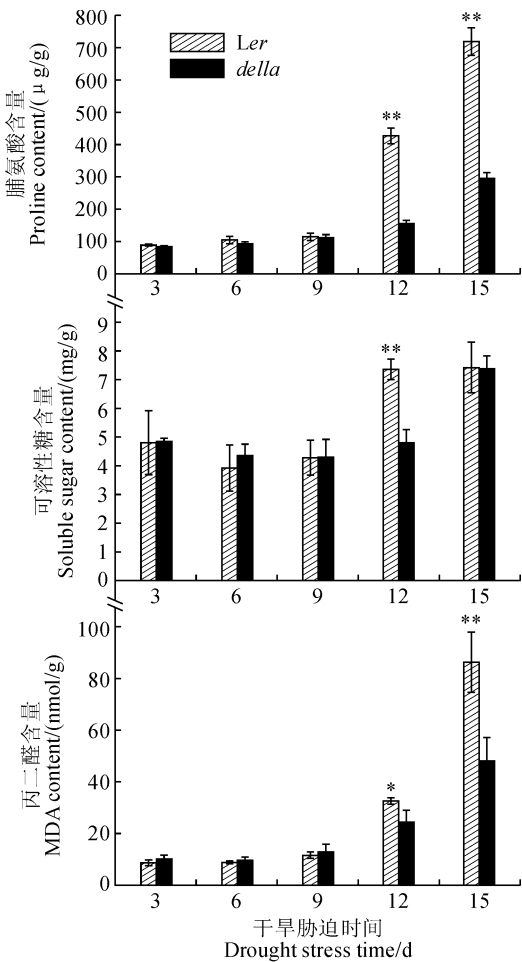


图 3 *Ler* 和 *della* 离体叶片失水率
Fig. 3 The water loss rate of leaves detached from *Ler* and *della* mutant

della 的脯氨酸和可溶性糖含量升高的速率比 *Ler* 慢(图 4) 这些结果表明在相同干旱处理条件下, *della* 突变体受到的胁迫程度较低,同时也说明渗透调节物质含量和变化速率并不是 *della* 突变体较 *Ler* 耐旱的原因。

丙二醛是植物膜脂过氧化的产物之一,其含量反映了植物胁迫后的氧化损伤程度。图 4 结果所示,干旱胁迫后 *della* 的丙二醛含量升高的速率比 *Ler* 慢,同样说明 *della* 突变体胁迫后受到的氧化损



* 表示 0.05 水平显著性,下同
图 4 干旱胁迫对 *Ler* 和 *della* 物质含量的影响
* indicates significant differences $P < 0.05$, the same as below
Fig. 4 The effect of drought stress on material contents of *Ler* and *della* mutant

伤程度较低。

2.4 干旱胁迫下 LEA 基因的表达模式

在拟南芥赤霉素负调控因子 SPINDLY 蛋白缺失突变体 *spy* 中, 3 个 *LEA* 基因 (*At2g03850*、*At2g36640* 和 *At3g17520*) 的高表达可能是其对于干旱胁迫耐受的原因^[13], 为检测这 3 个 *LEA* 基因在 *Ler* 和 *della* 突变体中的表达模式, 利用 qRT-PCR 检测 *At2g03850*、*At2g36640* 和 *At3g17520* mRNA 的干旱诱导表达水平。结果如图 5 所示, 干旱胁迫后, 除 *AT2g36640* 基因在 *Ler* 和 *della* 表达模式相似以外, *At2g03850* 和 *At3g17520* 基因在 *della* 中的上调表达变化倍数均高于 *Ler*, 这说明较高的 *LEA* 基因上调表达倍数可能是导致 *della* 突变体较野生型耐旱的另一个原因。

2.5 干旱胁迫下 ABA 应答基因的表达模式

干旱条件下, ABA 通过调节气孔关闭降低蒸腾

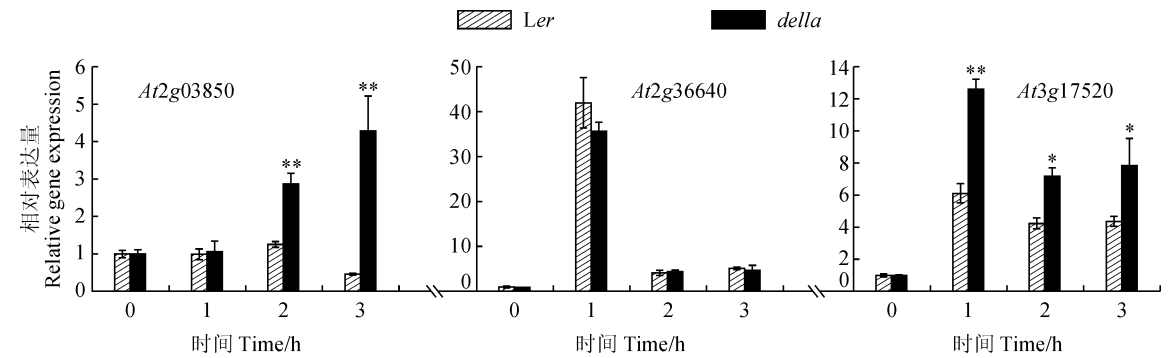


图 5 *At2g03850*、*At2g36640* 和 *At3g17520* 基因表达模式
Fig. 5 Gene expression patterns of *At2g03850*, *At2g36640*, and *At3g17520*

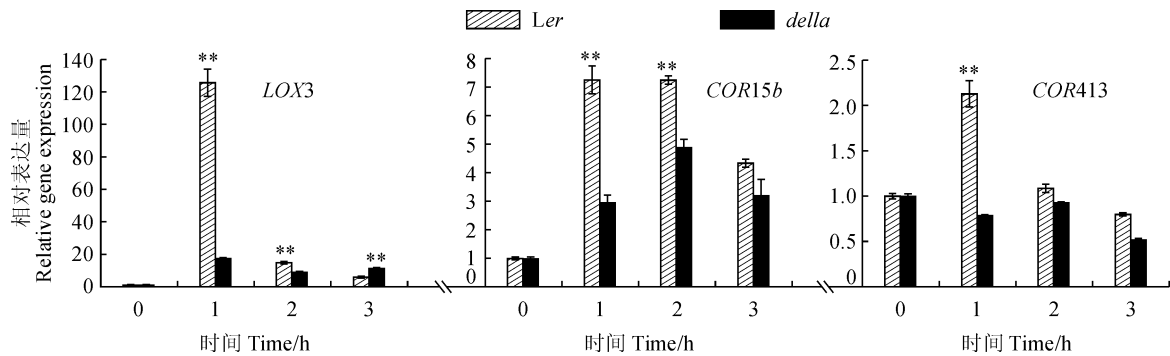


图 6 *LOX3*、*COR15b* 和 *COR413* 基因表达模式
Fig. 6 Gene expression patterns of *LOX3*, *COR15b*, and *COR413*

作用防止水分丢失、诱导抗逆相关基因表达,从而增强植物的抗旱能力^[15]。为检测 *della* 突变体抗旱能力较强的表型是否由于 ABA 信号应答引起的,对 *LOX3*、*COR15b* 和 *COR413* 等 3 个 ABA 应答基因的表达量进行检测。结果表明(图 6),干旱胁迫后,这 3 个 ABA 应答基因在 *della* 中的上调表达程度均低于野生型。尤其是 *LOX3* 基因在 *Ler* 中干旱胁迫 1 h 后表达量升高了约 125 倍,而在 *della* 突变体中仅升高了约 17 倍。这些结果表明,*della* 突变体中 ABA 信号并没有过度激活,较之野生型在干旱胁迫后的表现反而受到了抑制。

3 讨 论

植物激素是一类小分子化合物,调控了植物生长和发育以及对环境变化的响应。通过改变激素的合成、运输和信号转导,植物能够调节生长与胁迫耐受的平衡,促进植物在胁迫环境中生存。作为生长促进类激素,在低温、高盐和干旱胁迫下,赤霉素的含量和信号转导会降低来抑制植物生长抵抗逆境;相反,在树荫和水淹环境下,赤霉素的含量和信号转导又会增强来促进植物生长从而逃离不利环境^[8]。越来越多的证据表明,GA 缺陷虽然植株矮化但增

加了其对胁迫的耐受能力^[8, 10-12, 16]。然而,表现出 GA 过量表型的 *spy* 突变体通过降低在干旱胁迫下的失水速率、诱导 *LEA* 基因和 *CKX* 基因表达,提高了植物对高盐和干旱胁迫的耐受性,推测可能是由于 SPINDLY 蛋白与其他蛋白(而不是 DELLA 蛋白)相互作用参与了胁迫应答,因为外源施加 GA 降解 DELLA 后,拟南芥对干旱胁迫不耐受^[13]。在本研究中,同样具有 GA 过量表型的拟南芥 *DELLA* 蛋白五突变体也表现出对干旱胁迫有较高的耐受能力,并且这种耐受能力并不是脯氨酸、可溶性糖等小分子渗透调节物质含量高导致的,而是由于在干旱胁迫后,*della* 突变体叶片失水速度较野生型慢以及 *LEA* 基因表达量上调程度较高引起的。这一结果与在 *spy* 突变体中观察到的结果一致,说明单纯的 DELLA 蛋白失活能够提高植物胁迫耐受能力,只是这种失活不能是由于 GA 水平升高引起,可能存在其他机制。

ABA 通过正调控 SnRK2s (sucrose non-fermenting1-related protein kinases 2) 促进气孔关闭减少植物在干旱胁迫下的水分丢失^[15, 17], Lin 等^[9]的研究发现 GA 能够降低 SnRK2 活性拮抗 ABA 信号通路。干旱胁迫后的 *della* 突变体中,因 GA

信号持续激活,ABA 应答基因的上调表达的程度低于野生型,这一结果说明 *della* 突变体干旱胁迫下失水率较低的表型并不是 ABA 含量升高引起的,也存在着其他原因(图 7)。但另一方面该结果解释了 *della* 突变体在甘露醇胁迫下萌发率较快的原因可能由于 ABA 应答程度较低引起的。

本研究发现 DELLA 蛋白缺失植物表现出干旱胁迫耐受的表型,这种表型的产生是由于 *della* 突变体在干旱胁迫后失水速率低、*LEA* 基因诱导上调表达程度高引起的。但是通过提高 GA 水平降解 DELLA 蛋白反而降低了植物对干旱胁迫的耐受,说明 DELLA 蛋白在植物平衡生长发育和胁迫应答的功能方面仍待进一步研究。这个发现改变了以往

GA 过量表型突变体对干旱胁迫耐受程度低的认识,为深入研究 DELLA 蛋白功能及其在干旱胁迫下 GA 与 ABA 拮抗响应中的作用铺垫了基础,也为筛选抗旱植物提供了新的思路。

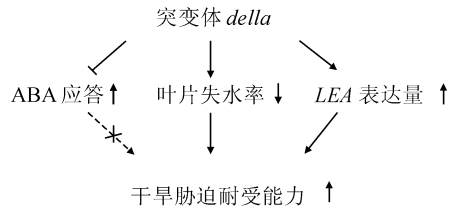


图 7 *della* 突变体增强干旱胁迫耐受性的模式图
Fig. 7 A model showing the *della* enhancing drought tolerance

参考文献:

[1] PISKUREWICZ U, JIKUMARU Y, KINOSHITA N, *et al.* The gibberellic acid signaling repressor RGL2 inhibits *Arabidopsis* seed germination by stimulating abscisic acid synthesis and ABI5 activity[J]. *Plant Cell*, 2008, **20**(10): 2 729-2 745.

[2] ACHARD P, GUSTI A, CHEMINANT S, *et al.* Gibberellin signaling controls cell proliferation rate in *Arabidopsis* [J]. *Current Biology*, 2009, **19**(14): 1 188-1 193.

[3] PLACKETT A R, THOMAS S G, WILSON Z A, *et al.* Gibberellin control of stamen development: a fertile field [J]. *Trends in Plant Science*, 2011, **16**(10): 568-578.

[4] TURNBULL C. Long-distance regulation of flowering time [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2011, **62**(13): 4 399-4 413.

[5] OLSZEWSKI N, SUN T P, GUBLER F. Gibberellin signaling: biosynthesis, catabolism, and response pathways [J]. *Plant Cell*, 2002, 14 Suppl: S61-80.

[6] CAO D, CHENG H, WU W, *et al.* Gibberellin mobilizes distinct DELLA-dependent transcriptomes to regulate seed germination and floral development in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2006, **142**(2): 509-525.

[7] WANG W, ZHANG J, QIN Q, *et al.* The six conserved serine/threonine sites of REPRESSOR OF *ga1-3* protein are important for its functionality and stability in gibberellin signaling in *Arabidopsis* [J]. *Planta*, 2014, **240**(4): 763-779.

[8] COLEBROOK E H, THOMAS S G, PHILLIPS A L, *et al.* The role of gibberellin signalling in plant responses to abiotic stress [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2014, **217**(Pt 1): 67-75.

[9] LIN Q, WU F, SHENG P, *et al.* The SnRK2-APC/C(TE) regulatory module mediates the antagonistic action of gibberellic acid and abscisic acid pathways [J]. *Nature Communications*, 2015, **6**: 7 981.

[10] ACHARD P, CHENG H, DE GRAUWE L, *et al.* Integra-

tion of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals [J]. *Science*, 2006, **311**(5 757): 91-94.

[11] ACHARD P, GONG F, CHEMINANT S, *et al.* The cold-inducible CBF1 factor-dependent signaling pathway modulates the accumulation of the growth-repressing DELLA proteins via its effect on gibberellin metabolism [J]. *Plant Cell*, 2008, **20**(8): 2 117-2 129.

[12] NIR I, MOSHELION M, WEISS D. The *Arabidopsis* gibberellin methyl transferase 1 suppresses gibberellin activity, reduces whole-plant transpiration and promotes drought tolerance in transgenic tomato [J]. *Plant Cell and Environment*, 2014, **37**(1): 113-123.

[13] QIN F, KODAIRA K S, MARUYAMA K, *et al.* SPINDLY, a negative regulator of gibberellic acid signaling, is involved in the plant abiotic stress response [J]. *Plant Physiology*, 2011, **157**(4): 1 900-1 913.

[14] XU J, XING X J, TIAN Y S, *et al.* Transgenic *Arabidopsis* plants expressing tomato glutathione S-transferase showed enhanced resistance to salt and drought stress [J]. *PLoS One*, 2015, **10**(9): e0136960.

[15] PANTIN F, MONNET F, JANNAUD D, *et al.* The dual effect of abscisic acid on stomata [J]. *New Phytologist*, 2013, **197**(1): 65-72.

[16] CLAEYS H, SKIRYCZ A, MALEUX K, *et al.* DELLA signaling mediates stress-induced cell differentiation in *Arabidopsis* leaves through modulation of anaphase-promoting complex/cyclosome activity [J]. *Plant Physiology*, 2012, **159**(2): 739-747.

[17] ACHARYA B R, JEON B W, ZHANG W, *et al.* Open Stomata 1 (OST1) is limiting in abscisic acid responses of *Arabidopsis* guard cells [J]. *New Phytologist*, 2013, **200**(4): 1 049-1 063.

(编辑:宋亚珍)