



# 大豆 ABA 信号途径 *GmCDPK SK5* 基因异源表达探究

胡慧敏<sup>1</sup>, 蔡婉茵<sup>1</sup>, 穆可彬<sup>1</sup>, 王 爽<sup>2</sup>, 麻 浩<sup>1</sup>

(1. 南京农业大学 农学院/作物遗传与种质创新国家重点实验室, 江苏 南京 210095; 2. 廊坊师范学院 生命科学院, 河北 廊坊 065000)

**摘 要:**为探究大豆 CDPK 家族成员 *GmCDPK SK5* 参与防御逆境胁迫的途径, 本研究分析外源 ABA 作用不同时间对大豆中 *GmCDPK SK5* 基因表达量的影响, 克隆基因上游启动子序列并分析其顺式作用元件, 构建 *GmCDPK SK5pro::GUS* 融合植物表达载体, 转化烟草和拟南芥, 并通过 GUS 组织化学染色和定量表达分析方法研究 *GmCDPK SK5* 启动子对外源施加的  $\text{Ca}^{2+}$  和 ABA 的响应。结果显示: 施加外源 ABA 能够诱导 *GmCDPK SK5* 基因下调表达。启动子顺式作用元件分析表明该启动子含有 3 个 TATA 盒和 23 个 CAAT 盒基本转录元件和多种与胁迫相关的顺式作用元件。烟草瞬时表达系统中,  $\text{Ca}^{2+}$  浓度增加, GUS 酶活性增加, 在  $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Ca}^{2+}$  条件下, 处理组中 GUS 酶活性是对照的 2.1 倍; ABA 浓度增加, GUS 酶活性减弱, 在  $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  ABA 条件下, 对照组中的 GUS 酶活性是处理的 5 倍; ABA 能诱导 *GmCDPK SK5* 基因下调表达。在拟南芥中, 与 WT 和 *cpk4-1* 突变体株系相比, 在外源施加 ABA 的条件下, *GmCDPK SK5* 过表达株系在种子萌发、幼苗生长和气孔运动等方面表现得最敏感。3 个株系中与 ABA 相关的基因 *ABF2*、*ABF4*、*ABI5*、*RD29A*、*RAB18* 和 *KIN1* 差异表达。结果说明 *GmCDPK SK5* 启动子对外源施加的  $\text{Ca}^{2+}$  和 ABA 有响应, 且 *GmCDPK SK5* 通过影响与响应 ABA 相关基因的表达来增强植株对 ABA 的敏感性。

**关键词:**大豆; *GmCDPK SK5*; 启动子; GUS 染色; ABA;  $\text{Ca}^{2+}$ ; 气孔运动

## Study on the Heterologous Expression of *GMCDPK SK5* Gene in Soybean ABA Signaling Pathway

HU Hui-min<sup>1</sup>, CAI Wan-han<sup>1</sup>, MU Ke-bin<sup>1</sup>, WANG Shuang<sup>2</sup>, MA Hao<sup>1</sup>

(1. Agricultural College, Nanjing Agricultural University/State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing 210095, China; 2. College of Life Sciences, Langfang Normal University, Langfang 065000, China)

**Abstract:** In order to explore the ways of CDPK family member *GmCDPK SK5* participating in the defense against adversity stress, in this study, the promoter sequence of *GmCDPK SK5* gene was cloned, and the *GmCDPK SK5pro::GUS* fusion plant expression vector was constructed to transform tobacco and *Arabidopsis*. The results showed that the application of exogenous ABA induced down-regulation of *GmCDPK SK5* gene expression. Analysis of promoter *cis*-acting elements showed that the promoter contains 3 TATA boxes and 23 CAAT boxes basic transcription elements and a variety of *cis*-acting elements related to stress. GUS histochemical staining and quantitative expression analysis were used to study the response of *GmCDPK SK5* promoter to exogenous  $\text{Ca}^{2+}$  and ABA. The results showed that the activity of GUS enzyme increased with the increase of  $\text{Ca}^{2+}$  concentration. Under the condition of  $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Ca}^{2+}$ , the activity of GUS enzyme in the treatment group was 2.1 times of the control group. While the GUS activity decreased with the increase of ABA concentration. Under  $0.01 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  ABA, the GUS activity in the control group was 5 times of the treatment group. Therefore ABA can induce the down-regulation of *GmCDPK SK5*. In *Arabidopsis*, compared with WT and *cpk4-1* mutant lines, *GmCDPK SK5* overexpression lines were the most sensitive to exogenous ABA in seed germination, seedling growth and stomatal movement. The ABA-related genes (*ABF2*, *ABF4*, *ABI5*, *RD29A*, *RAB18* and *KIN1*) in the three lines were differentially expressed. The results showed that *GmCDPK SK5* promoter responds to exogenous  $\text{Ca}^{2+}$  and ABA, and *GmCDPK SK5* enhances the sensitivity of plants to ABA by affecting the expression of ABA-related genes.

**Keywords:** Soybean; *GmCDPK SK5*; Promoter; GUS staining; ABA;  $\text{Ca}^{2+}$ ; Stomatal movement

自由流动的  $\text{Ca}^{2+}$  在细胞内的分布和流动是形成钙信号的基础, 当细胞受到外界刺激, 胞外  $\text{Ca}^{2+}$  进入细胞质, 使细胞质中的  $\text{Ca}^{2+}$  浓度迅速增加, 产生钙信号; 细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  感受器[钙调蛋白(CaMs)、钙调素类蛋白(CMLs)、钙依赖蛋白激酶(calcium-dependent protein kinase, CDPKs)和钙调磷酸酶 B

类似蛋白(IPKs)等]接收到这一信号后, 通过磷酸化或去磷酸化下游靶蛋白的方式将信号传递, 从而使植株对外界胁迫做出应答<sup>[1-3]</sup>。 $\text{Ca}^{2+}$  是植物细胞气孔开闭路径中的重要信号分子, 该信号主要是被 CDPKs 蛋白接收并传递给下游离子通道蛋白<sup>[4-5]</sup>。钙依赖蛋白激酶(CDPKs)参与介导了诸多信号通

收稿日期: 2021-04-25

基金项目: 国家自然科学基金(31371711, 31671772, 31971996); 国家重点研发计划(2018YFD0100905)。

第一作者: 胡慧敏(1995—), 女, 在读硕士, 主要从事大豆遗传育种研究。E-mail: 2018101089@njau.edu.cn。

通讯作者: 麻浩(1965—), 男, 博士, 博导, 主要从事种子科学与大豆遗传育种研究。E-mail: Lq-ncsi@njau.edu.cn。

路。如 *AtCPK3* 和 *AtCPK6* 在响应 ABA 和外源  $\text{Ca}^{2+}$  浓度升高的气孔关闭调控中发挥协同作用,在外源施加 ABA 条件下,野生型拟南芥保卫细胞中  $\text{Ca}^{2+}$  渗透通道和 S 型阴离子通道被激活,使细胞质中  $\text{Ca}^{2+}$  浓度迅速增加,从而使气孔关闭;而在 *cpk3* 和 *cpk6* 单突变体以及双突变中,外源施加 ABA 条件下的  $\text{Ca}^{2+}$  通道被激活的过程受阻,故气孔关闭也受阻<sup>[4]</sup>。*AtCDPK6* 通过磷酸化 SLAC1 的第 59 位丝氨酸来激活离子通道活性,参与 ABA 介导的气孔关闭<sup>[5]</sup>。*CPK4* 和 *CPK11* 也可以响应外源施加  $\text{Ca}^{2+}$  和 ABA,使其活性被激活影响下游的气孔运动,在发芽率和发芽后生长过程中外源施加 ABA、*CPK4* 和 *CPK11* 共表达拟南芥株系表现得最敏感;同时,体外磷酸化试验证明,CPK4 和 CPK11 激酶通过磷酸化 ABF1 和 ABF4 来参与 ABA 在植株体内的信号转导过程<sup>[6]</sup>。*AtCPK32* 通过磷酸化 *ABF4* 进而影响其它 ABA 相关基因的表达从而调节植株对外界环境刺激的响应<sup>[7]</sup>。同时,CDPKs 蛋白也参与植株的逆境胁迫。在马铃薯中,*GmCDPK4* 和 *GmCDPK5* 通过磷酸化氧化酶 RBOHB 来调节活性氧 (ROS) 的产生进而响应外界刺激<sup>[8]</sup>;在水稻中,*OsCPK21* 过表达株系也表现出对盐更强的耐受性<sup>[9]</sup>。综上,CDPK 参与 ABA 介导的一系列生理过程,包括种子发芽、发芽后生长、气孔运动以及植物在逆境胁迫下的耐受性。

*GmCDPK SK5* 属 CDPK I 家族的一员,其结构同样也包括 4 个部分:丝氨酸/苏氨酸蛋白组成的激酶结构域、自抑制结构域和与  $\text{Ca}^{2+}$  结合的 EF-hand 结构域 (Calmodulin-Like Domain, CLD)。Liu 等<sup>[10]</sup> 发现在大豆体内 *GmCDPK SK5* 和 *GmCDPK γ* 可以通过磷酸化 *GmSerat2;1* 参与抵御氧化胁迫。且同源性分析发现,*GmCDPK SK5* 与 *AtCPK4* 的同源性达到 61.87%,有研究表明,*AtCPK4* 参与 ABA 的信号转导过程,*AtCPK4* 过表达株系对外源施加的 ABA 在种子萌发、萌发后生长以及气孔运动等方面最敏感<sup>[6]</sup>。ABF2 和 ABF4 是与 ABA 响应相关的转录因子<sup>[11]</sup>,ABI5 与 ABA 反应相关,包含基本的亮氨酸拉链结构的转录因子<sup>[12]</sup>。RD29A、RAB18 和 KIN1 是与 ABA 相关并参与拟南芥响应外界胁迫诱导的基因<sup>[13-15]</sup>。而 *GmCDPK SK5* 是否也同样参与 ABA

信号转导过程有待进一步明确。本课题组前期研究发现,在高温高湿胁迫下,湘豆 3 号和宁镇 1 号 R7 期种子中的 CDPKs 蛋白的积累在品种间存在差异<sup>[16]</sup>,其中 *GmCDPK SK5* (NM\_001251588.3) 在高活力种子中显著上调表达,在低活力种子中呈显著下调表达,且该基因与高温高湿胁迫下的拟南芥种子活力形成有关<sup>[17]</sup>。前期通过农杆菌侵染拟南芥花絮法和 T-DNA 插入法分别获得 *GmCDPK SK5* 过表达 OE-SK5-6 和 *cpk4-1* 突变体材料<sup>[18]</sup>,本研究通过烟草瞬时表达系统和转基因拟南芥探究 *GmCDPK SK5* 启动子对外源施加的  $\text{Ca}^{2+}$  和 ABA 的响应情况,通过 *GmCDPK SK5* 过表达和沉默的拟南芥材料探究 *GmCDPK SK5* 在 ABA 信号转导通路中所扮演角色,进一步分析大豆中 CDPKs 家族的功能。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试烟草为本氏烟草。供试拟南芥为 *GmCDPK SK5* 突变体株系 AT4G09570 (*cpk4-1*)、过表达株系 OE-SK5-6 以及野生型株系 WT。供试大豆为大豆高种子活力品种湘豆 3 号与低活力品种宁镇 1 号,皆由本实验室前期筛选鉴定和保存<sup>[18]</sup>。

大肠杆菌 DH5α 和农杆菌 EHA105 感受态 (安徽吐露港生物科技公司);MS 植物培养基 (上海稼丰园艺)。其它化学试剂均为分析纯。

### 1.2 试验设计

1.2.1 外源 ABA 处理下大豆 *GmCDPK SK5* 基因表达分析 选取 50 粒饱满完整的宁镇 1 号和湘豆 3 号种子,消毒后播种于灭菌营养土中,每盆约 2 ~ 3 粒种子,置于培养箱中,30 ℃/20 ℃,湿度 70%,10 h/14 h (光照/黑暗) 培养,14 ~ 21 d 浇灌 20 mL 50 μmol · L<sup>-1</sup> ABA,分别在处理 0, 6, 12, 24, 48 和 96 h 取大豆叶片,液氮速冻后置于 -80 ℃。

1.2.2 *GmCDPK SK5* 启动子分离和载体构建 *GmCDPK SK5* 启动子的分离:设计特异性引物扩增 *GmCDPK SK5*-F 上游 1 500 bp 序列,测序后进行启动子元件分析,并将启动子连接到载体 PMD19-T 上。使用内切酶通过同源重组方法将 pBI121-GUS 载体的 *CaMV 35S* 替换成 *GmCDPK SK5* 启动子,构建 *GmCDPK SK5*pro :: GUS 融合表达载体 (图 1)。

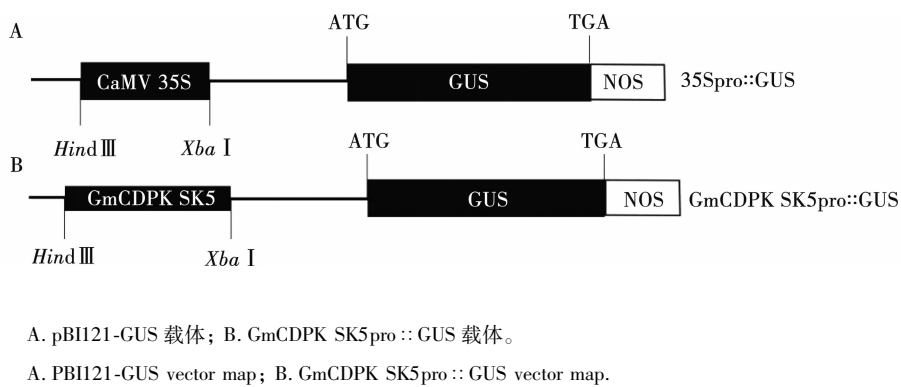


图1 *GmCDPK SK5* 启动子融合表达载体构建

Fig. 1 The construction of promoter fusion expression vector of *GmCDPK SK5* promoter

1.2.3 外源  $\text{Ca}^{2+}$  和 ABA 的诱导下启动子响应分析

烟草瞬时表达系统分析:将 *GmCDPK SK5*pro::GUS 载体和 35Spro::GUS 空载体转入农杆菌 EH105 菌株中,利用注射法将构建好的植物表达载体转入烟草叶片,黑暗培养 2~3 d 后取烟草叶片分别在生理盐水、生理盐水 + 50 mmol·L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>、生理盐水 + 50 μmol·L<sup>-1</sup> ABA 中浸泡 6 h 后,立即进行 GUS 组织化学染色和定量表达分析。

转基因拟南芥分析:将阳性 T<sub>1</sub> 代 *GmCDPKSK5*pro::GUS 转基因拟南芥植株培养至盛花期的过程中,依次取花、叶、茎、角果等组织及 T<sub>2</sub> 代经卡那霉素(50 μg·mL<sup>-1</sup>)筛选的幼苗进行 GUS 组织化学染色。将获得的 T<sub>3</sub> 代拟南芥种子均匀撒播在 MS 培养基上,14 d 后将幼苗分别移至含有 30,50 mmol·L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>、0.01,0.05 和 0.10 μmol·L<sup>-1</sup> ABA 的 MS 固体培养基上,光照培养箱中培养 14 d 后,取拟南芥植株进行 GUS 组织化学染色和定量表达分析。

1.2.4 不同拟南芥株系对 ABA 的响应 同时将同一批次的 *cpk4-1*、OE-SK5-6 和 WT 拟南芥种子表面消毒,用无菌牙签将种子分别点到含有 0.05,0.10 和 0.30 μmol·L<sup>-1</sup> ABA 的 MS 培养基以及空白 MS 培养基上,每个株系点 100 粒,3 次重复。4℃ 春化 2 d 后,放在光照培养箱,23℃/21℃,湿度 70%,16 h/8 h(白天/黑暗)培养,每天记录各株系发芽情况。然后再将在 MS 培养基上正常培养至根长为 1 cm 左右的 3 个株系的拟南芥幼苗分别移到 5,10,30 和 50 μmol·L<sup>-1</sup> ABA 的 1/2 MS 培养基上,生长 14 d 后测量并对比各处理根长。

将在培养皿上生长 14 d 的 *cpk4-1*、OE-SK5-6 和 WT 幼苗移栽于营养土中,在正常条件下生长 21 d,分别剪取 3 个株系的叶片进行气孔测定;再分别取 3 个株系的其它生长状态良好的植株地上部分称其鲜重,一部分放于培养箱(30℃/20℃,湿度 70%)

内自然干燥,每隔 1 h 称重 1 次,记录 6 h 内各株系的水分散失数据,计算叶片在单位时间水分散失速率。

1.2.5 不同拟南芥株系中响应 ABA 诱导基因的表 达分析 将收获的同一批次的 *cpk4-1*、OE-SK5-6 和 WT 种子表面消毒后,均匀布在 MS 培养基上在培养箱中正常生长 14 d 后,将 3 个株系的幼苗移栽于营养土中正常生长 14 d。分别取 3 个株系的叶片液氮速冻后至于 -80℃ 备用,用于分析与 ABA 响应相关基因 *ABF2*、*ABF4*、*ABI5*、*RD29A*、*RAB18* 和 *KINI* 的表达量。

1.3 方法

1.3.1 RNA 和 DNA 提取及 cDNA 第一链合成 以不同处理的大豆和拟南芥为材料,用 CTAB 方法<sup>[6]</sup> 提取试验材料的 DNA,用 RNA 提取试剂盒(Tolo Biotechnology)提取 RNA,然后采用 RTase M-MLV (TaKaRa)合成 cDNA 的第一链,-20℃ 保存备用。

1.3.2 基因表达量分析 外源 ABA 处理下大豆 *GmCDPK SK5* 基因表达分析:以 Actin 为内参基因,引物为 Actin-F (5'-GTTCTCTCCTTGTATGCAAGTG-3')、Actin-R (5'-CCAGACTCATCATATTCACCTTTA-G-3')、q-RTSK5-F (5'-CCGTGCGAGTGGTGGGAAGT-3') 和 qRTS-K5-R (5'-CACGCCTCAACAACCTCAAC-3'),使用 Tolo Biotechnology 试剂盒进行 qRT-PCR。反应程序为:95℃ 预变性 30 s;95℃ 变性 30 s,56℃ 退火 20 s,72℃ 延伸 20 s,40 个循环,读取荧光值;72℃ 孵育 10 min,读取熔解曲线。每个反应设置 3 个重复。

外源 ABA 处理下拟南芥株系中与 ABA 响应相关基因表达量检测:用 qRT-PCR 方法检测 3 个拟南芥株系中 *ABF2* (At1g45249)<sup>[11]</sup>、*ABF4* (At3g192-90)<sup>[11]</sup>、*ABI5* (At2g36270)<sup>[12]</sup>、*RD29A* (At5g5-2310)<sup>[15]</sup>、*RAB18* (At5g66400)<sup>[13]</sup> 和 *KINI* (At5g15960)<sup>[14]</sup> 基因的表

达量。以 *Tublin* 为内参基因,引物为 *Tublin-F* (5'-CTCAA GAGGTTCTCAGC-AGTA-3') 和 *Tublin-R* (5'-TCACCTTCTTCATCCGC-AGTT-3)<sup>[6]</sup>。

1.3.3 *GmCDPK SK5* 启动子的分离和载体构建  
使用引物 *GmCDPK SK5-F* ( AGTCCTTTTCAAC-CTCTTTTCG )、*GmCDPK SK5-R* ( CAAGGTAAC-CTGGGCTGGTC ),以大豆叶片总 DNA 为模板,PCR 扩增 *GmCDPK SK5* 启动子序列。反应体系:上下游引物各 1  $\mu\text{L}$ 、DNA 2.0  $\mu\text{L}$ 、dNTPs (2.5 mmol·L<sup>-1</sup>) 2.0  $\mu\text{L}$ 、10 × PCR Buffer 2.5  $\mu\text{L}$ 、MgCl<sub>2</sub> (25.0 mmol·L<sup>-1</sup>) 2.0  $\mu\text{L}$ 、EX Tag 0.25  $\mu\text{L}$ ,最后用 ddH<sub>2</sub>O 加至 25.0  $\mu\text{L}$ 。反应程序:95℃预变性 2 min,95℃变性 5 s,56℃退火 45 s,72℃延伸 50 s,32 个循环,72℃延伸 10 min。将产物连接到载体 PMD19-T (TaKaRa)上。

经通用生物系统安徽有限公司测序正确后,使用引物 *GmCDPK SK5 (FL)-F* ( GACCATGATTACG-CCAAGCTTAGTCCTTTTCAACCTCTT ) 和 *GmCDPK SK5 (FL)-R* ( ACCACCCGGGGATCCTCTAGAGT-GCAATCCAACCTGAATT ) 进行 PCR 扩增,用 *Hind* III 和 *Xba* I 限制性内切酶通过同源重组的方法将 pBI121-GUS 载体的 *CaMV 35S* 替换成 *GmCDPK SK5* 启动子,获得 *GmCDPK SK5pro :: GUS* 融合表达载体。

1.3.4 转化烟草 参照陈明<sup>[19]</sup>的农杆菌注射法将融合表达载体转化至烟草。

1.3.5 GUS 组织化学染色 参照陈明<sup>[19]</sup>的方法进行烟草和拟南芥 GUS 组织化学染色。

1.3.6 气孔观察 将叶片漂浮于缓冲液(50 mmol·L<sup>-1</sup> KCl,10 mmol·L<sup>-1</sup> Mes-Tris,pH6.15)中,一起放置在 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  的灯光下 2 h,然后分别放置在 10 和 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ABA 中进一步孵育,2 h 后,用胶带撕取叶片的下表皮,在荧光显微镜 (Olympus) 下观察并测量气孔的开度。

1.3.7 叶片离体失水率 选取不同处理的各株系生长状态基本一致的植株,3 个重复,剪取地上部分立即称其鲜重,记为 FW;将叶片放在培养箱自然干燥,每隔 1 h 称其重量,记为 DW;叶片在单位时间内的水分散失速率 (%) = (FW - DW)/(处理时间 × FW) × 100。

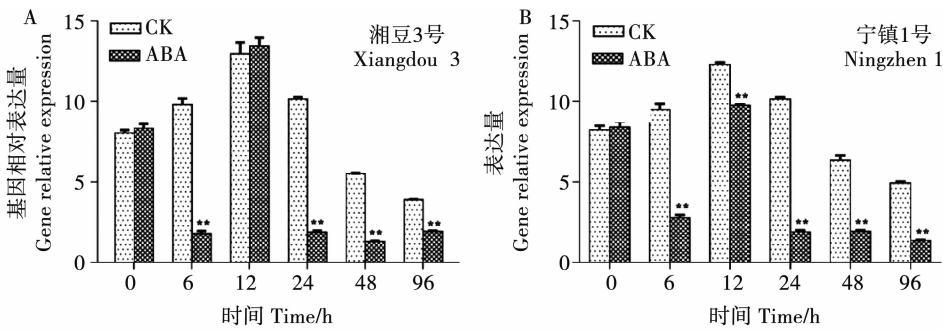
1.4 数据分析

利用 plantCARE 网站 (https://ngdc.cncb.ac.cn/databasecommons/) 对分离出来并测序正确的 *GmCDPK SK5* 启动子序列进行分析。使用 Primer premier 5.0 软件设计引物。使用 Excel 2016 整理数据,使用 Graphpad prism 8 制作图表。

2 结果与分析

2.1 外源 ABA 处理下大豆 *GmCDPK SK5* 基因表达分析

如图 2 所示,大豆品种湘豆 3 号和宁镇 1 号随着处理时间的增加 *GmCDPK SK5* 基因的表达量呈下降趋势,两个品种处理 6,24,48 和 96 h 时 ABA 处理基因表达量均与对照存在极显著差异。结果说明大豆 *GmCDPK SK5* 基因能够响应 ABA 诱导,在 ABA 诱导下基因表达量明显下调。



\* 代表显著差异 (P < 0.05); \*\* 代表极显著水平差异 (P < 0.01)。下同。  
\* represents significant difference (P < 0.05); \*\* represents extremely significant difference (P < 0.01). The same below.

图2 外源 ABA 处理不同时间下大豆叶片 *GmCDPK SK5* 基因的相对表达量

Fig.2 The relative expression of *GmCDPKSK5* genes under exogenous ABA treated for different times

2.2 *GmCDPK SK5* 启动子分离

电泳检测结果显示,分离得到 1 500 bp 左右的

*GmCDPK SK5* 启动子条带,并已经将 1 439 bp 测序正确对启动子序列接到载体 PMD19-T 上(图 3)。

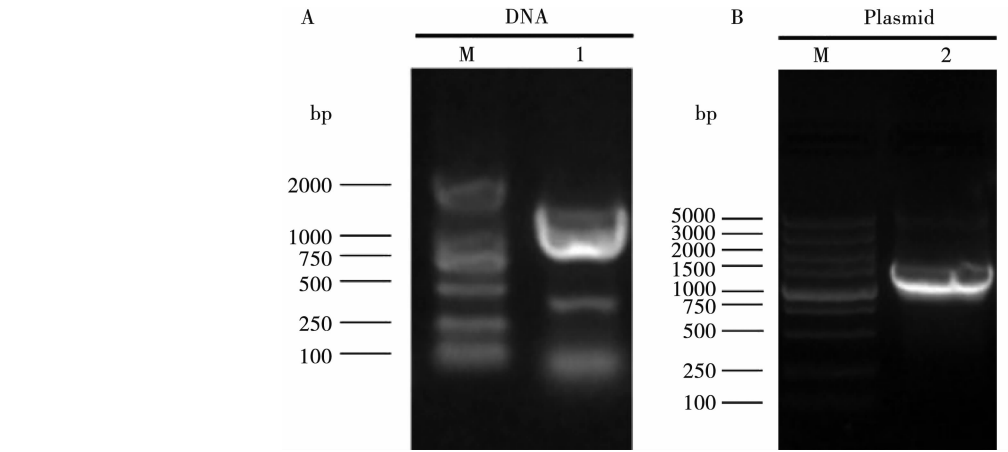


图 3 *GmCDPK SK5* 启动子的扩增(A)与载体构建(B)

Fig. 3 The amplification (A) and vector construction (B) of *GmCDPK SK5* promoter

2.3 *GmCDPK SK5* 启动子顺式作用元件分析

使用 PLACE 网站对 1 439 bp *GmCDPK SK5* 启动子序列的分析结果显示:该启动子含有 3 个 TATA 盒(TATTAAT)和 23 个 CAAT 盒(CAAT)基本转录元件和多种与胁迫相关的顺式作用元件,其中包括 13 个糖响应原件(WRKY)、13 个响应调控蛋

白结合元件(NGATT)、6 个 W-BOX 结合元件(TGACY)、2 个热激响应元件(CCAAT)、9 个与脱落酸信号转导中的转录因子有关的 MYC 元件(ACACNNG)、2 个脱落酸响应相关的 DPBF 元件(ACACNNG)以及 2 个与钙离子响应相关的 ABRE 元件(MACGYGB)(表 1)。

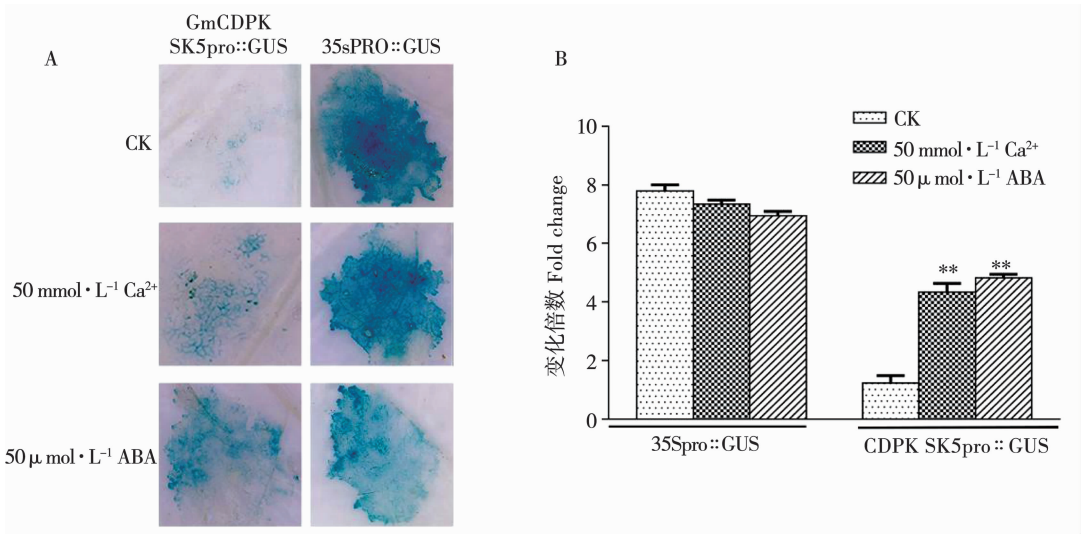
表 1 *GmCDPK SK5* 启动子区顺式作用元件

顺式作用位点 Cis-element	序列 Sequence	数目 Number	位点功能 Function feature
CAAT	CAAT	23	启动子基本转录元件 Basic transcription elements of promoter
GATA	GATA	17	高水平光调节和组织特异性表达元件 High-level light regulation and tissue-specific expression elements
WRKY	TGACT	13	糖响应元件 Sugar response elements
ARR1	NGATT	13	响应调控蛋白结合元件 Response regulatory protein binding elements
TAAAG	TAAAG	1	控制保卫细胞特异性基因表达 Control of guard cell specific gene expression
CCAAT	CCAAT	2	热激响应元件 Thermal response elements
W-BOX	TGACY	6	植物抗病和脱水相关的 WRKY 元件 WRKY components related to plant disease resistance and dehydration
MYC	CANNTG	9	脱落酸信号转导中的转录因子 Transcription factors in ABA signal transduction
ABRE	MACGYGB	2	钙离子响应元件 Ca <sup>2+</sup> response elements
GTI	GAAAAA	7	病原体和盐诱导及光调节响应元件 Pathogen and salt induction and photoregulation response elements
GTGA	GTGA	10	与果胶酸裂解酶相关 Related to pectinase
DPBF	ACACNNG	2	脱落酸响应元件 ABA response elements
CURE	GTAC	3	铜响应元件 Copper response elements
SURE	GAGAC	1	硫响应元件 Sulfur response element

2.4 外源Ca<sup>2+</sup>和ABA诱导下启动子响应分析

2.4.1 烟草瞬时表达系统分析 不同处理下对照*CaMV 35S*启动的GUS表达量很高;在正常培养条件下,*GmCDPK SK5*启动的GUS表达量显著低于阳性

对照*CaMV 35S*,但50 mmol·L<sup>-1</sup> Ca<sup>2+</sup>和50 μmol·L<sup>-1</sup> ABA 孵育6 h后,*GmCDPK SK5*启动的GUS表达量极显著增加,分别是对照的3.8倍和4倍,但也显著低于*CaMV 35S*启动的GUS表达量(图4)。



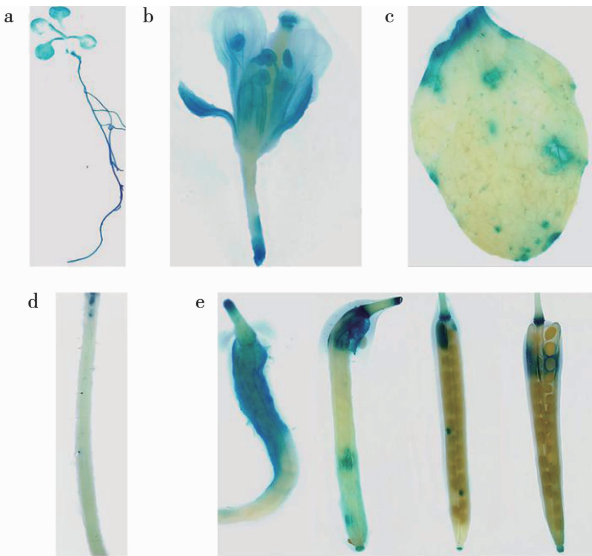
A. GUS 组织化学染色;B. GUS 荧光活性分析。  
A. Histochemical GUS staining; B. Enzymatic assay of GUS activity.

图4 外源Ca<sup>2+</sup>和ABA作用下转化烟草GUS染色分析

Fig.4 The GUS histochemical staining of transformed tobacco under the treatment of Ca<sup>2+</sup> and ABA

2.4.2 转基因拟南芥分析 T<sub>1</sub>和T<sub>2</sub>代阳性转基因拟南芥幼苗GUS染色结果表明:*GmCDPK SK5*启动子在发育中的种子中染色最深,花中次之,茎中染

色最浅,故*GmCDPK SK5*启动子在发育中的种子中表达量最高,花中次之,茎中的表达量最低(图5)。



a. 生长14 d的大豆幼苗; b. 花; c. 叶片; d. 茎; e. 不同阶段果荚。  
a. Soybean seedling for 14 days; b. Flower; c. Leaf; d. Stem;  
e. Siliques during different periods.

图5 T<sub>1</sub>和T<sub>2</sub>代转基因拟南芥GUS染色分析

Fig.5 The GUS histochemical staining of Arabidopsis T<sub>1</sub> and T<sub>2</sub> generations



对 T<sub>3</sub>代拟南芥幼苗施加 Ca<sup>2+</sup> 和 ABA 后,与对照相比,随着 Ca<sup>2+</sup> 离子浓度的增加 GUS 酶活性极显著增加,在 30 mmol·L<sup>-1</sup>Ca<sup>2+</sup> 条件下,处理组中 GUS 酶的活性是对照的 1.8 倍;在 50 mmol·L<sup>-1</sup>Ca<sup>2+</sup> 条件下,处理组中 GUS 酶的活性是对照的 2.1 倍。而随着 ABA 浓度的增加 GUS 酶的活性极显著减弱,在 0.05 μmol·L<sup>-1</sup>ABA 条件下,对照组中的 GUS 酶活性是处理的 1.2 倍,在 0.1 μmol·L<sup>-1</sup> ABA 条件下,对照组中的 GUS 酶活性是处理的 5 倍(图 6)。

研究结果说明 *GmCDPK SK5* 启动子对外源施加的 Ca<sup>2+</sup> 和 ABA 有响应。

**2.5 *GmCDPK SK5* 过表达拟南芥株系对 ABA 敏感性分析**

2.5.1 拟南芥发芽率 在正常生长条件下,WT、*cpk4-1* 突变体和 OE-SK5-6 株系的发芽率均能达到 100%;但随着外源 ABA 浓度的增加,3 个株系的发芽时间均有所延长,其中 *GmCDPK SK5* 过表达植株表现得更为敏感,在 0.3 μmol·L<sup>-1</sup> ABA 条件下,*GmCDPK SK5* 过表达植株发芽率只有 89.3%,而 *cpk4-1* 突变体植株不管是在哪个 ABA 浓度下,其发芽率均能达到 100%,说明在 ABA 胁迫下 *GmCDPK SK5* 过表达植株最敏感,WT 次之,*cpk4-1* 突变体能正常发芽(图 7)。

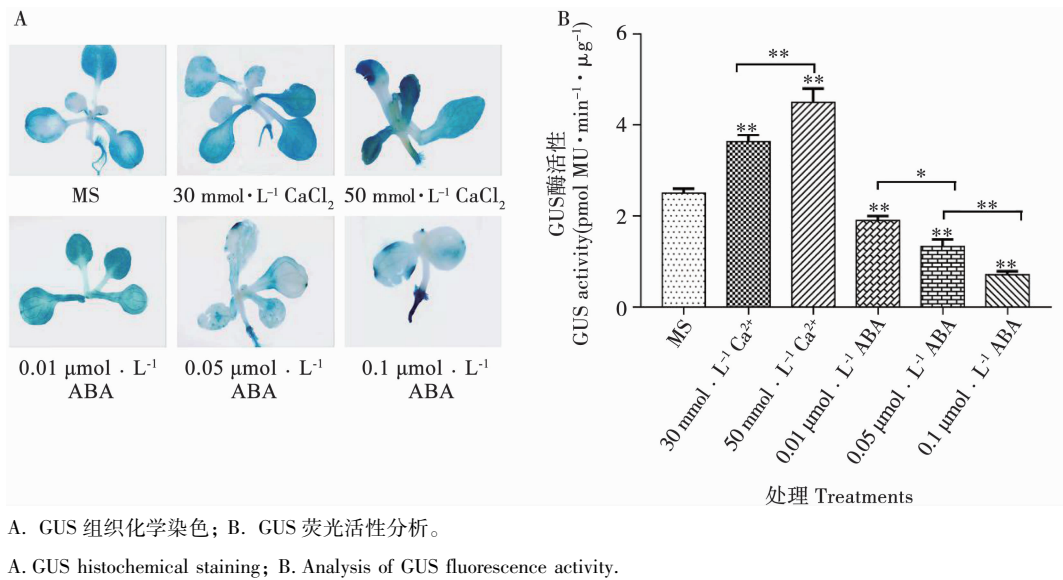
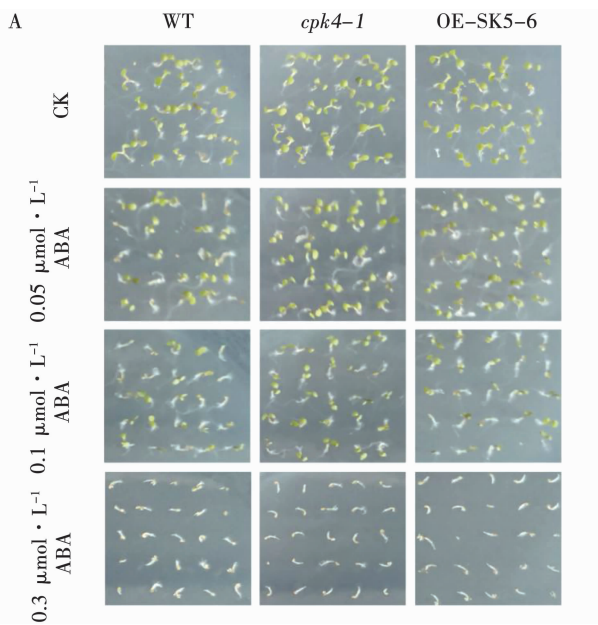
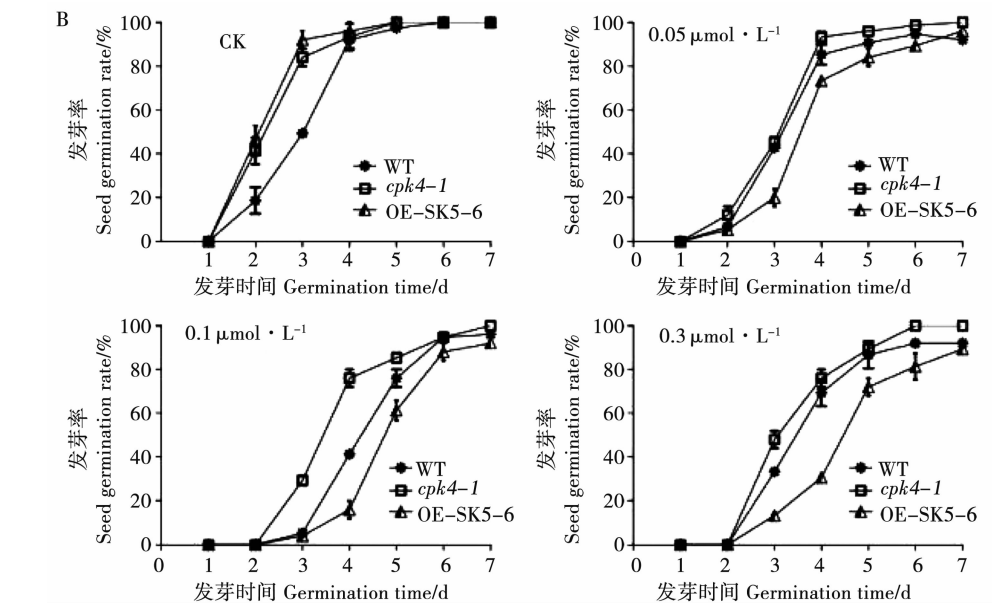


图 6 *GmCDPK SK5pro::GUS* 转基因拟南芥对 Ca<sup>2+</sup> 和 ABA 的响应

Fig.6 The responses of *GmCDPK SK5pro::GUS*-containing transgenic *Arabidopsis* to Ca<sup>2+</sup> and ABA





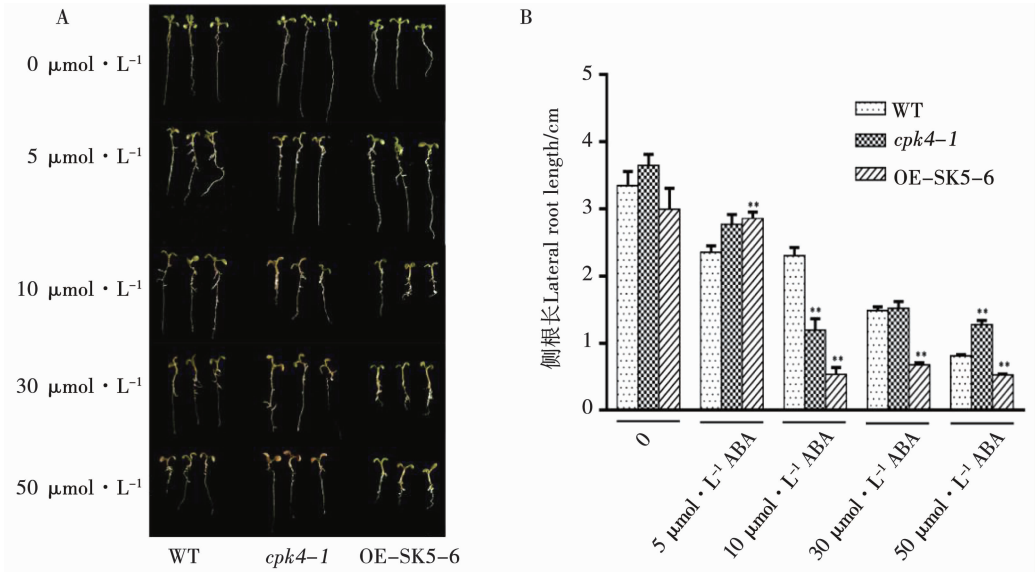
A. 拟南芥发芽 7 天表型观察; B. 拟南芥发芽数据统计。  
A. Phenotype observation of *Arabidopsis* germination in 7 days; B. Statistics of *Arabidopsis* germination.

图 7 不同浓度 ABA 对不同株系拟南芥种子发芽率的影响

Fig. 7 The effects of different ABA concentration on the seed germination rate of different lines of *Arabidopsis*

2.5.2 拟南芥根长 在正常生长情况下,3 个株系的根长没有显著性差异;随着 ABA 浓度的增加,与对照相比,*cpk4-1*、OE-SK5-6 和 WT 根长都变短,但 OE-SK5-6 株系的根长变短得更明显。在  $50\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

ABA 条件下,OE-SK5-6 株系的根长仅有 0.56 cm,而 WT 株系 *cpk4-1* 株系分别为 0.83 和 1.20 cm。说明在施加 ABA 的情况下,OE-SK5-6 株系的根部更敏感(图 8)。



A. 表型观察;B. 根长统计。  
A. Phenotype observation;B. Data statistics.

图 8 不同浓度 ABA 对拟南芥植株根长的影响

Fig. 8 The effects of different ABA concentration on the root length of *Arabidopsis*

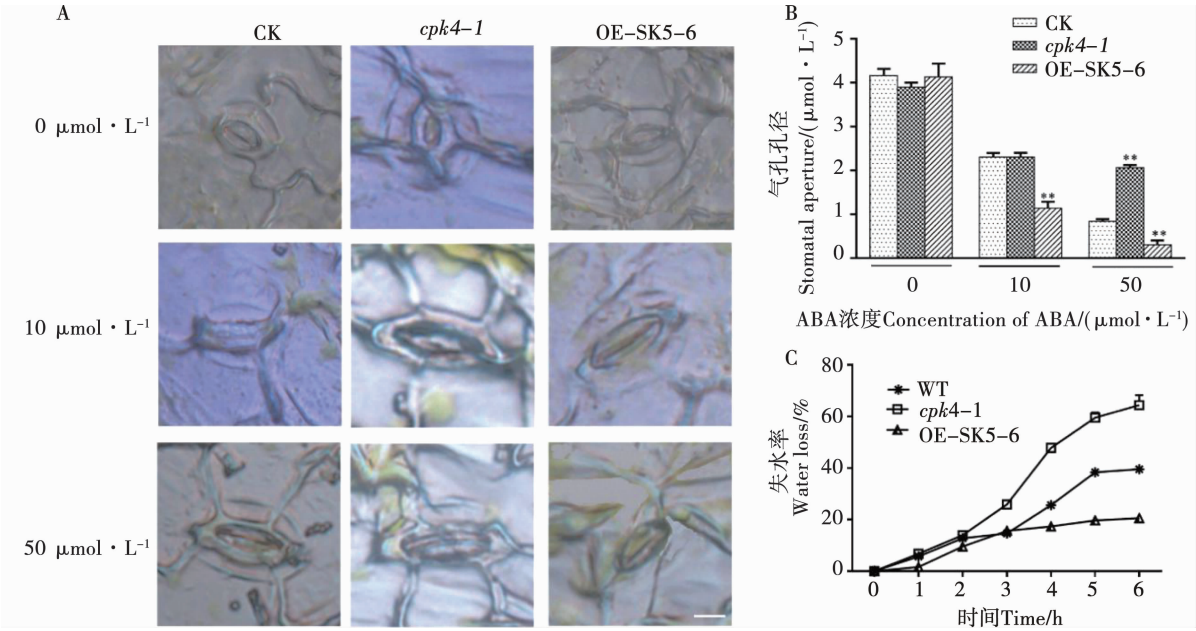
2.5.3 拟南芥气孔和叶片离体失水率 随着 ABA 浓度的增加,WT、*cpk4-1* 和 OE-SK5-6 株系的气孔孔径变小,在  $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ABA 处理下 OE-SK5-6 株系

的气孔孔径小于 WT 且达到显著差异水平;同样,在  $50\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ABA 处理下,*cpk4-1* 株系的气孔孔径最大达到  $2.1\text{ }\mu\text{m}$ ,相反 OE-SK5-6 株系气孔孔径最小几乎



闭合,且达到显著差异水平;*cpk4-1* 株系的失水率最高为 61%,WT 株系的失水率次之为 40%,OE-SK5-6 株系的失水率最低为 20%(图 9)。

研究结果说明 *GmCDPK SK5* 能够增强拟南芥株系对 ABA 的敏感性。



A. 气孔照片; B. 气孔孔径测量; C. 叶片离体失水率。  
A. Stoma photos; B. Stomatal diameter measurement; C. Rate of water loss of leaves *in vitro*.

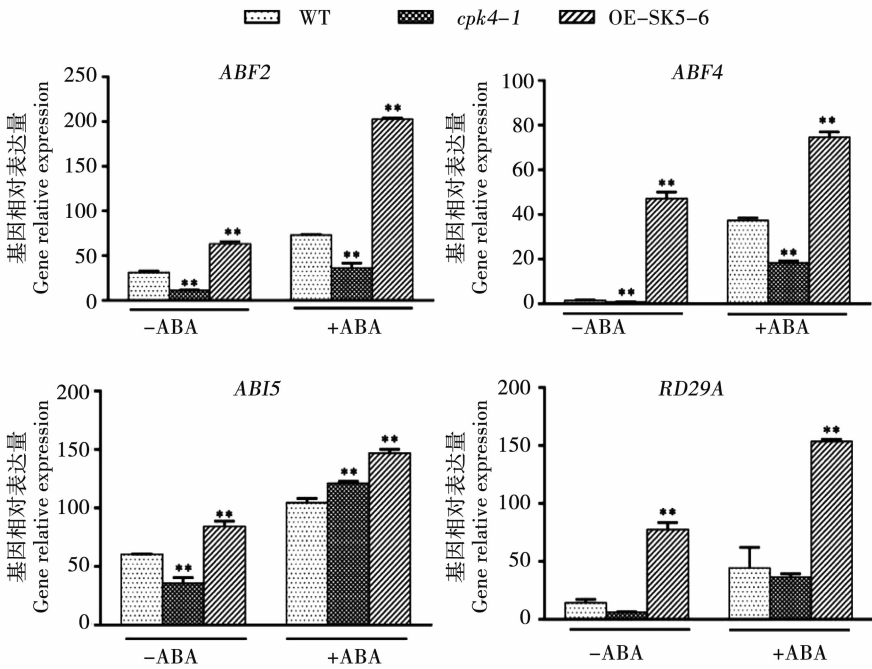
图 9 不同浓度 ABA 对拟南芥气孔孔径和叶片离体失水率影响

Fig. 9 The effects of different concentrations of ABA on the stomatal diameter and water loss rate of *Arabidopsis*

2.6 响应 ABA 诱导的基因在不同拟南芥株系中差异表达

在外源施加 ABA 的条件下,被检测的与 ABA 响应相关的基因均上调表达;但 *ABF2*、*ABF4*、*ABI5* 和 *RAB18* 在 *cpk4-1* 中下调表达,且达到显著差异;

而 *RD29A* 和 *KIN1* 在 *cpk4-1* 中的表达量与 WT 植株相比没有显著差异;然而这些基因在 *GmCDPK SK5* 过表达株系中上调表达,且均达到显著差异水平(图 10)。说明 *GmCDPK SK5* 参与 ABA 响应逆境路径的某一环节,具体环节还需进一步验证。



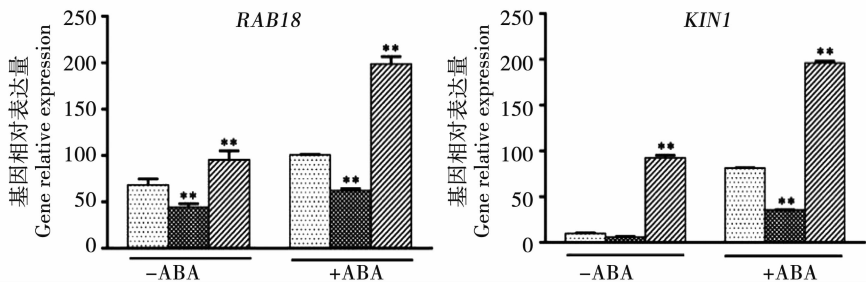


图 10 各拟南芥株系中与 ABA 相关基因的表达分析

Fig. 10 The expression analysis of ABA-related genes in various strains of *Arabidopsis*

3 讨论

钙依赖蛋白激酶(CDPKs)是一类研究广泛的Ca<sup>2+</sup>感受器,在植物中一般以单一多肽链的形式存在,从其N端至C端依次为可变区、激酶结构域以及CDPK激活结构域(CAD)。CAD结构域又包括自抑制结合区域和一个包含4个EF-hand的类钙调素结构域(CLD),CLD区域具有Ca<sup>2+</sup>亲和力,在低浓度Ca<sup>2+</sup>的条件下,CLD区域与自抑制区域结合并相互作用使蛋白结构稳定,当外界Ca<sup>2+</sup>浓度增加,Ca<sup>2+</sup>与CLD区域结合进而诱导蛋白的构象发生改变,从而激活CDPKs蛋白的激酶活性<sup>[2]</sup>。本研究首先通过GmCDPK SK5<sub>pro</sub>::GUS融合表达载体利用烟草瞬时表达系统证明了GmCDPK SK5启动子对外源施加的Ca<sup>2+</sup>和ABA有响应。随后获得GmCDPK SK5<sub>pro</sub>::GUS的转基因拟南芥植株并进行GUS组织化学染色和GUS定量表达分析发现Ca<sup>2+</sup>离子浓度的增加,GUS酶的活性增加;ABA浓度增加,GUS酶的活性减弱。说明GmCDPK SK5启动子对不同浓度的Ca<sup>2+</sup>和ABA也是有响应的。

CDPKs蛋白在ABA信号转导过程中也起着重要作用。实验室前期发现GmCDPK SK5既定位在细胞膜上也定位在细胞核上<sup>[18]</sup>,细胞中的这种双重定位能够促进基因更好地发挥作用。前人研究发现,细胞质定位的CPK4和CPK11可以更快速响应Ca<sup>2+</sup>和ABA激活其酶活性使其影响下游细胞的生理功能,如气孔的运动;而在细胞核的CPK4和CPK11则更容易磷酸化其它核定位的调控因子,体外磷酸化试验证明,CPK4和CPK11激酶磷酸化转录因子ABF1和ABF4来参与ABA在植株体内信号转导的过程<sup>[6]</sup>。本研究表明外源ABA能诱导GmCDPK SK5基因下调表达,同时也参与ABA在种子萌发、幼苗生长和气孔运动中的信号转导。与

GmCDPK SK5在拟南芥上的同源基因CPK4的过表达株系在外源施加ABA的条件下,同样也在种子萌发,根的伸长以及气孔运动方面表现得更敏感<sup>[6]</sup>。与ABA相关基因在OE-SK5-6、cpk4-1和WT株系中差异表达。故GmCDPK SK5也可能是通过影响与ABA响应相关基因的表达来增强植株对ABA的敏感性。课题组前期已初步证明GmCDPK SK5与高温高湿胁迫下种子活力形成有关:高温高湿胁迫后,GmCDPK SK5过表达的拟南芥种子活力更高<sup>[12]</sup>,但是并未探究GmCDPK SK5参与种子活力具体调控通路,故本研究为更进一步探究这一过程提供一条研究思路。

综上,GmCDPK SK5启动子对外源施加的Ca<sup>2+</sup>和ABA有响应,同时GmCDPK SK5也与其在拟南芥中的同源基因AtCPK4一样,通过响应ABA诱导的基因,参与ABA在逆境胁迫中的信号转导过程。

4 结论

在大豆中施加外源ABA后GmCDPK SK5基因表达量检测结果说明大豆GmCDPK SK5基因能够响应ABA诱导。进一步分离得到GmCDPK SK5的1439 bp启动子,包含多种与胁迫相关的顺式作用元件。烟草瞬时表达系统和转基因拟南芥GUS化学组织染色和定量分析表明,GmCDPK SK5的启动子对外源施加的Ca<sup>2+</sup>和ABA有响应。最后通过对GmCDPK SK5过表达OE-SK5-6株系、突变株系cpk4-1和WT株系的分析表明GmCDPK SK5也与其在拟南芥中的同源基因AtCPK4一样,通过响应与ABA诱导基因的表达从而参与ABA在逆境胁迫中的信号转导过程。不同拟南芥株系中响应ABA诱导基因差异表达分析表明GmCDPK SK5参与ABA响应逆境路径的某一环节,具体环节和相关基因还需进一步验证。

参考文献

[1] Mcainsh M R, Pittman J K. Shaping the calcium signature[J]. New Phytologist, 2009, 181(2): 275-294.

[2] Liese A, Romeis T. Biochemical regulation of *in vivo* function of plant calcium-dependent protein kinases ( CDPK ) [ J ]. Biochimica et Biophysica Acta ( BBA )-Molecular Cell Research, 2013, 1833(7): 1582-1589.

[3] Xie K, Chen J, Wang Q, et al. Direct phosphorylation and activation of a mitogen-activated protein kinase by a calcium-dependent protein kinase in rice[J]. Plant Cell, 2014, 26(7): 3077-3089.

[4] Mori I C, Yoshiyuki M, Yang Y, et al. CDPKs CPK6 and CPK3 function in ABA regulation of guard cell S-Type anion- and  $Ca^{2+}$ -permeable channels and stomatal closure [ J ]. PLoS Biology, 2006, 4(10): e327.

[5] Brandt B, Brodsky D E, Xue S, et al. Reconstitution of abscisic acid activation of SLAC1 anion channel by CPK6 and OST1 kinases and branchedABI1 PP2C phosphatase action [ J ]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(26): 10593-10598.

[6] Zhu S Y, Yu X C, Wang X J, et al. Two calcium-dependent protein kinases, CPK4 and CPK11, regulate abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 2007, 19(10): 3019-3036.

[7] Choi H I, Park H J, Ji H P, et al. *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase AtCPK32 interacts with ABF4, a transcriptional regulator of abscisic acid-responsive gene expression, and modulates its activity [ J ]. Plant Physiology, 2005, 139(4): 1750-1761.

[8] Kobayashi M, Ohura I, Kawakita K, et al. Calcium-dependent protein kinases regulate the production of reactive oxygen species by potato nadph oxidase [J]. Plant Cell, 2007, 19(3): 1065-1080.

[9] Asano T, Hakata M, Nakamura H, et al. Functional characterisation of OsCPK21, a calciumdependent protein kinase that confers salt tolerance in rice[J]. Plant Molecular Biology, 2011, 75(1-2): 179-191.

[10] Liu F, Yoo B C, Lee J Y, et al. Calcium-regulated phosphorylation of soybean serine acetyltransferase in response to oxidative stress [ J ]. Journal of Biological Chemistry, 2006, 281(37): 27405-27415.

[11] Choi H I, Hong J H, Ha J O, et al. ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors [ J ]. Journal of Biological Chemistry, 2000, 275(3): 1723-1730.

[12] Finkelstein R R, Lynch T J. The *Arabidopsis* abscisic acid response gene *ABI5* encodes a basic leucine zipper transcription factor[J]. Plant Cell, 2000, 12(4): 599-609.

[13] Lang V, Palva E T. The expression of a *rab*-related gene, *rab18*, is induced by abscisic acid during the cold acclimation process of *Arabidopsis thaliana* ( L. ) Heynh [ J ]. Plant Molecular Biology, 1992, 21(3): 581-582.

[14] Kurkela S, Borg-Franck M. Structure and expression of KIN2, one of two cold- and ABA-induced genes of *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Molecular Biology, 1992, 19(4): 689-692.

[15] Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. A novel *cis*-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low temperature, or high-salt stress[J]. The Plant Cell, 1994, 6: 251-264.

[16] 牛娟. 大豆 CDPK 蛋白基因 CDPK-SK5 的分离、表达分析与亚细胞定位 [D]. 南京: 南京农业大学, 2012. ( Nu J. Separate, expression and subcellular location of CDPK protein gene, CDPK-SK5 in soybean [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2012. )

[17] 宋利茹, 王爽, 牛娟, 等. 春大豆种子田间劣变性和劣变抗性的差异蛋白质组学研究 [J]. 中国农业科学, 2015, 48(1): 23-32. ( Song L R, Wang S, Niu J, et al. Differentially proteomics analysis of pre-harvest seed deterioration and deterioration resistance in spring soybean [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2015, 48(1): 23-32. )

[18] 王爽. 高温高湿下大豆钙依赖蛋白激酶基因在种子活力中的功能分析 [D]. 南京: 南京农业大学, 2016. ( Wang S. Function analysis of soybean [ *Glycine max* ( L. ) Merr. ] CDPK genes on seed vigor under high temperature and humidity [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2016. )

[19] 陈明. *GmCOL4*、*GmZTL1* 与顺式元件 HSE 响应高温高湿以及调控 *GmSBH1* 的研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2019. ( Chen M. Study on the function of *GmZTL1*, *GmCOL4* and *cis*-element and the co-regulation to *GmSBH1* [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2019. )