

向日葵 3 个谷胱甘肽-S-转移酶 *GST* 基因的克隆及表达模式分析

凌云鹤,李 静,景 兵,李春莲,肖恩时,王中华

(西北农林科技大学农学院,陕西 杨凌 712100)

摘 要:从向日葵转录组测序结果中获得了 3 个对盐胁迫有响应的谷胱甘肽-S-转移酶(*GST*, *EC*2.5.1.18) *GST* 基因,构建了系统进化树并进行分析,得知这 3 个基因属于 Tau 型 *GST*,并将它们命名为 *HaGSTU26* (HanXRQChr04g0127901)、*HaGSTU8* (HanXRQChr06g0177581)、*HaGSTU27* (HanXRQChr10g0316331),然后以向日葵 Sk02R 为试验材料,克隆这 3 个基因,并进行了不同组织和不同胁迫条件下的表达分析。序列分析表明:*HaGSTU26* 基因组为 1674bp, CDS(编码蛋白序列)长 666bp,编码 221 个氨基酸,由 2 个外显子和 1 个内含子组成;*HaGSTU8* 基因组为 2271bp, CDS 长 654bp,编码 217 个氨基酸,由 2 个外显子和 1 个内含子组成;*HaGSTU27* 基因组为 663bp, CDS 长 663bp,编码 220 个氨基酸,由 1 个外显子组成。实时荧光定量 PCR 分析表明:向日葵 *HaGSTU26*、*HaGSTU8*、*HaGSTU27* 基因在不同组织(根、幼叶、成熟叶、茎、幼茎、苞叶)中表达量不同,其中,*HaGSTU26* 基因和 *HaGSTU27* 基因在根中表达量最高,而 *HaGSTU8* 基因在苞叶中表达量最高,但这 3 个基因均在成熟茎中的表达量最低。在不同胁迫条件下,测定这 3 个基因在向日葵幼苗中的表达量,结果表明在盐及 ABA 胁迫下,基因表达量均随着处理时间的增加而呈现先增加后下降的趋势。其中,在盐胁迫下,*HaGSTU26* 基因在 12 h 后相对表达量最高,*HaGSTU8* 及 *HaGSTU27* 基因表达量在 3h 后相对表达量最高。在 ABA 胁迫后,*HaGSTU26* 及 *HaGSTU27* 基因表达量在 12 h 后相对表达量最高,*HaGSTU8* 在 24 h 后相对表达量最高。在冷胁迫下,*HaGSTU26* 和 *HaGSTU27* 基因上调表达,它们分别在 3、24 h 后相对表达量最高,*HaGSTU8* 基因下调表达,其相对表达量随处理时间的延长呈现逐渐减少的趋势。在热胁迫条件下,这 3 个基因的相对表达量随着胁迫时间的延长而增加,均在 24 h 后表达量最高。以上结果说明这 3 个基因对不同非生物胁迫(盐、ABA、冷、热胁迫)均有响应。

关键词:向日葵;谷胱甘肽-S-转移酶 *GST* 基因;基因克隆;基因相对表达量

中图分类号:S565.5;Q78 **文献标志码:**A

Cloning and expression analysis of three glutathione S-transferase *GST* genes from sunflower (*Helianthus annuus*)

LING Yun-he, Li Jing, JING Bing, LI Chun-lian, XIAO En-shi, WANG Zhong-hua

(College of Agriculture, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling, Shanxi 71210, China)

Abstract: The plant glutathione-S-transferase (*GST*, *EC*2.5.1.18) is a group of enzymes with multiple biological functions encoded by complex gene families that has great responses to various abiotic stresses. In this study, three *GST* genes responding to salt stress were obtained from sunflower transcriptome sequencing results and a phylogenetic tree were constructed for analysis. These three genes belong to Tau *GST* and were named as *HaGSTU26* (HanXRQChr04g0127901), *HaGSTU8* (HanXRQChr06g0177581) and *HaGSTU27* (HanXRQChr10g0316331). Next, we cloned these three genes from sunflower and performed expression analysis under different tissues and different stress conditions. Sequence analysis showed that DNA sequence of *HaGSTU26* gene was 1674bp and the CDS was 666 bp, which encoded 221 amino acids and consisted of 2 exons and 1 intron. The DNA sequence of *HaGS-*

收稿日期:2018-11-30

修回日期:2019-05-06

基金项目:国家特色油料产业技术体系杨凌综合试验站项目(CARS-14-2-21);国家自然科学基金青年科学基金项目(31601335);中央高校基本科研业务费(2452016012)

作者简介:凌云鹤(1994-),女,黑龙江牡丹江市人,硕士研究生,研究方向为向日葵逆境胁迫。E-mail:1103328750@qq.com

通信作者:景兵(1983-),男,山西运城人,博士,讲师,主要从事小麦和向日葵重要农艺性状形成的分子基础研究。E-mail:jingbing94@gmail.com

TU8 gene was 2271 bp and the CDS was 654 bp, which encoded 217 amino acids and consisted of 2 exons and 1 intron. The DNA sequence of *HaGSTU27* gene and CDS were both 663bp, encoding 220 amino acids and consisting of one exon. Real-time fluorescence quantitative PCR analysis showed that the expression levels of *HaGSTU26*, *HaGSTU8* and *HaGSTU27* sunflower were different in different tissues (root, young leaf, mature leaf, stem, young stem and temporal leaf), the *HaGSTU26* gene and *HaGSTU27* gene had the highest expression in roots, while *HaGSTU8* gene had the highest expression in the temporal leaf. However, all three genes have the lowest expression in mature stems. Under different stress conditions, the expression levels of these three genes in sunflower seedlings were determined. The results showed that under salt and ABA stress, the amount of gene expression increased first and then decreased with increasing treatment time. Under salt stress, the relative expression of *HaGSTU26* gene was at peak after 12h, and the expression of *HaGSTU8* and *HaGSTU27* were at the highest after 3 h. After ABA stress, the expression levels of *HaGSTU26* and *HaGSTU27* were the highest after 12 h, and the relative expression of *HaGSTU8* was the highest after 24 h. Under cold stress, *HaGSTU26* and *HaGSTU27* genes were up-regulated, and they had the highest relative expression after 3 h and 24 h, respectively. The expression of *HaGSTU8* gene was down-regulated, and its relative expression decreased gradually with the prolongation of treatment time. Under heat stress, the relative expression of three genes increased with the prolongation of stress time, and the highest expression was obtained after 24 h. The above results indicate that these three genes respond to different abiotic stresses (salt, ABA, cold and heat stress).

Keywords: *Helianthus annuus*; glutathione S-transferase *GST* gene; gene clone; relative gene expression

谷胱甘肽-S-转移酶是通过清除各种胁迫诱导的活性氧来保护细胞的重要酶。谷胱甘肽(GSH)在该酶的催化下能将有毒物质转化为无害或低毒物质。Wilce 等在 1960 年于动物中第 1 次发现 GST, 这些酶对解除药物毒性具有重要作用^[1]。1970 年, Edwards 等^[2]在玉米中发现可与氯-S-三嗪阿特拉津除草剂结合的 GST, 它可以保护作物免遭损害。此后在小麦、马铃薯、大麦、拟南芥、烟草、甘蔗、矮松、大豆、石竹、鹰嘴豆、高粱等多种植物中克隆到了许多 *GST* 基因或其类似序列^[3]。

研究发现, *GST* 基因在植物的所有组织中都有表达, 但 *GST* 同工酶种类及其表达水平在不同物种、不同组织及不同细胞中是不同的。各种胁迫条件, 如病原微生物, 除草剂, 重金属离子, 高盐, 高温, 低温, 机械损伤等都能诱导出几种特定的 *GST* 基因表达^[3], 其在植物抵抗生物和非生物胁迫中发挥着非常重要的作用。王丽萍等^[4]将盐地碱蓬的 *GST* 基因转入拟南芥中过量表达减轻了盐胁迫、干旱胁迫对其生长的危害^[5-6]。Galle 等^[7]鉴定 *TaGSTU1B* 和 *TaGSTF6* 基因在小麦抵抗干旱胁迫下起作用。朱守晶等^[8]通过试验发现 *BnGR1* 基因的表达量随 Cd^{2+} 浓度的增加而逐渐升高, 推测该基因增强了苎麻对镉胁迫的适应性; Kumar、Binh 等^[9-10]认为过量表达水稻 *OsGSTL2* 基因可以增强拟南芥对重金属、干旱及高盐胁迫的抗性; Agrawal 等^[11]研究发现 *OsGST2* 显著响应稻瘟病菌的诱导, 表明该基因在水稻防御反应中具有重要作用。安秀红等^[12]发

现苹果中的 *MdGSTU1* 被 NaCl 和 PEG 诱导表达。范玉洁等^[13]研究发现, 橡胶树 *HbGSTU1* 表达受低温等因素调控, 但对 ABA 处理的应答不明显。

向日葵(*Helianthus annuus* L.) 属于菊科(Compositae), 是重要的油料作物, 具有高产、高油、耐干旱、耐瘠薄、易栽培、适应性广等特点, 是世界上最重要的大田作物之一, 在中国已有四百多年的栽培历史^[14]。其叶片繁茂宽大、根系发达, 既可以减少地面的水分蒸发, 又能吸收大量的深层水、促使耕层可溶性盐类下移, 从而降低地表盐分含量, 从而使向日葵可以在盐碱地中正常的生长、繁育^[15-19]。目前国内外对向日葵抗逆分子机制的研究尚处起步阶段, 分离鉴定其抗性相关基因, 对培育抗逆转基因向日葵品种具有非常重要的意义。本研究在本实验室所做的向日葵逆境转录组基础上, 运用 RT-PCR 和 RACE 技术克隆了 3 个盐胁迫响应 *GST* 基因的 cDNA 序列, 构建系统进化树并进行分析, 利用实时定量 PCR 技术研究这 3 个基因在向日葵不同组织部位和不同胁迫条件下的表达, 为进一步研究该基因在向日葵抗性中的作用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料及其处理

供试材料为向日葵品种 Sk02R, 来源于西北农林科技大学农学院保存的种质资源。采用土培盆栽试验, 营养钵大小为 7 cm×7 cm, 每盆装入 200 g 湿润培养土。每盆精选籽粒饱满均匀且无病虫害

的种子 8 粒,播后正常供应水分,幼苗两叶一心时间苗,每盆定苗 2 株。

在向日葵六叶一心时期,分别进行 200 mmol · L⁻¹的氯化钠盐胁迫处理、100 μmol · L⁻¹的 ABA 喷施于向日葵叶片处理、4℃冷胁迫处理、43℃热胁迫处理,将向日葵置于光温培养箱(24℃,16 h 光照;21℃ 8 h 黑暗)中培养,取未处理、处理 1、3、6、12、24、48 h 的向日葵叶片以及未处理向日葵的根、幼叶、成熟叶、茎、幼茎、苞叶等部位,在实验室里用液氮处理后将放入-80℃冰箱保存。

1.2 方法

1.2.1 向日葵基因组 DNA 的提取 用 CTAB 法对向日葵幼叶进行基因组 DNA 的提取。

1.2.2 RNA 提取与 cDNA 第一链合成 利用多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒提取 RNA,使用生物光度计检测 RNA 的浓度与纯度,用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量,按照 Gen-Star 试剂盒说明反转录得到第一链 cDNA,在-20℃冰箱中保存。

1.2.3 GST 基因的克隆 根据向日葵转录组测序所发现的 GST 基因,设计克隆引物(TSINGKE 公司合成)。基因序列设计引物如下:

表 1 引物序列	
Table 1 Primer sequences	
引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')
HaGSTU26F	acgatactcgaggggatccATGACTGGTTCAGATGTTATAC
HaGSTU26R	catacaagtattggggatccTCAGTGGCCTTCTCTTCTGTC
HaGSTU8F	acgatactcgaggggatccATGGCGAATGAGGTGAAATTGC
HaGSTU8R	catacaagtattggggatccTTACGCCTTACCAACCTTGAC
HaGSTU27F	acgatactcgaggggatccATGGATGATGTTATACTGCTAG
HaGSTU27R	catacaagtattggggatccTCATTCATGGCCTTCTTCTTC

以之前从向日葵中提取的 cDNA 为材料,使用 KOD 酶进行 PCR 扩增。

(1)PCR 反应体系如下:

Buffer	25 μL
dNTPS	10 μL
引物	5μL 总体系 50μL
DNA	5 μL
KOD 酶	1 μL
去离子水	4 μL

(2)PCR 反应程序:

94℃ 预变性	5 min
95℃ 变性	30 s 35 个循环
56℃ 退火	30 s
72℃ 延伸	2 min
72℃ 延伸	10 min

PCR 程序结束后,使用 1%琼脂糖凝胶电泳进行检测,观察结果,判断是否成功扩增出所需要的目的片段。按照 DNA 回收纯化试剂盒的步骤进行目的片段的回收。将 pMDTM18-T Vector 载体与回收到的目的片段进行连接,使用 CaCl₂ 方法制备 E.coli DH5α 感受态,菌落 PCR 验证后送生工生物工程股份有限公司(上海)进行测序。然后通过 SE-QMAN 分析测序结果,与 HaGSTU26、HaGSTU8、HaGSTU27 进行序列比对,确定克隆序列是否正确。

1.2.4 生物信息学分析 利用 MEGA6 软件构建进化系统发育树;基因结构分析用 Gene Structure Display Server (GSDS)软件。

1.2.5 实时荧光定量 PCR 分析 根据已克隆的向日葵 GST 的 cDNA 序列分析结果,利用 Primer primer5.0 设计荧光定量引物(见表 2),参照杜方等^[20]的步骤进行荧光定量 PCR,进行向日葵不同部位不同胁迫下 GST 基因表达分析,每个试验设置 3 个重复。所得数据采用 Excel 进行平均数统计,2-△△CT 法^[21]计算相对表达量,以 SPSS 软件进行方差分析,LSD 多重比较,利用 Excel 绘图。

表 2 PCR 定量荧光引物	
Table 2 Fluorescent Quantitative PCR Primers	
引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')
HaGSTU26RTF	CGTTCGGTCTGAGGCTGAGAA
HaGSTU26RTR	TGTGGACCGGGTTCATTTCAA
HaGSTU8RTR	GCAATTTTCACCTGCAGACG
HaGSTU8RTF	TTGCACGGAGTTACAGGGAGT
HaGSTU27RTF	CTTCTGGGTGAGTGTGTTCGG
HaGSTU27RTR	GGGTTTGTCTCTCGGGTTTT
ActinF	ATCAGGAGACAGATGAAAGCG
ActinR	CCCAAAGTACACCTGGTCAAG

2 结果与分析

2.1 GST 基因的克隆及进化分析

通过对拟南芥和水稻的 GST 家族蛋白序列以及 HanXRQChr04g0127901、HanXRQChr06g0177581、HanXRQChr10g0316331 氨基酸序列 ClustalX 2.1 进行多序列比对,再用 MEGA 5.0 的 neighbor-joining (NJ) (Bootstrap 1000) 算法构建系统进化树(如图 1)。由系统进化树可知,这 3 个基因属于 Tau 型,将这 3 个基因分别命名为 HaGSTU26、HaGSTU8、HaGSTU27。

以向日葵幼叶 RNA 经过反转录形成的 cDNA 以及提取的 DNA 做模板,在其保守区内设计特异引物,进行基因扩增,琼脂糖凝胶电泳检测结果如图

2,根据已知的序列以及电泳出现的特异扩增带,其大小与预测长度基本相符,说明我们成功克隆了向日葵 *HaGSTU26*、*HaGSTU8*、*HaGSTU27* 基因。

2.2 *GST* 基因结构分析

由生物信息学分析得知:*HaGSTU26* 基因 DNA 序列全长为 1674bp,CDS(编码蛋白序列)长 666bp,编码 221 个氨基酸,由 2 个外显子和 1 个内含子组成;*HaGSTU8* 基因 DNA 序列全长为 2271bp,CDS 长 654bp,编码 217 个氨基酸,由 2 个外显子和 1 个内含子组成;*HaGSTU27* 基因 DNA 序列全长为 663bp,CDS 长 663bp,编码 220 个氨基酸由 1 个外显子组成,基因结构示意图如图 3。

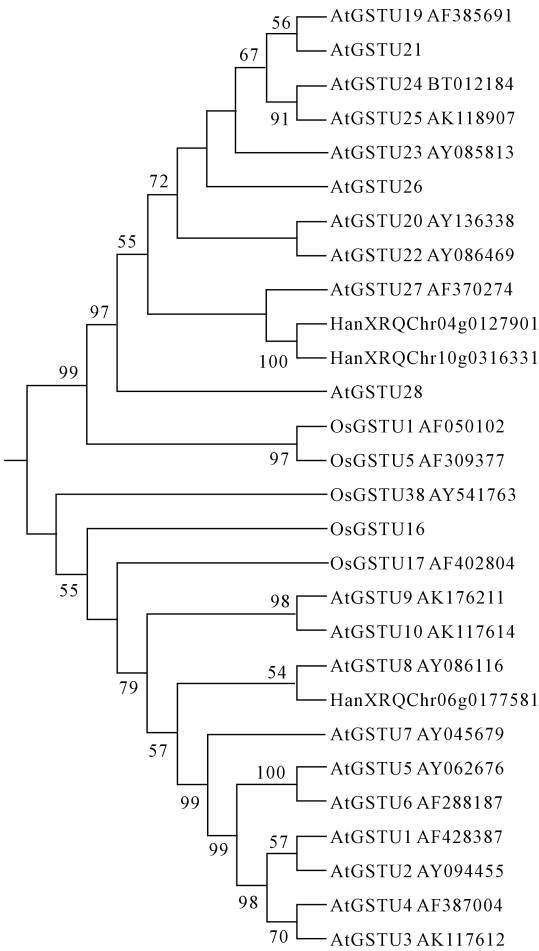


图 1 部分物种 GST 氨基酸序列的系统进化树
Fig.1 Phylogenetic tree of amino acid sequences of the GST from several plant species

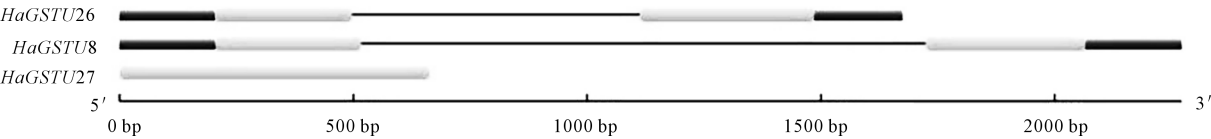


图 3 向日葵 *HaGSTU26*、*HaGSTU8*、*HaGSTU27* 基因结构
Fig.3 Gene structure of sunflower *HaGSTU26*, *HaGSTU8* and *HaGSTU27* genes

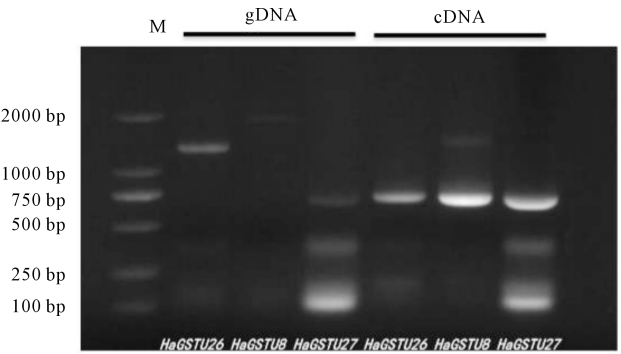
2.3 向日葵不同组织中 *GST* 基因的表达

HaGSTU26、*HaGSTU8*、*HaGSTU27* 基因在向日葵根、幼茎、幼叶、成熟叶、苞叶和成熟茎中均有表达且表达量不同,见图 4。*HaGSTU26* 基因在向日葵根中相对表达量最高,其次是幼叶、苞叶、成熟叶、幼茎和成熟茎,*HaGSTU8* 基因在苞叶中相对表达量最高,其次是根、成熟叶、幼茎、幼叶和成熟茎。*HaGSTU27* 基因在根中相对表达量最高,其次是幼叶、苞叶、成熟叶、幼茎和成熟茎。这 3 个基因在成熟茎中较其他组织相对表达量均最少。

2.4 向日葵在不同胁迫条件下 *GST* 基因的表达

2.4.1 盐胁迫下 *GST* 基因的表达模式分析 由图 5 可知,向日葵幼苗受到盐胁迫后,*HaGSTU26* 基因表达量随时间的延长先增加,在胁迫 6 h 后稍下调,但在胁迫 12 h 后相对表达量最高,此后逐渐降低。*HaGSTU8* 基因表达量随时间的延长先增加,在胁迫 3 h 后相对表达量最高,此后逐渐降低。*HaGSTU27* 基因的表达量随时间的延长先增加,在胁迫 3 h 后相对表达量最高,此后逐渐降低。说明向日葵 *HaGSTU26*、*HaGSTU8*、*HaGSTU27* 基因表达对盐胁迫有响应。

2.4.2 ABA 处理下 *GST* 基因的表达模式分析 向日葵幼苗经 ABA 处理后(图 6),*HaGSTU26* 基因表达量随时间的延长呈现先增加后降低的趋势,处理 12 h 后相对表达量急剧增加并且达到最高值。*HaGSTU8* 基因表达量随时间的延长呈现逐渐增加的趋势,处理 24 h 后相对表达量最高。*HaGSTU27* 基



注 Note: M;2000 marker.
图 2 向日葵 *HaGSTU26*、*HaGSTU8*、*HaGSTU27* 基因的克隆

Fig.2 Cloning of sunflower *HaGSTU26*, *HaGSTU8* and *HaGSTU27* genes

因的表达量随着时间的延长呈现先增加后降低的趋势,处理 12 h 后相对表达量最高。说明向日葵 *HaGSTU26*、*HaGSTU8*、*HaGSTU27* 基因表达对 ABA 处理有响应。

2.4.3 冷胁迫下 *GST* 基因的表达模式分析 向日葵幼苗受到冷胁迫后(图 7),*HaGSTU26* 基因的相对表达量随着时间的延长呈现先增加随后降低最后又升高的趋势,胁迫 3 h 后相对表达量最高。*HaGSTU8* 基因相对表达量随着时间的延长呈现逐渐减少的

趋势。*HaGSTU27* 基因的相对表达量随着时间的延长整体呈现增加的趋势,胁迫 24 h 后相对表达量最高。说明向日葵 *HaGSTU26*、*HaGSTU8*、*HaGSTU27* 基因表达对冷胁迫有响应,其中 *HaGSTU26* 和 *HaGSTU27* 基因上调表达,*HaGSTU8* 基因下调表达。

2.4.4 热胁迫下 *GST* 基因的表达模式分析 向日葵幼苗受到热胁迫后(图 8),*HaGSTU26* 基因的相对表达量随着时间的延长整体呈现增加的趋势,*HaGSTU8* 基因相对表达量随着时间的延长呈现先增加后

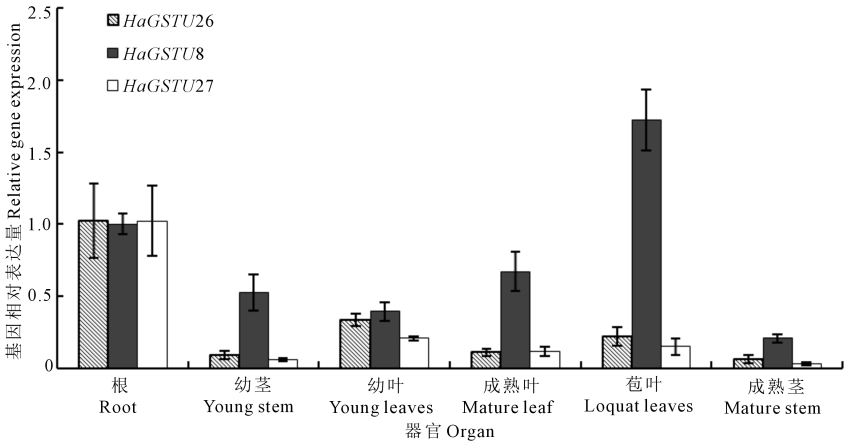


图 4 向日葵不同组织中 *GST* 基因的相对表达量
Fig.4 Relative expression of *GST* gene in different sunflower tissues

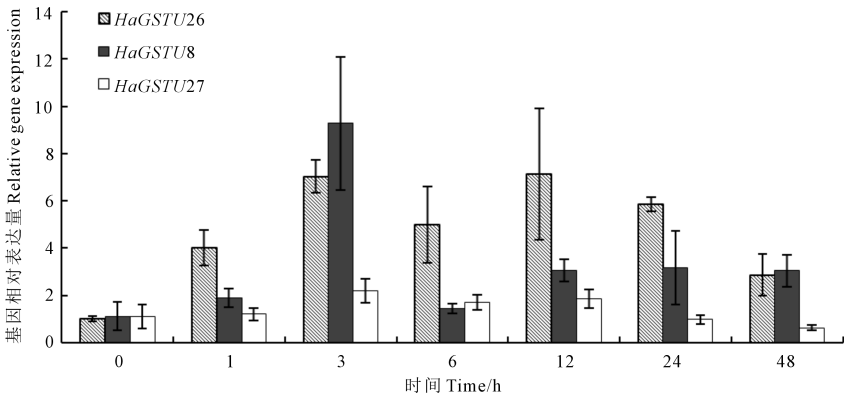


图 5 盐胁迫下 *GST* 基因的相对表达量
Fig.5 Relative expression of *GST* gene under salt stress

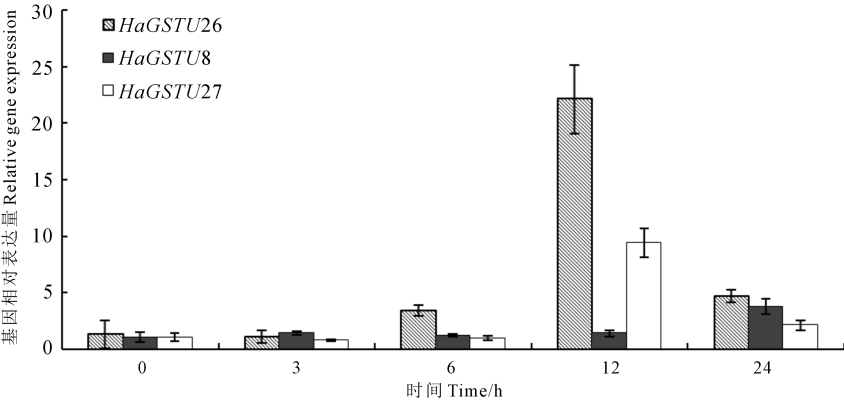


图 6 ABA 处理后 *GST* 基因的相对表达量
Fig.6 Relative expression of *GST* gene after ABA treatment

降低然后又增加的趋势,胁迫 3 h 后表达量上升,此后又下降到未胁迫时的水平,最后在胁迫 24 h 后,相对表达量达到最高值。*HaGSTU27* 基因的相对表

达量随着时间的延长整体呈现增加的趋势,这 3 个基因均在热胁迫 24 h 后表达量最高。说明向日葵 *HaGS-TU26*、*HaGSTU8*、*HaGSTU27* 基因表达对热胁迫有响应。

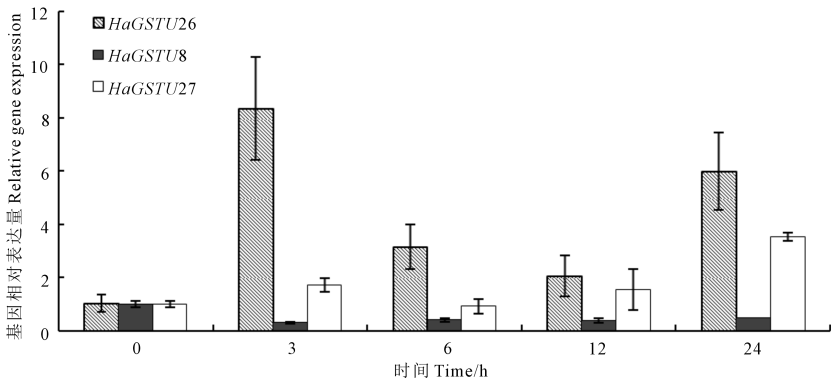


图 7 冷胁迫下 *GST* 基因的相对表达量
Fig.7 Relative expression of *GST* gene under cold stress

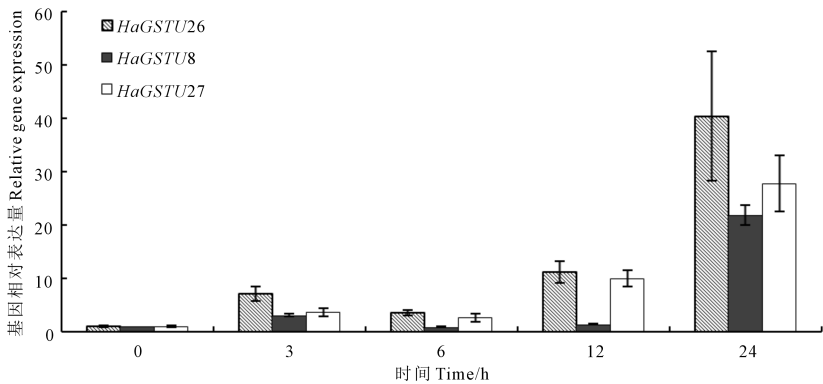


图 8 热胁迫下 *GST* 基因的相对表达量
Fig.8 Relative expression of *GST* gene under heat stress

3 讨 论

盐害是农业中最重要的非生物胁迫之一,土壤中过量的盐分积累,会减少土壤水势,细胞膨压,破坏土壤和植物中营养物质的平衡而使植物生长缓慢,并引起毒性效应^[22]。*GST* 在植物抵抗逆境胁迫中起到重要作用,它被分为 Phi、Tau、Theta、Zeta、Lambda 型、脱氢抗坏血酸还原酶(Dehydroascorbate reductases, DHARs)和 TCHQD7 类,其中 Phi 型和 Tau 型是植物所特有的^[19, 23-24],但目前有关向日葵 *GST* 基因的克隆还鲜少报道。本研究从向日葵品种 Sk02R 成功克隆了 *HaGSTU26*、*HaGSTU8*、*HaGSTU27* 这 3 个基因,通过进一步的系统进化树分析,本研究发现向日葵 *HaGSTU26*、*HaGSTU8*、*HaGSTU27* 的氨基酸序列与来自拟南芥、水稻中的 Tau 类 *GST* 基因聚为一个类群,亲缘关系最近,表明这 3 个基因属于 Tau 类 *GST* 家族成员。

有许多研究表明,*GST* 基因在植物不同组织中表达量不同。马立功等^[25]从向日葵中克隆到 1 个 *HaGSTU1* 基因,在根、茎、叶、花、和种子中均能检测

到该基因的表达,且在叶中相对表达量最高,在茎中的表达量最低。安秀红等^[12]从苹果中克隆 *MdGSTU1* 基因,其在根、茎、叶、花、果等部位中均有表达,根中的相对表达量最高。乔光等^[26]发现,木豆的 *CcGST1* 基因在其根、茎、叶中均有表达,但根中的表达水平最高。青花菜中的 *GST* 基因在根、叶、莢中的表达丰度较高,花蕾中表达丰度较低,存在明显的组织特异性^[27]。本研究对向日葵不同器官 *GST* 基因表达量进行分析,发现其在向日葵根、幼茎、幼叶、成熟叶、苞叶和成熟茎中均有表达,*HaGSTU26*、*HaGSTU27* 在根中的表达量最高,*HaGSTU8* 在苞叶中的表达量最高,*HaGSTU26*、*HaGSTU8*、*HaGSTU27* 的表达量均在成熟茎中最低,这与上述文献研究结果类似,故推测这 3 个 *GST* 基因在向日葵的生长发育及抗逆中具有重要作用。

GST 家族基因在多数植物中都参与了逆境胁迫的应答,这在许多参考文献中可以看到。An 等^[28]研究表明,苜蓿的 *MsGST*(KM044312)在 ABA、盐、干旱、冷和热等各种逆境胁迫下,其表达水平均上调。水稻在经 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd 处理 7 d 后,根系的

GST 活性明显增强^[29]。胡桃楸 *JrGSTTau1* 基因经 6℃、8℃、10℃、12℃ 以及 16℃ 处理的菌株中,其 GST、谷胱甘肽过氧化物酶 (GPX)、超氧化物歧化酶 (SOD) 和过氧化物酶 (POD) 活性表达量均上调,而 H₂O₂、丙二醛 (MDA) 和活性氧 (ROS) 均下调^[30]。苹果 *MdGSTU1* 在经 150 mmol·L⁻¹ NaCl 处理后,在 1 h 时表达量达到最高值^[12]。不同非生物胁迫 (干旱、盐、低温) 可显著诱导山羊草中 *AEGTA43277*、*AEGTA19581*、*AEGTA31937*、*AEGTA27563*、*AEGTA27835*、*AEGTA32578* 基因在根和叶片中的表达^[31]。本试验研究结果表明, *HaGSTU26*、*HaGSTU8*、*HaGSTU27* 这 3 个基因都可以被盐、冷、热等非生物胁迫以及 ABA 处理诱导表达,因此我们推测该基因在抵抗非生物胁迫中具有重要的作用。本研究仅对这 3 个 GST 基因进行了初步的表达分析,要想全面了解其在向日葵抗逆中的作用机制,有待进一步深入研究。

参 考 文 献:

- [1] Wilce M C J, Parker M W. Structure and function of glutathione S-transferases[J]. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1994, 1205(1): 1-18.
- [2] Edwards R, Dixon D P, Walbot V. Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health[J]. *Trends in Plant Science*, 2000, 5(5): 193-198.
- [3] 裴冬丽. 谷胱甘肽还原酶在植物防御中的研究进展[J]. *中国农学通报*, 2012, 28(18): 185-188.
- [4] 王丽萍, 戚元成, 赵彦修, 等. 盐地碱蓬 GST 基因的克隆、序列分析及其表达特征[J]. *植物生理与分子生物学学报*, 2002, 28(2): 133-136.
- [5] 戚元成, 高玉千, 张世敏, 等. 过量表达 GST 基因对盐胁迫下转基因拟南芥氧化损伤的影响[J]. *西北植物学报*, 2006, 26(8): 1621-1626.
- [6] 戚元成, 张小强, 刘卫群, 等. 过量表达谷胱甘肽转移酶基因对转基因拟南芥抗旱能力的影响[J]. *植物生理学通讯*, 2008, 44(2): 268-270.
- [7] Gallé A, Csiszár J, Secenji M, et al. Glutathione transferase activity and expression patterns during grain filling in flay leaves of wheat genotypes differing in drought tolerance: response to water deficit[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2009, 166(17): 1878-1891.
- [8] 朱守晶, 余伟林, 石朝燕, 等. 苧麻谷胱甘肽还原酶基因 (*BnGR1*) 的克隆和表达分析[J]. *农业生物技术学报*, 2015, 23(10): 1318-1326.
- [9] Kumar S, Asif M H, Chakrabarty D, et al. Expression of a rice Lambda class of glutathione S-transferase, *OsGSTL2*, in Arabidopsis provides tolerance to heavy metal and other abiotic stresses. *Journal of Hazardous Materials*, 2013, 15(248): 228-237.
- [10] Binh le T, Oono K. Molecular cloning and characterization of genes related to chilling tolerance in rice. *Plant Physiology*, 1992, 99(3): 1146-1150.
- [11] Agrawal G K, Jwan S, Rakwal R. A pathogen induced novel rice (*Oryza sativa* L.) gene encodes a putative protein homologous to type II glutathione S-transferases [J]. *Plant Science*, 2002, 163(6): 1153-1160.
- [12] 安秀红, 徐锴, 厉恩茂等. 苹果抗性相关的谷胱甘肽转移酶基因

- MdGSTU* 的生物信息学和表达分析[J]. *中国农业科学*, 2014, 47(24): 4868-4877.
- [13] 范玉洁, 林飞鹏, 安泽伟, 等. 一个橡胶树谷胱甘肽-S-转移酶基因的克隆和表达特性分析[J]. *中国农业科学*, 2011, 44(20): 4150-4158.
 - [14] 岳云. 盐胁迫对油菜生理生态指标及吸盐效果的研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2007.
 - [15] 邱念伟, 杨洪兵, 王宝山. Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白及其与植物耐盐性的关系[J]. *植物生理学报*, 2001, 37(3): 260-264.
 - [16] 陈炳东. 油用向日葵对 Na⁺ 盐胁迫的生理生化响应及农艺性状表现研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2009.
 - [17] Shi D, Sheng Y. Effect of various salt-alkaline mixed stress conditions on sunflower seedlings and analysis of their stress factors[J]. *Environmental & Experimental Botany*, 2005, 54(1): 8-21.
 - [18] Kaya M D, Okçu G, Atak M, et al. Seed treatments to overcome salt and drought stress during germination in sunflower (*Helianthus annuus* L.) [J]. *European Journal of Agronomy*, 2006, 24(4): 291-295.
 - [19] Akram M S, Ashraf M. Alleviation of adverse effects of salt stress on sunflower (*Helianthus annuus* L.) by exogenous application of potassium nitrate[J]. *Journal of Applied Botany & Food Quality*, 2012, 83(1): 19-27.
 - [20] 杜方, 樊俊苗, 王婷, 等. 百合品种和器官中花香和抗性基因的表达模式[J]. *分子植物育种*, 2017, 15(6): 2126-2132.
 - [21] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-ΔΔCT method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
 - [22] Torabian S, Zahedi M, Khoshgofarmanesh A. Effect of foliar spray of zinc oxide on some antioxidant enzymes activity of sunflower under salt stress[J]. *Journal of Agricultural Science & Technology*, 2016, 18(4): 1013-1025.
 - [23] Moon A. Regulatory and functional interactions of plant growth regulators and plant glutathione-S-transferases (GSTs) [J]. *Vitamins and Hormones*, 2005, 72(72): 155-202.
 - [24] Wagner U, Edwards R, Dixon D P, et al. Probing the diversity of the Arabidopsis glutathione-S-transferase gene family [J]. *Plant Molecular Biology*, 2002, 49(5): 515-532.
 - [25] 马立功, 孟庆林, 张匀华, 等. 向日葵谷胱甘肽-S-转移酶基因的克隆及抗病功能研究. *中国油料作物学报*, 2015, 37(5): 635-643.
 - [26] 乔光, 文晓鹏, 洪怡. 木豆抗旱相关基因 *CcGST1* 克隆与表达分析. *西南林业大学学报*, 2017, 37(4): 1-7.
 - [27] 荆赞革, 裴徐梨, 朱素珍, 等. 青花菜谷胱甘肽-S-转移酶的克隆及表达特性分析[J]. *基因组学与应用生物学*, 2017, (2): 341-347.
 - [28] An J, Yang P, Cao Y, et al. Cloning and expression analysis of a novel glutathione-S-transferase gene, *MsGST*, from alfalfa (*Medicago sativa*) [J]. *Indian Journal of Genetics & Plant Breeding*, 2017, 77(3): 394-399.
 - [29] Zhang C H, Ze-Ying W U, Ting J U, et al. Purification and Identification of Glutathione-S-transferase in rice root under cadmium Stress [J]. *Rice Science*, 2013, 20(3): 173-178.
 - [30] Yang G, Xu Z, Peng S, et al. In planta characterization of a tau class glutathione-S-transferase gene from *Juglans regia* (*JrGSTTau1*) involved in chilling tolerance [J]. *Plant Cell Rep*, 2016, 35(3): 681-92.
 - [31] 马建辉, 张文利, 高小龙, 等. 山羊草谷胱甘肽-S-转移酶基因家族鉴定及表达分析. *作物杂志*, 2018, 186(5): 54-62.