

干旱胁迫下沙棘 CMO 基因的时空表达模式与蛋白结构预测

刘青青, 马玉花*, 董佳伟, 冶贵生, 张 丹, 杨开宇

(青海大学 农牧学院, 青海 西宁 810016)

摘 要: CMO 基因是沙棘体内甜菜碱合成过程中的关键性基因, 对植物体抗旱起着重要作用。以青海野生中国沙棘的根、茎、叶为试验材料, 对沙棘 CMO 基因及其全长序列进行克隆, 并进行生物信息学分析, 在此基础上对不同程度干旱胁迫下沙棘不同组织部位 CMO 基因的时空表达模式进行研究。结果表明, 沙棘 CMO 基因全长 1 566 bp, ORF 长 1 364 bp, 编码 454 个氨基酸, 分子量为 51.41 ku, 等电点为 6.78; CMO 蛋白亚细胞定位于叶绿体, 无信号肽, 蛋白二级结构主要为无规则卷曲; CMO 蛋白具有多个多种类型的功能位点, 为蛋白功能的实现提供了保障; 此外 CMO 蛋白的亲水性较强, 无跨膜螺旋区; CMO 蛋白三维结构由 α 螺旋、 β 折叠和无规则卷曲互相盘绕而成; 时空表达模式研究表明沙棘 CMO 基因的表达明显受到干旱胁迫的影响, CMO 基因的表达量随胁迫时间的延长而整体呈逐步升高的趋势, 直至胁迫末期或复水后才有所降低; CMO 基因在沙棘不同组织部位中的表达有一定的差异, 表达量大小为根>叶>茎。通过对沙棘 CMO 基因的研究分析, 以期为提高沙棘抗旱性及植物 CMO 基因的深入研究提供参考意义。

关键词: 沙棘; 干旱胁迫; CMO 基因; 蛋白质结构

中图分类号: S793.6

文献标志码: A

文章编号: 1001-7461(2024)02-0021-07

Spatiotemporal Expression Patterns and Protein Structure Prediction of Seabuckthorn CMO Gene Under Drought Stress

LIU Qing-qing, MA Yu-hua*, DONG Jia-wei, YE Gui-sheng, ZHANG Dan, YANG Kai-yu

(College of Agriculture and Animal Husbandry, Qinghai University, Xining 810016, Qinghai, China)

Abstract: CMO gene is a key gene for the synthesis of betaine in *Hippophae rhamnoides*. It plays an important role in drought resistance of plants. Taken the roots, stems and leaves of wild *H. rhamnoides* subsp. *sinensis* Rousi occurring in Qinghai as the experimental materials, the CMO gene and its full-length sequence were cloned and bioinformatics was analyzed, the spatiotemporal expression patterns of CMO genes in different tissue parts of sea buckthorn plant under different degrees of drought stress were studied. The results were reported as follows. The total length of CMO gene is 1 566 bp, the ORF length is 1 364 bp, encoding 454 amino acids, the molecular weight is 51.41 ku, the isoelectric point is 6.78; CMO protein subcells are localized in chloroplasts, no signal peptides, and the protein secondary structure is mainly irregular curling; CMO protein has a number of various types of functional sites, which provide a guarantee for the realization of protein function; in addition, CMO protein has strong hydrophilicity and no transmembrane helix region; the three-dimensional structure of CMO protein consists of α helix, β sheet, and random coil. The spatiotemporal expression pattern study showed that the expression of CMO gene was obviously affected by drought stress, and the expression of CMO gene showed a gradual increase with the extension of stress time, and did not decrease until the end of stress or after rehydration. The expression of CMO gene

收稿日期: 2023-02-03 修回日期: 2023-04-04

基金项目: 国家自然科学基金(31660071); 青海省科技厅项目(2017-ZJ-734); 青海省“高端创新人才千人计划”项目。

第一作者: 刘青青。研究方向: 林木遗传育种, 生态修复等。E-mail: 2994573423@qq.com

* 通信作者: 马玉花, 博士, 教授, 硕士生导师。研究方向: 森林培育理论与技术, 植物资源开发利用。E-mail: qhxnmyh@163.com

in different tissue parts was different, and the expression size was in the order of root > leaf > stem. This study analyzes the CMO gene of sea buckthorn in order to provide reference significance for improving the drought resistance of *H. rhamnoides* and the in-depth study of plant CMO gene.

Key words: *Hippophae rhamnoides* subsp. *sinensis*; drought stress; CMO gene; protein structure

沙棘 (*Hippophae rhamnoides*) 能适应高寒、炎热及干旱的环境, 具有防风固沙, 保持水土的生态功能^[1-3]; 其果实具有较高的营养价值和药用价值, 是一种具备研究价值和开发价值的植物^[4-6]。沙棘叶片细小且偏厚, 使其具有较强的保水能力^[7]; 枝条坚硬且表面覆盖有蜡质层, 能够抵挡强烈的日光直射, 减少气孔水分蒸腾; 另有部分小枝条变形成为枝刺, 以利于其在不良环境下生长^[8]。然而, 沙棘的抗旱性不仅是由于生理形态上的特点决定的, 更关键在于其内部物质的调控。因此, 有必要对干旱胁迫下沙棘的内部物质调控进行研究。

干旱环境下, 植物为了应对干旱胁迫, 植物细胞质内积累渗透调节剂以调节细胞内的渗透压, 减少失水, 维持植物体内水分平衡以适应胁迫环境, 从而提高自身的抗旱性^[9]。甜菜碱是其中最主要的渗透调节物质之一, 在干旱、盐胁迫等逆境中起着重要的作用^[10]。甜菜碱的积累能够保持细胞与外界环境的渗透压平衡, 具有非常重要的调节功能^[11-12], 如维持酶的活性、保护细胞内蛋白质、稳定细胞膜, 因此能够提高植物对干旱胁迫的适应力^[13-14]。

甜菜碱是由胆碱作为底物的两步催化氧化形成的, 即胆碱到甜菜碱醛再到甜菜碱^[15]。在高等植物中, 催化这两步反应的依次是胆碱单加氧酶 (choline monooxygenase CMO E. C. 1. 1. 3, -) 和甜菜碱醛脱氢酶 (betaine aldehyde dehydrogenase, BADH E. C. 1. 2. 1. 8)^[16-17]。其中, CMO 催化的第一步反应是甜菜碱生物合成的限速步骤^[18]。因此, 提高 CMO 基因的表达量, 就能促进植物体内甜菜碱含量从而增强其抗旱能力^[19]。沙棘具有极强的抗旱性, 但目前为止有关沙棘 CMO 基因的表达模式及其蛋白结构的研究未见报道。研究发现, 不同植物的 CMO 基因在干旱胁迫下诱导甘氨酸甜菜碱积累, 从而提高植物抗逆性。如玉米 (*Zea mays*)^[20]、西瓜 (*Citrullus lanatus*)^[17]、甘菊 (*Chrysanthemum lavandulifolium*)^[21]。然而也有一些逆境条件下不积累甜菜碱的植物, 如番茄 (*Solanum lycopersicum*)、烟草 (*Nicotiana tabacum*)、水稻 (*Oryza sativa*) 等^[22], 而沙棘在受到逆境胁迫时植物体内是否有甜菜碱的积累, 及其 CMO 基因结构分析和表达模式却未见报道。因此, 本研究对沙棘 CMO 基因及其全长序列进行了克隆, 并进行了 CMO 蛋白

的亚细胞定位、二级结构、三级结构等生物信息学分析, 在此基础上对干旱胁迫下的沙棘 CMO 基因时空表达模式进行了研究, 明确了 CMO 基因在沙棘抗旱过程中起到的作用及其随着在时间和空间上的变化规律, 为沙棘抗旱机理的阐明及抗旱转基因作物育种提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

以青海省西宁市大通县 (37°14'45"N, 101°30'15"E, 海拔 2 920 m) 采集的中国沙棘 (*Hippophae rhamnoides* subsp. *sinensis* Rousi) 种子为种植材料, 播种于 20 cm (高) × 25 cm (直径) 花盆中 (泥炭: 园土: 珍珠岩 = 40: 30: 30 (体积%))。待沙棘苗长至 20~25 cm 时, 选取生长良好且长势均匀的沙棘幼苗, 进行干旱胁迫处理, 其中一组为对照组 (control, CK), 另外一组为胁迫组 (drought stress, XP), 对照组正常浇水, 胁迫组停止浇水, 在干旱胁迫处理的第 0 (CK)、2、4、7、11、15 d 的上午采集沙棘的根、茎、叶, 在第 15 天采样后对胁迫组进行复水, 并于复水 1 d 后采集根、茎、叶, 每个处理 3 次重复, 采集的样品立刻投入液氮中速冻后带回实验室后放置于 -80 °C 备用。

1.2 研究方法

1.2.1 沙棘 CMO 基因的全长克隆

1.2.1.1 总 RNA 提取与 cDNA 第一链合成 总 RNA 的提取依照 EASYspin Plus 植物 RNA 快速提取试剂盒 (RN38) 说明书进行。反转录过程按 PrimeScript® II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒的说明书进行。

1.2.1.2 CMO 基因核心序列的获得 采用 DNASTAR 对已知植物 CMO 同源基因进行同源比对分析, 根据保守区序列设计沙棘 CMO 基因的扩增引物 (CMO-F: 5'-TGCAATTGGAAGGTTT-TCTGYGAYAAAYTA-3', CMO-R: 5'-GATGCAGC-CAGCAATGRAARTGRTGNA-3'), 扩增 CMO 基因核心序列。PCR 反应体系: 模板 cDNA 2 μL, 10 × PCRbuffer 5 μL, MgCl₂ 3 μL, dNTP4 μL, CMO-F 2 μL, CMO-R 2 μL, Taq 0.5 μL, RNase-Free ddH₂O 31.5 μL。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 60 °C 1 min, 72 °C 1 min, 35 个循环;

最后 72 °C 延伸 10 min。

1.2.1.3 CMO-3'端 RACE 扩增 根据 CMO 核心片段序列设计 3'端特异性引物 P1 和 P2(P1(外侧): 5'-CATGATTAATAGGTATGGTCCATG-GATG-3'; P2(内侧): 5'-CTTGAAGCTGCTCT-TAAGGATGACAAAG-3'),与接头引物 T1(5'-CGCGGATCCACTAGTGATTTCCTACTATAGG-3')进行巢式 PCR 扩增 3'-端内侧。外侧 PCR 反应条件:95 °C 5 min;95 °C 40 s,60 °C 30 s,72 °C 90 s,35 个循环;72 °C 10 min。巢式 PCR 反应条件:95 °C 5 min;95 °C 40 s,60 °C 30 s,72 °C 90 s,95 °C 5 min;95 °C 40 s,60 °C 30 s,72 °C 90 s,20 个循环;72 °C 10 min。

1.2.1.4 CMO-5'端 RACE 扩增 根据测序所得到的 CMO 核心片段序列,设计 5'-端特异性引物 P3 和 P4(P3(外侧):5'-ATCATTGTAGAGTAGGAAT-CAAGCTTGAGAC -3';P4(内侧):5'-GAGACCCGA-TGCAAGGCCCTTAT -3'),分别与接头引物 T2 和 T3(5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACCCCCCCCCC-CCCC-3'和 5'-GGCCACGCGTCGACTAGT-3')进行巢式 PCR 扩增 5'-端。外侧 PCR 反应条件:95 °C 5 min;95 °C 40 s,60 °C 30 s,72 °C 90 s,35 个循环;72 °C 10 min。巢式 PCR 反应条件:95 °C 5 min;95 °C 40 s,60 °C 30 s,72 °C 90 s,20 个循环;72 °C 10 min。

1.2.2 序列测定及分析 将沙棘 CMO 基因核心片段,3'端和 5'端 PCR 扩增回收产物送上海生工测序。

DNASTAR 软件进行序列分析并预测蛋白的二级结构和亲水性, TMHMM 进行蛋白跨膜螺旋区分析, Predictprotein 进行细胞定位及蛋白修饰位点分析, I-TASSER 在线服务器预测蛋白的三级结构, SignalP4.1 对沙棘 CMO 蛋白是否存在信号肽进行预测, Kyte-Doolittle 方法预测 CMO 蛋白亲水性分析。

1.2.3 CMO 基因的表达研究 根据沙棘 CMO 基因序列设计荧光定量 PCR 扩增引物 CMO-DL-F 和 CMO-DL-R(CMO-DL-F: 5'-CTAAAGGCAACT-CGAATAACAGGAA-3', CMO-DL-R: 5'-AGAA-GAACAAATGGACCCCAAG-3'),以 β -actin(β -actin-DL-F: 5'-GGTCCTCTTCCAACCATCTCTC-3', β -actin-DL-R: 5'-CTGTGATCTCTTTGCT-CATCCTGT -3')为内参进行沙棘 CMO 基因在不同程度干旱胁迫下的不同组织部位表达情况研究。PCR 扩增参数为:95 °C 30 s;95 °C 5 s,55 °C 30 s,72 °C 30 s,35 个循环;72 °C 5 min。根据 K. J. Livak 等^[23]的方法来计算基因的相对表达量。

2 结果与分析

2.1 沙棘 CMO 基因的序列分析

将提取的沙棘总 RNA 经反转录合成 cDNA 后进行 PCR 扩增,所得 CMO 基因核心序列扩增的电泳鉴定结果见图 1。对照 Marker 条带比较分析,图 1 中的扩增产物条带大小约为 500 bp,符合预期目的片段的大小。序列测定结果显示所得 CMO 基因核心区的核苷酸序列长度为 496 bp。

根据沙棘核心区序列和 3'端接头序列设计引物进行巢式 PCR 获得沙棘 CMO 基因的 3'端,并进行序列测定,得到 1 段长 387 bp 的片段(图 2);根据沙棘核心区序列和 5'端接头序列设计引物进行巢式 PCR 获得沙棘 CMO 基因的 5'端,并进行序列测定,得到 1 段长 913 bp 的片段(图 3)

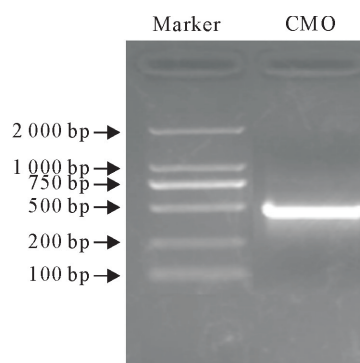


图 1 CMO 基因核心序列

Fig. 1 The part fragment of CMO gene

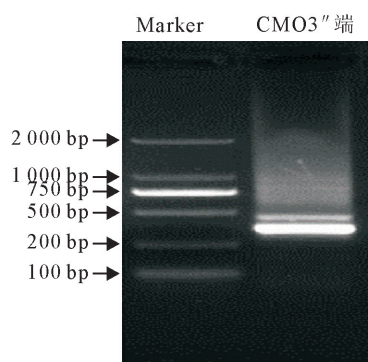


图 2 CMO 基因 3'端

Fig. 2 3'end of CMO gene

2.2 沙棘 CMO 基因生物信息学分析

2.2.1 沙棘 CMO 基因的全长 cDNA 的特征 沙棘 CMO 基因全长 1 566 bp, ORF 长 1 364 bp, 编码 454 个氨基酸。3'非翻译区(3' UTR)长 180 bp, 5'非翻译区(5' UTR)长 21 bp。推测分子量为 51.41 ku, 等电点为 6.78。

2.2.2 CMO 蛋白亚细胞定位 沙棘 CMO 蛋白用 predictprotein 进行蛋白的亚细胞定位, 预测结果(图 4)可见沙棘 CMO 蛋白亚细胞定位于叶绿体中。

2.2.3 CMO 蛋白结构预测 预测的二级结构结

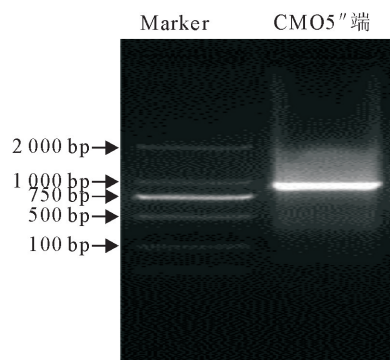


图3 CMO 基因 5'端

Fig. 3 5' end of CMO gene

果显示沙棘 C 蛋白二级结构主要为 α 螺旋占 17.18%, β 折叠占 22.03%, 无规则卷曲占 60.79%。可见, 无规则卷曲是沙棘 CMO 蛋白二级结构的主要构成元件。在蛋白质二级结构的基础



图4 沙棘 CMO 蛋白亚细胞定位

Fig. 4 Protein subcellular localization of CMO protein

上, 采用 I-TASSER 在线软件对沙棘 CMO 蛋白进行蛋白质三维结构的预测(图 5)。预测结果显示, 5 个得分最高的 CMO 蛋白三维结构均主要由 α 螺旋、 β 折叠和无规则卷曲互相盘绕而成。其中模型 1 的 C-score 到了 -2.12, 说明所建模型可信度较高。同时, TMHMM 预测中国沙棘 CMO 基因跨膜区结果显示, CMO 蛋白不含跨膜螺旋的结构。

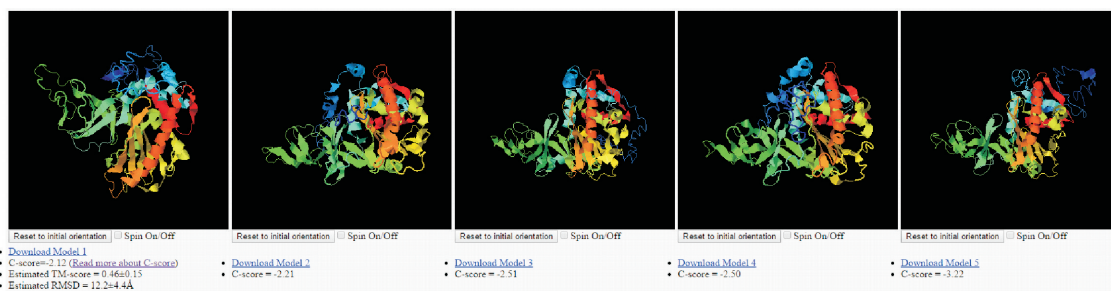


图5 沙棘 CMO 蛋白三维结构的预测

Fig. 5 Predicted 3D structure of CMO protein

对 CMO 进行功能位点预测的结果表明, CMO 具有 8 个蛋白激酶 C 磷酸化位点, 分别为 3~5 位的 TRR, 29~31 位的 SNR, 45~47 位的 TTK, 72~74 位的 TFK, 149~151 位的 TGR, 241~243 位的 TKK, 401~403 位的 SLK, 451~453 位的 SLK; 4 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点, 分别为 219~222 位的 SVND, 241~244 位的 TKKE, 259~262 位的 SSSE, 401~404 位的 SLKD; 2 个酪氨酸激酶磷酸化位点, 分别为 343~349 位的 RLGSEALY, 421~427 位的 RGLSPAY; 7 个 N-端豆蔻酰化位点, 分别为 165~170 位的 GNVHAF, 178~183 位的 GS-VLAC, 186~191 位的 GQKSCF, 201~206 位的 GLDGAL, 268~273 位的 GVDSSL, 307~312 位的

GLASGL, 418~312 位的 GVQRGL。

Kyte-Doolittle 方法预测蛋白亲水性结果显示(图 6), CMO 蛋白的疏水性较弱, 分布区域较少, 而其亲水性较强, 具有多个连续亲水区域。

SignalP4.1 对沙棘 CMO 蛋白测试结果如图 7 所示。 x 轴为氨基酸, y 轴为 C 值计分(score), 其表示信号肽剪切点的记分, 图 7 中用红色显示; S-score 表示信号肽记分, 用绿色显示, 最高记分点所对应氨基酸位于信号肽部位; Y-score 是 C 值和 S 值的综合记分值, 用蓝色显示, Y-max 通常被视为最理想的剪切位点。通过上述数据推测, 沙棘 CMO 蛋白无信号肽, 属于非分泌蛋白, 该蛋白不含信号肽。

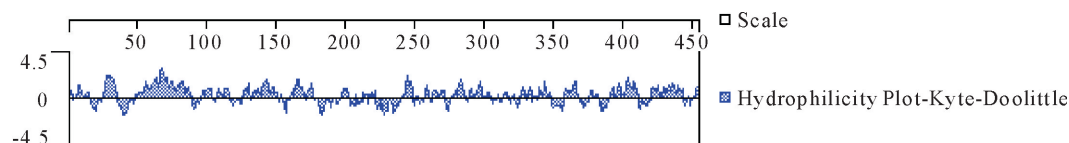


图6 沙棘 CMO 蛋白亲水性分析

Fig. 6 Hydrophilicity plot of CMO protein

2.3 沙棘 CMO 基因的表达模式分析

分别以对照和干旱胁迫处理 2 d(ds1)、4 d(ds2)、7 d(ds3)、11 d(ds4)、15 d(ds5)及复水

24 h 后(fs)的沙棘根、茎、叶 cDNA 为模板进行 Real-Time PCR, 以对照各组织部位 CMO 基因的表达量为 1, 研究根、茎、叶 CMO 基因的表达情况, 结果

分别见图 8—图 10。

2.3.1 沙棘根中 CMO 基因的表达分析 由图 8 可见在沙棘根中,胁迫前 11 d CMO 基因的表达量随着胁迫程度的加剧而逐渐上升,在第 11 天达到最大值,是对照的 9.55 倍,而在胁迫第 15 天相对第 11 天表达量急剧降低,是对照的 5.08 倍,复水后沙棘根中 CMO 基因的表达量迅速下降,但仍高于对照,是对照的 1.93 倍。

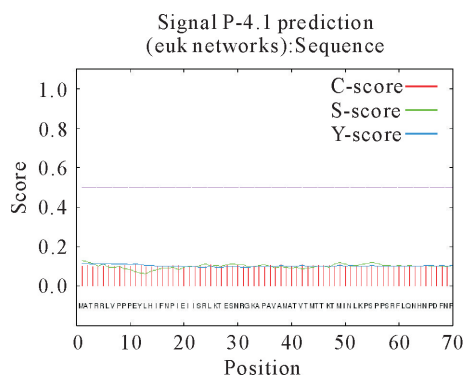


图 7 沙棘 CMO 蛋白信号肽预测

Fig. 7 Signal peptide prediction of CMO protein

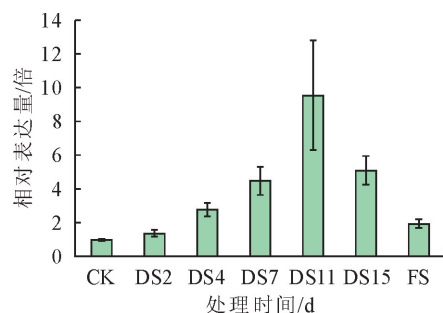


图 8 不同干旱胁迫下沙棘根中 CMO 基因的表达情况

Fig. 8 Expression of CMO gene in root of *H. rhamnoides* under drought stress

2.3.2 沙棘茎中 CMO 基因的表达分析 由图 9 可见,沙棘茎中 CMO 基因的表达在胁迫第 2 天相对对照略有降低,随后持续增加,但在第 11 天以前均低于对照的表达量,CMO 基因的表达量在胁迫第 15 天达到最大值,是对照的 3.21 倍;复水后表达量降低(1.91),但仍高于对照组的表达量。

2.3.3 沙棘叶中 CMO 基因的表达分析 CMO 基因在沙棘叶中的表达情况见图 10。由图 10 可见,在干旱胁迫初期,沙棘叶中的 CMO 基因的表达量变化不大,随着干旱胁迫的逐步增强,CMO 基因的表达量急剧增加,在胁迫第 11 天达到最大值(3.48);胁迫 15 d 时表达量又降低(1.96);复水后表达量相对胁迫最后一天略有增加,为对照的 2.86 倍。

2.3.4 沙棘 CMO 基因的表达分析 CMO 基因在整个沙棘植株中的表达情况见图 11。由图 11A 可见,除在干旱胁迫第 2 天的 CMO 基因表达量低于

对照组,其余处理均高于对照水平。同时随着干旱胁迫的增强,CMO 基因的表达量呈现出先升高后降低的趋势,在胁迫第 11 天达到最大值(14.83);胁迫 15 d 时表达量又降低(10.25);复水后表达量有所降低,但比对照组高。由图 11B 可见,不同处理下,沙棘根的 CMO 基因表达量总和最高(26.15),茎次之(10.31),叶最低(13.00)。说明沙棘的 CMO 基因在根中的表达水平高,在叶中的表达水平最低。

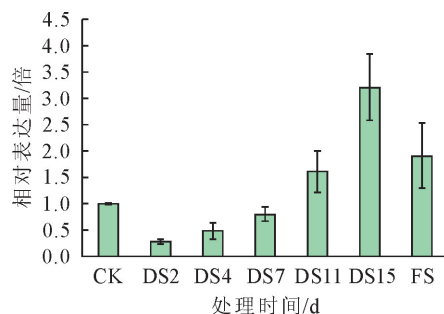


图 9 不同干旱胁迫下沙棘茎中 CMO 基因的表达情况

Fig. 9 Expression of CMO gene in stem of *H. rhamnoides* under different drought stress

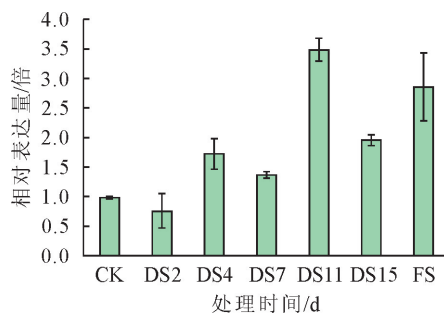


图 10 不同干旱胁迫下沙棘叶中 CMO 基因的表达情况

Fig. 10 Expression of CMO gene in leaf of *H. rhamnoides* under different drought stress

3 结论与讨论

本研究通过对中国沙棘 CMO 蛋白的研究,发现中国沙棘 CMO 蛋白定位于叶绿体中,二级结构预测显示无规则卷曲为中国沙棘 CMO 蛋白二级结构的主要构成元件,三维结构均主要由 α 螺旋、 β 折叠和无规则卷曲互相盘绕而成。Nuccio 等^[24]发现菠菜(*Spinacia oleracea*)CMO 基因表达产物定位于叶绿体基质中,与本研究结论一致。同时发现,中国沙棘的 CMO 基因与马玉花等^[25]得出的梭梭(*Haloxylon ammodendron*)CMO 基因大小及蛋白结构相似。而徐晟等^[26]通过对石蒜(*Lycoris radiata*)的研究发现,石蒜 CMO 的氨基酸序列与海枣(*Phoenix dactylifera*)、香蕉(*Musa paradisiaca*)等植物 CMO 氨基酸序列的一致性在 70% 以上。与本研究结论一致。表明 CMO 基因编码的氨基酸与

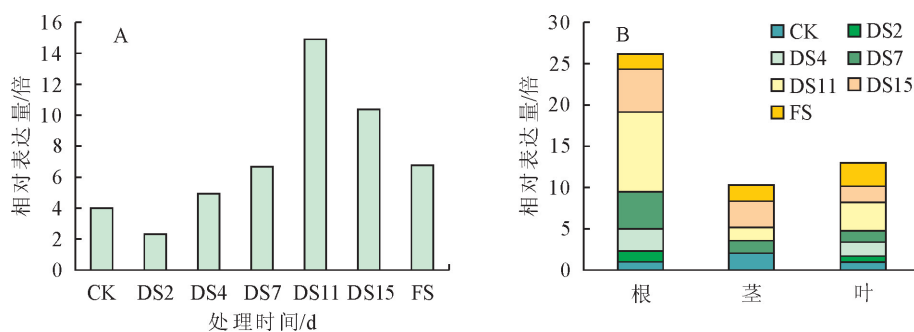


图 11 不同干旱胁迫下沙棘叶中 CMO 基因的表达情况

Fig. 11 Expression of CMO gene in *H. rhamnoides* leaves under different drought stresses

其他植物 CMO 蛋白具有较高的一致性,CMO 基因具有较高的保守性。

蛋白质的磷酸化是最普遍、最重要的一种蛋白翻译后的修饰方式。一般来说,多肽链中的氨基酸潜在的磷酸化位点越多,发挥更多功能的可能性就越大^[27]。本研究中,功能位点预测显示中国沙棘的 CMO 包含 8 个蛋白激酶 C 磷酸化位点、4 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点、2 个酪氨酸激酶磷酸化位点及 7 个 N-端豆蔻酰化位点,可以看出 C 磷酸化在该蛋白中占主导地位,推测 C 磷酸化可能在 CMO 蛋白行使功能的过程中发挥重要作用。庞宁宁等^[28]对能有效应对自然胁迫的黄瓜 (*Cucumis sativus*) PP2-A1 蛋白进行研究时,也发现 PP2-A1 蛋白有 4 个丝氨酸位点、4 个苏氨酸位点、1 个酪氨酸位点,说明磷酸化位点可能与应对胁迫相关的基因、蛋白有关。这些磷酸化位点为今后基因表达调控、蛋白修饰提供了参考位点。此外中国沙棘 CMO 基因还包括了 7 个 N-端豆蔻酰化位点。相关研究发现豆蔻酰化蛋白是调节细胞生长发育、参与信号传导、肿瘤发生和病毒复制组装等过程的重要功能性蛋白^[29],一些蛋白的生物学活性极大程度地依赖于其 N-端豆蔻酰化^[30],所以植物信号传导可能与豆蔻酰化与蛋白息息相关,这些位点为 CMO 执行催化功能合成甜菜碱醛提供了活化位点及催化位点。中国农业大学杨淑华揭示的蛋白激酶 OST1 被低温激活的分子机制,也表明豆蔻酰开关可能参与了植物对低温信号的感知与转导^[31]。由此可见,中国沙棘的 CMO 基因与其抵御外界胁迫息息相关。

不同干旱胁迫程度下沙棘 CMO 基因的表达情况研究结果表明,沙棘 CMO 基因表达量随处理时间的延长,基本呈逐渐增长的趋势,直至胁迫末期或者复水后才有所降低,接近正常水平的对照组。Russell^[32]发现甜菜 (*Beta vulgaris*) 受到干旱胁迫时,CMO 基因的转录水平性提高了 5 倍,当恢复正常生长条件时,CMO 基因的表达量也随之降低到原来的水平。本研究中,随着胁迫时间的增加,根茎

叶中的 CMO 基因的表达量均有增加,与 Russell 的试验结果一致。佟少明等^[33]对辽宁碱蓬 (*Suaeda liaotungensis*) SICMO 研究时也表明根是植物感受土壤环境的第一器官,并发现 CMO 对盐胁迫的最早响应在根中,与本研究中首先增加的是根中的 CMO 表达量结果一致。出现这种现象可能是由于此时根中已经做出应答反应,而茎和叶还未能及时做出反应。而随着胁迫的逐步增强,根系已经无法提供足量的水分,叶片中的水分逐渐丧失,因此到后期,叶片的 CMO 基因表达量剧增维持叶部原有水分,这与吕笑言等^[34]对甜菜 CMO 基因在盐胁迫下的表达的研究相同。本研究中胁迫后期 CMO 的表达量又回落到之前的状态。可能是由于此时沙棘已处于极度失水状态,能量 ATP 及相关物质的合成均无法满足后续的高表达量。而复水初期叶片仍处于失水状态,同时能量 ATP 等物质的合成也随着水分的提供增加,因此 CMO 的表达量较复水前仍有所增加。根、茎、叶中基因的表达特征说明不同组织中沙棘 CMO 基因表达存在差异,这可能与沙棘所处的生长环境与生理期有关。本研究通过对青海旱生中国沙棘 CMO 基因的克隆、序列分析及结构预测,在此基础上对干旱胁迫下的沙棘 CMO 基因时空表达模式进行了研究。将为沙棘 CMO 基因的表达特性研究奠定基础,并为沙棘抗逆分子机制的阐明提供依据。

参考文献:

- [1] CAO Z, LI T, LI G, et al. Modular growth and clonal propagation of *Hippophae rhamnoides* subsp. *sinensis* in response to irrigation intensity[J]. Journal of Forestry Research, 2016, 27 (5): 1019-1028.
 - [2] 胡杜娟, 胡建忠, 魏学智. 不同沙棘品种的抗旱性比较[J]. 北方园艺, 2017, (7): 27-30.
 - [3] 樊梦颖, 张明明, 张情, 等. 不同月份沙棘根瘤细菌群落结构特征的分析对比[J]. 西北林学院学报, 2020, 35(6): 160-167.
- FAN M Y, ZHANG M M, ZHANG Q, et al. Analysis and comparison of bacterial community structure characteristics of sea buck-

- thorn nodules in different months[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2020, 35(6): 160-167. (in Chinese)
- [4] CHEN S Y, ZHANG X Z. Characterization of the complete chloroplast genome of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) [J]. Conservation Genet Resour, 2017, 4(9): 623-626.
- [5] EVAI, MARTINA B, MARGARITA T, *et al.* Biological properties of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) derived products[J]. Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria, 2020, 19(2): 195-205.
- [6] TIITINEN K M, YANG B, HARALDSSON G G, *et al.* Fast analysis of sugars, fruit acids, and vitamin C in sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) [J]. J. Agric. Food Chem., 2006, 54(7): 2508-2513.
- [7] 吴林, 霍焰, 聂小兰. 沙棘叶片组织结构观察及其与抗旱性关系的研究[J]. 吉林农业大学学报, 2003, 25(4): 390-393.
- WU L, HUO Y, NIE X L. Observation of tissue structure of sea buckthorn leaves and its relationship with drought resistance[J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2003, 25(4): 390-393. (in Chinese)
- [8] 李晓燕, 王林, 李连国, 等. 沙棘茎的形态解剖特征与其生态适应性研究[J]. 干旱区资源与环境, 2008, 22(3): 187-191.
- [9] 武玉叶, 李德全, 赵世杰, 等. 外源渗透物质对渗透胁迫下小麦幼苗叶片水分状况和光合作用的影响[J]. 植物生理学通讯, 1999, 35(1): 23-25.
- [10] JONES R G, TOREG R A. Ahypothesis on cytoplasmic osmoregulation[C]//MARA E C. Regulation of cell membrane activities in plants. Northholland: Amsterdam, 1977: 121.
- [11] 李顺泽, 伍振煌, 王俊龙. 甜菜碱的生物功能、药理活性及其在动物生产中的应用研究进展[J]. 饲料研究, 2022, 45(21): 150-155.
- [12] 王国霞, 卢超, 赵奇, 等. 外源甜菜碱对低温胁迫下油茶生理特性的影响[J]. 西北林学院学报, 2020, 35(5): 78-84.
- WANG G X, LU C, ZHAO Q, *et al.* Effects of exogenous betaine on physiological characteristics of *Camellia oleifera* under low temperature stress[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2020, 35(5): 78-84. (in Chinese)
- [13] GOEL D, SINGH A K, YADAV V, *et al.* Transformation of tomatowith a bacterial cod a gene enhances tolerance to saltand water stress[J]. J. Plant Physiol, 2011, 168(11): 1286-1294.
- [14] 王世豪, 朱芳铭, 孙梦利, 等. 外源甜菜碱调节西瓜细胞渗透胁迫研究[J]. 热带作物学报, 2020, 41(9): 1816-1821.
- [15] 刘振林, 尹伟伦, 戴思兰. 菠菜甜菜碱醛脱氢酶基因同源片段的克隆与序列分析[J]. 分子植物育种, 2006(1): 35-40.
- [16] 郑贞贞, 李佳, 叶广继, 等. 马铃薯青薯九号甜菜碱醛脱氢酶基因(StBADH)克隆及进化分析[J]. 分子植物育种, 2017, 15(9): 3417-3427.
- [17] 孙梦利, 徐子健, 龙娅丽, 等. 西瓜 CMO 基因序列分析及受乙烯诱导后表达特性分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2018, 37(1): 350-357.
- [18] 罗伯祥, 肖自友, 邓力华, 等. 转山菠菜胆碱单加氧酶基因(AhCMO)水稻创制及其耐盐性研究[J]. 生命科学研究, 2010, 14(3): 219-225, 245.
- [19] 石磊, 甘晓燕, 夏兴雷, 等. 梭梭 CMO 基因的克隆与植物表达载体的构建[J]. 西北植物学报, 2010, 30(8): 1514-1519.
- SHI L, GAN X Y, XIA X L, *et al.* Cloning of CMO gene and construction of plant expression vector[J]. Northwestern Botanical Journal, 2010, 30(8): 1514-1519. (in Chinese)
- [20] 任小燕, 杜建中, 孙毅. 转 AhCMO 基因玉米后代的获得及耐盐性鉴定[J]. 分子植物育种, 2013, 11(3): 332-338.
- [21] 牛雅静, 王淑慧, 黄河, 等. 甘菊 CMO 同源基因的分离与表达分析[J]. 生物技术通报, 2012, 237(4): 58-62.
- [22] 周树峰, 李秋莉, 吴元奇, 等. 农杆菌介导的辽宁碱蓬胆碱单氧化酶基因 CMO 转化烟草提高抗氧化胁迫的研究[J]. 中国农学通报, 2010, 26(15): 44-47.
- [23] LIVAK K L, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using Real-Time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method[J]. Methods, 2001, 25: 402-408.
- [24] NUCCIO M L, RUSSELL B L, NOLTE K D. The endogenous choline supply limits glycine betaine synthesis in transgenic tobacco expressing choline monooxygenase [J]. The Plant Journal, 1998, 16(4): 487-496.
- [25] 马玉花, 冶贵生, 冯志鹏. 柴达木盆地梭梭 CMO 基因的克隆及其蛋白结构预测[J]. 西北林学院学报, 2016, 31(2): 115-119.
- MA Y H, YE G S, FENG Z P. Cloning of CMO gene and protein structure prediction of shuttle CMO gene in Qaidam Basin[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2016, 31(2): 115-119. (in Chinese)
- [26] 徐晟, 蒋明敏, 江宜龙, 等. 石蒜 LrCMO 基因的克隆及表达分析[J]. 分子植物育种, 2017, 15(4): 1240-1248.
- [27] 李洁琼, 李小万. 小胸鳖甲 Attacin 基因结构与功能生物学分析[J]. 湖北农业科学, 2022, 61(24): 170-176.
- [28] 庞宁宁, 樊怀福, 王哲, 等. 黄瓜 PP2-A1 蛋白的生物信息学分析[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(2): 46-49.
- [29] TOWLER D A, GORDON J I, ADAMS S P. The Biology and Enzymology of Eukaryotic Protein Acylation[J]. Annual Review of Biochemistry, 1988, 57(1): 69-97.
- [30] DURONIO R J, TOWLER D A, HEUCKEROTH R O. Disruption of the yeast N-myristoyl transferase gene causes recessive lethality[J]. Science, 1989, 243(4892): 796-800.
- [31] 杨淑华. 蛋白激酶 OST1 通过调节 ICE1 的稳定性调控拟南芥的抗冻性[J]. 科学新闻, 2016, 519(1): 96.
- [32] RUSSELL B L. Osmotic Stress induces expression of choline monooxygenase in sugar beet and amaranth[J]. Plant Physiology, 1998, 116(2): 859-865.
- [33] 佟少明, 尹辉, 夏冰, 等. 辽宁碱蓬 SICMO 基因盐胁迫表达分析及盐诱导启动子鉴定[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2016, 32(3): 332-338.
- TONG S M, YIN H, XIA B, *et al.* Analysis of salt stress expression and salt-induced promoter identification of SICMO gene in Liaoning Province[J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biol, 2016, 32(3): 332-338. (in Chinese)
- [34] 吕笑言, 王宇光, 金英. 甜菜 BvM14-CMO、BvM14-BADH 基因的克隆、盐胁迫表达及生物信息学分析[J]. 黑龙江大学自然科学学报, 2018, 35(1): 83-88.
- LÜ X Y, WANG Y G, JIN Y. Cloning, salt stress expression and bioinformatics analysis of sugar beet BvM14-CMO and BvM14-BADH genes[J]. Journal of Natural Sciences of Heilongjiang University, 2018, 35(1): 83-88. (in Chinese)