



拟南芥液泡膜水孔蛋白的互作蛋白 AtSM34 参与种子萌发的渗透胁迫响应

李丽娟^{①†}, 任飞^{②†}, 魏鹏程^①, 陈其军^①, 陈珈^①, 王学臣^{①*}

① 中国农业大学生物学院, 植物生理学与生物化学国家重点实验室, 北京 100193;

② 北京市农林科学院林业果树研究所, 北京 100093

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: xcwang@cau.edu.cn

2011-07-27 收稿, 2011-09-01 接受

国家重点基础研究发展计划(2006CB100100)、国家自然科学基金(3077019)和高等学校学科创新引智计划(B06003)资助

摘要 水孔蛋白(aquaporin, AQP)广泛参与植物的各种生理活动, 但还有许多调控机制未被发现. 为进一步对其调控因子进行研究, 运用酵母双杂交筛选拟南芥液泡膜水孔蛋白 TIP1;1 (tonoplast intrinsic protein, TIP)的互作子, 这是拟南芥中第一个被发现的液泡膜上具有高度水转运活性的蛋白. 以 AtTIP1;1 为诱饵, 筛选得到一个新的 TIPs 结合蛋白, 并在酵母和植物细胞中验证了这种结合. 该蛋白被命名为 AtSM34, 编码一个含 309 个氨基酸的多肽, 预测分子量为 34 kD, 具有 1 个单独的 MYB/SANT 样结构域. AtSM34 启动子融合 GUS 组织化学染色分析显示, 其表达主要位于花、茎和叶中, 尤其是维管束组织, 并且响应渗透胁迫. AtSM34 定位于内质网, 截断分析显示其 N 端(1~83 位氨基酸)对于其定位至关重要. 过表达 AtSM34 导致转基因植物对外源甘露醇、山梨醇及脱落酸更加敏感, 表现为萌发延迟. 进一步研究发现, AtSM34 也可与 AtTIP1;2 和 AtTIP2;1 结合, 这 2 个 TIP 蛋白对液泡渗透调节发挥着重要作用, 并在种子萌发阶段大量表达. 这暗示着 AtSM34 可能通过影响水孔蛋白基因的表达, 参与种子萌发早期阶段的渗透胁迫响应.

关键词

拟南芥
渗透胁迫
液泡膜水孔蛋白
内质网

水孔蛋白(aquaporin, AQP)是细胞膜上介导水分渗透调节的一类通道蛋白^[1], 对植物生长发育发挥重要作用. 水孔蛋白的调节及其综合功能的发挥对于胁迫条件下保持水平衡具有重要作用^[2].

水孔蛋白的活性可被多种因素所调控, 包括磷酸化、异聚化、pH、Ca²⁺、温度以及溶质浓度等, 调节其开闭方式^[3-6]. 最近有研究发现, 一些膜结合蛋白或细胞质蛋白可通过与水孔蛋白的互作, 甚至形成蛋白复合体, 来参与调控水孔蛋白的表达、活性及其在膜定位的动态转运. 在动植物中都不乏有这样的例子. 单独 1 个 AQP0 四聚体可与 2 个钙调素(calmodulin, CaM)分子以 Ca²⁺依赖的方式结合, 并且

调控其通道活性^[7]. 热激蛋白(heat shock protein 70, Hsp70)可与 AQP2 互作, 并在鼠肾细胞中调控其转运^[8]. 植物中的研究发现, 黄瓜花叶病毒(*Cucumber mosaic virus*, CMV)1a 可与拟南芥的 TIP1 和 TIP2 存在互作, 并可能通过互作来调控 CMV 在液泡膜上的复制^[9]. 大豆胞质内的谷氨酸盐合酶可与 NOD26 的 C 端相互作用, 对促进氮源的高效吸收固定、阻止氨毒害具有重要作用^[10]. 还有一些蛋白可通过与水孔蛋白的互作, 调控水孔蛋白的数量及定位, 从而响应外界的环境胁迫. 在拟南芥中过表达辣椒的 E3 泛素连接酶同源基因 *Rma1H1*, 导致 AtPIP2;1 蛋白表达下降, 并且在原生质体中抑制了 PIP2;1 从内质网

英文版见: Li L J, Ren F, Wei P C, et al. Identification of AtSM34, a novel tonoplast intrinsic protein-interacting polypeptide expressed in response to osmotic stress in germinating seedlings. *Chinese Sci Bull*, 2011, 56, doi: 10.1007/s11434-011-4793-4

(endoplasmic reticulum, ER)向质膜的转运. 由于体内质膜水孔蛋白的下降, 转基因拟南芥植物的抗旱性大大提高^[11].

液泡作为植物所特有的重要器官, 在膨压调节、渗透调控、细胞信号存储和降解等方面发挥着重要作用. 液泡膜内在水孔蛋白(tonoplast intrinsic proteins, TIPs)是一类液泡膜定位的水孔蛋白^[12]. *TIP* 基因表达的变化可能会影响水通过液泡膜的运动, 从而影响植物的非生物胁迫响应^[13]. 对冰草花叶植物(*Mesembryanthemum crystallinum*)渗透胁迫的研究发现, 甘露醇诱导的水分失衡使 McTIP1;2 (McMIPF)蛋白表达升高, 并且导致其重新分布于内涵体组分, 这些变化暗示着 McTIP1;2 对渗透胁迫的响应^[14].

AtTIP1;1 属于拟南芥液泡膜水孔蛋白亚家族, 是最早在爪蟾卵母细胞表达系统中发现的具有高度水转运活性的蛋白之一^[15]. 拟南芥中 AtTIP1;1 的敲除突变体 *tip1;1-1* 及 TIP1;1 与 TIP1;2 的双突变体 *tip1;1-1/tip1;2-1* 都没有显示出与野生型有任何明显不同的表型, 这可能是 TIP 同源基因的功能冗余所造成的^[16,17]. 但这些研究背后也暗示着与 AtTIP1;1 相关的功能及调控机制可能仍未被发现.

本研究希望通过寻找 AtTIP1;1 的互作蛋白来更好地探索其功能. 我们以 AtTIP1;1 为诱饵, 通过分裂泛素化酵母双杂系统筛选得到一个新的互作蛋白, 并且在双分子荧光互补(bimolecular fluorescence complementation, BiFC)实验中证实了二者的互作. 所得到的新蛋白编码一个 309 个氨基酸的多肽, 预测分子量为 34 kD, 并且含有一个 MYB/SANT 样结构域, 因此命名其为 AtSM34, 与 maMYB 具有相同的 AGI 编号^[18], 虽然其并未被归入拟南芥中所鉴定的典型 MYB 基因^[19]. 过表达 *AtSM34* 可导致转基因植株的萌发和早期生长阶段对外源渗透胁迫比野生型更加敏感. 进一步研究显示, 其定位于内质网, N 端对于其定位具有重要作用. 进一步研究发现, AtSM34 与 AtTIP1;2 和 AtTIP2;1 这 2 个在种子萌发阶段大量表达的 TIP 蛋白也有结合. 这暗示着 AtSM34 可能通过与 AtTIPs 的结合, 影响拟南芥种子萌发时期内源 *TIP* 基因的表达.

1 材料与方法

(i) 植物材料及生长条件. 所有实验使用拟南芥 Columbia-0 为野生型. 转基因标记野生型液泡的

种子 35S::spRFP-AFVY(云扁豆蛋白的 C 端液泡分选信号 AFVY 四肽, 融合于红色荧光蛋白(red fluorescent protein, RFP)的 C 端)由 Warwick 大学的 Lorenzo Frigerio 博士惠赠. 拟南芥种子在 0.5%次氯酸钠中浸泡 15 min, 用灭菌的重蒸水漂洗 5 次, 播种于 1/2 MS 培养基(Sigma, 美国)中, 含 1%蔗糖, 0.5%植物凝胶(Sigma), pH 调至 5.8. 放入 4℃冰箱春化 3 d, 然后移入光照培养箱. 长日照条件 22~23℃, 16 h (光)/20℃, 8 h (暗)为周期光照培养. 取生长于 1/2 MS 加 1%蔗糖培养基的 6 d 小苗, 于 1/2 MS 液体培养基加入研究所需的胁迫条件进行处理, 随后进行后续 mRNA 分析.

(ii) 酵母分裂泛素化系统筛选及互作分析. 本实验选用 DUAL 膜系统(DUALsystems Biotech, 瑞士)筛选膜蛋白 AtTIP1;1 互作蛋白. *TIP1;1* 编码区用 *Sfi*I 酶切位点克隆于 pTMBV4 诱饵载体. 所用引物如下: TIP1 正向: 5'-GGCCATTACGGCCTTAAAAATGCCGATCAGAAACATC-3'; TIP1 反向: 5'-GGCCGAGGCGGCCCGTAGTCTGTGGTTGGGAGCT-3'.

拟南芥 NubG-x cDNA 文库(P02210)被用于 AtTIP1;1 互作蛋白的筛选鉴定. cDNA 的筛选使用酵母菌株 DSY-1, 酵母转化步骤见 DUAL 系统技术指南. 转化子涂布于亮氨酸、色氨酸和组氨酸, 并加入 10 mmol/L 3-氨基-1,2,4-三氮唑(3-AT)的三缺培养基. 得到的阳性克隆在上述培养基重复培养, 并进行 β-半乳糖苷酶活性检测. 蓝色的阳性克隆质粒从酵母中提取并转化大肠杆菌 *E. coli* 后进行测序. 为进一步验证互作, 分离出来的捕获质粒分别与含诱饵 *pTMBV4-TIP1;1* 或对照 *pMBV-Alg5* 的酵母 DSY1 一对一进行转化.

(iii) 双分子荧光互补(BiFC)研究与共聚焦成像分析. BiFC 分析参照文献[20]中所述. 实验所用引物: TIP1-B 正向: 5'-GCTCTAGAATGCCGATCAGAAACATCG-3'; TIP1-B 反向: 5'-CGGGATCCGTAGTCTGTGGTTGGGAGCT-3'; TIP12-B 正向: 5'-GCTCTAGAATGCCGACCAGAAACATCG-3'; TIP12-B 反向: 5'-CGGGATCCGTAATCGGTGGTAGGCAATG-3'; TIP21-B 正向: 5'-GCTCTAGAATGGCTGGA-GTTGCCCTTTGG-3'; TIP21-B 反向: 5'-GGGGTACC-GAAATCAGCAGAAGCAAGAGG-3'; SM34-B 正向: 5'-GCTCTAGAATGGATTTTTTCGACGAAGAC-3'; SM34-B 反向: 5'-CGGGATCCATTAGCTGGAGTTT-

TCGAGC-3'; SM34-250B 正向: 5'-GCTCTAGAATG-GGTAAGATTCGCGTCGGTT-3' (限制性内切酶位点如下画线所示).

PCR 扩增得到 *AtTIP1;1*, *AtTIP1;2* 和 *AtTIP2;1* 编码区, 分别克隆于 pUC-SPYCE 载体^[20]并测序. *AtSM34* 编码区全长及截去 N 端 1~83 位氨基酸的片段(*AtSM34Δ83aa*)插入 pUC-SPYNE 载体并测序正确. *pUC-SPYNE-AtSM34Δ83aa* 和 *pUC-SPYNE-AtSM34* 与上述质粒及对照载体分别用 PEG 介导转化拟南芥叶肉原生质体^[21], 所有转化用不同批次的拟南芥叶肉原生质体材料至少重复 3 次. FM4-64 (N-(3-triethylammoniumpropyl)-4-(6-(4-(diethylamino) phenyl)hexatrienyl) pyridinium dibromide; Invitrogen, 美国)用 DMSO 溶解至 1 mmol/L, 并用 W5 溶液将母液稀释至 15 μmol/L 用于叶肉原生质体染色, 染色 2 h 后用 W5 溶液漂洗 3 遍, 激光共聚焦显微镜(LSM 510 META, Zeiss, 德国)下进行观察.

激光共聚焦显微镜(LSM 510 META)用于图像分析, 在 40 倍油镜(Plan-NEOFLUAR, NA 1.3)下进行观察. 黄色荧光蛋白(yellow fluorescent protein, YFP)检测激发波长为 488 nm, 在发射波长为 515~530 nm 处收集. FM4-64 和 RFP 的检测激发波长为 543 nm, 在发射波长为 585~615 nm 处采集. 荧光采集为多通道模式. 所用共聚焦图像 LSM 采用图像浏览器 3.2 (Zeiss)并输出为 TIFF 文件.

(iv) *AtSM34* 启动子区的分离及 GUS 组织化学分析. 为研究 *AtSM34* 的组织特异性表达, 用 KOD DNA 聚合酶以基因组 DNA 为模板 PCR 扩增 *AtSM34* 基因 ATG 上游 1035 bp 的启动子区, 所用引物如下: 正向: 5'-CGCGGATCCTACTCAAAGCAAACAAC-GAAG-3'; 反向: 5'-GGCGAATTCGTGTTGCTCTGT-TGCACTGTAGA-3'(限制性内切酶位点如下画线所示).

扩增产物测序正确后用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 位点插入 pCAMBIA1391 载体^[22]. 之后转化农杆菌 GV3101 并转化拟南芥 Col-0. GUS 染色分析按照文献[22]所示.

(v) *AtSM34*-GFP 融合蛋白的亚细胞定位. *AtSM34* 可读框全长用 *Xba* I 和 *Bam*H I 位点克隆于瞬时表达载体 pUC-EGFP^[23] 35S 启动子下游. 用 *Xba* I 和 *Bam*H I 内切酶将 *AtSM34Δ83aa* 片段从

pUC-SPYNE-AtSM34Δ83aa 切下, 连入 pUC-EGFP. *AtSM34* 编码区也由 PCR 扩增, 融合至绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)的 C 端, 并通过 *Spe* I 和 *Sal* I 酶切位点连入改造后 35S 驱动的 pCAMBI-A1300 载体^[24]. 所用引物如下: 正向: 5'-GACTAGT-ATGGATTTTTTCGACGAAG-3'; 反向: 5'-ACGC-GTCGACTTAATTAGCTGGAGTTTT-3' (限制性内切酶位点如下画线所示). 构建的 DNA 质粒由 PEG 介导转化拟南芥叶肉原生质体^[21].

AtSM34 编码区融合 GFP 克隆至 pBI121 载体^[25], 由 35S 驱动, 进行稳定表达研究. 通过农杆菌 GV3101 介导转化拟南芥. 激光共聚焦显微镜观察 35S::*AtSM34*-GFP 转基因的卡那抗性拟南芥幼根. 5 个不同的 35S::*AtSM34*-GFP 转基因株系用于融合蛋白的定位观察. GFP 的激发光波长为 488 nm, 515~530 nm 收集, Zeiss 40 倍油镜下观察. 观察 ER, 转化的拟南芥叶肉原生质体和 35S::*AtSM34*-GFP 转基因根, 用 1 μmol/L red-orange-fluorescent BODIPY 558/568-conjugated brefeldin A (B7449, Invitrogen, Eugene, OR, 美国)染色 30 min. 荧光检测激发波长为 543 nm, 发射波长在 585~615 nm.

(vi) 反转录半定量和实时定量 PCR 分析. 样品收集和总 RNA 提取使用 RNA 纯化试剂盒(BioTeke, 北京), 方法参照说明书. 反转录使用 M-MLV 反转录酶(Promega, Madison, WI, 美国)和 Oligo-dT18 引物(TaKaRa, 大连). 合成的 cDNA 用于半定量和定量 PCR 分析.

半定量 RT-PCR 分析所用 *SM34* 基因特异的引物如下: 45420-171 正向: 5'-TGAACCTGCCAAATCGC-TAC-3'; 45420-741 反向: 5'-ACCTTCCGCATCTCCA-CC-3'. 以 *ACTIN2/8* (*At3g18780*) mRNA 表达作为内参. 半定量 RT-PCR 所用的特异引物为: 5'-TCTTC-CGCTCTTTCTTTCCA-3'和 5'-GAGAGAACAGCTT-GGATGGC-3'^[26]. *ACTIN2/8* 和 *AtSM34* 分别扩增 23 和 29 个循环. PCR 程序如下: 94°C, 30 s; 56°C, 30 s; 72°C, 50 s. 最后, 72°C, 7 min, 完成产物合成. 实时定量 PCR 分析所用 *AtSM34* 基因的特异引物如下: 45420 正向: 5'-TGATGATTACGCTCAGTTT-3'; 45420 反向: 5'-ACCTTCCGCATCTCCACC-3'. 实时定量 PCR 分析所用 *ACTIN2/8* 基因的引物为: *ACTIN2/8*-正向: 5'-GGTAACATTGTGCTCAGTGGTGG-3'; *ACTIN2/8*-反向: 5'-AACGACCTTAATCTTCATGCTGC-3'^[27].

所检测基因的相对表达水平对照 *ACTIN2/8* 表达的标准曲线用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法^[28]计算. 实时定量 PCR 实验进行 3 次独立的重复.

(vii) 过表达 *AtSM34* 株系分析. Pfu DNA 聚合酶用如下引物从拟南芥幼苗 cDNA 扩增得到 *AtSM34* 编码区全长. 45420 正向: 5'-GCTCTAGAATGGA-TTTTTTCGACGAAGAC-3'; 45420 反向: 5'-GGGG-TACCATTAGCTGGAGTTTTTCGAG-3' (限制性内切酶位点如下画线所示).

扩增片段用 *Xba* I 和 *Kpn* I 位点连入改造的 pSuper1300 载体^[29]并测序正确. 改造 pSuper1300 载体, PCR 扩增得到 *FLAG* 片段用 *Kpn* I 和 *Sac* I 位点插入到 pSuper1300 载体. 所构建载体(pSuper1300-*AtSM34-FLAG-TNOS*)转化农杆菌 GV3101, 并采用悬滴法转化野生型拟南芥^[30]. 转基因植株用 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的潮霉素进行筛选. 具有抗性的转基因植株移入土中温室生长. 根据 T_2 代和 T_3 代种子的抗性分离比, 选取 T_3 代纯和株系进行表达分析和表型鉴定.

野生型 *AtSM34* 转基因过表达株系(OE-6 和 OE-10)每种大约 60 粒种子铺于含 1% (w/v)蔗糖的 1/2 MS 培养基上, 分别加入 400 mmol/L 甘露醇、400 mmol/L 山梨醇、1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 脱落酸(abscisic acid, ABA). 4 $^{\circ}\text{C}$ 培养 3 d, 然后移入长日照条件 22 $^{\circ}\text{C}$ 培养. 每天计算萌发数(以胚根露出)持续 5 d. 植物生长 7 d 后照相. 实验进行 3 次独立重复.

(viii) Western blot 分析. 培养的植物材料用蛋白提取缓冲液提取总蛋白. 用 Bio-Rad Minigel 电泳仪系统(Bio-Rad, 美国) 12% (w/v)的胶进行 SDS-PAGE. 分离的蛋白转移至 PVDF 膜, 然后用 flag 抗体(Sigma) 作为一抗(1:10000 稀释)孵育. 之后用 TBS-T 缓冲液洗 3 遍, 再用辣根过氧化物酶耦联亲和纯化的羊抗兔 IgG [H+L]作为二抗孵育 1 h. 再重复前面的漂洗过程, 之后用增强的化学发光系统(ECL, Amersham Biosciences, 瑞士)检测膜上的蛋白.

2 结果

2.1 酵母泛素分裂系统分析 *AtSM34* 与 *AtTIP1;1* 的互作

为寻找 *AtTIP1;1* 的互作蛋白, 以其为诱饵用分离泛素化酵母双杂交系统(DUAL)筛选拟南芥 6 d 小苗的 NubG-x cDNA 文库. 对从阳性克隆分离得到的

捕获质粒进行测序. 进一步分析发现 1 个独特的克隆, 编码 1 个含 309 个氨基酸的多肽(*AtSM34*, At5g45420), 预测分子量为 34 kD, 具有类似 MYB/SANT 样结构域. 最近有报道其可能作为膜滞留的转录因子对根毛的伸长具有重要作用^[18].

为证实 *AtSM34* 与 *AtTIP1;1* 的互作, 捕获质粒 *pDL2-Nub-AtSM34* 重新转化至表达有 *pTMBV4-TIP1;1-Cub* 诱饵载体的酵母菌 DSY1. 转化子可以在含 10 mmol/L 3-AT 的 SD/-His-Trp-Leu 培养基上生长, 用 X-gal 进行 β 半乳糖苷酶活性检测为阳性(图 1(a)). 阴性对照 *pDL2-Nub-AtSM34/pMBV-Alg5* 和 *pTMBV4-TIP1;1-Cub/pAlg5-NubG* 均未观察到互作, 说明 *AtSM34* 和 *TIP1;1* 可以在酵母细胞中发生相互作用.

2.2 双分子荧光互补(BiFC)研究

双分子荧光互补(BiFC)实验进一步证实了 *AtTIP1;1* 与 *AtSM34* 的结合. *TIP1;1* 融合于 YCE, *AtSM34* 融合于 YNE, 分别共转化 35S::*spRFP-AFVY* 转基因植株及野生型拟南芥的叶肉原生质体. 重组的 YFP 荧光定位于斑点状类似前体液泡的小囊泡结构(图 1(c))中. 以前有报道 35S::*spRFP-AFVY* 广泛定位于中央大液泡腔内^[31]. 液泡融合是动态变化的, 带有 RFP 的 AFVY 四肽可以标记各种囊泡, 也可同时标记蛋白存储液泡(protein-storage vacuoles, PSVs), 密集型囊泡(dense vesicles, DV)或堆积前体囊泡(precursor-accumulating vesicles, PAC)^[32]等. 图 1(c)中箭头所指的 YFP 荧光与散布于中央大液泡周围的红色小囊泡结构是有重合的. 此外, 为进一步验证这个结构, 我们用荧光染料 FM4-64 将原生质体进行染色, FM4-64 作为一种有利工具, 可以在活细胞中追踪囊泡内吞的运输过程^[33]. YFP 荧光能够与 FM 4-64 染料在胞内部分共定位, 但不位于中央大液泡膜上(图 1(c)中部叠加图), 表明该结合可能发生于小囊泡中, 暗示 *AtSM34* 有可能参与囊泡运输过程.

与上述 BiFC 分析相比, 当 *TIP1;1* 分别融合于分裂的 YFP 的 N 端和 C 端, 瞬时转化 FM4-64 染色的拟南芥叶肉原生质体. 水孔蛋白在体内行使生物学功能时可以形成同源四聚体. 重组的 YFP 荧光主要位于中央大液泡的膜上及其紧邻的球形小液泡上(图 1(c)下排图片). 这些结果暗示, *AtTIP1;1* 与 *AtSM34* 的互作发生于囊泡中, 而不在中央大液泡膜上.

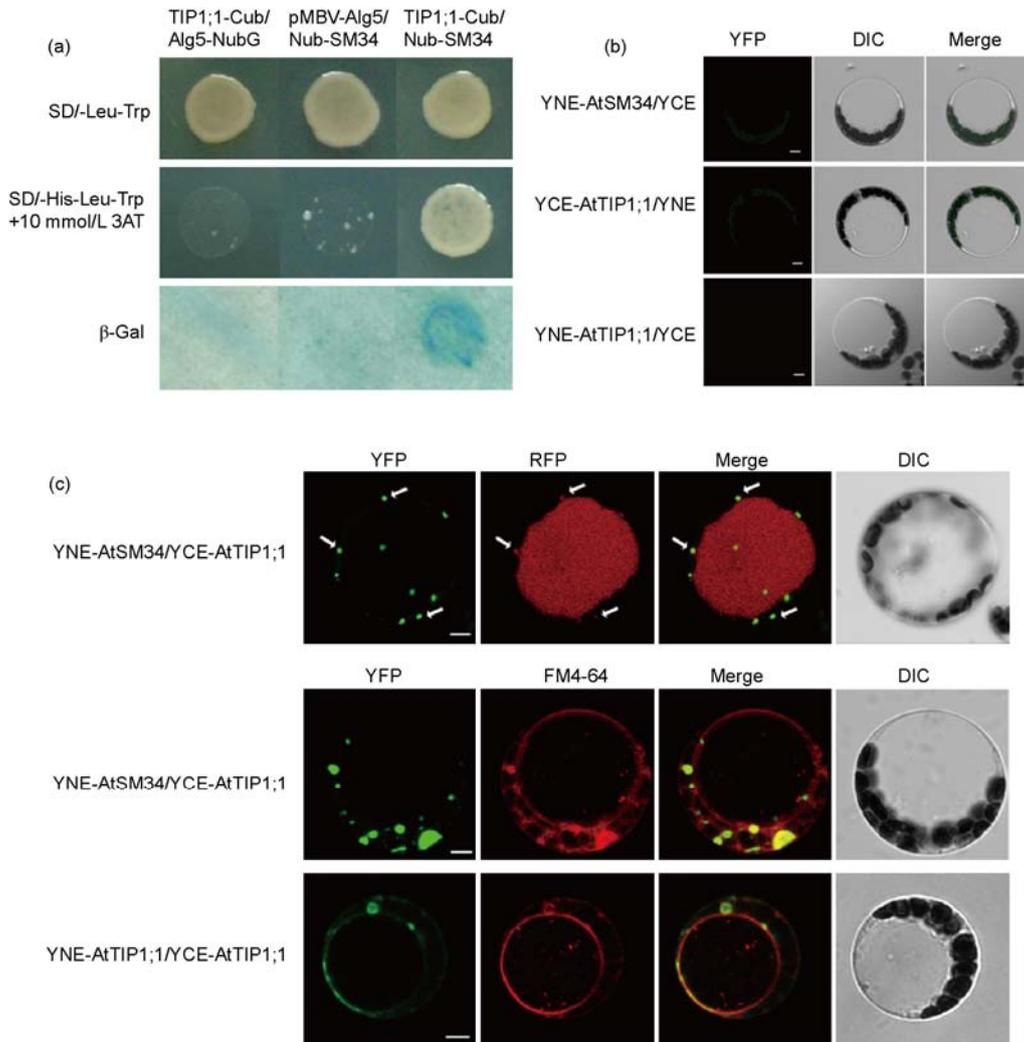


图1 酵母泛素分裂系统及双分子荧光互补(BIFC)实验分析 AtTIP1;1 与 AtSM34 的结合

(a) 酵母泛素分裂系统实验分析 AtTIP1;1 与 AtSM34 的结合. 将 *pTMBV4-TIP1;1-Cub* 与 *pDL2-Nub-SM34* 共转化酵母 DSY1, 共转化的酵母细胞可以在 SD/-Trp-Leu 与含 10 mmol/L 3AT 的 SD/-His-Len-Trp 培养基上生长, 且 β-半乳糖苷酶检测为阳性; (b) YNE-AtSM34/YCE, YCE-AtTIP1;1/YNE 和 YNE-AtTIP1;1/YCE 共转化拟南芥叶肉原生质体的 YFP 荧光观察; (c) 双分子荧光互补实验分析 AtTIP1;1 与 AtSM34 的结合. YNE-AtSM34 与 YCE-AtTIP1;1 或 YNE-AtTIP1;1 与 YCE-AtTIP1;1 共转化拟南芥叶肉原生质体的 YFP 荧光观察. 上排图片中箭头所指的 YFP 发光结构与 *35S::spRFP-AFVY* 转基因植株 RFP 标记的红色小液泡结构是有重合的. 中间一排图片是荧光染料 FM4-64 将共转化 AtTIP1;1 与 AtSM34 的原生质体进行染色. 下排图片是荧光染料 FM4-64 将共转化 YNE-AtTIP1;1 与 YCE-AtTIP1;1 的原生质体进行染色. 为了观察方便, 将 YFP 荧光用绿色表示. YFP, 黄色荧光蛋白信号; DIC, 明场; Merge, 2 张图片的叠加. 比例尺为 5 μm

此外, 在对照组 YNE-AtSM34 与 YCE 空载体、YCE-AtTIP1;1 与 YNE 空载体及 YNE-AtTIP1;1 与 YCE 空载体转化原生质体都没有检测到 YFP 信号(图 1(b)).

2.3 AtSM34 的组织表达方式

半定量 RT-PCR 检测 AtSM34 在拟南芥中不同组织器官的表达. 从拟南芥的根、茎、叶、花和幼嫩的

果荚中提取总 RNA, 以 *ACTIN2/8* 的表达作为上样对照. 如图 2 所示, 在花、叶和茎中都检测到 AtSM34 较高的表达水平, 而在根和果荚中表达较低.

进一步用 AtSM34 启动子驱动的 GUS 报告基因 (*AtSM34promoter::GUS*) 详细研究 AtSM34 的表达模式. 3 个以上的不同拟南芥转基因株系用于研究分析. 刚萌发种子的子叶(图 2(a)中白色箭头所指)、幼苗(图 2(b)~(d))中都可以观察到明显的 GUS 染色. 2 周大的

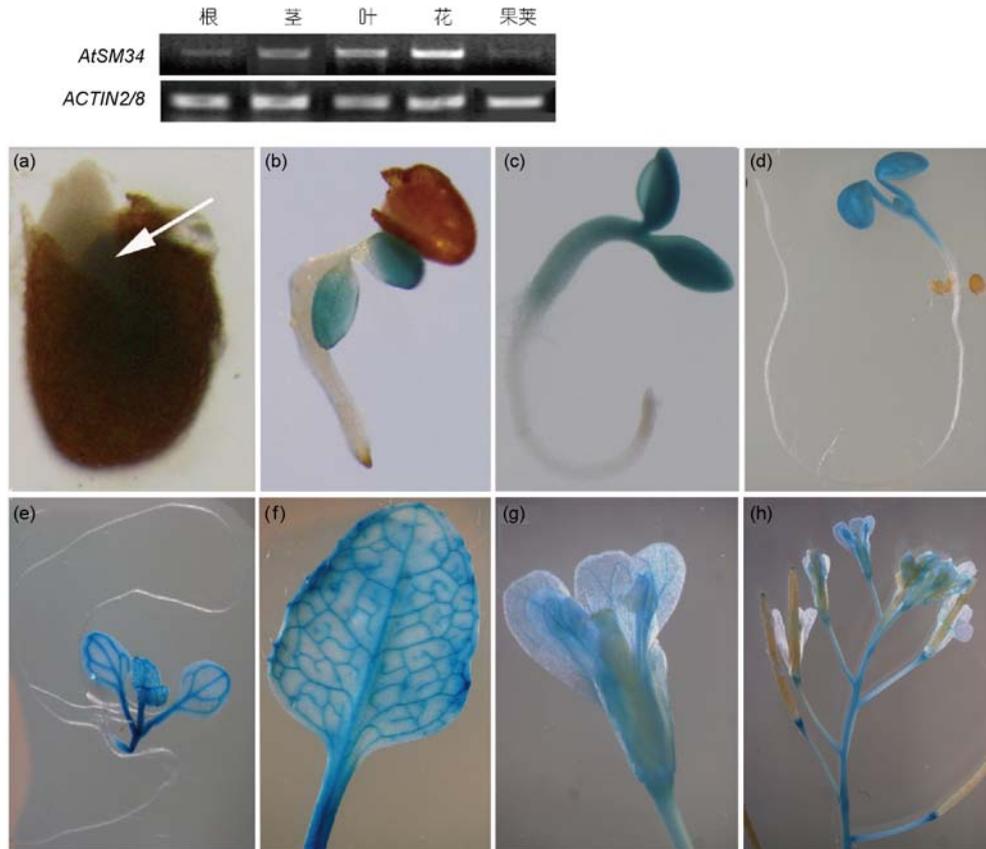


图2 *AtSM34*的组织特异性表达

半定量 RT-PCR 分析 *AtSM34* 在野生型拟南芥不同器官里的表达. 总 RNA 从 4 周龄的 Col-0 野生型拟南芥的根、茎、叶、花和荚果中提取. *ACTIN2/8* 作为内参基因. (a)~(h)为 *AtSM34* 启动子::GUS 转基因植株的 GUS 组织化学染色. (a) 萌发 24 h 的种子; (b) 2 d 大的小苗; (c) 3 d 大的小苗; (d) 5 d 大的小苗; (e) 2 周大的小苗; (f) 4 周龄莲座叶; (g) 5 周龄的花; (h) 5 周龄花序上的茎

小苗(图 2(e)), 莲座叶, 尤其维管束部分(图 2(f))也可以观察到强烈的 GUS 信号. 成熟的茎(图 2(h))和花萼及花瓣(图 2(g))也检测到 GUS 染色. 然而, 在根和幼荚中几乎检测不到 GUS 活性.

2.4 *AtSM34* 定位于内质网

Tair 网站(<http://www.arabidopsis.org>)预测, *AtSM34* 定位于内质网. 为检测 *AtSM34* 的亚细胞定位, 35S 驱动的 GFP 分别融合于 *AtSM34* 的 C 端 (*AtSM34-GFP*)及 N 端(*GFP-AtSM34*), 并瞬时转化拟南芥叶肉原生质体. 共聚焦显微镜观察到类似于内质网的绿色荧光结构. 以前研究显示, 叶肉原生质体中 ER 的定位方式呈丝网状分布^[34]. 为进一步证实, 叶肉原生质体用 ER 特异的红色染料 BODIPY 558/568-conjugated brefeldin A 进行染色. GFP 的绿色荧光与标记 ER 的红色荧光均能够共定位(图 3(a)). 这

说明 GFP 融合于 *AtSM34* 的 N 端或 C 端不会影响其定位方式(图 3(a)).

进一步观察稳定表达 35S::*AtSM34-GFP* 的转基因拟南芥, 其 ER 染料染色后的幼根中 GFP 荧光也与染料的红色荧光相重合(图 3(a)下排图片), 说明 *AtSM34* 定位于 ER. 这与 maMYB 在烟草表皮细胞中的定位相一致^[18].

2.5 N 端 83 个氨基酸对于 *AtSM34* 亚细胞定位具有重要作用

疏水分析网站(http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html)预测显示, *AtSM34* 的 N 端 83 个氨基酸存在 2 个跨膜结构域. 当 GFP 与 *AtSM34*Δ83aa 融合, 绿色荧光遍布于细胞质、细胞核(图 3(b)中间一排图片), 说明 N 端区域对其 ER 的亚细胞定位具有重要作用. 对照 35S::GFP 则显示为遍在的

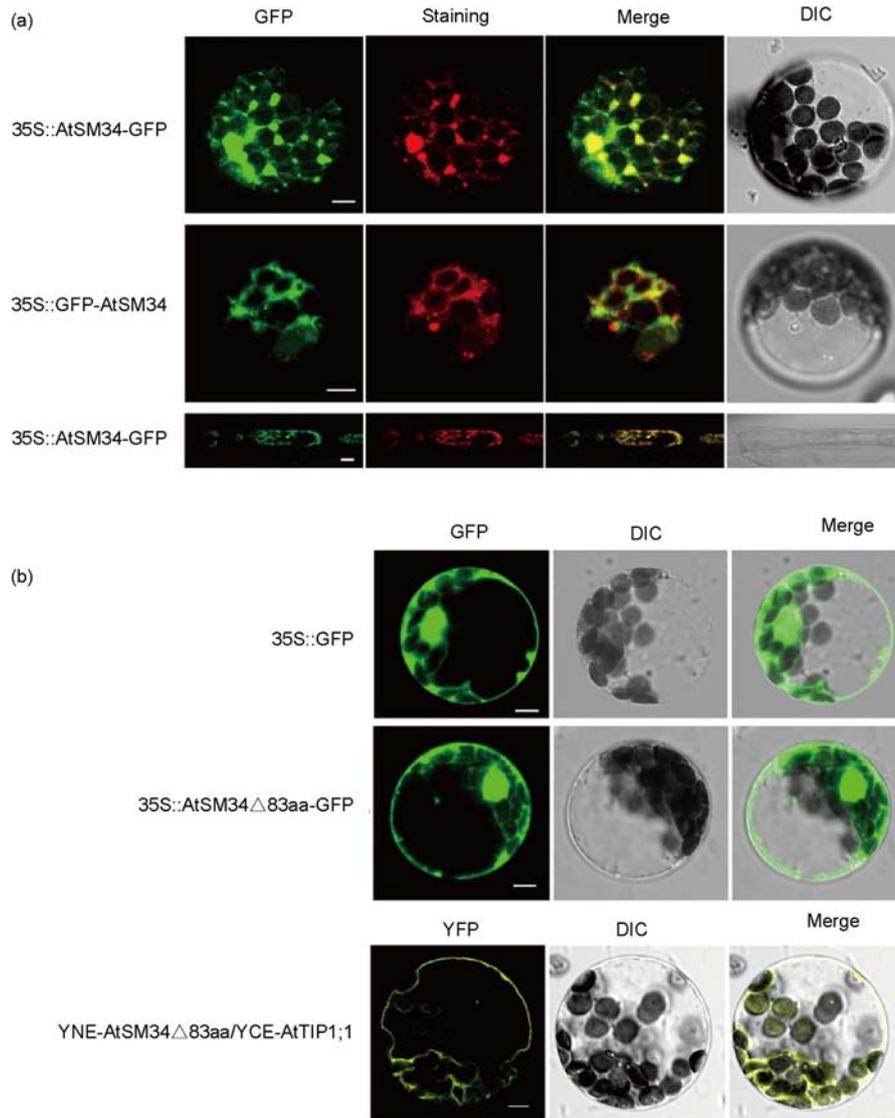


图3 AtSM34在拟南芥叶肉原生质体与幼苗根细胞中的亚细胞定位

(a) AtSM34分别融合GFP的N端与C端瞬时转化拟南芥叶肉原生质体(上面与中间一排图片),或是35S::AtSM34-GFP转基因稳定表达拟南芥幼苗的根(下排图片),同时用ER标记染料BODIPY 558/568-conjugated brefeldin A染色;(b) 上排图片是拟南芥叶肉原生质体转化35S::GFP空载体;中间一排图片是AtSM34缺失N端83个氨基酸后的亚细胞定位;下排图片是AtSM34Δ83aa与TIP1;1的BIFC结合实验. GFP, 绿色荧光蛋白信号; YFP, 黄色荧光蛋白信号; DIC, 明场; Staining, 染色; Merge, 2张图片的叠加. 比例尺为5 μm

表达方式.

为进一步检测这段序列是否与AtTIP1;1结合相关,将YNE-AtSM34Δ83aa和YCE-AtTIP1;1共转化拟南芥原生质体. YFP荧光重新定位于中央大液泡膜上(图3(b)下排图片),这与一些TIP成员在叶肉原生质体中的定位非常相似^[12]. 这证明AtSM34的N端前83个氨基酸不是其发生互作所必需的,可能作为跨膜域与其亚细胞定位密切相关.

2.6 AtSM34过表达株系对渗透胁迫和ABA敏感

为研究AtSM34的生物学功能,我们分析了Super启动子驱动的AtSM34过表达的20个不同转基因株系,在阳性转基因植株中检测了AtSM34基因的表达水平,实时定量PCR结果显示,转基因植株中OE-6和OE-10两个不同株系中AtSM34的mRNA表达水平要明显高于野生型(图4(a)). flag抗体检测转基因植株flag标签的Western blot分析进一步证实了

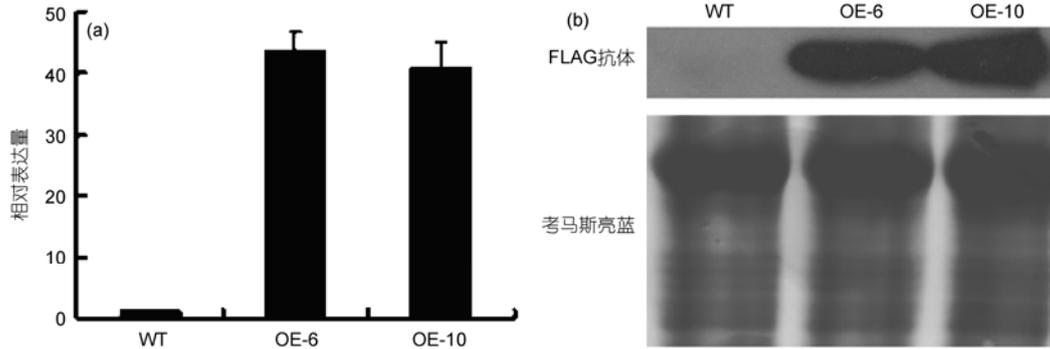


图4 *AtSM34*在过表达株系的实时定量PCR转录分析和Western blot蛋白表达分析

(a) *AtSM34*在2周龄野生型与过表达株系(OE-6和OE-10)的实时定量PCR转录分析. *ACTIN2/8*作为内参基因; (b) *AtSM34*在野生型与过表达株系(OE-6和OE-10)的Western blot蛋白表达分析. 从成熟叶片中抽提总蛋白,用12%的凝胶分离并用考马斯亮蓝染色.分离后的总蛋白利用FLAG抗体进行Western blot分析

其表达. OE-6和OE-10中均可检测到相应的蛋白条带,而在野生型中没有表达(图4(b)). OE-6和OE-10的纯合株系用于后续实验研究.

为进一步阐明*AtSM34*的可能功能,我们进行了一系列胁迫处理并观察其萌发和生长时期的表现.在正常生长条件下,所有植株都能正常萌发和生长.但在加入高浓度的甘露醇、山梨醇和ABA的1/2 MS固体培养基上,过表达植株OE-6和OE-10的萌发和早期生长明显延迟于野生型(图5(a)).

3 d后,在含400 mmol/L甘露醇的1/2 MS培养基上,有约70%的野生型已经萌发,而转基因过表达植株萌发率不到20%(图5(b)).与此相似,在含400 mmol/L山梨醇的1/2 MS培养基上,OE-6和OE-10的萌发率约为30%和40%,而野生型(wild type, WT)的萌发率约为72%(图5(b)).在含1 μmol/L ABA的1/2 MS培养基上生长2 d,有约40%的过表达株系萌发,而60%以上的野生型已经萌发.这些结果说明,过表达*AtSM34*使种子萌发和植物早期生长对于渗透胁迫和ABA更加敏感.

2.7 *AtSM34*胁迫响应的表达方式

为进一步研究渗透胁迫下*AtSM34*的表达方式,生长6 d的野生型小苗用甘露醇处理不同时间段,实时定量PCR检测*AtSM34*的表达.结果显示,渗透胁迫下*AtSM34*的表达量随时间而变化(图6(a)),在处理8 h达到最大,约为对照的2倍.而在处理24 h后表达量则迅速降低.

实时定量PCR同时检测了*AtSM34*在其他胁迫下

的表达方式.与渗透胁迫相似,在ABA,甲基紫精(methyl viologen, MV)以及葡萄糖4和12 h处理下,*AtSM34*都有一定的诱导表达.这显示*AtSM34*能被不同非生物胁迫所诱导,并且可能参与植物的环境胁迫响应.

2.8 *AtSM34*与其他亚型TIP互作的研究

BiFC研究发现,*AtSM34*也可与TIP1;2和TIP2;1发生互作,且拟南芥原生质体共转化YNE-*AtSM34*和YCE-*AtTIP1;2*(或YCE-*AtTIP2;1*),YFP荧光分布方式与前面非常相似(图7(a)).同时,在YCE-*AtTIP1;2*/YCE-*AtTIP2;1*和YNE空载体共转化的对照组没有检测到荧光信号.

另外,酵母泛素分裂系统分析发现,*AtSM34*和TIPs的结合具有一定特异性,*AtSM34*也可与*AtTIP1;3*结合,但不能与*AtTIP2;2*和*AtTIP3;2*发生互作(图7(b)).因此,也不能排除还有其他水孔蛋白会与之结合.

2.9 渗透胁迫下*AtSM34*对拟南芥TIP基因表达的影响

TIP1;1,*TIP1;2*与*TIP2;1*是液泡膜水孔蛋白1和2亚家族中表达量最高的一类基因^[1],在BiFC实验中显示都可与*AtSM34*互作.因此,我们选择了这些亚型来进一步检测*AtSM34*对其基因转录水平的影响.实时定量PCR所用TIP基因引物参照Beebo等人^[17]的报道.如图8所示,正常和处理条件下*TIP1;1*,*TIP1;2*和*TIP2;1*基因的表达水平在转基因植株中均

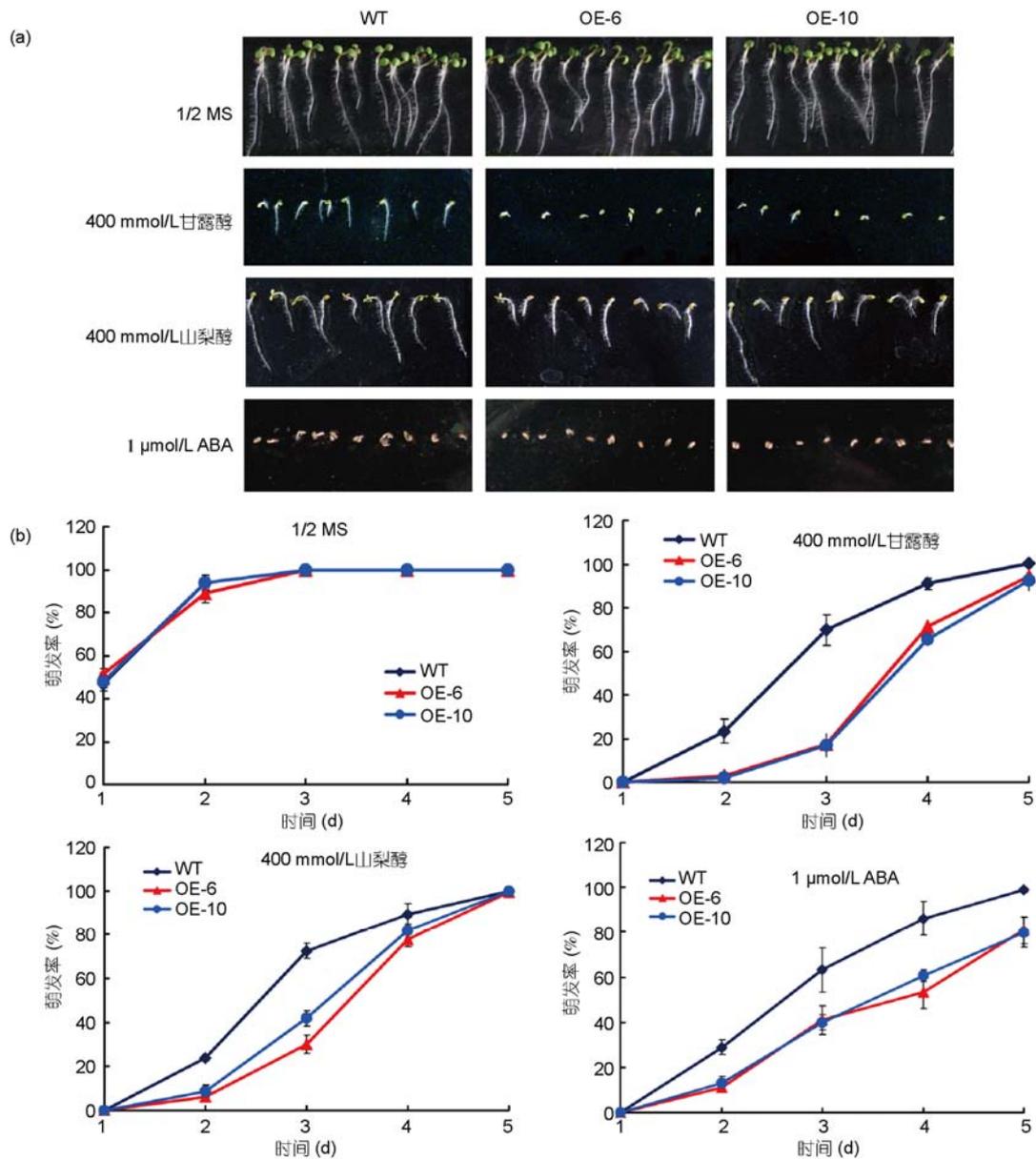


图5 过表达 *AtSM34* 导致转基因植物对渗透胁迫更加敏感

(a) WT 与过表达植株(OE-6 和 OE-10)在 1/2 MS 培养基及加入 400 mmol/L 甘露醇、400 mmol/L 山梨醇和 1 μmol/L ABA 胁迫处理下的种子萌发及早期生长。春化后生长 5 d 进行拍照, 含有 400 mmol/L 山梨醇的培养基春化后生长 9 d 进行拍照; (b) WT 与过表达植株(OE-6 和 OE-10)在 1/2 MS 培养基及加入 400 mmol/L 甘露醇、400 mmol/L 山梨醇及 1 μmol/L ABA 胁迫处理下 5 d 的萌发率统计折线图。每种植株大约使用 60 粒种子进行萌发实验。标准偏差为 3 次独立的生物学实验结果所得

发生了一定变化。渗透处理 12 h 后, 这 3 个 *TIP* 基因在 WT 和过表达植株 OE-6, OE-10 的表达量都降低, 但在过表达植株中降低更快。这说明过量表达 *AtSM34* 可能在渗透胁迫下影响了拟南芥种子萌发时期一些内源 *TIP* 基因的表达。

3 讨论

通过研究我们鉴定了一个新的蛋白 *AtSM34*, 它可能作为拟南芥液泡膜水孔蛋白的互作蛋白, 并在酵母和植物细胞中验证了它们的结合。在动物中已经有水孔蛋白的互作蛋白被报道, 但在植物中

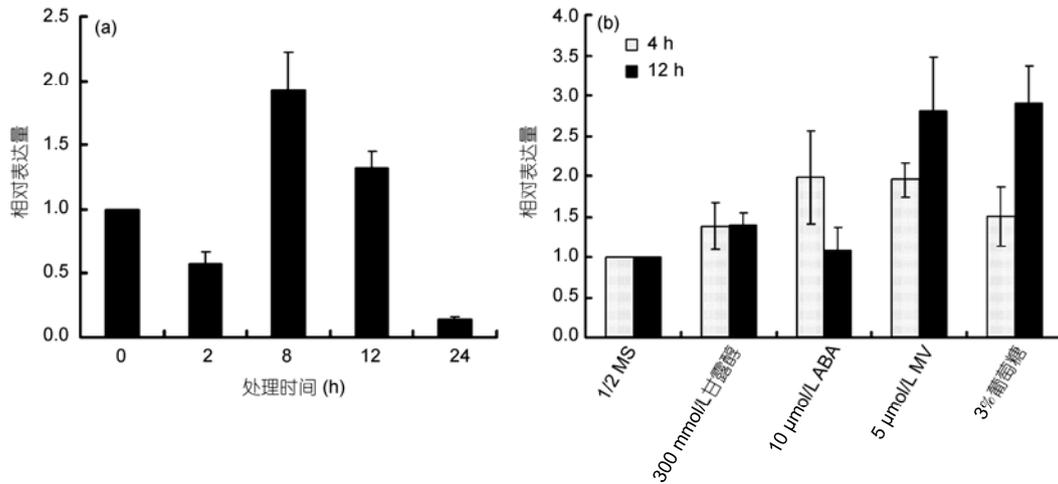


图 6 *AtSM34* 基因在胁迫条件下的表达分析

(a) 300 mmol/L 甘露醇处理拟南芥 6 d 大的幼苗, 利用实时定量 PCR 检测处理不同时间段 *AtSM34* 的表达分析; (b) 将 6 d 大的拟南芥幼苗在 300 mmol/L 甘露醇、10 μmol/L ABA, 5 μmol/L MV 及 3% 葡萄糖等各种胁迫下进行处理 4 和 12 h, 以 1/2 MS 处理作为对照, 提取总 RNA 进行实时定量 PCR 分析. *ACTIN2/8* 作为内参基因. 标准偏差为 3 次独立的生物学实验结果所得

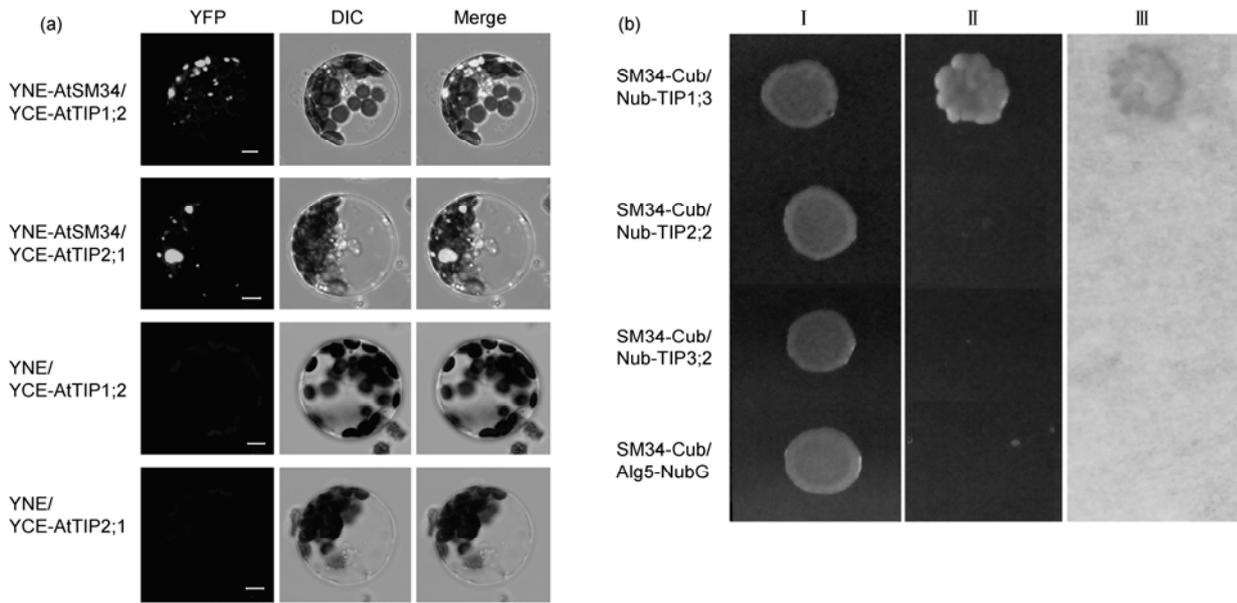


图 7 *AtSM34* 与其他 TIPs 的结合研究

(a) 双分子荧光互补实验分析显示 *AtSM34* 能与 *AtTIP1;2* 和 *AtTIP2;1* 结合. YFP, 黄色荧光蛋白信号; DIC, 明场; Merge, 2 张图片的叠加. 比例尺为 5 μm; (b) 酵母泛素分裂系统实验分析 *AtSM34* 与其他 TIPs 的结合. *AtSM34-Cub/pAlg5-NubG* 作为阴性对照. (I) 为 SD/-Trp-Leu 培养基; (II) 为含 10 mmol/L 3-AT 的 SD/-Trp-Leu-His 培养基; (III) 为 β-半乳糖苷酶活性检测

很少有报道, 除了一些已知水孔蛋白形成同源或异源聚合体^[35]. TIP 是植物中含量最丰富的一类水孔蛋白, 因此对其相关蛋白的探索将有助于阐明其功能及其调控机制.

众所周知, 在所有植物水孔蛋白合成过程中, 在其成熟前都是通过分泌途径到达其最终的亚细胞定位区域. 已有研究显示, TIP 蛋白大部分定位于液泡膜上^[12]. 但在渗透胁迫下, *McTIP1;2* (*McMIPF*) 蛋白

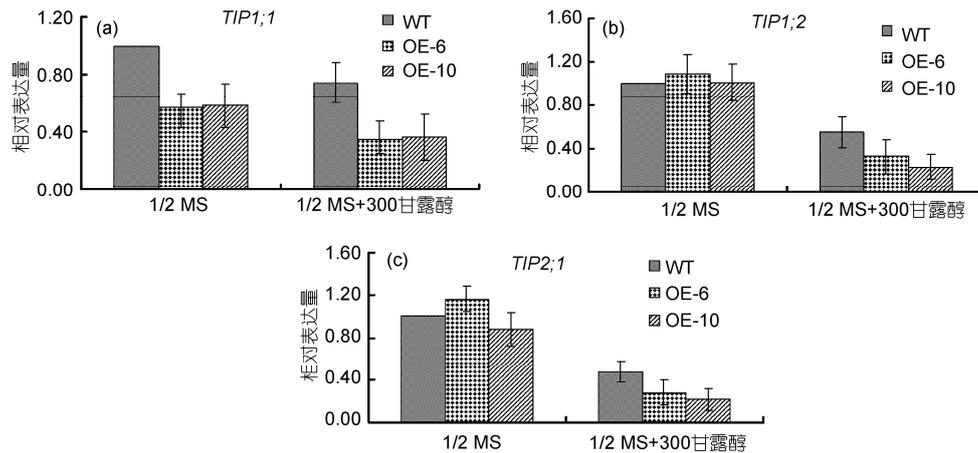


图8 渗透胁迫处理下 *TIPs* 基因在 WT 与过表达植株(OE-6 和 OE-10)中的相对表达量

利用实时定量 PCR 检测渗透胁迫处理下 WT 与过表达植株(OE-6 和 OE-10)中 *TIP1;1*, *TIP1;2* 和 *TIP2;1* 基因的相对表达量. 1/2 MS 培养基生长 6 d 的拟南芥幼苗, 在加入 300 mmol/L 甘露醇的液体培养基中浸泡 12 h. 柱状图表示该基因相对野生型表达量的倍数变化. *ACTIN2/8* 作为内参基因. 标准偏差为 3 次独立的生物学实验结果所得

可被重新定位于内涵体中^[14]. 最近, 研究显示水孔蛋白的转运对其表达和功能调控具有重要作用^[35]. BiFC 共定位结果显示, 互作发生于小囊泡中, 其可能参与水孔蛋白从内质网到液泡的分选过程, 但具体机制还需进一步研究.

当截去 *AtSM34* N 端前 83 个氨基酸, 互作方式发生了改变, 可能由于跨膜区的缺失使其位于胞质中, 从而能够与 *TIP1;1* 的胞质区直接互作. *AtSM34Δ83* 作为可溶性蛋白在胞质中合成, 不再依赖于分泌途径. 因此, 它们的互作发生在液泡膜上, 与 *TIP1;1* 的定位方式一致.

AtSM34 启动子驱动的 GUS 转基因植物研究显示, 在刚萌发种子的子叶(图 2(a))及小苗(图 2(b)和(c))中可以检测到明显的 GUS 信号, 说明 *AtSM34* 可能参与种子萌发及幼苗早期生长.

水孔蛋白在细胞的渗透调节、种子发育晚期的液泡形态建成及萌发早期阶段均发挥着重要作用^[15]. 有报道显示, 种子成熟和萌发时期都有大量液泡膜水孔蛋白(α -TIP, β -TIP 和 TIP3s)参与^[36,37], 且水孔蛋白的初始表达量与种子萌发率具有一定相关性^[38]. 在生长和发育中, 液泡膜水孔蛋白调节着液泡的渗透性并介导细胞间水分运输. 因此, 水孔蛋白有助于种子萌发的水分吸收, 并促进组织扩张与细胞增大所需水分的供应^[38,39]. 从定量 PCR 结果来看, 渗透处理下, *TIP1;1*, *TIP1;2* 和 *TIP2;1* 基因在过表达植株中表达量更低. 因此, 我们推测, 渗透胁迫下, 过表

达植株由于 *TIPs* 表达的降低, 水分平衡调节能力减弱, 吸收水分慢于野生型, 导致过表达植株在高渗下萌发和生长延缓. 此外, 拟南芥中有 10 个 TIP 亚型, 也不能排除 *AtSM34* 与其他水孔蛋白互作, 从而导致渗透胁迫下生长早期的萌发延迟.

为进一步探讨 *AtSM34* 在渗透胁迫中发挥的作用, 我们利用实时定量 PCR 检测了渗透胁迫相关的一系列已知 marker 基因, 其中包括 *RD22*, *RD29A*, *DREB2A*, *COR47*, *KIN1*, *KIN2*, *ERD10*, *NCED3*, *ADH1* 和 *bZIP60* 等. 在渗透胁迫 12 h 后, 除 *RD29A* 在 *AtSM34* 过表达植株中的表达量明显低于野生型(图 S1), 其他基因的表达变化与表型没有明显的相关性. 一般认为, *RD29A* 启动子区至少存在 2 个顺式作用元件, 一个是 ABA 相关的干旱应答元件, 另一个为渗透压变化所诱导^[40]. 这说明 *AtSM34* 参与渗透胁迫可能不是通过典型的信号转导途径.

植物中广泛存在 MYB 类蛋白及 MYB 类似蛋白, 它们在生长发育、代谢调控、生物与非生物胁迫应答过程中具有重要功能^[19,41~44]. 一些具有 MYB/SANT 类似结构域而不同于 MYB 样转录因子的蛋白正逐渐被发现. 在西红柿和拟南芥中异源表达西红柿特异的早期结实基因(early fruit specific gene) *Lefsm1*, 转基因幼苗发育受严重影响, 导致生长迟缓, 并且缺乏顶端优势^[45]. MYB 相关基因参与了其他许多植物特异的生理过程, 但是其生理功能没有被完全揭示, 许多 MYB 类似蛋白的性质尚不清楚^[46]. 另外, *AtSM34*

有可能作为一个膜滞留的转录因子, 不排除其与除水孔蛋白外的其他蛋白互作, 从而导致过表达 *AtSM34* 植株萌发的延迟。

AtSM34 在植物早期渗透胁迫响应所发挥的功能仍需进一步鉴定。对于 *AtSM34* 下游目标基因的进一步研究, 将有助于更深入地阐明其分子生物学功能。

参考文献

- 1 Alexandersson E, Fraysse L, Sjøvall-Larsen S, et al. Whole gene family expression and drought stress regulation of aquaporins. *Plant Mol Biol*, 2005, 59: 469–484
- 2 Jang J Y, Rhee J Y, Kim D G, et al. Ectopic expression of a foreign aquaporin disrupts the natural expression patterns of endogenous aquaporin genes and alters plant responses to different stress conditions. *Plant Cell Physiol*, 2007, 48: 1331–1339
- 3 Gerbeau P, Amodeo G, Henzler T, et al. The water permeability of *Arabidopsis* plasma membrane is regulated by divalent cations and pH. *Plant J*, 2002, 30: 71–81
- 4 Uehlein N, Lovisolo C, Siefritz F, et al. The tobacco aquaporin NtAQP1 is a membrane CO₂ pore with physiological functions. *Nature*, 2003, 425: 734–737
- 5 Chaumont F, Moshelion M, Daniels M J. Regulation of plant aquaporin activity. *Biol Cell*, 2005, 97: 749–764
- 6 Fischer M, Kaldenhoff R. On the pH regulation of plant aquaporins. *J Biol Chem*, 2008, 283: 33889–33892
- 7 Reichow S L, Gonen T. Noncanonical binding of calmodulin to aquaporin-0: Implications for channel regulation. *Structure*, 2008, 16: 1389–1398
- 8 Lu H A, Sun T X, Matsuzaki T, et al. Heat shock protein 70 interacts with aquaporin-2 and regulates its trafficking. *J Biol Chem*, 2007, 282: 28721–28732
- 9 Kim M J, Kim H R, Paek K H. *Arabidopsis* tonoplast proteins TIP1 and TIP2 interact with the cucumber mosaic virus 1a replication protein. *J Gen Virol*, 2006, 87: 3425–3431
- 10 Masalkar P, Wallace I S, Hwang J H, et al. Interaction of cytosolic glutamine synthetase of soybean root nodules with the C-terminal domain of the symbiosome membrane nodulin 26 aquaglyceroporin. *J Biol Chem*, 2010, 285: 23880–23888
- 11 Lee H K, Cho S K, Son O, et al. Drought stress-induced Rma1H1, a RING membrane-anchor E3 ubiquitin ligase homolog, regulates aquaporin levels via ubiquitination in transgenic *Arabidopsis* plants. *Plant Cell*, 2009, 21: 622–641
- 12 Wudick M M, Luu D T, Maurel C. A look inside: Localization patterns and functions of intracellular plant aquaporins. *New Phytol*, 2009, 184: 289–302
- 13 Kaldenhoff R, Fischer M. Aquaporins in plants. *Acta Physiol (Oxf)*, 2006, 187: 169–176
- 14 Vera-Estrella R, Barkla B J, Bohnert H J, et al. Novel regulation of aquaporins during osmotic stress. *Plant Physiol*, 2004, 135: 2318–2329
- 15 Maurel C, Chrispeels M, Lurin C, et al. Function and regulation of seed aquaporins. *J Exp Bot*, 1997, 48: 421–430
- 16 Schüssler M D, Alexandersson E, Bienert G P, et al. The effects of the loss of TIP1;1 and TIP1;2 aquaporins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 2008, 56: 756–767
- 17 Beebo A, Thomas D, Der C, et al. Life with and without AtTIP1;1, an *Arabidopsis* aquaporin preferentially localized in the apposing tonoplasts of adjacent vacuoles. *Plant Mol Biol*, 2009, 70: 193–209
- 18 Slabaugh E, Held M, Brandizzi F. Control of root hair development in *Arabidopsis thaliana* by an endoplasmic reticulum anchored member of the R2R3-MYB transcription factor family. *Plant J*, 2011, doi: 10.1111/j.1365-3113X.2011.04602.x
- 19 Stracke R, Werber M, Weisshaar B. The *R2R3-MYB* gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Opin Plant Biol*, 2001, 4: 447–456
- 20 Walter M, Chaban C, Schütze K, et al. Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. *Plant J*, 2004, 40: 428–438
- 21 Sheen J. A transient expression assay using *Arabidopsis* mesophyll protoplasts. 2002, <http://genetics.mgh.harvard.edu/sheenweb/>
- 22 An R, Chen Q J, Chai M F, et al. AtNHX8, a member of the monovalent cation: Proton antiporter-1 family in *Arabidopsis thaliana*, encodes a putative Li/H antiporter. *Plant J*, 2007, 49: 718–728
- 23 Xu J, Li H D, Chen L Q, et al. A protein kinase, interacting with two calcineurin B-like proteins, regulates K⁺ transporter AKT1 in *Arabidopsis*. *Cell*, 2006, 125: 1347–1360
- 24 Cao X, Yang K Z, Xia C, et al. Characterization of DUF724 gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*, 2010, 72: 61–73
- 25 Wang M, Xu Q, Yu J, et al. The putative *Arabidopsis* zinc transporter ZTP29 is involved in the response to salt stress. *Plant Mol Biol*, 2010, 73: 467–479
- 26 Chen N Z, Zhang X Q, Wei P C, et al. AtHAP3b plays a crucial role in the regulation of flowering time in *Arabidopsis* during osmotic stress. *J Biochem Mol Biol*, 2007, 40: 1083–1089

- 27 Charrier B, Champion A, Henry Y, et al. Expression profiling of the whole *Arabidopsis* shaggy-like kinase multigene family by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Plant Physiol*, 2002, 130: 577–590
- 28 Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{(-\Delta\Delta C(T))}$ method. *Methods*, 2001, 25: 402–408
- 29 Chen Y F, Li L Q, Xu Q, et al. The WRKY6 transcription factor modulates PHOSPHATE1 expression in response to low Pi stress in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2009, 21: 3554–3566
- 30 Clough S J, Bent A F. Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 1998, 16: 735–743
- 31 Hunter P R, Craddock C P, Di Benedetto S, et al. Fluorescent reporter proteins for the tonoplast and the vacuolar lumen identify a single vacuolar compartment in *Arabidopsis* cells. *Plant Physiol*, 2007, 145: 1371–1382
- 32 Vitale A, Hinz G. Sorting of proteins to storage vacuoles: How many mechanisms? *Trends Plant Sci*, 2005, 10: 316–323
- 33 Jelinkova A, Malinska K, Simon S, et al. Probing plant membranes with FM dyes: Tracking, dragging or blocking? *Plant J*, 2010, 61: 883–892
- 34 Kim D H, Eu Y J, Yoo C M, et al. Trafficking of phosphatidylinositol 3-phosphate from the *trans*-Golgi network to the lumen of the central vacuole in plant cells. *Plant Cell*, 2001, 13: 287–301
- 35 Maurel C, Verdoucq L, Luu D T, et al. Plant aquaporins: Membrane channels with multiple integrated functions. *Annu Rev Plant Biol*, 2008, 59: 595–624
- 36 Johnson K D, Herman E M, Chrispeels M J. An abundant, highly conserved tonoplast protein in seeds. *Plant Physiol*, 1989, 91: 1006–1013
- 37 Höfte H, Hubbard L, Reizer J, et al. Vegetative and seed-specific forms of tonoplast intrinsic protein in the vacuolar membrane of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, 1992, 99: 561–570
- 38 Vander W C, Postaire O, Tournaire-Roux C, et al. Expression and inhibition of aquaporins in germinating *Arabidopsis* seeds. *Plant Cell Physiol*, 2006, 47: 1241–1250
- 39 Peng Y, Lin W, Cai W, et al. Overexpression of a *Panax ginseng* tonoplast aquaporin alters salt tolerance, drought tolerance and cold acclimation ability in transgenic *Arabidopsis* plants. *Planta*, 2007, 226: 729–740
- 40 Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. Characterization of the expression of a desiccation-responsive *rd29* gene of *Arabidopsis thaliana* and analysis of its promoter in transgenic plants. *Mol Gen Genet*, 1993, 236: 331–340
- 41 Lee M M, Schiefelbein J. Developmentally distinct *MYB* genes encode functionally equivalent proteins in *Arabidopsis*. *Development*, 2001, 128: 1539–1546
- 42 Abe H, Urao T, Ito T, et al. *Arabidopsis* AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell*, 2003, 15: 63–78
- 43 Denekamp M, Smeekens S C. Integration of wounding and osmotic stress signals determines the expression of the AtMYB102 transcription factor gene. *Plant Physiol*, 2003, 132: 1415–1423
- 44 Araki S, Ito M, Soyano T, et al. Mitotic cyclins stimulate the activity of c-Myb-like factors for transactivation of G2/M phase-specific genes in tobacco. *J Biol Chem*, 2004, 279: 32979–32988
- 45 Barg R, Sobolev I, Eilon T, et al. The tomato early fruit specific gene *Lefsm1* defines a novel class of plant-specific SANT/MYB domain proteins. *Planta*, 2005, 221: 197–211
- 46 Hamaguchi A, Yamashino T, Koizumi N, et al. A small subfamily of *Arabidopsis* RADIALIS-LIKE SANT/MYB genes: A link to HOOKLESS1-mediated signal transduction during early morphogenesis. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2008, 72: 2687–2696

补充材料

图 S1 渗透胁迫处理下 *RD29A* 基因在野生型(WT)与过表达植株(OE-6 和 OE-10)中的相对表达量

本文的以上补充材料见网络版 csb.scichina.com。补充材料为作者提供的原始数据，作者对其学术质量和内容负责。

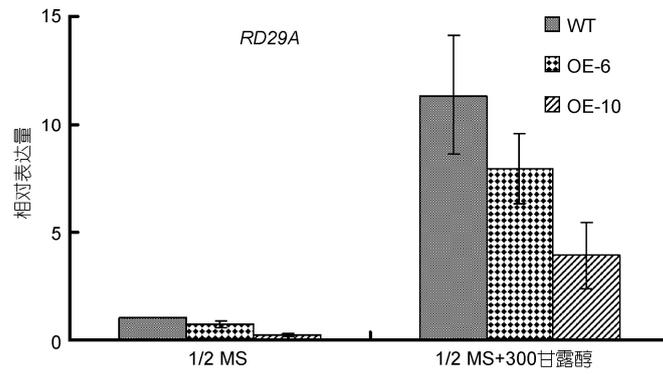


图 S1 渗透胁迫处理下 *RD29A* 基因在野生型(WT)与过表达植株(OE-6 和 OE-10)中的相对表达量

1/2 MS 生长 6 d 的拟南芥幼苗, 用含 300 mmol/L 甘露醇的 1/2 MS 液体培养基浸泡 12 h. 柱状图表示 *RD29A* 相对野生型表达量的变化倍数. *ACTIN2/8* 作为内参基因. 标准偏差为 3 次独立的生物学实验结果所得