



金勋,杨柳,潘红丽,等.大豆 *GmFtsH2* 基因的克隆及表达分析[J].黑龙江农业科学,2022(1):6-13,19.

# 大豆 *GmFtsH2* 基因的克隆及表达分析

金 勋,杨 柳,潘红丽,芮海英,王丽娜,李 娜,李泽宇

(黑龙江省农业科学院 大庆分院,黑龙江 大庆 163316)

**摘要:**为了进一步了解 *FtsH* 基因在大豆中的表达特性和功能,通过 GenBank 中拟南芥等其他植物 *FtsH* 基因序列设计 1 对简并引物,从盐处理的大豆叶片中克隆 *GmFtsH2* 的全长 cDNA 序列,并利用在线生物信息学软件对其进行分析。采用实时荧光定量 PCR 方法分析 *GmFtsH2* 在低温、盐、干旱和高温处理下的表达情况。从大豆中克隆到一条全长为 2 200 bp 的 mRNA 序列,命名为 *GmFtsH2* 基因,开放阅读框 2 091 bp,编码 696 个氨基酸,相对分子量约为 75.089 kDa,理论等电点为 5.65,蛋白质不稳定系数为 34.90,是稳定蛋白。大豆 *GmFtsH2* 与来源于三叶草、葡萄、水稻、玉米和拟南芥类的 *FtsH* 类同源蛋白的氨基酸序列比对发现,这些蛋白具有 *FtsH* 蛋白共同的保守结构域,包括 N 端两个跨膜域、AAA 结构域、锌离子结合模块等。大豆 *GmFtsH2* 与其他 19 种植物 *FtsH* 蛋白的系统进化分析表明,与野生豆和菜豆两个蛋白的亲缘关系较近。RT-PCR 分析表明,*GmFtsH2* 在大豆的叶片、茎、根、茎尖的组织内均有表达,且在茎尖中表达量最高,茎中最低。大豆叶片在 4 ℃ 低温和 NaCl 处理下,*GmFtsH2* 的表达随时间延长逐渐被诱导,分别在处理后的 9 h 和 12 h 达到最高峰;而经干旱诱导的大豆叶片,*GmFtsH2* 的表达在第 3 天达到最高峰,随后 *GmFtsH2* 的表达下调,第 11 天又达到一个小高峰。推测 *GmFtsH2* 在大豆抵御逆境胁迫中起作用。

**关键词:**大豆;*FtsH*;逆境胁迫;表达分析

*FtsH* (Filamentation temperature-sensitive H) 属于 AAA 蛋白酶家族,它是由 *FtsH* 基因编码的一种 ATP 和  $Zn^{2+}$  依赖型兼职蛋白,兼具 ATP 酶活性、蛋白水解活性和分子伴侣活性<sup>[1-4]</sup>,与热激、光胁迫、渗透压、病害、耐盐碱等逆境胁迫相关,在植物生长发育和响应逆境胁迫反应中起重要的调节作用。*FtsH* 基因最初是由 4 个不同的研究小组在筛选 4 个大肠杆菌表现型(*hflB*、*ftsH*、*tolZ*、*mrsC*)时独立发现的,这 4 个基因是同一个基因,因多数研究者引用 *FtsH*,均以 *FtsH* 命名该基因<sup>[5]</sup>。*FtsH* 基因负责细菌原生质膜、线粒体膜、叶绿体膜上的未装配蛋白的降解,通过及时降解非复合体形式的自由亚基,避免其可能的有害积累<sup>[6-7]</sup>。在真核生物中,已知的 *FtsH* 基因均定位于叶绿体膜或线粒体膜上<sup>[8-9]</sup>。在枯草芽孢杆菌、乳酸乳球菌等原核生物以及酵母、拟南芥、烟草、苜蓿、菠菜、玉米和梨等多种真核生物中都相继发现了 *FtsH* 基因<sup>[10-16]</sup>,说明该基因在生物基因组中广泛分布。*FtsH* 基因在拟南芥、水稻、玉米和大豆等高等植物中由多基因家族编码,家族中不同成员的 *FtsH* 基因的结构、功能和作用方式不同。拟南芥 *FtsH* 基因家族含有 12 条

*FtsH* 基因,有 9 种定位于叶绿体中<sup>[17]</sup>。*AtFtsH1* 参与 D1 蛋白光氧化损伤产物 23 kDa 肽段的降解<sup>[18]</sup>。菠菜 *FtsH* 参与 D1 蛋白光氧化损伤产物 23 kDa 肽段的降解<sup>[19]</sup>,而且 *FtsH* 基因分布于叶绿体基质类囊体和光系统 II (Photosystem II, PSII) 堆叠的基粒膜上<sup>[20]</sup>,这与拟南芥的试验结果一致。*FtsH* 蛋白酶与 PSII 结合,与反应中心 D1 蛋白的早期降解有关,而且 *FtsH2* 蛋白酶在 PSII 的修复中起作用<sup>[21]</sup>。Singh 等<sup>[22]</sup> 研究认为 *FtsH* 蛋白酶与包括 D1 蛋白在内的光损害蛋白的降解密切相关。*FtsH* 基因不仅参与 D1 在光系统 II 修复中的降解,并保护幼嫩叶片免受光损伤<sup>[23]</sup>。*AtFtsH11* 在拟南芥的耐热过程中起着关键的作用<sup>[24]</sup>。烟草叶绿体 *FtsH* 蛋白同系物 DS9 表达降低能增强叶片对病毒侵染的超敏反应,说明其与植物抗病性有一定关系<sup>[25]</sup>。Ivashuta 等<sup>[26]</sup> 发现在低温和强光条件下,提高了紫花苜蓿叶片中 *FtsH* 基因的 mRNA 和蛋白的基因水平。Sun 等<sup>[27]</sup> 在番茄热激试验中发现 *LeFtsH6* 是典型的热激基因,与番茄的热胁迫敏感性有关。范敏等<sup>[28]</sup> 发现马铃薯 *SoFtsH* 基因在干旱胁迫下,叶片和根系里的表达量明显增加,而且抗旱与干旱敏感品种表达模式不同。*FtsH* 蛋白的蛋白酶和分子伴侣活性是线粒体和叶绿体膜蛋白质质量控制系统的组成部分<sup>[29]</sup>。有关 *FtsH* 基因在高等植物方面的研究成果,主要

收稿日期:2021-09-22

第一作者:金勋(1962—),男,博士,高级农艺师,从事植物遗传育种研究。E-mail:jinxun6268@126.com。

集中于在高温、干旱、低温和病毒浸染胁迫下 *FtsH* 基因的表达和功能。*FtsH* 基因不仅参与生物体内正常的代谢调节过程,而且与多种逆境胁迫密切相关,在抵抗热激、高渗、盐害和冷胁迫中起作用<sup>[30]</sup>。目前,通过生物信息学方法推测在大豆基因组中存在 11 个 *FtsH* 基因,这些大豆的 *FtsH* 基因与 7 种拟南芥的 *AtFtsH* 基因相一致<sup>[31]</sup>,这也是大豆 *FtsH* 基因研究的发端。但在大豆方面还鲜有 *FtsH* 基因与抗逆性相关的研究报道。本研究中分离和克隆大豆中的 *FtsH* 基因,并了解其序列特征、组织表达特性及在干旱、盐、低温和高温等非生物胁迫过程中的表达模式,为进一步探明 *FtsH* 基因参与植物防御反应的机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究在黑龙江省农业科学院大庆分院综合试验室进行。选用黑龙江省农业科学院大庆分院培育的大豆品种抗线 3 号,在人工气候箱内培养,温度为 25 ℃,光周期 16L:8D,种子萌发出三出复叶时开始试验。

1.2 方法

1.2.1 试验设计 冷处理为 5 ℃,盐胁迫处理为 200 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl 溶液,高温处理为 38 ℃。分别在上述处理后 0,0.5,1.0,3.0,6.0,12.0,24.0 和 48.0 h 剪取叶片,用于基因克隆和表达特性分析。干旱处理取浇足水的幼苗,停止浇水后 0,3,5,7,9 和 11 d 的叶片,用于表达特性分析。取根、茎、叶和茎尖用于该基因在大豆不同器官中的表达特性分析。在各种胁迫处理的植株叶片与对照叶片同时取样,样品用液氮速冻后保存于-70 ℃超低温冰箱用于 RNA 提取。

1.2.2 总 RNA 提取和基因克隆 总 RNA 提取采用 Trizol 法,通过琼脂糖凝胶电泳进行 RNA 质量和浓度检验后,保存备用。通过对 NCBI 的 GenBank 数据库中报道的拟南芥等物种的 *FtsH* 基因序列分析后,设计了 4 对用于基因克隆的特异引物(表 1)。经过预试验确定引物序列,正向引物:5'-CATGCCATGGAGATGGCAGCAT-CATCAGCATGC-3';反向引物:5'-CGGGATCC-AACAGTGGCTGGTACTGG-3'。用大豆盐处理的叶片 cDNA 为模板进行片段扩增,反应体系:4 μL 模板,4 μL dNTPs(2.5 mmol·L<sup>-1</sup>),5 μL Buffer(10×),5 μL Primer F,5 μL Primer R,0.5 μL(5 U·μL<sup>-1</sup>)聚合酶,26.5 μL ddH<sub>2</sub>O。反应

程序:95 ℃预变性 5 min;94 ℃变性 45 s,退火温度 55 ℃,退火时间 45 s;72 ℃延伸,延伸时间 140 s,35 个循环;72 ℃延伸 10 min。克隆片段经琼脂糖凝胶电泳分类后,进行回收、克隆和测序分析。

表 1 试验引物及其序列

引物名称	序列(5'-3')
FTSH-1F	ATGTCGGCGTTGGAGTATCTC
FTSH-2F	ATGGCAGCRYCATCTCRGCATG
FTSH-3F	ATGAAGCAAGTTMAWATC
FTSH-MF	GGTCYCCWGGVACWGGDAARAC
FTSH-R1	CTGCAATGGGAGGAGAGACCC
FTSH-R2	GGAGTTGAAGGAGGGACMC
FTSH-R3	CTAAAGGTGAAGACCCRCCACC
FTSH-MR	GTYTTHCCWGTBCCWGGRGACC

1.2.3 *GmFtsH2* 基因序列分序 开放阅读框查询、核酸序列及氨基酸序列分别在 NCBI 数据库中用 ORF Finder、BLASTn 和 BLASTx 分析;采用 DNAMAN 输出氨基酸序列多重比对;使用 MEGA 6.0 软件中邻近相连法构建系统进化树;用 EXPASY (<http://expasy.org/tools/>) 中的 ProtParam、ProScale 和 PredictProtein 等工具对氨基酸序列进行生物信息学分析;蛋白质功能位点分析通过 PROSITE (<http://prosite.expasy.org/>) 进行,蛋白质高级结构预测通过 SWISS-MODEL (<http://www.swissmodel.expasy.org/interactive>) 进行。

1.2.4 *GmFtsH2* 启动子序列推测及分析 在 NCBI 数据库中利用 Mapviewer 工具 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/>),取 *GmFtsH2* 序列上游 2 200 bp(含 *GmFtsH* 本身序列 200 bp)基因序列作为启动子预选序列;应用在线植物转录元件分析工具 PLACE 软件 (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html>) 分析启动子的顺式作用元件。

1.2.5 *GmFtsH2* 基因表达特性分析 依据克隆的基因序列,设计特异引物(表 1),采用 qRT-PCR 检测基因的表达。利用大豆的 *tublin* 基因作为内参基因,特异引物为 TB1Actin-F: 5'-GAGAAGAGTATCCGGATAGG -3'和 TB1Actin-R: 5'-GAGCTTGAGTGTTCGGAAAC-3'。采用荧光定量 PCR 仪 LC480(Roche 480,美国)进行 qRT-PCR 分析,每个样品 3 次重复,PCR 程序为 95 ℃预变性 1 min;95 ℃ 10 s,55 ℃ 1 min,72 ℃ 30 s,共 40 个循环。按照基因相对表达分析

2<sup>-ΔΔCT</sup>方法分析 *GmFtsH2* 基因的相对表达量及标准差。

2 结果与分析

2.1 大豆 *GmFtsH2* 基因的克隆及序列分析

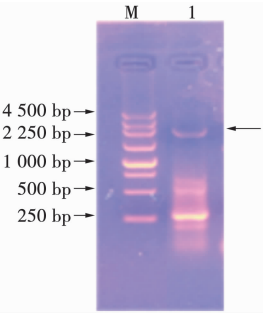
以盐处理的大豆叶片总 RNA 逆转录的 cDNA 第一链为模板,进行 PCR 扩增,获得了 1 个约为 2 200 bp 的特异产物(图 1)。对该片段进行连接、转化、筛选阳性克隆、重组载体鉴定、测序,测序结果验证了大豆 *FtsH* 基因序列,鉴于本研究中的大豆 *FtsH* 与拟南芥 *AtFtsH2* 高度同源,将克隆的大豆 *FtsH* 基因命名为“*GmFtsH2*”( *Glycine max* Filamentation Temperature-sensitive H2)。 *GmFtsH2* 序列全长 2 091 bp, GenBank 登录号为: jx644158 (GI: 410832837)。经 ORF Finder 在线程序分析表明, *GmFtsH2* 基因具有完整的开放阅读框,其长度为 2 091 bp,编码 696 个氨基酸,具有 4 个外显子和 3 个内含子。

2.2 序列比较与进化树分析

在 NCBI 中对 *GmFtsH2* 核苷酸序列进行 BLASTx 同源比对,结果表明, *GmFtsH2* 与菜豆(XM 007158834.1)、三叶草(AB236793.1)、

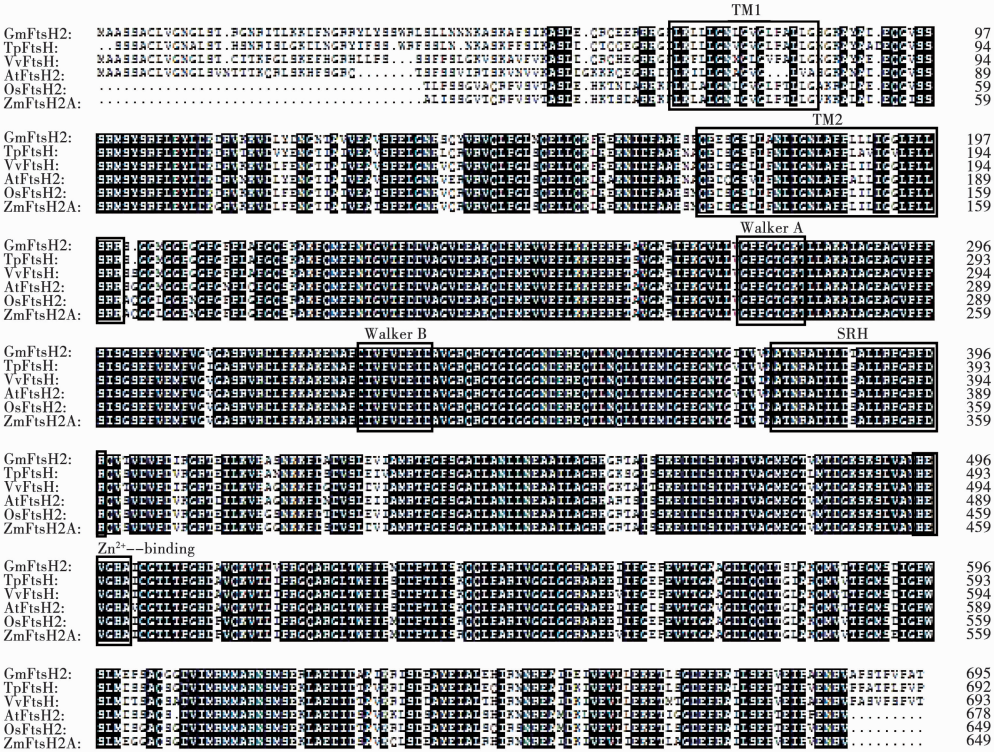
蓖麻(XM\_002520327.1)、水稻(AK064913.1)、玉米(EU961437.1)、葡萄(AM424788.2)等植物的相似性分别达到 93%、87%、84%、79%、79% 和 82%。

大豆 *GmFtsH2* 氨基酸序列与三叶草 *FtsH* (BAE71245.1)、葡萄 *FtsH* (CAN73350.1)、拟南芥 *FtsH2* (NP 850156.1)、水稻 *FtsH2* (Q655S1.1)、玉米 *FtsH2A* (AFW87710.1)等植物的相似性分别达 89%、89%、84%、89%和 88%,具有较高的同源性(图 2)。



M. 4 500 bp Marker; 1. PCR 扩增结果。

图 1 大豆 *FtsH2* 基因的 PCR 扩增结果



TM1. 第一跨膜域; TM2. 第二跨膜域; Walker A. A 模块; Walker B. B 模块; SRH. 第二同源区; Zn<sup>2+</sup>-binding. 锌离子结合模体; *GmFtsH2*. 大豆 *FtsH2* (AFV92900.1); *TpFtsH*. 三叶草 *FtsH* (BAE71245.1); *VvFtsH*. 葡萄 *FtsH* (CAN73350.1); *AtFtsH2*. 拟南芥 *FtsH2* (NP 850156.1); *OsFtsH2*. 水稻 *FtsH2* (Q655S1.1); *ZmFtsH2A*. 玉米 *FtsH2A* (AFW87710.1)。

图 2 *GmFtsH2* 与其他植物 *FtsH* 同源比对

由图 3 可知,大豆 *GmFtsH2* 与其他 19 种植物 FtsH 蛋白的系统进化分析,可分为 3 组,第一组来源于大豆、野生豆、菜豆、三叶草、黄瓜、蓖麻、辣椒、烟草、拟南芥和油菜等双子叶植物;第二组来源于小麦、玉米和水稻等单子叶植物;第三组为番茄、玉米和高粱等单双子叶植物混合为一组。从以上结果可以看出,大豆 *GmFtsH2* 与野生豆

和菜豆等双子叶豆科植物的亲缘关系较近,而与茄科和十字花科的关系稍远,离单子叶禾本科的关系更远,但是这些 FtsH 蛋白都来源于相同的祖先。而且双子叶之间或单子叶之间的亲缘关系比单子叶与双子叶之间的亲缘关系更近一些,也就是单、双子叶之间的遗传变异较大,这些与其他蛋白的系统进化分析结果一致<sup>[32]</sup>。

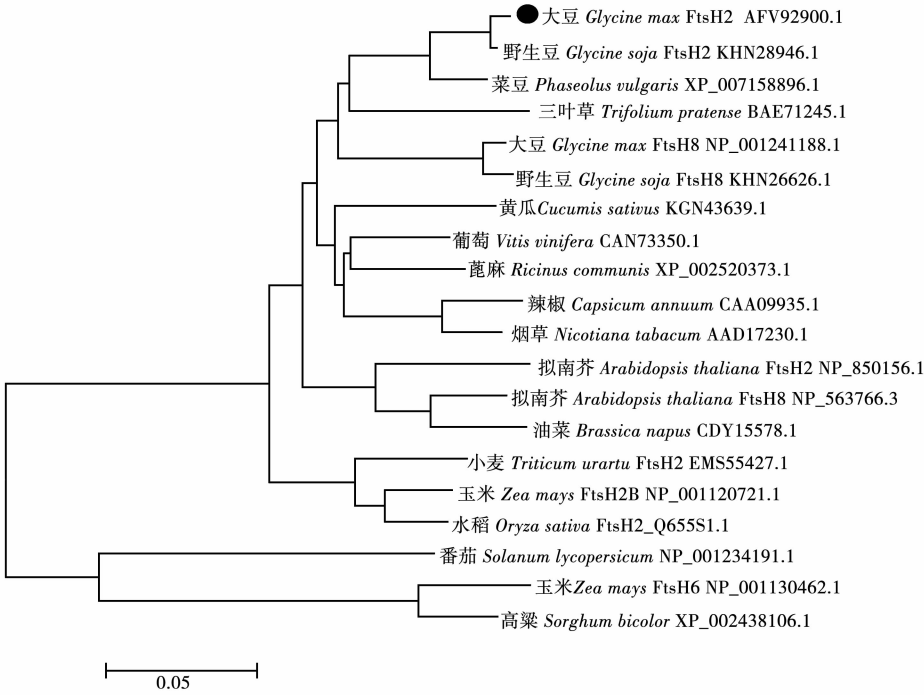


图 3 *GmFtsH2* 与其他植物 FtsH 氨基酸序列的系统进化分析

2.3 大豆 *GmFtsH2* 蛋白特征分析

ProtParam 预测 *GmFtsH2* 蛋白的分析表明,*GmFtsH2* 包含 696 个氨基酸,其中甘氨酸(Gly)、丙氨酸(Ala)、亮氨酸(Leu)和缬氨酸(Val)的含量分别占总氨基酸的 10.5%、9.3%、9.9% 和 7.3%。*GmFtsH2* 蛋白的分子量约为 75.089 kDa,理论等电点为 5.65,带负电荷氨基酸(Asp+Glu)占 12.8%,带正电荷氨基酸(Arg+Lys)占 11.7%,蛋白质不稳定系数为 34.90,是稳定蛋白。经 PredictProtein 和 BLASTx 软件预测,*GmFtsH2* 蛋白具有 FtsH 蛋白共同的保守结构域(图 2),包括 N 端两个跨膜域、AAA 结构域、锌离子结合模块等,与典型的 FtsH 蛋白保守结构域一致<sup>[2]</sup>。大豆 *GmFtsH2* 蛋白的保守结构域在氨基酸 93~684 处,氨基酸序列的 N 端有两个跨膜域(transmembrane domains, TM),第一跨膜域(TM1)不保守(在氨基酸 69~86 处),而第二跨膜域(TM2)高度保守(在氨基酸 180~197 处),

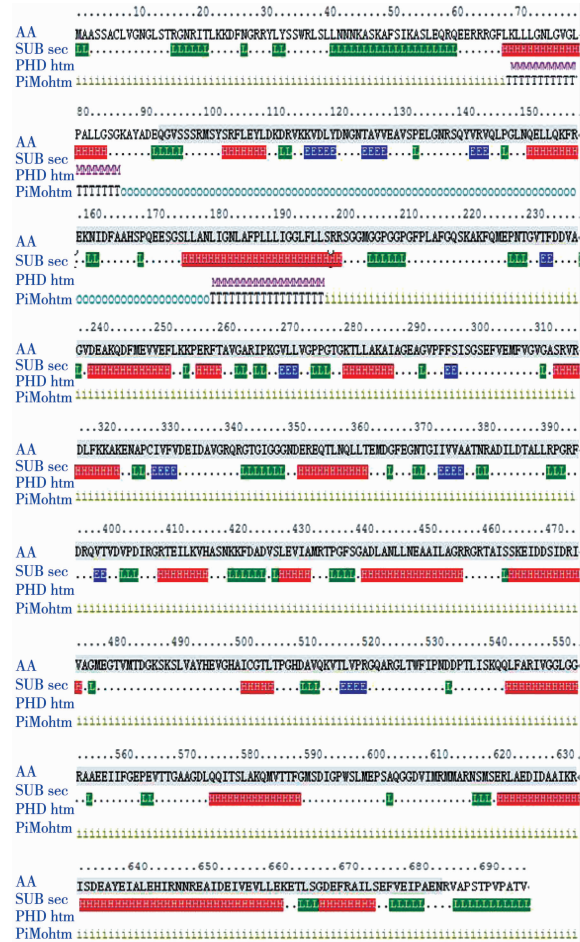
位于 FtsH 的保守结构域之间(氨基酸 93~200 处);AAA 结构域(AAA domain)在氨基酸 245~402 处,其中含 ATP 结合模体包括 Walker A(氨基酸 274~281 处)和 Walker B(氨基酸 329~334 处)模体;第二同源区(Second Region of Homology;SRH)在氨基酸 379~397 处;锌离子结合模体(zinc-binding motif)在氨基酸 519~523 处。

蛋白序列的二级结构分析表明(图 4),*GmFtsH2* 可形成  $\alpha$ -螺旋(H)、 $\beta$ -折叠(E)和环(L) 3 种结构,分别占整个氨基酸序列的 40.4%、12.5% 和 47.1%。蛋白跨膜结构分析发现,*GmFtsH2* 包含的 2 小段 18 个氨基酸的疏水跨膜域将 75.089 kDa 的 FtsH 蛋白锚定在细胞质膜上,93 个氨基酸在膜外,其他很长的 N 端及 C 端位于膜内。

三维空间结构预测分析表明,*GmFtsH2* 蛋白形成螺旋形的空间结构,并且 AAA 蛋白酶结



构域在氨基酸序列 373~391 处;锌离子结合位点在 492~501 处与蛋白链的 HIS495、HIS499 相结合(图 5)。以上的结果表明,由于二级结构与空间三维结构所使用的软件不同,保守结构域的一些具体位置稍有差别。



AA. 氨基酸序列;SUB sec. 二级结构;H.  $\alpha$ -螺旋;E.  $\beta$ -折叠;L. 卷曲;PHD htm. PHD 预测跨膜区域螺旋结果;M. 跨膜区域螺旋;空白. 非跨膜区域螺旋;阴影部分 GmFtsH2 的保守域;PiMohtm. 预测 GmFtsH2 的跨膜区域结构分析;i. 膜内区域;T. 跨膜区域;o. 膜外区域。

图 4 GmFtsH 的结构特征

2.4 大豆 *GmFtsH2* 基因的启动子序列预测及分析

通过 NCBI 数据库中的 Map viewer 工具查到 *GmFtsH2* 基因位于大豆第 8 染色体上,从 *GmFtsH2* 基因图谱中获得该基因的上游 2 200 bp 序列(其中含 *GmFtsH2* 基因的 200 bp 序列),该序列 2010 年已被登入到 GenBank 数据库中,登录号为 NW\_003722738.1,是其序列中间一部分片段(gi353336023:6543710—6545910)。

GenBank 数据库中表明,该核苷酸序列的 1 802~2 201 bp 处,是 *GmFtsH2* 基因的 mRNA 序列,说明该序列是 *GmFtsH2* 基因 5'非翻译区的上游启动子序列。经 PLACE 分析表明,*GmFtsH2* 启动子序列除了基本元件外,还含有多个生物胁迫和非生物胁迫的响应元件,主要分为:(1)与激素应答相关元件,如与赤霉素、水杨酸等引起的转录激活有关;(2)与植物生长发育有关的应答元件,如分生组织、胚乳、种子、生理节奏有关应答元件;(3)与光调控有关元件,如 GAG (序列 AGAGAGT),CATT(序列 GCATTC),Box4(序列 ATTAAT),AE (序列 AGAAACTT),TCT (序列 TCTTAC),I-box(序列 TATTATCTAGA),GT1 (序列 GGTAA),CATT (序列 GCATTC)等应答元件;(4)与胁迫诱导应答相关元件,如厌氧(ARE,序列 TGGTTT)、热胁迫元件(HSE,序列 AAAAAATTTTC 和 AGAAAATTCG)、低温胁迫(LTR,序列 CCGAAA)、防御胁迫(TC-rich,序列 ATTTTCTTCA)、干旱胁迫(MBS,序列 CAACTG、CGGTCA)、真菌(Box-W1,序列 TTGACC)等应答元件。预示 *GmFtsH2* 基因是与大豆耐逆境胁迫有关的非常重要的基因之一,而且本试验中已经明确该基因与大豆的低温、干旱和高温胁迫有关。

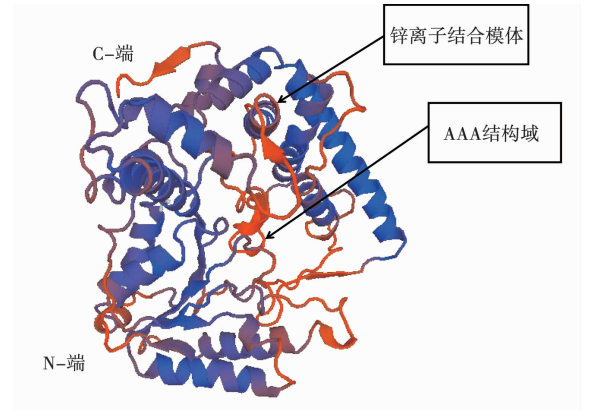


图 5 *GmFtsH2* 基因编码蛋白的三级结构预测模型

2.5 *GmFtsH2* 基因的表达分析

分别取生长 25 d 的大豆根、茎、茎尖、三出复叶提取 RNA,采用荧光实时定量 PCR 分析 *GmFtsH2* 基因在不同组织中的表达差异,结果显示该基因在茎尖和叶中表达水平较高,在根中有较低水平的表达,在茎中几乎检测不到表达(图 6)。

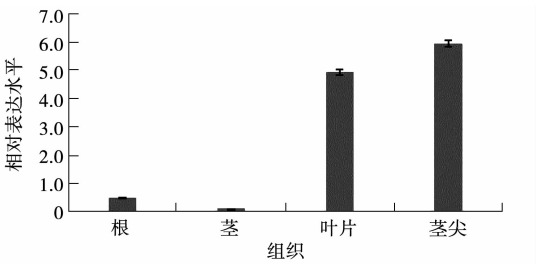
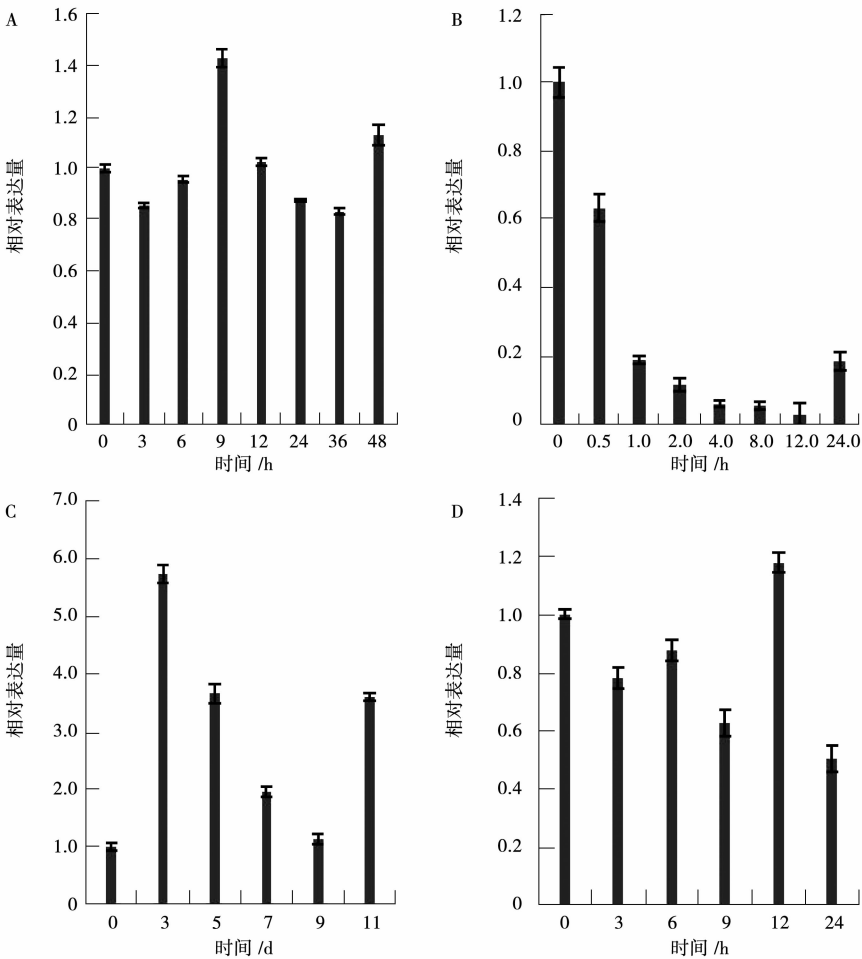


图 6 *GmFtsH2* 基因的组织特异性表达

采用荧光实时定量 PCR 分析 *GmFtsH2* 基因在低温、盐、干旱和高温胁迫过程中表达量的变化,大豆经 4 ℃ 低温处理(图 7A)下,*GmFtsH2* 基因表达随时间的延长逐渐被诱导, 处理 9 h 后表

达丰度最大,随后表达下调,推测 *GmFtsH2* 基因可能是参与低温胁迫反应的下游基因。大豆叶片经 38 ℃ 高温处理(图 7B)时,相对表达量一直呈下降趋势,推测 *GmFtsH2* 基因的表达情况在高温胁迫下不稳定。大豆叶片经干旱处理(图 7C) 3 d 后表达丰度最大,随后 *GmFtsH2* 的表达下调,第 11 天又达到一个小高峰,说明 *GmFtsH2* 基因受干旱诱导,作为正向调控因子参与干旱的早期应答反应。大豆经 NaCl 处理(图 7D)9 h 后基因表达量没有变化,12 h 表达量丰度最大,推测 *GmFtsH2* 基因可能是参与 NaCl 胁迫反应的下游基因。



A. 4 ℃ 低温胁迫; B. 38 ℃ 高温胁迫; C. 干旱胁迫; D. 200 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl 盐胁迫。

图 7 *GmFtsH2* 在不同逆境胁迫下幼苗叶片中的表达

3 讨论

大豆起源于中国,是重要的油料作物和经济作物,在食品工业和农业生产中占重要地位。目前,我国 80% 以上大豆供给来自于进口,国产大

豆远远不能自给自足。在大豆种植过程中,盐渍土面积扩大、干旱、低温和高温等自然环境条件的变化会严重影响产量。因此研究大豆的耐逆应答机制和培育耐逆大豆品种具有重要的现实意义。

组织特异性表达分析可知,*GmFtsH2* 基因在茎尖及叶片中表达丰度最大,而且启动子元件预测中有与植物发育有关的分生组织和生理节奏元件。拟南芥同源基因 *AtFtsH2* 的研究中发现,*AtFtsH5* (VAR1)和 *AtFtsH2* (VAR2)参与光保护和类囊体发育过程<sup>[33]</sup>,两个基因突变都会引起叶片花斑和对光抑制敏感性提高,*AtFtsH2* (VAR2)与 D1 蛋白的功能有关<sup>[34]</sup>。推测 *GmFtsH2* 参与茎尖和叶片的生长发育过程中的光保护及类囊体发育过程。

本试验中对 *GmFtsH2* 基因的启动子元件分析可知,启动子中含热胁迫 (HSE)、低温胁迫 (LTR)、干旱胁迫 (MBS)和防御胁迫 (TC-rich)反应相关的元件。Yue 等<sup>[35]</sup>在 PEG、盐、冷、ABA 处理玉米幼苗时发现 *ZmFtsH2A* 基因在玉米根和叶片组织中均有表达,而 *ZmFtsH2B* 基因仅在玉米叶片中受渗透胁迫和外源 ABA 的诱导上调表达。

本研究中大豆叶片经低温处理后 *GmFtsH2* 表达上调,9 h 达到最高峰,最后表达下调。大豆叶片经 NaCl 处理后,*GmFtsH2* 表达 12 h 达到最高峰,随后逐渐下调。以往利用与本研究相同的品种和 NaCl 处理后,SOD 值的表达在 12 h 达到高峰,随后下调<sup>[36]</sup>。本研究中大豆叶片干旱处理下,*GmFtsH2* 的表达 3 d 达到高峰,随后表达下调,在 11 d 又达到第 2 个小高峰。以往利用与本研究相同的品种和干旱处理下,SOD 值的表达高峰也出现在处理后的第 3 天,随后 SOD 值的表达下调<sup>[37]</sup>。植物的 SOD 可以消除逆境胁迫产生的有害物质,从而避免或减轻逆境胁迫对植物的伤害程度。而 *AtFtsH2* 蛋白参与降解和修复 PSII 反应中心 D1 蛋白的损伤,从而减少植物的损害程度。以上结果表明:在盐胁迫、干旱胁迫中 *GmFtsH2* 基因与 SOD 表达最大丰度的时间相吻合,推测 *GmFtsH2* 基因为与 SOD 相关的基因,在植物体内可能参与同样的生化反应。两者的具体关系有待于今后的进一步研究。

## 4 结 论

大豆 *GmFtsH2* 基因是拟南芥 *AtFtsH2* 基因的同源基因,其蛋白具有 FtsH 蛋白共同的保守结构域,包括 N 端两个跨膜域、AAA 结构域、锌离子结合模块等。从 *GmFtsH2* 基因的启动子序列预测中含有非生物胁迫的响应元件、同源基因拟南芥 *AtFtsH2* 基因功能及 *GmFtsH2* 基因

的组织特异性及低温、干旱、盐等逆境胁迫的表达,推测 *GmFtsH2* 基因可能参与大豆降解和修复 PSII 反应中心 D1 蛋白的损伤,减少植物在逆境胁迫下的损害程度。

## 参考文献:

- [1] KARATA K,INAGAWA T,WILKINSON A J,et al. Dissecting the role of a conserved motif(the second region of homology) in the AAA family of ATPases. Site-directed mutagenesis of the ATP-dependent protease FtsH[J]. Journal of Biological Chemistry,1999,274:26225-26232.
- [2] LANGER T. AAA proteases:Cellular machines for degrading membrane proteins[J]. Trends in Biochemical Sciences, 2000,25:247-251.
- [3] OGURA T,WILKINSON A J. AAA+superfamily ATPases:Common structure-diverse function[J]. Genes Cells, 2001,6:575-597.
- [4] MIHO Y N,YASUSI Y. Quality control of Photosystem II: The molecular basis for the action of FtsH protease and the dynamics of the thylakoid membranes[J]. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2014 (137): 100-106.
- [5] NEUWALD A F,ARAVIND L,SPOUGE J L,et al. AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly,operation, and disassembly of protein complexes [J]. Genome Research,1999,9(1):27-43.
- [6] SUMMER E J,CLINE K. The nucleotide sequence of a tobacco homolog of Pftf(accession no. AF117339);Evidence for two plastid-localized AAA-family proteins in higher plants(PGR 99-029)[J]. Plant Physiology,1999,119(3): 1147-1147.
- [7] SAKAMOTO W,ZALTSMAN A,ADAM Z,et al. Coordinated regulation and complex formation of YELLOW VARIEGATED1 and YELLOW VARIEGATED2, chloroplastic FtsH metalloproteases involved in the repair cycle of photosystem II in *Arabidopsis* thylakoid membranes[J]. Plant Cell,2003,15:2843-2855.
- [8] ADAM Z, ADAMSKA I, NAKABAYASHI K, et al. Chloroplast and mitochondrial proteases in *Arabidopsis*. A proposed nomenclature [J]. Plant Physiology, 2001, 125: 1912-1918.
- [9] LINDAHL M,TABAK S,CSEKE L,et al. Identification, characterization, and molecular cloning of a homologue of the bacterial FtsH protease in chloroplasts of higher plants[J]. Journal of Biological Chemistry, 1996, 271: 29329-29334.
- [10] DEUERLING E,PAESLACK B,SCHUMANN W. The *FtsH* gene of *Bacillus subtilis* is transiently induced after osmotic and temperature upshift[J]. Journal of Bacteriology, 1995,177:4105-4112.
- [11] DEUERLING E,MOGK A,RICHTER C,et al. The *FtsH* gene of *Bacillus subtilis* is involved in major cellular processes such as sporulation, stress adaptation and secre-

- tion[J]. *Molecular Microbiology*, 1997, 23: 921-933.
- [12] IVASHUTA S, IMAI R, UCHIYAMA K, et al. Changes in chloroplast FtsH-like gene during cold acclimation in alfalfa (*Medicago sativa*) [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2002, 159: 85-90.
- [13] BOURDINEAUD J P, NEHME B, TESSE S, et al. The *FtsH* gene of the wine bacterium *Oenococcus oeni* is involved in protection against environmental stress [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69: 2512-2520.
- [14] CHEN M, CHOI Y, VOYTAS D F, et al. Mutations in the *Arabidopsis* VAR2 locus cause leaf variegation due to the loss of a chloroplast FtsH protease[J]. *The Plant Journal*, 2000, 22: 303-313.
- [15] DUWAT P, EHRlich S D, GRUSS A. The *recA* gene of *Lactococcus lactis*: Characterization and involvement in oxidative and thermal stress[J]. *Molecular Microbiology*, 1995, 17: 1121-1131.
- [16] GUO Z H, GAO X, CAI H Q, et al. Genome-wide identification, evolution and expression analysis of the *FtsH* gene during fruit development in pear (*Pyrus bretschneideri*) [J]. *Plant Biotechnology Reports*, 2021, 15: 537-550.
- [17] SAKAMOTO W, ZALTSMAN A, ADAM Z, et al. Coordinated regulation and complex formation of YELLOW VARIEGATED1 and YELLOW VARIEGATED2, chloroplastic *FtsH* metalloproteases involved in the repair cycle of photosystem II in *Arabidopsis* thylakoid membranes [J]. *Plant Cell*, 2003, 15: 2843-2855.
- [18] LINDAHL M, SPETEA C, HUNDAL T, et al. The thylakoid FtsH protease plays a role in the light-induced turnover of the photosystem II D1 protein [J]. *Plant Cell*, 2000, 12: 419-431.
- [19] YOSHIOKA M, UCHIDA S, MORI H, et al. Quality control of photosystem II [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281: 21660-21669.
- [20] LIU X Y, RODERMEL S R, YU F. Avar2 leaf variegation suppressor locus suppressor of variegation3, encodes a putative chloroplast translation elongation factor that is important for chloroplast development in the cold [J]. *BMC Plant Biology*, 2010, 10: 1-18.
- [21] SILVA P, THOMPSON E, BAILEY S, et al. *FtsH* is involved in the early stages of repair of photosystem II in *Synechocystis* sp PCC 6803 [J]. *Plant Cell*, 2003, 15 (9): 2152-2164.
- [22] SINGH M, YAMAMOTO Y, SATOHA K, et al. Post-illumination-related loss of photochemical efficiency of Photosystem II and degradation of the D1 protein are temperature-dependent [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2005, 162(11): 1246-1253.
- [23] TIAN Y N, ZHONG R H, WEI J B, et al. *Arabidopsis* chlorophyllase 1 protects young leaves from long-term photodamage by facilitating FtsH-mediated D1 degradation in photosystem II repair [J]. *Molecular Plant*, 2021, 14(7): 1149-1167.
- [24] CHEN J, BURKE J J, VELTEN J, et al. FtsH11 protease plays a critical role in *Arabidopsis* thermotolerance [J]. *Journal Plant*, 2006, 48(1): 73-84.
- [25] SEO S, OKAMOTO M, IWAI T, et al. Reduced levels of chloroplast FtsH protein in tobacco mosaic virus-infected tobacco leaves accelerate the hypersensitive reaction [J]. *Plant Cell*, 2000, 12: 917-932.
- [26] IVASHUTA S, IMAI R, UCHIYAMA K, et al. Changes in chloroplast FtsH-like gene during cold acclimation in alfalfa (*Medicago sativa*) [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2002, 159: 85-90.
- [27] SUN A Q, YI S Y, YANG J Y, et al. Identification and characterization of a heat-inducible *FtsH* gene from tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) [J]. *Plant Science*, 2006, 170: 551-562.
- [28] 范敏, 金黎平, 黄三文, 等. 马铃薯 *SoFtsH* 基因全长 cDNA 克隆与在干旱条件下表达研究 [J]. *作物学报*, 2007(11): 1748-1754.
- [29] HANNA J, MALGORZATA K, JOANNA S. Protein quality control in organelles-AAA/FtsH story [J]. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, 2013, 1833: 381-387.
- [30] FISCHER B, RUMMEL G, ALDRIDGE P, et al. The FtsH protease is involved in development, stress response and heat shock control in *Caulobacter crescentus* [J]. *Molecular Microbiology*, 2002, 44: 461-478.
- [31] YIN Z T, MENG F F, SONG H N, et al. *GmFtsH9* expression correlates with *in vivo* photosystem II function: Chlorophyll a fluorescence transient analysis and eQTL mapping in soybean [J]. *Planta*, 2011, 234(4): 815-827.
- [32] 李永春, 张春艳, 张宁, 等. 小麦质膜蛋白基因 TaPM19-1 的克隆及其对非生物胁迫的响应 [J]. *中国农业科学*, 2012, 45(12): 2502-2509.
- [33] SAKAMOTO W, TAMURA T, HANBA-TOMITA Y, et al. The VAR1 locus of *Arabidopsis* encodes a chloroplastic *FtsH* and is responsible for leaf variegation in the mutant alleles [J]. *Genes Cells*, 2002, 7: 769-780.
- [34] LIU X Y, YU F, RODERMEL S. *Arabidopsis* chloroplast *FtsH*, var2 and suppressor of var2 leaf variegation: A review [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2010, 52: 750-761.
- [35] YUE G D, HU X R, HE Y, et al. Identification and characterization of two members of the *FtsH* gene family in maize (*Zea mays* L.) [J]. *Molecular Biology Reports*, 2010, 37: 855-863.
- [36] 李亮, 李泽宇, 王丽娜, 等. 不同大豆品种耐盐性表现分析 [J]. *黑龙江农业科学*, 2013(2): 17-20.
- [37] 芮海英, 王丽娜, 金铃, 等. 苗期干旱胁迫对不同大豆品种叶片保护酶活性及丙二醛含量的影响 [J]. *大豆科学*, 2013, 32(5): 647-649.



## Effects of NaCl Stress on Seed Germination of *Amaranthus hypochondriacus*

WANG Jian-li<sup>1</sup>, MU Lin-lin<sup>1</sup>, SHEN Zhong-bao<sup>1</sup>, YOU Jia<sup>1</sup>, ZHANG Dong-mei<sup>1</sup>, QI Chun-jie<sup>2</sup>, DI Gui-li<sup>1</sup>

(1. Pratacultural Science Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China;

2. Shangzhi Weihe Forest District Middle School, Shangzhi 150623, China)

**Abstract:** In order to select salt-tolerant *Amaranthus hypochondriacus* germplasm resources, filter paper culture method was adopted and four *Amaranthus hypochondriacus* lines were used as materials, the effect of different concentrations of NaCl (0, 50, 100 and 200 mmol·L<sup>-1</sup>) on the seed germination characteristics, including germination rate, germination energy, germination index, seed vigor index, relative salt injury rate and whole plant length were studied and the average membership function values of four seeds under different NaCl stress were analyzed. The results showed that with the increase of salt solution concentration, the germination rate, germination energy, germination index, seed vigor index and the whole plant length of the four materials all decreased, and the relative salt damage rate increased. Low-concentration salt stress (50 mmol·L<sup>-1</sup>) had no significant effect on the germination rate of the LX014 and LX022. However, when the salt concentration was 100 mmol·L<sup>-1</sup>, the seed germination index of all varieties decreased significantly, the relative salt injury rate increased significantly, and the seed salt stress effect was significantly intensified. By comprehensive evaluation of the average membership function value, we concluded that LX014 had the strongest salt tolerance, followed by LX022, LX006, LX019 have the poorest salt tolerance.

**Keywords:** *Amaranthus hypochondriacus*; seed germination; salt stress; salt tolerant

(上接第 13 页)

## Cloning and Expression Analysis of *GmFtsH2* Genes in Soybean

JIN Xun, YANG Liu, PAN Hong-li, RUI Hai-ying, WANG Li-na, LI Na, LI Ze-yu

(Daqing Branch, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Daqing 163316, China)

**Abstract:** In order to further understand the expression characteristics and functions of *FtsH* gene in soybean, primers for cloning *GmFtsH2* gene were designed in references with the *FtsH* gene sequences of *Arabidopsis* and other plants opened in GenBank. Full-length cDNA of *GmFtsH2* was cloned from soybean leaves with salt treatment, and analyzed with bioinformatics software online. The expression of *GmFtsH2* under the low temperature, salinity, drought and high temperature conditions were analyzed with real-time PCR. A full-length mRNA of 2 200 bp was cloned from soybean, and named *GmFtsH2* gene. The open reading frame was 2 091 bp, encoding 696 amino acids. The relative molecular weight was about 75.089 kDa and the theoretical isoelectric point was 5.65. Its protein instability index was 34.90, indicating a stable protein. The alignment of *GmFtsH2* in soybean and homologous protein amino acid sequence of *FtsH* from clover, grape, rice, corn and *Arabidopsis* sequence revealed that those proteins showed a common conservative domain structure, including membrane-spanning domains to N terminus, AAA-structure domain, Zinc ions in combination with module, etc. Phylogenetic analysis between *GmFtsH2* in soybean and *FtsH* protein of the other 19 kinds of plants showed that it was resembled to wild beans and kidney beans. Real-time RT-PCR analysis showed that *GmFtsH2* was expressed in soybean leaves, stem, root, stem tip, and the stem tip had the highest expression, the lowest expression was in the stem. The expression of *GmFtsH2* in soybean leaves was induced gradually with time and to a maximum at 9 and 12 h respectively under 4 °C low temperature and NaCl treatment. Under drought treatment *GmFtsH2* expression reached to maximum after 3 days. Thereafter *GmFtsH2* were down expressed subsequently and reached to a small peak again after 11 days treatment. It is suggested that the *GmFtsH2* plays a role in the resistance of adversity stress in soybean.

**Keywords:** soybean; *FtsH*; abiotic stress; expression analysis