

逆境诱导水稻谷胱甘肽合成酶基因的表达研究

麦维军, 曾纪晴, 张明永*, 蔡昭艳

(中国科学院华南植物园, 广州 510650)

摘要: 用 RACE 方法获得了全长的水稻谷胱甘肽合成酶 (GS) 基因的 cDNA, 并命名为 *OsGS* (GeneBank accession No.: AY453405)。该 cDNA 全长 1 892 bp, 编码一个由 540 个氨基酸组成的多肽, 预测其氨基端 (N 端) 含有一段定位叶绿体的信号肽。比较水稻基因组定位结果表明 *OsGS* 基因位于水稻 12 号染色体短臂上, 转录区全长 6 321 bp, 由 12 个外显子和 11 个内含子组成。通过 RT-PCR 对 *OsGS* 在水稻正常生长条件和逆境条件下的表达进行了研究。结果表明, 在正常生长条件下, *OsGS* 在水稻幼苗的根和叶以及抽穗期水稻的根中表达; 但在抽穗期水稻的叶、茎和幼穗中表达, 这显示 *OsGS* 在水稻中的表达具有发育和组织特异性。利用抽穗期水稻的叶片为材料, 经高温、干旱和重金属逆境处理后, *OsGS* 在抽穗期叶片中的转录被诱导表达; 而在盐、低温、伤害逆境下则不被诱导。在轻度和中度干旱胁迫 4 h 后 *OsGS* 基因可被诱导表达。外源 ABA 处理也能够提高 *OsGS* 的转录水平, 这显示 *OsGS* 可能是依赖 ABA 信号途径的环境胁迫诱导基因。

关键词: 水稻; 谷胱甘肽合成酶基因; 基因表达; 胁迫

中图分类号: Q786

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2006)06-0451-09

Stress Inducible Expression Analysis of Glutathione Synthetase Gene in Rice (*Oryza sativa*)

MAI Wei-jun, ZENG Ji-qing, ZHANG Ming-yong*, CAI Zhao-yan

(South China Botanical Garden, the Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China)

Abstract: A full-length cDNA of rice (*Oryza sativa* L.) glutathione synthetase (GS) gene was obtained by 5'-RACE (rapid amplification of 5'-complementary DNA ends), and the gene was named as *OsGS* (GeneBank accession No.: AY453405). The 1 892 bp cDNA contained an open reading frame (ORF) encoding a polypeptide of 540 amino acid residues with a predicted signal peptide of chloroplast. The alignment of *OsGS* cDNA with the mapped genome sequences of rice indicated that *OsGS* is located in the short arm of rice chromosome 12, and the transcript region (6 321 bp) of this gene consists of 12 exons and 11 introns. The transcriptions of *OsGS* in rice under normal and stress conditions were studied by RT-PCR method. The results showed that, under normal conditions, the transcriptions of *OsGS* could be detected in roots, leaves of one-week old seedlings and roots of heading rice, but not in leaves, stems and spikes of heading rice. This result indicated that the expression of *OsGS* conforms to a spatio-temporal pattern. Under stress conditions, the expression of *OsGS* in the leaves of heading rice demonstrated that the transcription of *OsGS* was strongly induced by heat shock (40°C), cadmium and drought; but not by salt, low temperature and wound. Further transcription analysis showed that *OsGS* expression was strongly induced by mild and medium drought stress for 4 hours. In addition, the exogenous ABA could induce the transcription of *OsGS* in the leaves of flowering rice, suggesting that the response of *OsGS* to drought might be

收稿日期: 2006-03-02 接受日期: 2006-08-04

基金项目: 广东省自然科学基金项目 (06026070), 广东省科技计划项目 (2006A20101004), 国家自然科学基金 (30670169) 资助

* 通讯作者 Corresponding author

mediated by ABA-dependent pathway.

Key words: *Oryza sativa*; Glutathione synthetase gene; Expression; Stress

谷胱甘肽(glutathione, GSH)是生物体内的一种重要小分子三肽化合物。GSH 作为生物体内最主要的非蛋白巯基,是细胞内主要的还原型物质。它可以调节细胞内的氧化还原状态,维持硫醇和二氧化硫的平衡,保护生物体内蛋白质的巯基(-SH),对内、外源性毒物具有解毒作用。GSH 作为植物体内重要的抗氧化剂可以降低各种逆境胁迫中产生的活性氧的积累,减轻活性氧对植物体的伤害。GSH 还可能是逆境条件下的信号传递物之一^[1],可能涉及植物程序化死亡的诱导^[2],促进抵御真菌感染的各种基因转录^[3]。

生物体内的 GSH 是在 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶(γ -ECS, EC 6.3.2.2)及谷胱甘肽合成酶(GS, EC 6.3.2.3)的催化作用下,通过两个依赖 ATP 提供能量的反应,由谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸合成的。因为 GSH 可通过反馈抑制调控 γ -ECS 的活性, γ -ECS 被认为是 GSH 生物合成途径中的限速酶^[4-5]。但是,在某些逆境条件下 γ -ECS 是否可作为 GSH 合成途径中的关键酶仍有争议。比如,在 Cd 胁迫条件下, γ -ECS 可能不再是 GSH 合成的限制性酶,因为 Cd 胁迫会消耗植物体内的 GSH, GSH 对 γ -ECS 的反馈抑制被解除,而 GSH 合成酶活性在 Cd 胁迫下受到抑制,因此 GSH 合成酶可能成为 GSH 合成途径的限制酶^[6]。研究发现,过量表达 GSH 合成酶基因的印度芥菜(*Brassica juncea*)比野生型具有更高的 GSH 含量和更高的植物螯合肽(PC)合成能力,结果也提高了植株对 Cd 的抗性,而且转化植株体内能积累更多的 Cd^[6]。因此,GSH 合成酶在植物的抗逆性反应中具有不可忽视的作用。

Ullmann 等在 1996 年首次从拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中克隆了植物 GSH 合成酶基因^[7]。此后,植物谷胱甘肽合成酶基因陆续在豌豆(*Pisum sativum*)^[8]、蒺藜状苜蓿(*Medicago truncatula*)^[9]、大豆(*Glycine max*)、玉米(*Zea mays*)、小麦(*Triticum aestivum*)^[10]和百日菊(*Zinnia elegans*)^[11]等植物中被克隆,但迄今还没有水稻 GSH 合成酶基因被克隆的报道。因此,克隆水稻 GSH 合成酶基因并研究其在水稻中的功能,对了解 GSH 在水稻生长发育与抗逆的作用具有一定的意义。本文报道

了水稻 GSH 合成酶基因的克隆和在水稻中的逆境诱导表达分析的初步结果。

1 材料和方法

1.1 材料

水稻(*Oryza sativa* L. cv. Nipponbare)来源于日本水稻资源中心。EST 克隆(R3434、S21515 和 S1893)来自日本水稻基因组计划(RGP)。

1.2 水稻总 RNA 的提取

剪取开花期水稻叶片 200 mg(每叶片取中部 2 cm),采用 Qiagen 公司的 RNeasy Plant Mini Kit 提取水稻叶片总 RNA。经 RNase free 的 DNase I (TaKaRa)处理,以去除可能的 DNA 污染。

1.3 5'-RACE

用于 5'-RACE (rapid amplification of 5' complementary DNA ends) 的水稻谷胱甘肽合成酶基因的特异引物为:5'-TCA CCA CTT TTG TCA AGT GCA TAT AC-3'。扩增出来的片断经测序(上海联众基因公司)确认后用 *Bam*HI 酶切,再将 *OsGS* cDNA 的 3'-和 5'-端连接起来,以得到水稻 GSH 合成酶基因的全长 cDNA,操作方法参见 Clontech 公司的 SMART RACE cDNA Amplification Kit 操作手册。

1.4 RT-PCR

扩增 *OsGS* mRNA 的引物为:Primer R, 5'-CTG CAT TAG GAT GTA GGC TGC;Primer L, 5'-TGG GAA CAC AGC AAT TGC TC。

为了检测水稻 *OsGS* cDNA 的表达,将组成性表达的水稻 *Actin* 基因 mRNA (GenBank 登录号:AB047313)作为 *OsGS* mRNA 半定量 RT-PCR 的内标。扩增 *Actin* mRNA 的引物根据 AB047313 设计为:*Actin* L primer: 5'-CCG GAA TTC CGG ATG TCA TTT TCG;*Actin* R primer: 5'-GGG TTC GAA CCC AAT AGT CAC AAA。

一步法 RT-PCR 采用 Promega 公司的 AccessQuick™ RT-PCR System 进行。逆转录(RT)反应条件为:37℃ 保温 15 min 后再在 42℃ 保温

30 min, 94℃ 灭活逆转录酶 2 min 后进行 PCR 扩增反应。PCR 反应条件为: 94℃ 45 s, 60℃ 45 s, 72℃ 1 min, 共 29 个循环; 最后 72℃ 扩展 5 min。取 20 μl 反应液在 2% 的琼脂糖上电泳并拍照记录结果。

1.5 *OsGS* 基因的结构分析

基因组和 cDNA 序列比对在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> 和 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Genome/PlantBlast.shtml?2>) 上进行。*OsGS* cDNA 序列在 expasy (<http://www.expasy.ch/tools/dna.html>) 进行翻译, 预测水稻 GSH 合成酶的一级结构和大小。*OsGS* 编码的多肽氨基酸序列在 <http://wolfsort.seq.cbrc.jp/> 上用 PSORT 软件预测其在细胞中的定位。在 <http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/> 上用 ChloroP 1.1 软件预测信号肽片段长度。氨基酸序列同源性分析在 <http://clustalw.genome.jp/> 上利用 CLUSTAL W (1.83) 软件进行。利用 Phylip 和 Treeview 建立谷胱甘肽合成酶的进化树并分析。

1.6 水稻的逆境处理

不同逆境胁迫处理 取开花期水稻叶片(每叶片取中部 2 cm), 浸泡于各种处理液中以模拟各种逆境。各种处理如无特殊说明, 均在 25℃ 下进行。低温处理: 水稻叶片于双蒸水中 10℃ 浸泡 24 h; 高温处理: 水稻叶片于双蒸水中 40℃ 浸泡 2 h; 盐胁迫处理: 水稻叶片于 100 mmol/L NaCl 中浸泡 24 h; 干旱处理: 水稻叶片于 10% PEG (FW=6000, 纯度 ≥ 99%, Sigma) 中浸泡 24 h; 伤害处理: 取最上一片叶切成 1 cm 段浸水中 24 h; 重金属处理: 水稻叶片于 100 μmol/L 乙酸镉 (Cd(CH₃COO)₂) 中浸泡 24 h; 以上溶液均加入 0.01% Triton-100。

不同浓度 PEG 干旱胁迫处理 剪取开花期

水稻叶片(每叶片取中部 2 cm), 浸泡于 0%、5%、10%、15%、20%、25% 和 30% PEG (FW=6000, 纯度 ≥ 99%, Sigma) 水溶液 24 h (加入 0.01% Triton-100)。

不同时期干旱胁迫处理 将开花期水稻移栽到 2 000 cm² 花盆中, 一株一盆, 正常浇水 10 d 后停止浇水, 从停止浇水当天开始每隔 3 d 从一盆水稻中剪取 200 mg 叶片用于提取总 RNA, 一直持续到第 21 天。

不同外源信号分子处理 剪取开花期水稻叶片(每叶片取中部 2 cm), 浸泡于 0.5 mmol/L 水杨酸 (SA, salicylic acid)、0.5 mmol/L 脱落酸 (ABA, abscisic acid) 和 1% 过氧化氢 (H₂O₂) 溶液 24 h (加入 0.01% Triton-100)。

2 结果和分析

2.1 谷胱甘肽合成酶基因的结构

利用拟南芥的谷胱甘肽合成酶基因 cDNA (X83411) 与 GenBank 中水稻 EST 进行同源分析后发现 3 个 EST 克隆可能是水稻 GSH 合成酶基因的 EST 克隆, 从日本 RGP 获得了这 3 个克隆 (S21512、S1393、R3434)。对获得的 3 个 EST 克隆进行测序后, 结果发现 R3434 克隆与其它植物的 GSH 合成酶基因完整序列具有很高的同源性, 但不是全长的 cDNA, 缺少 5' 端。于是通过 5'-RACE 的方法获得全长的水稻 GSH 合成酶基因的 cDNA (GenBank 登录号: AY453405)。该序列全长 1 892 bp, 阅读框介于 +28 与 +1 650 bp 之间, 与水稻基因组比较, 结果表明水稻谷胱甘肽合成酶基因转录区全长 6 321 bp, 位于水稻 12 号染色体短臂上, 含有 12 个外显子和 11 个内含子 (图 1), 除第 6 个内含子按 AT/AC 方式剪切外, 其余 10 个内含子

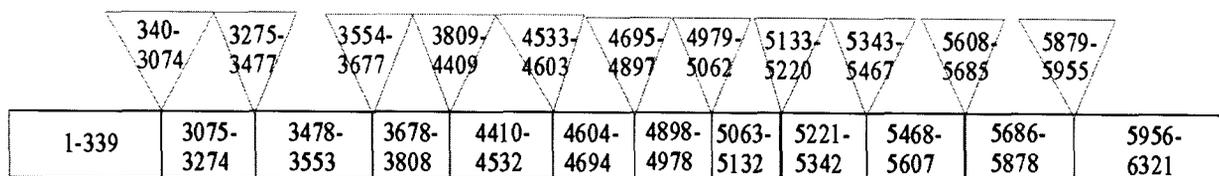


图 1 水稻 *OsGS* 基因结构示意图

Fig. 1 The genomic structure of rice glutathione synthetase gene (*OsGS*)

方框表示外显子, 三角形表示内含子, 数字表示外显子和内含子的大小。

The relative positions and sizes of the exons and introns are indicated by boxes and triangles respectively.

都严格符合内含子和外显子的 GT/AG 剪切规则。把这一水稻谷胱甘肽合成酶基因命名为 *OsGS*。取 *OsGS* 转录区上游 2 000 bp DNA 序列在 <http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html> 上进行顺式作用调控元件的搜索, 发现了许多与逆境胁迫(干旱、高温、低温、病原菌和伤害)和信号传导(ABA、乙烯和SA)相关的顺式元件(表 1)。另外, 该启动子区还发现一些光调控基因所共有的顺式元件(如 GT-1 和 GATA 模块)以及真核生物基因所共有的 TATA 和 CAAT 盒等。

2.2 水稻谷胱甘肽合成酶基因编码多肽的一级结构

预测 *OsGS* cDNA 编码一个含有 540 个氨基酸的多肽, 其等电点 (PI) 为 6.01, 分子量 (MW) 为 58 969 Da。预测的 *OsGS* 多肽与其它物种已知的谷胱甘肽合成酶做了聚类比较, 发现与其它物种的谷胱甘肽合成酶有很高的相似性, 与小麦谷胱甘肽合成酶的相似性为 88%。在多肽的 C 末端具有谷胱甘肽合成酶多肽均具有的富含甘氨酸的保守序列: KPQREGGNN (图 2)。用 PSORT II 和 ChloroP 1.1 软件发现在 *OsGS* 编码的多肽氨基酸序列 N 末端有 47 个氨基酸组成的叶绿体定位信号肽序列, 显示 *OsGS* 的表达产物可能被运输进入叶绿体。

2.3 水稻谷胱甘肽合成酶的进化树分析

从 NCBI 获得 18 条各物种的谷胱甘肽合成酶

氨基酸序列, 利用软件 Phylip 生成进化树。进化树分析结果表明谷胱甘肽合成酶家族可以分成微生物、动物和植物 3 个大类群 (图 3)。水稻谷胱甘肽合成酶与小麦和玉米等单子叶植物的亲缘关系最近, 与豌豆和番茄 (*Lycopersicon esculentum*) 等双子叶植物的亲缘关系较远, 与动物和微生物的亲缘关系最远。这与水稻的进化地位和水稻与其它生物的亲缘关系相一致。

2.4 水稻谷胱甘肽合成酶基因的组织表达特异性

通过 RT-PCR 来检测 *OsGS* 的表达, 结果表明: 在正常生长条件下, *OsGS* 在水稻幼苗的根和叶以及开花期的根中表达, 但不在开花期的叶、茎和幼穗中表达, 具有发育与组织表达的特异性。从图 4 中可见组成性表达的水稻 *Actin* 基因的转录不具组织与发育特异性 (图 4 中 *Actin* 扩增带), 但 *OsGS* 的 RT-PCR 扩增带只在水稻幼苗的根和叶以及开花期水稻的根中可见 (图 4 中 *OsGS* 扩增带)。

2.5 谷胱甘肽合成酶基因在逆境条件下的诱导表达

以开花期水稻作为逆境诱导实验的材料。RT-PCR 结果显示开花期水稻叶片谷胱甘肽合成酶基因响应各种逆境条件诱导表达的结果 (图 5)。高温、干旱和重金属 Cd 可诱导水稻谷胱甘肽合成酶基因 *OsGS* 在抽穗期叶片中表达 (转录), 而盐、低温、伤害逆境则不能诱导其表达。这表明水稻谷胱

表 1 *OsGS* 上游序列中与逆境和信号传导有关的顺式元件预测

Table 1 Predicted *cis*-elements associated with stress and signal conduction within the upstream of *OsGS*

顺式元件 <i>cis</i> -elements	在 <i>OsGS</i> 上游的位置 Position of the <i>cis</i> -elements within the upstream of <i>OsGS</i>	功能 Predicted functions
DRE2COREZMRAB17	-698	ABA和脱水响应元件
MYB1AT	-901, -995	ABA和脱水响应元件
MYBCORE	-231, -680	ABA和脱水响应元件
MYB2CONSENSUSAT	-682	ABA和脱水响应元件
MYCONSENSUSAT	-1385, -1115, -416, -317, -232, -196	ABA和脱水响应元件
MYCATERD1	-196	干旱胁迫响应元件
HSE	-1382	热激响应元件
LTRECOREATCOR15	-697	低温响应核心元件
ERELEE4	-538	乙烯响应元件
ELRECOREPCRP1	-141	病原菌elicitor响应元件
WBOXATNPR1	-141, -1661	SA诱导的WRKY识别位点
WBOXNTERF3	-140, -1217	伤害诱导相关元件
WRKY7IOS	-1827, -1487, -1217, -140	赤霉素信号传导途径转录抑制因子WRKY结合位点

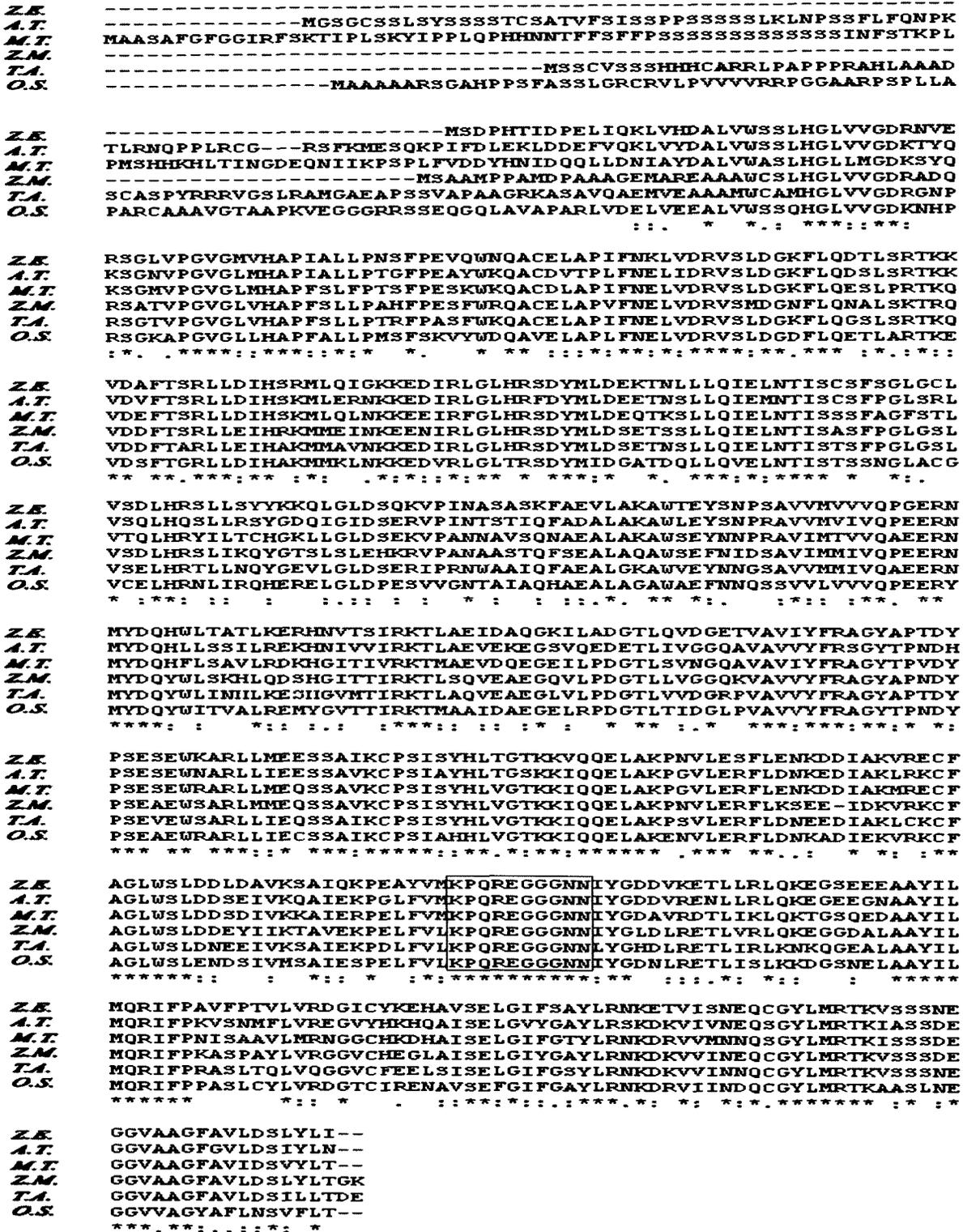


图 2 水稻谷胱甘肽合成酶 (GS) 蛋白和其它植物 GS 蛋白氨基酸序列的同源性比较

Fig. 2 Amino acid alignment of glutathione synthetase in various plants

O.S.: 水稻 *Oryza sativa*; Z.E.: 百日菊 *Zinnia elegans*; A.T.: 拟南芥 *Arabidopsis thaliana*; M.T.: 蒺藜状苜蓿 *Medicago truncatula*;

Z.M.: 玉米 *Zea mays*; T.A.: 小麦 *Triticum aestivum*. GS 家族富含甘氨酸的保守区域用方框标记; “*、.”表示氨基酸序列相似程度。

Conserved glycine-rich domain of glutathione synthetase family are boxed; *, . and . indicate the similarity of amino acid.



图 3 谷胱甘肽合成酶家族的进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of glutathione synthetase based on the amino sequences

种名后为该蛋白在 GenBank 中的登录号。The proteins GenBank accession numbers are listed after the species names.

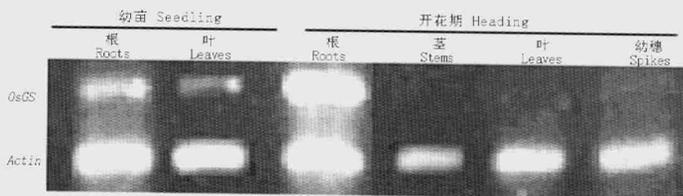


图 4 水稻谷胱甘肽合成酶基因的组织表达特异性的 RT-PCR 分析

Fig. 4 RT-PCR analysis of *OsGS* mRNA transcription in rice under normal condition

用于 RT-PCR 的总 RNA 提取自发芽 7 d 的水稻幼苗的根和叶及开花期水稻的根、茎、叶和幼穗。Total RNAs for RT-PCR were extracted from roots and leaves of 7-day-old rice or roots, stems, leaves and spikes of heading rice, which were grown under normal conditions.

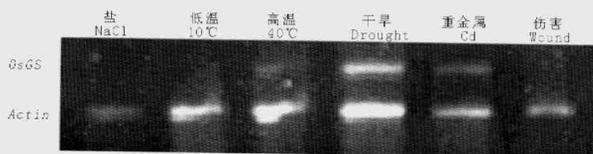


图 5 抽穗期水稻叶片中 *OsGS* 在逆境条件下诱导表达的 RT-PCR 结果

Fig. 5 RT-PCR analysis of *OsGS* transcription under various abiotic stresses

抽穗期水稻叶片中 *OsGS* 在高温 (40°C, 2 h)、干旱 (10% PEG, 24 h) 和重金属 (100 μmol/L Cd(CH₃COO)₂, 24 h) 的逆境处理下诱导表达, 但在盐 (100 mmol/L NaCl, 24 h)、低温 (10°C, 24 h) 和伤害等逆境处理下不被诱导。水稻肌动蛋白基因的 RT-PCR 产物作为内标, 扩增带为 *Actin*, *OsGS* 的 RT-PCR 扩增带为 *OsGS*。 *OsGS* transcription pattern in the leaves of heading rice showed that the expression of *OsGS* could be induced by high temperature (40°C for 2 h), draught (10% PEG for 24 h) and heavy metal (100 μmol/L Cd(CH₃COO)₂ for 24 h) treatment, but not by salt (100 mmol/L NaCl for 24 h), low temperature (10°C for 24 h) and wound treatment for 24 h. RT-PCR for *OsGT1* and *Actin* was carried out in a same PCR reaction and their primers were showed in the text. The constitutive expression of *Actin* gene was used as an internal control.

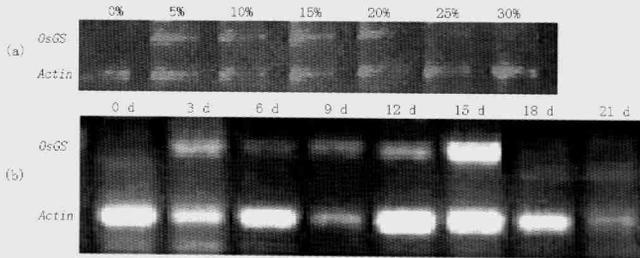


图 6 开花期水稻叶片中谷胱甘肽合成酶基因在不同程度干旱逆境下的诱导表达

Fig. 6 The inducible expression of *OsGS* in the leaves of heading rice under different strength of drought (a) 经不同浓度 PEG 脱水处理后的水稻谷胱甘肽合成酶基因的 RT-PCR 分析; (b) 在干旱处理的不同时期 (停止浇水 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21d) 水稻谷胱甘肽合成酶基因的 RT-PCR 分析。 (a) RT-PCR analysis of *OsGS* transcription in rice leaves after dehydration treatments by different concentration of PEG; (b) RT-PCR analysis of *OsGS* transcription in rice leaves after natural drought treatments (0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 and 21 days after stopping irrigation).

甘肽合成酶基因可能并不是环境胁迫普遍性诱导基因,而是选择性抗性诱导基因。

2.6 谷胱甘肽合成酶基因与水稻抗旱的关系

PEG 具有脱水的作用,在离体条件下可用于人工模拟干旱胁迫。通过 RT-PCR 的方法检测 *OsGS* 基因在水稻干旱条件下的诱导表达,从而了解 *OsGS* 基因在水稻抗旱中的作用,图 6 (a) 显示水稻开花期叶片谷胱甘肽合成酶基因在 PEG 的浓度为 5%、10%、15% 和 20% 的模拟干旱胁迫条件下可被诱导表达。而在更高浓度则不被诱导。图 6 (b) 显示水稻谷胱甘肽合成酶基因在水稻处于自然干旱胁迫下,即停止浇水后的 3、6、9、12 和 15 d 被诱导表达,而在干旱 18、21 d 等更长的时间后其转录则停止了。这些结果显示 *OsGS* 基因是干旱逆境响应基因,抽穗期的叶片在中度和中度干旱胁迫可诱导 *OsGS* 的转录。

2.7 谷胱甘肽合成酶基因的诱导信号分子

目前的研究表明植物对干旱胁迫可通过两条途径而发生响应,即一是依赖 ABA 的途径,另一则是独立于 ABA 的反应途径。为了探求谷胱甘肽合成酶基因诱导表达的信号途径,利用已有文献报道的具有氧化胁迫信号分子功能的 3 种小分子物质,水杨酸、脱落酸和过氧化氢作为外源信号分子对实验材料进行处理后,提取总 RNA,通过 RT-PCR 研究谷胱甘肽合成酶基因的诱导表达情况。结果表明

谷胱甘肽合成酶基因能被外源脱落酸 (ABA) 诱导表达 (图 7),说明谷胱甘肽合成酶基因诱导表达的信号途径可能依赖 ABA 的信号传导途径。



图 7 开花期水稻叶片中谷胱甘肽合成酶基因在外源信号分子处理下的诱导表达

Fig. 7 *OsGS* expression in the leaves of heading rice induced by exogenous 100 μmol/L of SA, ABA and 1% of H_2O_2 .

3 讨论

本文用 5'-RACE 方法首次从水稻中获得了谷胱甘肽合成酶基因的 cDNA 全序列克隆 (GenBank 登录号: AY453405), 并与水稻基因组序列进行比较分析了 *OsGS* 基因的结构, 发现 *OsGS* 基因位于水稻 12 号染色体短臂 (BAC 克隆序列号: AL731744), 含有 12 个外显子和 11 个内含子 (图 1), 全长 6 321 bp, 编码 540 个氨基酸。在网上进行 *OsGS* 基因启动子分析, 发现了许多与逆境胁迫 (干旱、高温、低温、病原菌和伤害) 和信号传导 (ABA、乙烯和 SA) 相关的顺式元件 (表 1)。通过大肠杆

菌异源表达, 检测了水稻谷胱甘肽合成酶活性, 证实得到的 *OsGS* 基因具有活性(数据未提供)。这说明所克隆的 *OsGS* 基因确实是水稻谷胱甘肽合成酶的基因。

Schafer 等的研究表明, 芥菜 (*Brassica juncea*) 谷胱甘肽合成酶存在一个小的多基因家族^[12], 而 Ullmann 等的研究结果显示拟南芥的谷胱甘肽合成酶基因是单基因, 并且存在编码定位到叶绿体的转运肽序列^[7]。最新的研究发现, 尽管预测拟南芥谷胱甘肽合成酶基因含有编码定位到叶绿体的转运肽序列, 但实验表明该基因主要在细胞质中表达^[13], 这与 May 等^[11]观察到拟南芥谷胱甘肽合成酶基因在细胞质和叶绿体中均有表达的结果相符^[14]。我们的研究也发现 *OsGS* 仅存在于水稻 12 号染色体短臂的一个 BAC 克隆上, 显示 *OsGS* 是一个单拷贝基因, 同时 *OsGS* 具有编码定位叶绿体的转运肽的序列, 但 *OsGS* 基因表达的确切定位还有待实验证实。另外, 我们的研究表明 *OsGS* 在水稻幼苗的根和叶以及开花期水稻的根中表达, 但不在开花期的叶、茎和幼穗中表达。虽然 *OsGS* 具有定位叶绿体的转运肽序列, 但它并不在开花期水稻的叶中表达。这表明水稻 *OsGS* 基因编码产物可通过组织和器官的特异表达调控机制分布于植物不同的部位。同时它们合成的谷胱甘肽也可以在不同细胞与组织间运输, 而且谷胱甘肽运输基因在不同物种中都是多基因家族^[14], 表明在某些特定部位合成的 GSH 可以通过运输到它所需要发挥功能的地点。

逆境诱导表达试验结果显示, 在高温、干旱和重金属逆境处理后, *OsGS* 在抽穗期叶片中的转录被诱导表达, 而在盐、低温、伤害逆境下则不被诱导。而在低温、盐和伤害等环境胁迫下并不被诱导, 这可能表明水稻谷胱甘肽合成酶基因并不是环境胁迫普遍性诱导基因, 而是选择性抗性诱导基因。

研究表明, 在轻度的干旱胁迫下, 各种抗氧化小分子如谷胱甘肽、抗坏血酸和维生素 E 等在抗氧化胁迫中起着主要作用^[14]; 在中度干旱胁迫下抗氧化小分子与过氧化物酶等保护酶共同组成有效的抗氧化系统^[17]; 但是随着干旱程度加深, 自由基的产率提高, 清除系统趋于饱和, 伤害变得难以避免, 伤害的加深破坏了植物细胞的防御体系, 细胞趋于死亡^[18]。本实验通过检测谷胱甘肽合成酶基因在不同程度和不同时间的干旱胁迫的诱导表达验证了这

一点。而这也证明了谷胱甘肽合成酶基因具有抵抗干旱胁迫的功能。

现在认为干旱胁迫下氧化胁迫诱导基因的信号途径有 4 条, 两条是依赖 ABA 的途径, 另两条是不依赖 ABA 的途径。一条依赖 ABA 的信号途径需要蛋白的合成; 另一条信号途径的调控主要在转录水平, 许多相关的顺式和反式作用元件已经被鉴定; 一条非依赖 ABA 途径同时也能被冷胁迫诱导; 一些干旱诱导基因不被 ABA 也不为冷胁迫所诱导, 这表明存在第四条信号途径^[19]。我们的实验结果显示水稻谷胱甘肽合成酶基因能被 ABA 处理所诱导, 但不能被冷胁迫诱导。所以诱导水稻谷胱甘肽合成酶基因表达的信号途径可能是依赖 ABA 的途径。我们在 *OsGS* 基因上游发现了许多与水分胁迫和 ABA 响应有关的顺式元件更证明了这一点。一些基因响应干旱胁迫很迅速, 10 min 内就被诱导表达, 而另一些基因在 ABA 累积到一定程度才被诱导, 所以响应速度比较缓慢, 需要几小时甚至更长的时间^[20]。我们的实验显示水稻谷胱甘肽合成酶基因在 ABA 处理 8 h 才被诱导表达。这表明水稻谷胱甘肽合成酶基因是胁迫缓慢响应基因, 信号传导途径属于依赖 ABA 同时需要蛋白合成的途径。Wingate 等^[3]和 Dhindsa^[21]的研究表明 GSH 是诱导干旱胁迫的信号分子。根据前人和我们的研究, GSH 可能是环境胁迫的二级或三级信号分子。

参考文献

- [1] Lappartient A G, Vidmar J J, Leustek T, et al. Inter-organ signaling in plants: regulation of ATP sulfurylase and sulfate transporter genes expression in roots mediated by phloem-translocated compound [J]. *Plant J*, 1999, 18(1):89-95.
- [2] Vanacker H, Foyer C H, Carver T L W. Change in apoplastic antioxidants induced by powdery mildew attack in oat genotypes with race non-specific resistance [J]. *Planta*, 1999, 208(3):444-452.
- [3] Wingate V P M, Lawton M A, Lamb C J. Glutathione causes a massive and selective induction of plant defense genes [J]. *Plant Physiol*, 1988, 87:206-210.
- [4] Richman P G, Meister A. Regulation of γ -glutamylcysteine synthetase by non-allosteric feedback inhibition by glutathione [J]. *J Biol Chem*, 1975, 250:1422-1426.
- [5] Hell R, Bergmann L. γ -Glutamylcysteine synthetase in higher plants: catalytic properties and subcellular location [J]. *Planta*, 1990, 180:603-612.
- [6] Zhu Y L, Pilon-Smits E A, Jouanin L, et al. Overexpression of

- glutathione synthetase in Indian mustard enhances cadmium accumulation and tolerance [J]. *Plant Physiol*, 1999, 119(1):73–80.
- [7] Ullmann P, Gondet L, Potier S, et al. Cloning of the *Arabidopsis thaliana* glutathione synthetase (*GSH2*) by functional complementation of a yeast *gsh2* mutant [J]. *Eur J Biochem*, 1996, 236(2): 662–669.
- [8] Moran J F, Iturbe-Ormaetxe I, Matamoros M A, et al. Glutathione and homogluthathione synthetases of *Legume nodules*. Cloning, expression, and subcellular localization [J]. *Plant Physiol*, 2000, 124 (3):1381–1392.
- [9] Frendo P, Jimenez M J, Mathieu C, et al. A *Medicago truncatula* homogluthathione synthetase is derived from glutathione synthetase by gene duplication [J]. *Plant Physiol*, 2001, 126 (4):1706–1715.
- [10] Skipsey M, Davis B G, Edwards R. Diversification in substrate usage by glutathione synthetases from soya bean (*Glycine max*), wheat (*Triticum aestivum*) and maize (*Zea mays*) [J]. *Biochem J*, 2005, 391(3):567–574.
- [11] Henmi K, Demura T, Tsuboi S, et al. Change in the redox state of glutathione regulates differentiation of tracheary elements in *Zinnia* cells and *Arabidopsis* roots [J]. *Plant Cell Physiol*, 2005, 46 (11):1757–1765.
- [12] Schafer H J, Haag-Kerwer A, Rausch T. cDNA cloning and expression analysis of genes encoding GSH synthesis in roots of the heavy-metal accumulator *Brassica juncea* L.: Evidence for Cd-induction of a putative mitochondrial gamma-glutamylcysteine synthetase isoform [J]. *Plant Mol Biol*, 1998, 37(1):87–97.
- [13] Wachter A, Wolf S, Steininger H, et al. Differential targeting of GSH1 and GSH2 is achieved by multiple transcription initiation: implications for the compartmentation of glutathione biosynthesis in the Brassicaceae [J]. *Plant J*, 2005, 41(1):15–30.
- [14] May M J, Vernoux T, Leaver C J, et al. Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development [J]. *J Exp Bot*, 1998, 49(321):649–667.
- [15] Zhang M Y, Bourbonloux A, Cagnac O, et al. A novel family of transporters mediating the transport of glutathione derivatives in plants [J]. *Plant Physiol*, 2004, 134(1):482–491.
- [16] Price A H, Taylor A, Ripley S J, et al. Oxidative signals in tobacco increase cytosolic calcium [J]. *Plant Cell*, 1994, 6(9):1301–1310.
- [17] Kranner I, Beckett R P, Wornik S, et al. Revival of a resurrection plant correlates with its antioxidant status [J]. *Plant J*, 2002, 31(1): 13–24.
- [18] Farrant J M. A comparison of mechanisms of desiccation tolerance among three angiosperm resurrection plant species [J]. *Plant Ecol*, 2000, 151(1):29–39.
- [19] Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2000, 3(3):217–223.
- [20] Yamaguchi-Shinozaki K, Koizumi M, Urao S, et al. Molecular cloning and characterization of 9 cDNAs for genes that are responsive to desiccation in *Arabidopsis thaliana*: Sequence analysis of one cDNA clone that encodes a putative transmembrane channel protein [J]. *Plant Cell Physiol*, 1992, 33 (3):217–224.
- [21] Dhindsa R S. Drought stress, enzymes of glutathione metabolism, oxidation injury and protein synthesis in *Tortula ruralis* [J]. *Plant Physiol*, 1991, 95(2):648–651.