

\* 学术论文 \*

复苏植物牛耳草引导蛋白基因的克隆与表达<sup>\*</sup>吴仁花 王丽丽 王智 商海红 刘霞 朱燕 亓崇东 邓馨<sup>\*\*</sup>

中国科学院植物研究所, 中国科学院光合作用与环境分子生理学重点实验室, 北京 100093

**摘要** 复苏植物生长在干旱频繁发生的特殊生境中, 具有耐极端干旱的特性, 是一种宝贵的耐旱基因资源植物。前期实验从复苏植物牛耳草的叶片中得到一个干旱诱导的细胞壁蛋白基因片段, 在此基础上利用 5'-RACE 获得全长 cDNA, 命名为 *BhDIR1*, 编码一个 199 个氨基酸的小分子量蛋白质, 与松柏等植物中发现的可能参与木质素合成的引导蛋白具有 20%—40% 的序列相似性。表达分析表明 *BhDIR1* 在复苏植物牛耳草干旱复水过程中 mRNA 明显积累, 激素、信号分子和温度胁迫都可诱导其表达。*BhDIR1* 在 N' 端包含一个外泌的信号肽, GFP 融合蛋白的荧光定位分析证实 *BhDIR1* 定位于细胞膜和壁上。根据牛耳草干旱后酸溶木质素含量下降这一现象及以上结果可推测, *BhDIR1* 可能通过调控木质素的单体间的连接方式而改变木质素的物理性质来影响细胞壁的机械强度和柔韧性, 减少干旱对细胞造成的机械伤害。

**关键词** 复苏植物 引导蛋白 干旱 木质素 细胞壁

干旱是植物生长过程中经常遭遇的环境胁迫, 而不同植物抵御干旱的能力及方式不尽相同。仙人掌等形成了适于保护水分的特殊形态结构; 短命菊等“短命植物”形成了在雨季迅速完成生活史的短暂生活周期, 从而避开旱季; 与大多数植物采取吸水、保水、用水的策略不同, 一类被称之为复苏植物的特殊植物在干旱时会快速失水以达到一种类似休眠的状态, “干而不死”, 在水分适宜时又迅速恢复生活状态, 继续其生活史。这类植物通常生活在干旱频繁发生的特殊生境中如喀斯特石山上, 但其耐旱机制还未为人知。很多研究表明, 复苏植物细胞内存在着较高水平的抗氧化酶、渗透调节物质、保护性大分子如 LEA 蛋白等, 并在干旱时通过积累大量的蔗糖或其他寡糖形成“玻璃化”状态来降低代谢速率, 这些胞内机制是复苏植物耐旱的主要

原因<sup>[1]</sup>。但近来很多证据表明细胞壁的韧性和强度可能对复苏植物耐旱复苏起到重要作用。对 *Cra-terostigma wilmsii*, *Myrothamnus flabellifolius* 和 *Sporobolus stapfianus* 等植物的观察发现脱水后叶肉细胞皱缩的同时, 很多细胞的细胞壁也发生明显折叠, 这使细胞发生质壁分离的可能性大为降低<sup>[2-3]</sup>; 有助于减轻细胞膜的破坏程度和维持细胞结构的完整性。对复苏植物细胞壁的结构和组成研究, 发现除作为细胞壁主要组成成分的糖类发生变化外, 一些细胞壁相关蛋白的编码基因的表达也受到干旱诱导。例如复苏植物脱水时细胞壁 expansin 蛋白编码基因表达上调, 且其上调与细胞壁韧性相关<sup>[4]</sup>。Neale 等<sup>[5]</sup>发现在禾本科复苏植物 *S. stapfianus* 脱水叶组织中有两个细胞壁结构蛋白的编码基因受干旱诱导而增加表达量。

我国自 1999 年来已在国际学术期刊上发表了

2008-03-17 收稿, 2008-04-23 收修改稿

\* 国家自然科学基金资助项目(批准号: 30400027)

\*\* 通信作者, E-mail: deng@ibcas.ac.cn

©1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

多篇关于复苏植物的研究报道<sup>[6-10]</sup>. 在对苦苣苔科旋蒴苣苔属植物牛耳草 (*Boea hygrometrica* (Bunge) R Br.) 的研究中, 发现牛耳草叶片的光合活性在脱水时显著降低, 但复水恢复; 而叶绿素和类囊体膜叶绿素-蛋白复合物在脱水复水过程中保持高度的稳定<sup>[8]</sup>; 很多基因在脱水及复水时也受到明显的诱导或抑制<sup>[9]</sup>; 蛋白质组学研究表明牛耳草中 35% 的蛋白在干旱时显著积累, 5% 的蛋白在复水时显著累积, 其中 8 种蛋白在活性氧的清除、光合作用和能量代谢方面起作用<sup>[10]</sup>. 电子显微镜观察发现牛耳草叶片的细胞壁在干旱时发生向内折叠<sup>[11]</sup>, 因此对在牛耳草干旱过程中表达的细胞壁相关蛋白的研究将对揭示其耐旱复苏机制具有重要的价值. 王丽丽<sup>[12]</sup> 利用 cDNA 微阵列技术在脱水 2 h 的牛耳草叶片的 cDNA 文库中找到了一个干旱诱导的与细胞壁木质素合成相关的引导蛋白编码基因片段, 本文在此基础上, 对这个基因进行克隆和表达研究.

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

牛耳草成熟植株采自北京植物园, 温室中盆栽土培, 25 °C, 16h/8h 光周期, 正常供水. 适应 2 周后, 取离体叶片, 在人工气候箱 (25 °C、相对湿度 50%、16h/8h 光周期) 中干旱处理. 在脱水前 (d0)、脱水 2 h (d2)、8 h (d8)、24 h (d24)、72 h (d72)、复水 8 h (r8)、复水 48 h (r48), 取样用于提取 RNA. 离体叶片干旱后的复水在放有湿滤纸保湿的培养皿中进行.

为研究牛耳草引导蛋白基因对激素等信号分子和其他环境胁迫的响应, 取牛耳草叶片分别浸泡于 100 μmol/L ABA, 0.5 mmol/L SA, 40% 乙烯利, 5 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 10 mmol/L EGTA 和 200 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 中或在保湿的培养皿中分别进行 4 °C 和 37 °C 处理, 在处理前 (unt)、处理后 0.5 h (0.5)、8 h (8)、24 h (24) 分别取样用于提取 RNA.

### 1.2 5'-RACE 克隆 *BhDIR1* cDNA

5' 末端扩增及全长 cDNA 第一链的合成参照 Invitrogen life technologies instruction manual 进行, cDNA 第一链的合成采用引物 R-1: 5'-GCT CCTCCTGGCAATCC-3'; 第一轮 PCR 使用引物

Anchor primer-1: 5'-GGCCACGCGTCTGACTAG-TAC(G)<sub>14</sub>-3' 和基因特异性引物 R-2: 5'-CTC-CAAGTCCGAGAAGGCTCCGAA-3' 进行扩增 *BhDIR1* 5' cDNA 末端. 条件为 95 °C 预变性 5 min, 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 35 个循环, 最后 72 °C 10 min. 第一轮 PCR 产物大小与预期一致不再进行第二轮扩增.

### 1.3 克隆、测序与序列分析

PCR 产物经 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳后, 用胶回收试剂盒 (北京道普生物公司) 对目的片段进行纯化. 纯化产物与 pBS 载体连接, 转化大肠杆菌 DH5-α 感受态细胞, 对 PCR 检查为阳性的克隆进行测序 (北京奥科生物技术有限责任公司). 测序所得 cDNA 序列同源性比对和相似性搜索用 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) 网站 BLAST 软件进行, 氨基酸序列推断通过 ExPASy 网站 (<http://au.expasy.org>) 的程序翻译. 利用 CLUSTAL X (version 1.81) 软件对 *BhDIR1* 及多个分别来自拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、烟草 (*Nicotiana benthamiana*)、水稻 (*Oryza sativa*)、玉米 (*Zea mays*)、高粱 (*Sorghum bicolor*)、棉花 (*Gossypium barbadense*)、金钟花 (*Forsythia intermedia*)、大麦 (*Hordeum vulgare*)、红雪松 (*Thuja plicata*)、云杉 (*Picea glauca*, *P. sitchensis*) 等的引导蛋白序列进行比对. 进化树构建使用 *Mega* (version 3.1) 软件包进行. 采用邻接法 (*Neighbor-Joining method*) 构建进化树, 用 *bootstrap* (1000 replicates) 对所构建的进化树进行评估.

### 1.4 总 RNA 的提取

牛耳草叶片总 RNA 的提取用异硫氰酸胍-酚法 (分子克隆第二版).

### 1.5 半定量 RT-PCR

用 DNase (RNase free) 消化总 RNA 并确定无基因组 DNA 污染后, 用 Promega M-MLV 反转录酶进行反转录. 操作方法参照说明书. 选择 18S RNA 为内参, 用引物 18S-1: 5'-TTGTGTTG-GCTTCGGGATCGGAGTAAT-3' 和 18S-2: 5'-TG CACCACCACCATA GAATCAAGAA-3', 及 *BhDIR1* 基因的特异引物. 5'-CGGATCCA TGGGAAAGC-

TTG-3'和 5'-GACTCGAGATAATACGTAAGTACAG-3'; 以适当稀释后的逆转录产物为模板, 分别进行 PCR 反应, 条件如下: 95 °C 预变性 5 min, 94 °C 30 s, 57 °C 30 s, 72 °C 45 s, 24 个循环, 最后 72 °C 10 min.

### 1.6 BhDIR1-GFP 融合基因表达载体的构建及其亚细胞定位分析

利用基因 *BhDIR1* 的一对特异引物 (5'-CG-GATCCATGGGAAAGCTTG-3'和 5'-GACTCGAGATAATACGTAAGTACAG-3'), 通过 PCR 扩增基因的 cDNA 序列, 将 PCR 产物经过酶切连接到 GFP 载体上 (pGJ280, 德国波恩大学 D. Bartles 教授馈赠), 后又经酶切连接到载体 pBIN19 上, 得到包含 *CaMV35S*: *BhDIR1*: *GFP* 的融合表达载体, 经测序验证后转入农杆菌 LBA4404. *BhDIR1-GFP* 农杆菌瞬时转染本明烟的叶片, 2 天后撕取叶片表皮用激光共聚焦显微镜 (Zeiss, Germany) 进行观察并采集图像, 激发光波长为 488 nm. 为了确认蛋白定位情况, 撕下的烟草表皮浸入 0.8 M 甘露醇溶液中 5—10 min 进行质壁分离, 采集图像.

### 1.7 酸溶木质素含量的测定

采用 Klason 方法测定酸溶木质素的含量, 干燥后的植物材料用酒精抽提 8 h, 中间更换酒精 4 次. 干燥后称取 0.8 克粉末, 加入 12 mL 72% (W: W) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 于 20 °C 水浴中水化 2 h (每隔 10 min 振荡一次). 再加入 448 mL 水混匀, 121 °C 灭菌 1 h. 自然冷却后, 过滤得到木质素粉末, 滤纸用热水 (90 °C) 冲洗几次除去硫酸. 干燥箱内 80 °C 过夜烘干木质素粉末并称量. 用所得木质素粉末重量占植物干重的百分数来表示酸溶木质素的相对含量.

## 2 结果

### 2.1 *BhDIR1* 的克隆及序列分析

实验室前期利用 cDNA 微阵列技术分析复苏植物牛耳草的干旱诱导基因的研究发现, 在牛耳草干旱 2 h 的叶片中存在一个 521 bp 的干旱诱导基因片段, 与在云杉 (*P. glauca*) 中报道的细胞壁木质素合成相关的引导蛋白编码基因<sup>[13]</sup> 有约 35% 的相似性. 本文利用 5'-RACE 的方法得到

其全长的 cDNA 序列, 共 791 bp, 命名为 *BhDIR1*. 该 cDNA 序列编码一个 600 bp 的开放阅读框, 88 bp 的 5'-UTR, 95 bp 的 3'-UTR, 最终以 poly(A) 结尾. 该基因无内含子, 这与其他引导蛋白相同<sup>[14]</sup>. *BhDIR1* 编码一个 199 个氨基酸的蛋白, 经序列同源性分析, 发现 *BhDIR1* 与烟草中的引导蛋白 *NbDIR1* 相似性最高为 38%, 经 PSORT 分析 *BhDIR1* N-端具有一个 25 个氨基酸的胞外定位信号肽, 表明 *BhDIR1* 可能是一个细胞外分泌蛋白, *BhDIR1* 包含一个 Dirigent 保守域 (PF03018), 利用 HIV sequence database 预测 *BhDIR1* 多肽具有两个 N-糖基化位点分别在第 68 个氨基酸 (Asn) 和第 78 个氨基酸 (Asn) (图 1), 这与金钟花的引导蛋白 *FiDIR1* 有 4 个 N-糖基化位点类似<sup>[15]</sup>, 也是外泌蛋白的一个特征.

*BhDIR1* 与金钟花和烟草的引导蛋白进行序列比对 (图 1), 发现 *BhDIR1* 具有引导蛋白的 4 个保守的氨基酸基序, 图 1 中框出的氨基酸为其保守的氨基酸基序: 基序 I (FGsasVhDDPaT, 开始于第 87 氨基酸), 基序 II (SssVGRAQGhY, 开始于第 105 氨基酸), 基序 III (uTashsG, 开始于第 133 氨基酸), 基序 IV (RcaSVVGGTGcFhMARGaAsacT, 开始于第 156 氨基酸). *BhDIR1* 与拟南芥、大麦、云杉等植物中发现的引导蛋白的系统进化树显示, *BhDIR1* 属于 DIR-b 亚家族 (图 2), 但只在 DIR-b 亚家族的外围, 没有和任何一个其他的 DIR 聚到一起, 表明牛耳草的 *BhDIR1* 序列具有较大的特殊性.

### 2.2 *BhDIR1* 的表达分析

半定量 RT-PCR 结果 (图 3(a)) 显示 *BhDIR1* 未处理时 (d0) 有很弱的表达, 在干旱早期 (d0.5 h) 就被显著诱导表达, 直到干旱后期都保持大于 3 倍脱水 0 h 时的表达量, 复水后 48 h 内仍保持高水平的表达. Northern blots 进一步验证了 *BhDIR1* 在牛耳草干旱复水过程被诱导表达 (数据未列出). 高温 (37 °C) 可以迅速诱导 (0.5 h) *BhDIR1* 表达, 冷害 (4 °C) 诱导较慢, 处理 8 h 开始有积累, 而后略有降低 (图 3(b)).

BhDIR1	MMGKLDMSKSFLLIYSLIYVAIISGAFAKTGASKAPEPVDKWFAGLKKSLVPKFKFIEIYI
NbDIR1	---MEKLNLI LLLSSIAITISSIPFAHANISQEPKAVEKWFELKSHAKPKIKLHFYF
FiDIR1	-----MVSKTQIVALFLCFLTSTSSATYGRKPRPRRCKELVVFYFHDVLFKGNNYHNAT
	. : : : * . * . . * . * : . * . .
	基序 I                      基序 II
BhDIR1	QDIRGAANQTVVWLVAQSNISATSPTFFGQVYLADNILLTPKPESTRLGRAQGFQAFSDL
NbDIR1	HDIYVSGKNPTAIPIAQANSTSHSPSSFGLLAVLDDRLTIGPEINSTTIGRAQGVGAASL
FiDIR1	SATVGS-----PQWGNKTAMAVPPNYGDLVVFDDPIILDNNLHSPVVGRAQGMFYDQK
	* . . : : * : * : : * : * : : * : * : : * : * : : * : * : : * : * : : * : * : : *
	基序 III                      基序 IV
BhDIR1	EVPALPYSWNLAFTSGEYKGSSTLSISCRNQVLDYSSEPSIVGGTGHFRMASGIAIGANFL
NbDIR1	DEFSLLMSLNFVFTNGKYNGTSLLLGRNTVLNEYREMPIVGGSQVFRRLARGVATAKTYF
FiDIR1	NTYNAWLGFSPFNSTKYVGTLNFAQADPLLNKTRDISVIVGGTGDFFMARGVATLMTDA
	: . : . : * . : * * * * : * : * : : * : * : : * : * : : * : * : : * : * : : *
BhDIR1	PRDARGIAVLKTYTYFTYY
NbDIR1	LSNSSGDAIVEYNGVWLHY
FiDIR1	FEQDVYFRLRVDINLYECW
	. : . : :

图 1 BhDIR1 与金钟花的 FiDIR1、烟草的 NbDIR1 的氨基酸序列同源性比较  
相同氨基酸用“\*”表示并给以灰色背景，相似的氨基酸用“。”表示，缺失的氨基酸用“-”表示。黑线框出的部分为 BhDIR1 的保守基序。标有下划线的氨基酸为信号肽序列，三角标示的氨基酸为推测的 N-糖基化位点

*BhDIR1* 在  $\text{CaCl}_2$ 、 $\text{H}_2\text{O}_2$  和乙烯处理 0.5 h 时开始有明显的积累，并在处理过程中保持着稳定的表达量(图 3(b))；在 ABA 和 EGTA 处理 0.5 h 时也有明显的积累，随着处理时间的延长表达量逐渐升高(图 3(b))；也受 SA 诱导，且处理 8 h 时诱导最强(图 3(b))。以上结果表明 *BhDIR1* 可以快速的响应多种环境胁迫、激素和信号分子，故可能通过多种信号途径参与胁迫反应。

### 2.3 *BhDIR1*-GFP 的亚细胞定位

构建了 *BhDIR1*-GFP 的瞬时表达载体，并在本明烟叶片中表达，激光共聚焦显微镜观察发现 *BhDIR1*-GFP 荧光信号分布于细胞外围(图 4)，细胞内完全无信号，而 GFP 的荧光信号除在细胞外围，在细胞各个部位均有分布(图 4)。用高渗溶液使细胞发生质壁分离后，发现 *BhDIR1*-GFP 的多数荧光信号集中于质膜，有少量的信号留在壁上，但在胞内仍没有荧光信号(图 4)。而 GFP 的信号则仍是细胞各部位均可见。以上结果表明 *BhDIR1* 定位于细胞壁和细胞膜上。

### 2.4 牛耳草干旱过程中酸溶木质素含量的变化

引导蛋白可能参与木质素的合成，*BhDIR1* 在牛耳草干旱复水过程中被诱导表达，但高锰酸钾及间苯三酚染色未发现叶脉木质部细胞木质素含量有明显变化(数据未列出)。采用 Klason 方法测定新鲜的和完全脱水的牛耳草叶片的酸溶木质素含量，结果显示牛耳草完全脱水后，酸溶木质素的含量明显降低(图 5)。推测 *BhDIR1* 可能通过改变木质素单体的组成及连接方式而影响木质素的酸溶性，影响酸溶木质素的含量。

## 3 讨论

引导蛋白英文名为 Dirigent protein, Davin 等<sup>[10]</sup>于 1997 年在连翘属植物金钟花中首次发现。这种 26 ku 的糖基化蛋白，它可以聚合成分子质量为 78 ku 的聚合体。这个 78 ku 蛋白聚合体本身无催化中心，推测其功能是捕获木质素单体分子，并在氧化酶的作用下帮助单体分子按一定的方式聚合形成二聚体<sup>[11]</sup>。在体外漆酶存在的条件下这种金钟花中的引导蛋白(FiDIR)可以指导两个松柏醇聚合形成

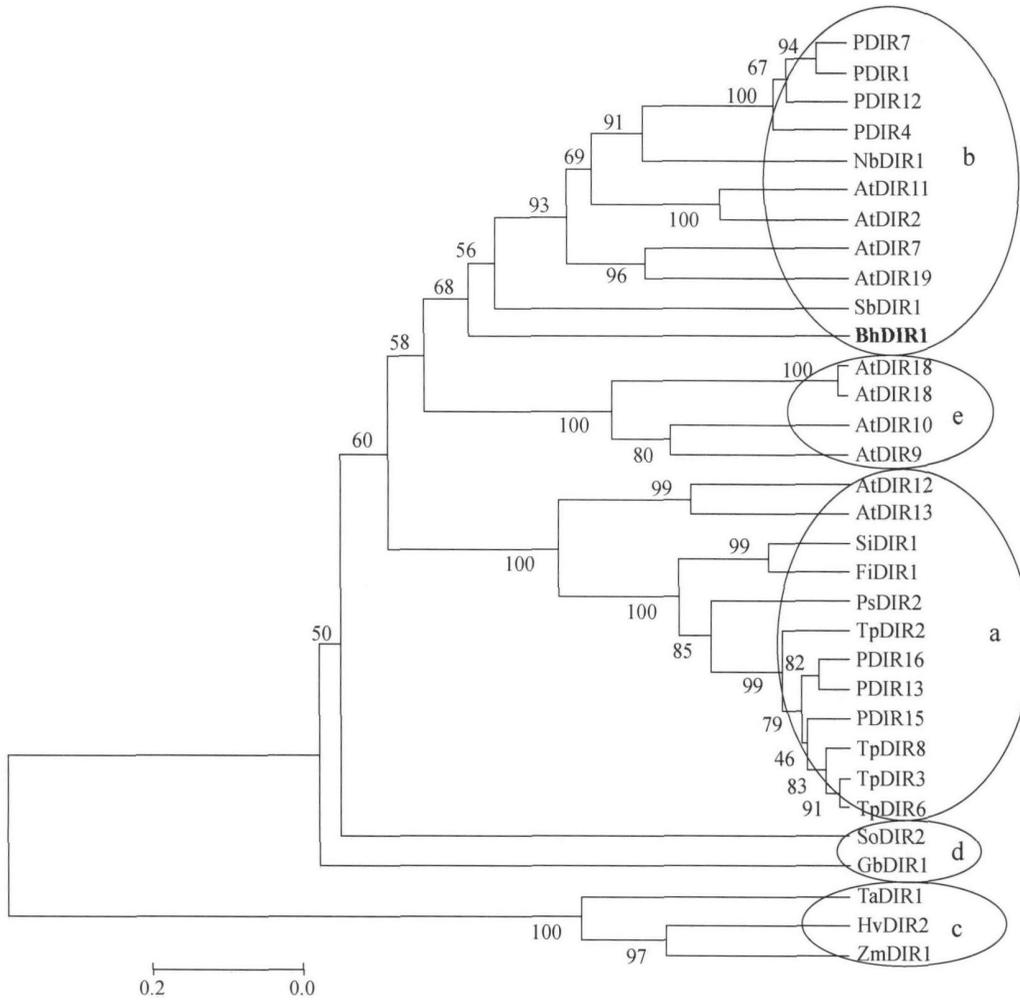


图 2 系统进化树

各蛋白的登录号分别是: PDIR7(云杉) ABD52118; PDIR12(云杉) ABD52123; PDIR4(云杉) ABD52115; NbDIR1(烟草) BAF02555; AtDIR2(拟南芥) AY093095; AtDIR7(拟南芥) AK118030; AtDIR19(拟南芥) AK117899; SbDIR1(高粱) AAM94289; AtDIR9(拟南芥) BT010722; AtDIR10(拟南芥) BT002889; AtDIR16(拟南芥) BT008336; AtDIR18(拟南芥) AY081267; AtDIR12(拟南芥) BT004016; AtDIR13(拟南芥) BT009718; SiDIR1(芝麻) AAT11124; FiDIR1(金钟花) AAF25357; PsDIR1(豌豆) AAD25355; TpDIR2(红雪松) AAF25360; PDIR15(云杉) ABD52126; PDIR13(云杉) ABD52124; TpDIR3(红雪松) AAF25361; TpDIR6(红雪松) AAF25364; TpDIR7(红雪松) AAF25365; TpDIR8(红雪松) AAF25366; SoDIR2(高粱) CAF25234; GbDIR2(棉花) AAY44415; TaDIR1(小麦) AAC49284; HvDIR1(大麦) AAA87042; ZmDIR1(玉米) AAF71261; PDIR1(云杉) ABD52112

具有右旋光性的松脂醇<sup>[16]</sup>, 引导蛋白在木脂体和木质素合成中的单体捕获及定向连接的引导作用, 说明其对细胞壁中木质素的单体组成及连接方式的决定起着重要的作用, 从而可能影响到细胞壁的物理性质(如机械强度、柔韧性)。

引导蛋白广泛存在于陆地植物中(地衣、蕨类植物、裸子植物和被子植物), 各种植物中引导蛋

白氨基酸序列的相似性在 19.5%—98.4% 之间<sup>[13]</sup>. 牛耳草中发现的干旱诱导表达的 *BhDIR1* 与其他植物的引导蛋白有一定的同源性, 并具有引导蛋白共有的保守氨基酸基序(图 1). Steven 等<sup>[11]</sup> 将引导蛋白归为 5 个亚家族: DIRa, DIRb, DIRc, DIRd 和 DIRe, DIRa 亚家族成员的研究表明, 它们可以引导木脂体和木质素形成时酚类分子的立体特异连接

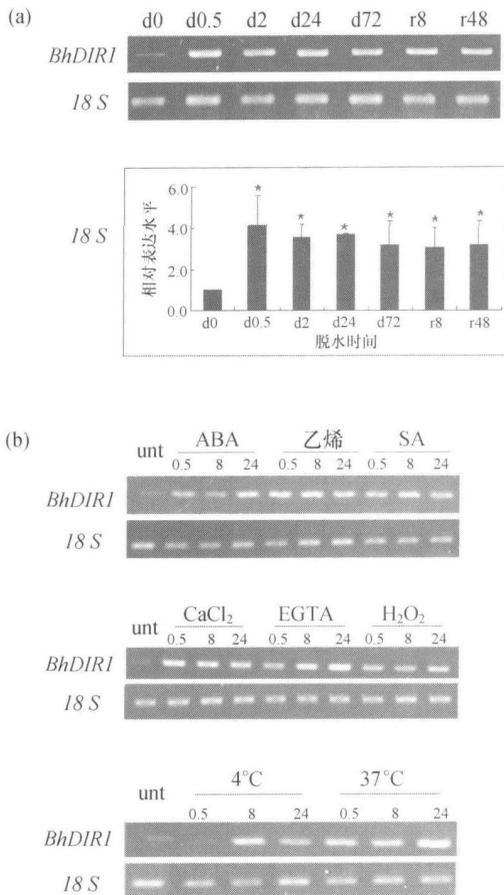


图 3 *BhDIR1* 的表达分析

(a) *BhDIR1* 分别在脱水 0h(d0)、脱水 0.5h(d0.5)、脱水 2h(d2)、脱水 24h(d24)、脱水 72h(d72)、脱水 72h 复水 83h(r8)、脱水 72h 复水 48h(r48) 的牛耳草叶片中的表达；表达水平相对于 18S，显著性水平 \*  $P < 0.05$ ；(b) 激素、信号分子及温度胁迫处理 0.5h(0.5)、8h(8)、24h(24) 对牛耳草叶片中 *BhDIR1* 表达水平的影响。unt, 未处理；18S 作为内参，所有 RT-PCR 反应最少重复 2 次

反应，故认为 DIRa 亚家族成员为真正的 dirigent protein 基因。而其他亚家族的基因 (*PDIR10* 和 *PDIR12*) 除了在云杉 (*Picea spp.*) 中发现其在各组织中组成性表达外，尚未有功能方面的研究，故称为 dirigent-like protein 基因。而 *BhDIR1* 属于功能尚未研究的 DIRb 亚家族 (图 2)，而且在构建的进化树中没有和任何一个 DIRb 的蛋白聚在一起。表明牛耳草 *BhDIR1* 的蛋白序列有很大的特殊性，预示 *BhDIR1* 可能在功能上有一定的特殊性，推测可能与牛耳草特殊的耐旱复苏特点有关。

引导蛋白及引导类蛋白的基因表达主要受发育和组织特异性的决定，但近来有报道表明生物胁迫可诱导其表达，例如 Steven 等<sup>[13]</sup> 发现云杉的 *DIRa* 亚族引导蛋白基因 (*PDIR5* 和 *PDIR13*) 在树皮和木质部中可以被象鼻虫和机械伤害诱导表达，且诱导强度高达 500 倍，*DIRb* 亚族基因 (*PDIR10* 和 *PDIR12*) 也可以被病菌侵害、虫害及机械伤害诱导表达<sup>[13]</sup>，类似的反应在金钟花的引导蛋白研究中也发现<sup>[17]</sup>。研究结果表明引导蛋白还可能在防御机制中扮演一定角色。本文结果表明 *BhDIR1* 不但可以快速响应干旱并在干旱复水过程中保持较高的 mRNA 积累，而且也受高温、冷害胁迫所诱导，表明引导蛋白可能参与多种胁迫反应，可能在抗逆方面具有普遍功能。由于植物体内的乙烯和 ABA 等激素及  $H_2O_2$  等信号分子往往会在胁迫反应时积累并参与其信号传导途径，文中也检测了 *BhDIR1* 对这些信号分子的响应，结果发现该基因也受到乙烯，ABA， $CaCl_2$ ，EGTA， $H_2O_2$ ，SA 的调控，证明引导蛋白基因的表达可能受多个信号途径的复杂调控。

红雪松中引导蛋白基因家族的成员的启动子与 GUS 的融合基因已被转化到拟南芥中，大部分在维管束区域检测到有表达<sup>[18]</sup>，呈现出明显的组织特异性，各个启动子之间的表达区域表现出重叠和互补的特征<sup>[18]</sup>。金钟花中的引导蛋白 (*FiDIR*) 只在维管束组织的细胞壁中被检测到<sup>[19]</sup>。本文研究结果表明 *BhDIR1* 定位于细胞膜和壁上 (图 4)，而细胞壁正是木质素合成的部位，这预示 *BhDIR1* 很可能参与了木质素的合成。自然界中不同植物中木质素的单体成分及单体间的连接方式都不同，推测是因为植物体内不同的引导蛋白在木质素合成时对单体的特异选择和连接方式的定向造成的。利用高锰酸钾及间苯三酚染色观察均未发现干旱牛耳草叶片的木质素含量有明显变化；但酸溶性木质素含量下降，牛耳草干旱过程中 *BhDIR1* 大量诱导，推测 *BhDIR1* 可能通过改变木质素单体的组成及连接方式而影响木质素的酸溶性，影响酸溶性木质素的含量。酸溶性木质素的含量的降低可能会改变细胞壁的机械强度和柔韧性，在干旱来临时牛耳草细胞壁可以随着细

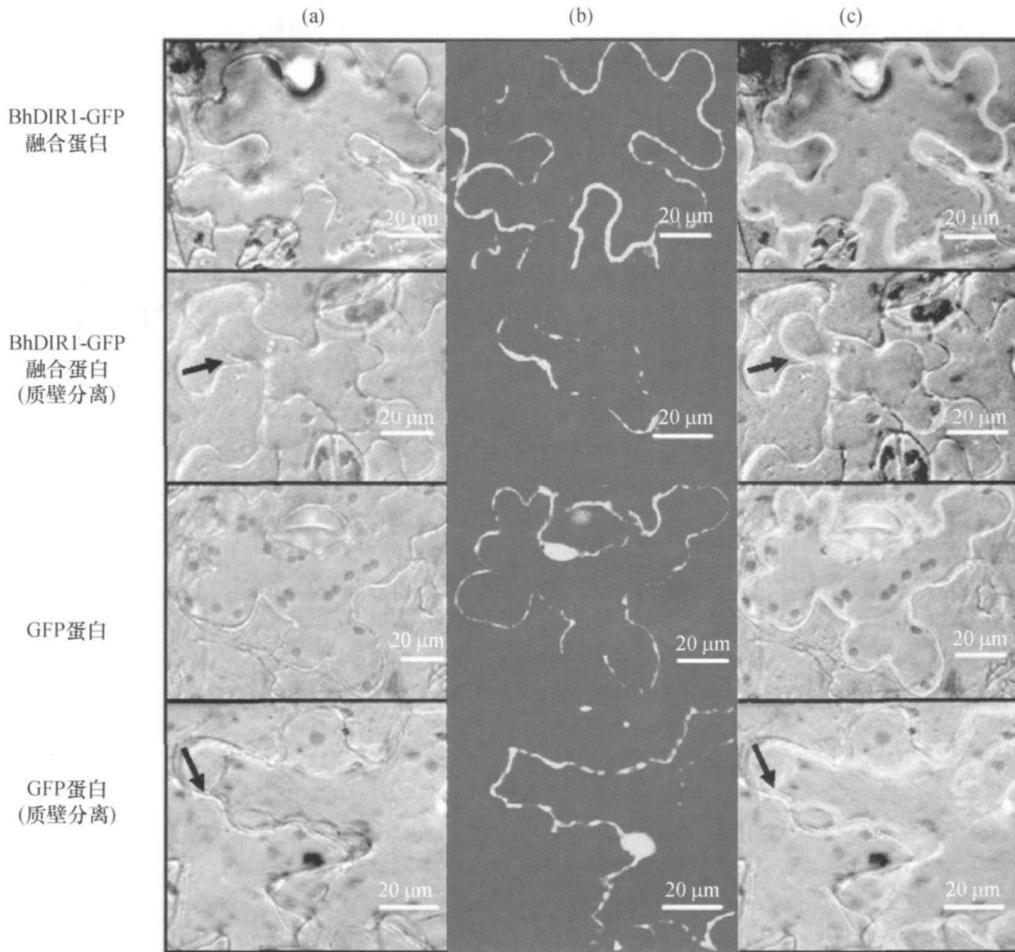


图 4 BhDIRI- GFP 融合蛋白的亚细胞定位, GFP 作为对照  
(a) 为明场图像, (b) 为激光图像, (c) 为融合图像

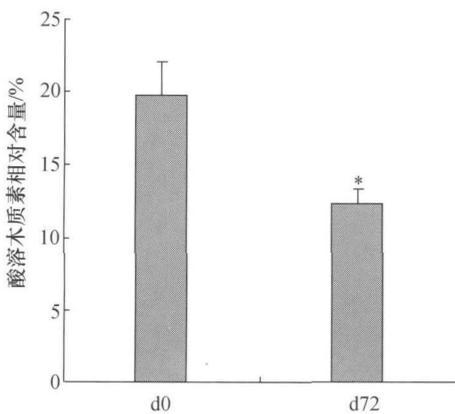


图 5 牛耳草叶片的酸溶性木质素含量  
d0, 脱水 0 h; d72, 脱水 72 h. 显著性水平 \* $P < 0.05$

胞膜向内折叠, 从而减少干旱对细胞造成的伤害.

综上所述, 干旱时 *BhDIRI* 大量表达, 可能通过调控木质素的单体间的连接方式而改变木质素的物理性质, 从而影响细胞壁的机械强度和柔韧性, 减少干旱对细胞造成的机械伤害, 使之在复水时可以迅速恢复生活状态.

致谢 中科院植物所宋艳茹研究员对本文给予了悉心的指导和修改, 特此致谢.

### 参 考 文 献

- Ingram J, Bartels D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1996, 47: 377-403
- Vicré M, Olivier L, Farrant J, et al. Composition and desicca-

- tion-induced alterations of the cell wall in the resurrection plant *Craterostigma wilmsii*. *Physiol Plant*, 2004, 120: 229—239
- 3 Francesca DV, Toufik E, Roberto C, et al. Morphological and ultrastructural aspects of dehydration and rehydration in leaves of *Sporobolus stapfianus*. *Plant Growth Regul*, 1998, 24: 219—228
  - 4 Jones L, McQueen-Mason S. A role for expansins in dehydration and rehydration of the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *FEBS Letters*, 2004, 559: 61—65
  - 5 Neale AD, Blomstedt CK, Bronson P, et al. The isolation of genes from the resurrection grass *Sporobolus stapfianus* during severe drought stress. *Plant Cell & Environ*, 2000, 23: 265—278
  - 6 Shen Y, Tang MJ, Hu YL, et al. Isolation and characterization of a dehydrin-like gene from drought-tolerant *Boea crassifolia*. *Plant Sci*, 2004, 166: 1167—1175
  - 7 Chen BJ, Wang Y, Hu YL, et al. Cloning and characterization of a drought-inducible MYB gene from *Boea crassifolia*. *Plant Sci*, 2005, 168: 493—500
  - 8 Deng X, Hu ZA, Wang HX, et al. A comparison of photosynthetic apparatus of the detached leaves of the resurrection plant *Boea hygrometrica* with its non-tolerant relative *Chirita heterotrichia* in response to dehydration and rehydration. *Plant Sci*, 2003, 165: 851—861
  - 9 Deng X, Hu ZA, Wang HX. mRNA differential display visualized by silver staining tested on gene expression in resurrection plant *Boea hygrometrica*. *Plant Mol Biol Rep*, 1999, 17: 1—7
  - 10 Jiang GQ, Wang Z, Shang HH, et al. Proteome analysis of leaves from the resurrection plant *Boea hygrometrica* in response to dehydration and rehydration. *Planta*, 2007, 225: 1405—1420
  - 11 商海红, 更苏植物牛耳草 *Boea hygrometrica* (Bunge) R Br. 叶片耐旱复苏的细胞学研究, 西南大学硕士学位论文, 重庆, 2006
  - 12 王丽丽, 复苏植物牛耳草 *Boea hygrometrica* 干旱诱导基因的筛选和功能分析, 中国科学院植物所博士学位论文, 北京, 2007
  - 13 Ralph S, Park J, Bohlmann J. Dirigent proteins in conifer defense: Gene discovery, phylogeny, and differential wound- and insect-induced expression of a family of DIR and DIR-like genes in spruce (*Picea spp.*). *Plant Mol Biol*, 2006, 60: 21—40
  - 14 Kim MK, Jeon JH, Fujita M, et al. The western red cedar (*Thuja plicata*) 8-8-*DIRIGENT* family displays diverse expression patterns and conserved monolignol coupling specificity. *Plant Mol Biol* 2002a, 49: 199—214
  - 15 Gang DR, Costa MA, Fujita M, et al. Regiochemical control of monolignol radical coupling: A new paradigm for lignin and lignan biosynthesis. *Chem & Biol*, 1999, 6: 143—151
  - 16 Davin LB, Wang HB, Crowell AL, et al. Stereoselective bimolecular phenoxy radical coupling by an auxiliary (Dirigent) protein without an active center. *Science*, 1997, 17: 275—362
  - 17 Hadwiger LA, Chiang CC, Horovitz D. Expression of disease resistance response genes in near-isogenic pea cultivars following challenge by *Fusarium oxysporum* race. *Mol Plant Pathol*, 1992, 40: 259—269
  - 18 Kim MK, Jeon JH, Davin LB, et al. Monolignol radical-radical coupling networks in western red cedar and Arabidopsis and their evolutionary implications. *Phytochem*, 2002b, 61: 311—322
  - 19 Davin LB, Lewis NG. Dirigent proteins and dirigent sites explain the mystery of specificity of radical precursor coupling in lignan and lignin biosynthesis. *Plant Physiol*, 2000, 123: 452—461