

# 星星草 *PutNaKR3* 基因的克隆及其耐逆性分析

张常旭<sup>1</sup> 冯 鹏<sup>1</sup> 赵宗宝<sup>1</sup> 李 莹<sup>2</sup> 常 纓<sup>1</sup>

1. 东北农业大学生命科学学院, 哈尔滨 150030; 2. 东北林业大学盐碱地生物资源环境研究中心, 哈尔滨 150040

**摘要** 以 NaCl 胁迫星星草(*Puccinellia tenuiflora*) cDNA 酵母文库为基础, 在星星草中筛选和鉴定 *PutNaKR3* 基因, 对 *PutNaKR3* 基因及其编码的氨基酸序列进行生物信息学、组织特异性表达和非生物胁迫应答表达分析。结果表明: 星星草 *PutNaKR3* 基因具有组织表达特异性, 在根和叶中的表达量明显高于其他组织; 过表达 *PutNaKR3* 基因可增强酵母菌株在盐、碱、氧化和渗透胁迫下的生存能力, 同时可提高酵母在部分金属胁迫下的适应能力。

**关键词** 星星草; 重金属相关植物蛋白; 钠钾根缺陷 3 基因(*PutNaKR3*); 盐胁迫; 非生物胁迫; 抗逆育种

**中图分类号** Q 948.11 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2019)05-0050-07

生态环境的不断恶化以及对土地不合理的开发利用, 使得我国土壤盐碱化面积不断扩大, 土壤盐碱化已经成为制约农业生产力的重要因素之一。星星草(*Puccinellia tenuiflora*) 为禾本科碱茅属多年生草本植物, 广泛分布于我国东北松嫩平原的盐碱土地, 是一种极端耐盐碱植物, 即使在 pH 值为 10 的重盐碱土壤中也能生长繁殖, 从 20 世纪 80 年代起被筛选应用于治理盐碱化的草地, 目前已经在盐碱草地改良和植被恢复实践中得到大面积的推广与应用<sup>[1-4]</sup>。在模式植物拟南芥的研究中已经证明, *NaKR*(sodium potassium root defective) 基因参与  $\text{Na}^+$  的转运, 通过排出  $\text{Na}^+$  来减少  $\text{Na}^+$  的积累, 从而增强植物的盐耐受性<sup>[5-6]</sup>。

*NaKR* 基因编码金属伴侣蛋白, *NaKR* 蛋白为含有重金属相关结构域(heavy metal-associated, HMA)的金属伴侣蛋白, 属于重金属相关植物蛋白(heavy metal-associated plant proteins, HPP)亚族<sup>[7-10]</sup>。研究表明, 金属离子进入细胞后会被特定的载体即金属伴侣蛋白运送至特定的细胞位点, 成为蛋白质结构组分或催化因子<sup>[11-12]</sup>。研究表明, 拟南芥 *AtNaKR1* 基因在拟南芥韧皮部特异表达, 主要参与  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$  等金属离子的转运途径, 且在拟南芥的生长发育过程中发挥着重要作用。该基因的突

变体植株具有叶片中存在高浓度  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Rb}^+$ , 叶片中淀粉积累量增加, 根部短小, 蔗糖长距离转运减弱以及开花时间变晚等表型特征<sup>[5]</sup>。在对 *AtNaKR3* 基因的研究中发现, *AtNaKR3* 基因响应高盐和渗透胁迫, 但不受  $\text{Cu}^{2+}$  胁迫诱导, 拟南芥 *AtNaKR3* 过表达植株表型相对于野生型拟南芥具有更高的盐耐受性, 且 *AtNaKR3* 基因的过表达明显增加了 *SOS1* 和 *SOS3* 基因的表达, 从而证明 *AtNaKR3* 基因在拟南芥应对盐胁迫的 *SOS* 途径中发挥着重要作用<sup>[6]</sup>。

本研究通过建立 NaCl 胁迫条件下酵母 cDNA 文库, 在星星草中鉴定并获得了 *PutNaKR3* 基因, 对其进行生物信息学分析并采用 qRT-PCR 技术对该基因的组织表达模式进行分析, 同时分析过表达酵母在盐胁迫、碱胁迫、氧化胁迫、渗透胁迫和重金属胁迫等非生物胁迫的耐受能力, 以期为星星草抗逆育种的分子机制研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料

星星草植株及种子采自东北林业大学盐碱地生物资源环境研究中心安达野外实验基地。于野外实习基地分别收集星星草根、茎、叶、花、鞘和穗于液氮

收稿日期: 2019-03-07

基金项目: 国家自然科学基金项目(31570189)

张常旭, 硕士研究生, 研究方向: 植物资源学与分子生物学, E-mail: 1009500516@qq.com

通信作者: 常 纓, 博士, 教授, 研究方向: 植物资源学与分子生物学, E-mail: changyingnew@163.com;

李 莹, 博士, 讲师, 研究方向: 逆境生物学, E-mail: 110506641@qq.com

中速冻,  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。

## 1.2 星星草 *PutNaKR3* 基因克隆以及组织表达

星星草 cDNA 文库通过酶切、连接构建到改造的酿酒酵母表达载体 pAUR101 (TaKaRa, 日本) 上。利用 LiAc/PEG 酵母转化法, 将其高效转化到酿酒酵母菌株 InVac I 中。通过对星星草酵母文库的耐盐筛选, 从中分离得到抗性酵母克隆, 用通用引物 PCR 获得 *PutNaKR3* 基因全长。

使用 Trizol 法提取星星草各组织总 RNA, 用反转录试剂盒 Hiscript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa, 中国哈尔滨) 合成 cDNA, 具体操作步骤参见试剂盒说明书。采用  $-2^{\Delta\Delta C_t}$  法进行 qRT-PCR 分析该基因在不同组织中表达情况。

## 1.3 星星草 *PutNaKR3* 基因的序列分析

采用 ORF finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 程序确定其开放阅读框。利用 Blastp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 进行序列同源性搜索; 利用 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam>) 软件对 *PutNaKR3* 基因编码的蛋白质进行理化性质分析; 采用 Tmpred ([http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html)) 和 TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 对该基因的跨膜结构进行分析; 利用 SignalP4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) 分析该蛋白是否含有信号肽; 利用 PSIPRED 软件 (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) 分析星星草 *PutNaKR3* 蛋白二级结构; 使用 BioEdit 软件进行氨基酸序列比对分析; 使用 MEGA5.0 软件绘制系统进化树。

## 1.4 过表达酵母菌株的非生物逆境抗性分析

分别取起始  $\text{OD}_{600}$  约为 0.6 的 pYES<sub>2</sub>-*PutNaKR3* 和载体 pYES<sub>2</sub> 的  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$  和  $10^{-5}$  的酵母菌液于  $1.3\text{ mol/L NaCl}$ 、 $28\text{ mmol/L NaHCO}_3$ 、 $12\text{ mmol/L Na}_2\text{CO}_3$ 、 $3\text{ mol/L H}_2\text{O}_2$ 、 $1.8\text{ mol/L}$  山梨醇、 $12\text{ mmol/L CuCl}_2$ 、 $12\text{ mmol/L FeCl}_3$ 、 $15\text{ mmol/L BaCl}_2$ 、 $4\text{ mmol/L MnCl}_2$ 、 $1.5\text{ mmol/L CoCl}_2$ 、 $2.2\text{ mmol/L NiSO}_4$ 、 $10\text{ mmol/L ZnCl}_2$  的半乳糖诱导的酵母培养基中,  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养 3~5 d, 观察其生长状态。

# 2 结果与分析

## 2.1 *PutNaKR3* 基因的克隆与序列分析

通过对星星草酵母文库进行耐盐性筛选, 获得具有抗性的酵母克隆, 命名为 *PutNaKR3*。通过 ORF finder 对星星草 *PutNaKR3* 基因序列进行分析, 证实该基因的开放阅读框 (ORF) 长 540 bp, 推测其编码 179 个氨基酸。NCBI 分析 *PutNaKR3* 基因编码蛋白质的氨基酸序列, 该蛋白含有一个 HMA (heavy metal-associated) 保守结构域, 而 C 端不含有异戊二烯化基序, 属于重金属相关植物蛋白 (heavy metal-associated plant proteins, HPP) 家族成员 (图 1)。GenBank 中选取部分植物的 HPP 蛋白进行比对分析, 结果表明, 星星草 *PutNaKR3* 基因与二穗短柄草 *BdNaKR3* 基因、玉米 *ZmNaKR2* 基因、拟南芥 *AtNaKR3* 基因、水稻 *OsNaKR2* 基因和谷子 *SiNaKR2* 基因具有较高的同源性 (60%~90%), 这些 NaKR 类蛋白均在 C 末端含有保守结构域 HMA, 该结构域的主要特点为 Cyst-XX-Cys。使用 ProtParam 在线软件对该蛋白质进行预测分析, 结果显示: 其相对分子质量 18.6 ku, 理论等电点 (pI) 9.58, 属于碱性蛋白; 负电荷氨基酸 (Asp+Glu) 总数为 14, 正电荷氨基酸 (Arg+Lys) 总数为 25; 不稳定系数为 53.79, 为不稳定的蛋白质。

为预测星星草 *PutNaKR3* 蛋白亚细胞定位, 采用生物软件对该蛋白序列进行分析 (图 2)。采用 NLS Mapper 软件预测该蛋白质的核定位信号, 在 N 端预测到一个核定位信号, 预测评分为 5.6, 推测该蛋白质存在于细胞核和细胞质中 (图 2A)。采用 SignalP 4.1 软件分析该蛋白质序列, 结果显示该蛋白质无信号肽结构 (图 2B)。采用 TMHMM 法分析结果显示, 该蛋白不存在跨膜区 (图 2C)。根据上述结果推测 *PutNaKR3* 基因编码的蛋白质为一种非跨膜蛋白, 主要存在于细胞质和细胞核中。通过 PSIPRED 软件对该蛋白质的二级结构进行分析, 星星草 *PutNaKR3* 蛋白在其保守结构域 HMA 处含有类铁蛋白折叠 ( $\alpha\beta\alpha\beta\beta$ ) 结构。选择其他物种中已经确定的 HPP 蛋白与星星草 *PutNaKR3* 蛋白进行聚类分析并绘制进化树, 结果表明, 星星草 *PutNaKR3* 蛋白与二穗短柄草 *BdNaKR3* 具有较高的同源性 (图 3)。

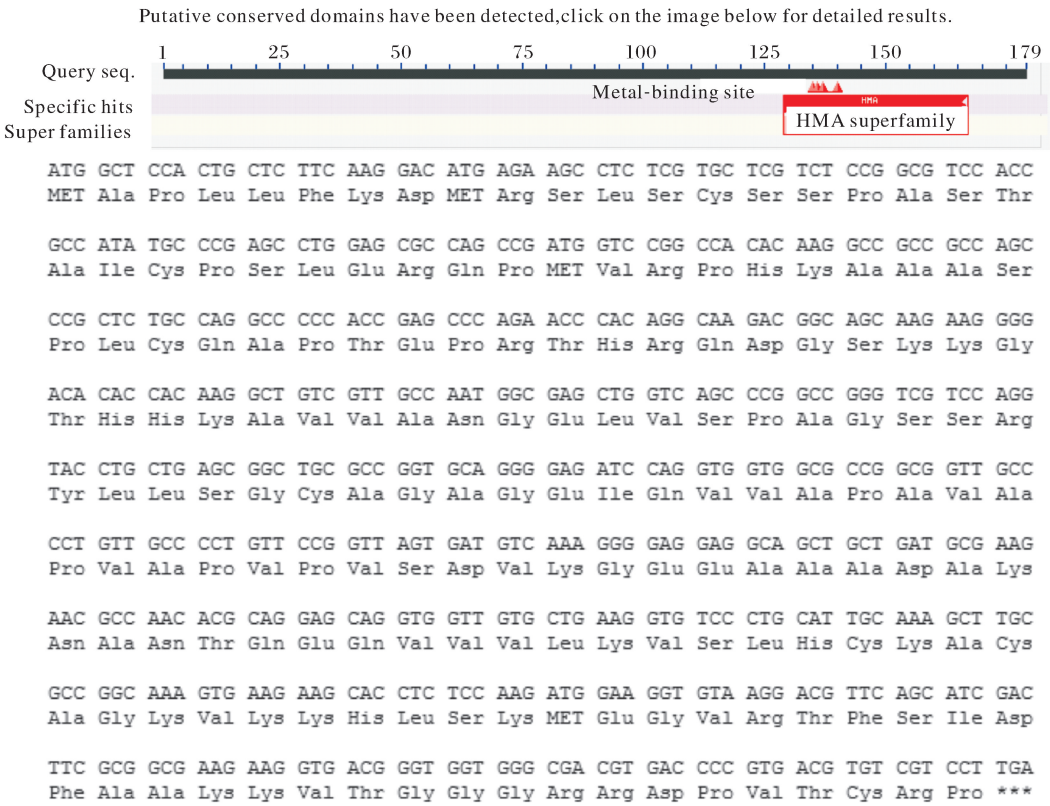
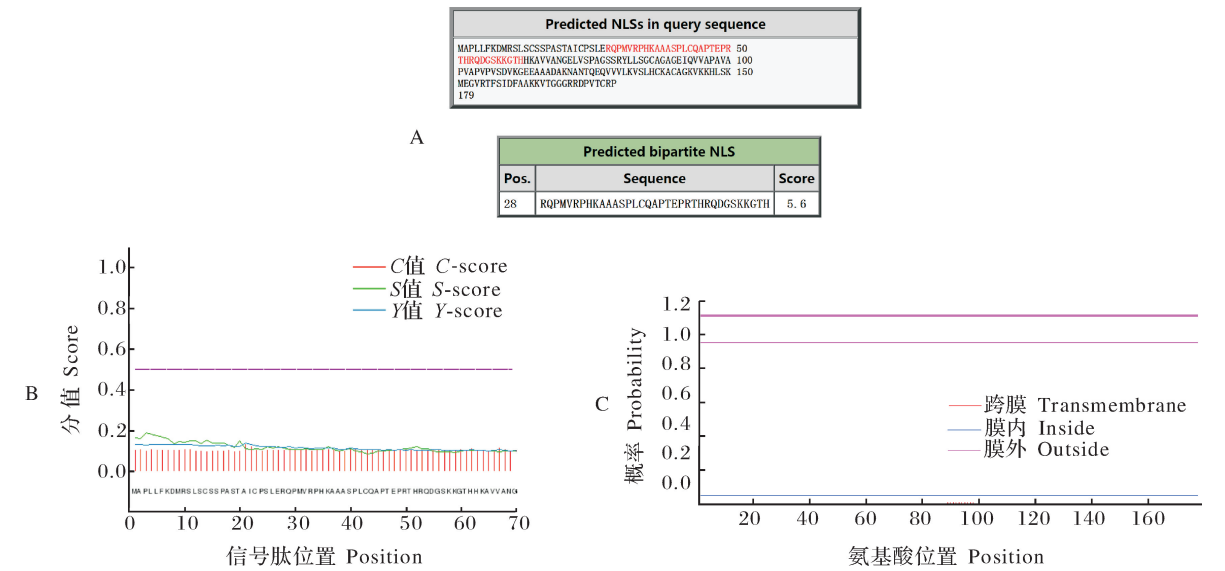


图 1 星星草 *PutNaKR3* 基因的 cDNA 序列和氨基酸序列保守结构域分析

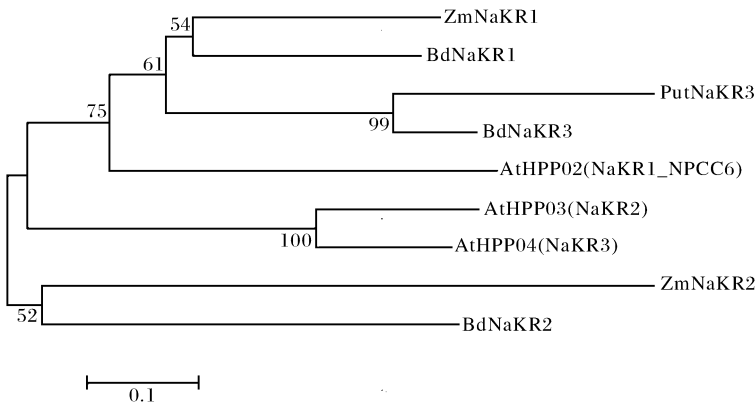
Fig.1 Conserved domain analysis of the cDNA sequence and amino acid sequence of *PutNaKR3* gene



A:NLS Mapper 预测核定位信号; B:SignalP 4.1 分析 *PutNaKR3* 信号肽; C:TMHMM 法分析跨膜区。A:NLS Mapper predicts nuclear localization signal; B:SignalP 4.1 analyzes *PutNaKR3* signal peptide; C:TMHMM analyzes transmembrane region.

图 2 星星草 *PutNaKR3* 的蛋白质序列分析

Fig.2 Protein sequence analysis of *Puccinellia tenuiflora PutNaKR3*



数值表示 1 000 次重复抽样所得 60% 以上的置信度。The number represent the percentage of 1 000 bootstrap replications, only above 60% was showed. ZmNaKR1:XP\_008674049.1, *Zea mays* ; ZmNaKR2: XP\_008656812.1, *Zea mays* ; BdNaKR1:XP\_003565192.1, *Brachypodium distachyon* ; BdNaKR2: XP\_010235110.1, *Brachypodium distachyon* ; BdNaKR3:XP\_003563696.1, *Brachypodium distachyon* ; AtHPP02(NaKR1\_NPCC6) :AT5G02600, *Arabidopsis thaliana* ; AtHPP03(NaKR2) :AT2G37390, *Arabidopsis thaliana* ; AtHPP04(NaKR3) :AT3G53530, *Arabidopsis thaliana* .

图 3 基于 NJ 法构建星星草 *PutNaKR3* 蛋白和其他植物 NaKR 蛋白氨基酸序列的系统进化树

Fig.3 Phylogenetic tree of amino acid sequence of *PutNaKR3* protein and other plant NaKR proteins based on NJ method

2.2 *PutNaKR3* 基因在星星草不同组织中的表达

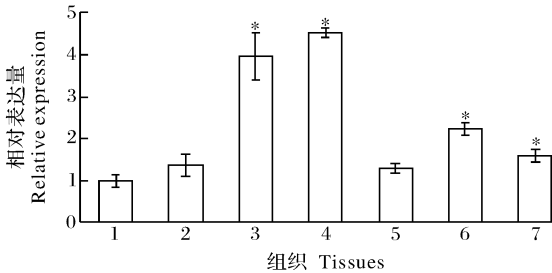
采用  $-2^{\Delta\Delta Ct}$  法对 *PutNaKR3* 基因在星星草根、茎、叶、花、鞘、穗、种子的表达模式进行 qRT-PCR 分析。结果(图 4)显示:*PutNaKR3* 基因在星星草根、茎、叶、花、鞘、穗、种子中均有表达,但在不同组织中的表达量有明显差异,其中在花中的表达量最低,而在根和叶中的表达水平明显高于其他组织器官,表达量分别是花的 3.9 倍和 4.5 倍。*PutNaKR3* 基因在花、茎和鞘中的表达水平相似,均明显低于根和叶的表达量,而在穗和种子中的表达量

略高于花的表达量,但是明显低于根和叶中的表达量。表明 *PutNaKR3* 基因具有组织表达特异性,主要在叶和根中大量表达。

2.3 pYES<sub>2</sub>-*PutNaKR3* 在酵母中的表达及其抗逆性检测

酵母是单细胞真核生物,与植物具有类似的代谢途径,且遗传操作简单易行,是外源蛋白表达的合适宿主,pYES<sub>2</sub> 是半乳糖诱导的过表达载体。因此,本研究利用酵母表达体系进行了转基因酵母对非生物逆境的耐性实验。对含有 pYES<sub>2</sub>-*PutNaKR* 和 pYES<sub>2</sub> 的酵母菌株分别模拟盐胁迫、碱胁迫、氧化胁迫、渗透胁迫和重金属胁迫,检测转基因酵母菌株抗性(图 5)。正常情况下,含 pYES<sub>2</sub>-*PutNaKR* 和 pYES<sub>2</sub> 的酵母菌株在无逆境处理的 YPD 培养基上生长情况相似;但在 1.3 mol/L NaCl 胁迫下生长状况明显优于对照菌株,说明过表达 *PutNaKR3* 提高了酵母菌株对盐胁迫的耐性。在 28 mmol/L NaHCO<sub>3</sub>、12 mmol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 条件下,转 pYES<sub>2</sub>-*PutNaKR* 酵母菌株长势略优于对照菌株,但并未明显增强酵母菌株对碱胁迫的抗性,说明 *PutNaKR3* 基因可轻微增强酵母菌株对碱胁迫的抗性。结果表明,*PutNaKR3* 基因增强植物盐碱抗性,尤其是增强植物耐盐性方面发挥着重要作用。

*PutNaKR3* 基因的过表达菌株在其他非生物胁迫下的生长状况如图 5B 所示,在氧化逆境(3 mol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)下,转 pYES<sub>2</sub>-*PutNaKR* 酵母菌

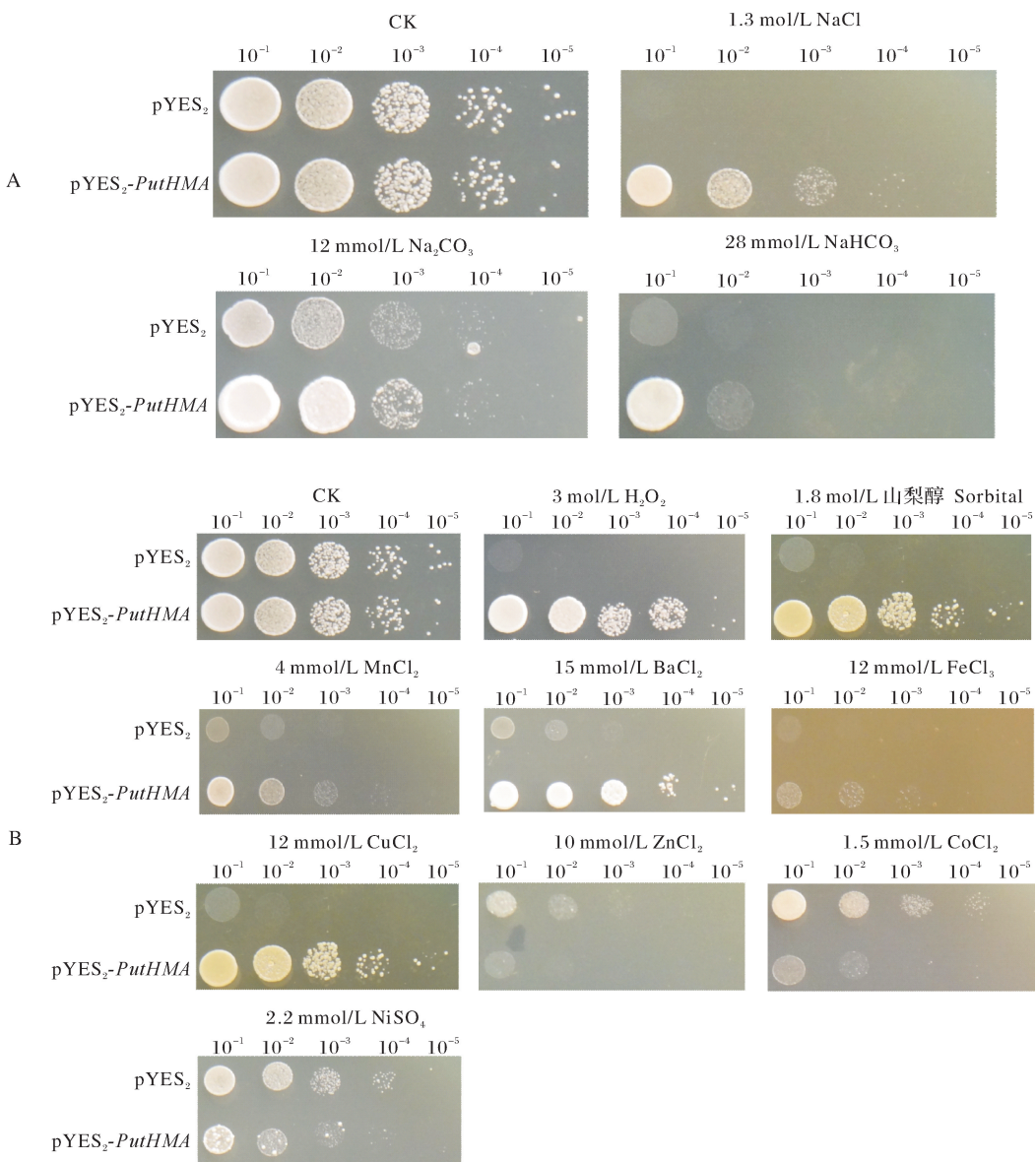


图中的数据为相对表达量的平均值±标准误差(n=4, *Actin* 做内参),星号表示 *PutNaKR3* 基因在不同组织的表达量相对于花有显著差异。1:花;2:茎;3:叶;4:根;5:鞘;6:穗;7:种子。Results arenormalized against *Actin* expression and are expressed as mean±SE from four individuals. \* indicates a significant ( $P<0.05$ ) difference between flower within the other tissue. 1: Flower; 2: Stem; 3: Leaf; 4: Root; 5: Sheath; 6: Ear; 7: Seed.

图 4 *PutNaKR3* 基因在星星草各组织中的表达丰度

Fig.4 Abundance of *PutNaKR3* gene expression in various tissues of *Puccinellia tenuiflora*





A: *PutNaKR3* 基因的过表达菌株在盐、碱等非生物胁迫下的生长状况; B: *PutNaKR3* 基因的过表达菌株在其他非生物胁迫下的生长状况。A: Growth status of over-expressing strain of *PutNaKR3* gene under abiotic stress of saline-alkali; B: Growth status of over-expressing strain of *PutNaKR3* gene under other abiotic stress.

图 5 非生物胁迫下转 *PutNaKR3* 基因酵母菌株的抗性分析

Fig.5 Resistance analysis of transgenic *PutNaKR3* gene yeast strain under abiotic stress

株长势明显优于对照菌株,说明过表达 *PutNaKR3* 明显提高可酵母菌在氧化逆境中的生存能力。以 1.8 mol/L 山梨醇模拟渗透胁迫,结果显示,转基因酵母菌株在渗透胁迫下生长情况明显优于对照菌株,说明过表达 *PutNaKR3* 提高了酵母菌株对渗透胁迫的耐性。重金属胁迫结果表明,过表达 *PutNaKR3* 提高了酵母菌株对  $K^{+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Ba^{2+}$ 、 $Fe^{3+}$  和  $Mn^{2+}$  的抗性,而在  $ZnCl_2$ 、 $NiSO_4$  和  $CoCl_2$  处理下反而降低了酵母菌株的生存能力。这些结果表明,

*PutNaKR3* 基因的过量表达对酵母菌株在环境胁迫中的生长发挥着重要作用,进一步说明 *PutNaKR3* 基因在星星草应对各种环境胁迫过程中发挥着重要作用。

### 3 讨论

盐碱胁迫严重影响着作物的生长与发育,土壤盐碱化已经成为制约我国农业可持续发展的重要因素之一<sup>[13-17]</sup>。星星草不仅是一种优良的牧草,还可

以作为改良土壤盐碱性的先锋植物,同时为相关研究提供丰富的耐盐碱基因资源,具有重要的经济价值和生态效应<sup>[18-21]</sup>。

植物 *NaKR* 基因通过参与  $\text{Na}^+$  转运来提高植物盐耐受性,同时也能应对其他非生物胁迫,提高植物耐受性<sup>[22-23]</sup>。本研究对 *PutNaKR3* 基因在星星草根、茎、叶、花、鞘、穗、种子的表达分析表明该基因在根和叶中具有较高的表达水平。对其编码的氨基酸序列进行预测分析,该蛋白定位于细胞核和细胞质,无跨膜区,与拟南芥 *AtNaKR3* 蛋白相似。对其蛋白结构域分析结果显示,与拟南芥等其他物种 *NaKR* 蛋白具有类似的结构,均在 C 末端具有 HMA 结构域,且不同物种 *NaKR* 蛋白的 HMA 结构域具有较高的相似度。利用酵母过表达 *PutNaKR3* 基因并对该转基因酵母进行  $\text{NaCl}$  和  $\text{KCl}$  的盐胁迫处理,发现过表达酵母菌株在盐胁迫下生长状况明显优于对照菌株,说明过表达 *PutNaKR3* 提高了酵母菌株耐盐胁迫的能力。在氧化、渗透以及  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Ba}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$  等金属离子胁迫下,过表达 *PutNaKR3* 酵母菌株生长存活能力均有所提高,但在碱胁迫下并未明显增强其逆境存活能力。推测 *PutNaKR3* 基因参与星星草应对盐胁迫相关途径,从而提高星星草盐耐受性,同时该基因受氧化、渗透和部分金属离子诱导,不受碱胁迫诱导。之后的研究可以考虑对该基因可能参与的植物抗逆途径进行研究,为更深入了解该基因家族的功能提供新的资料。

参 考 文 献

[1] 王雷, 吴丽丽, 曲跃军, 等.  $\text{NaCl}$  胁迫下星星草生理响应及分子机制的研究[J]. 北方园艺, 2010(7): 23-25.

[2] 王苹, 李建东, 欧勇玲. 松嫩平原盐碱化草地星星草的适应性及耐盐生理特性的研究[J]. 草地学报, 1997(2): 80-84.

[3] 孙国荣, 阎秀峰, 肖玮. 星星草耐盐碱生理机制的初步研究[J]. 武汉植物学研究, 1997(2): 162-166.

[4] 高红明, 王建波, 孙国荣. 星星草耐盐碱生理机制再探讨[J]. 西北植物学报, 2005, 25(8): 1589-1594.

[5] HUI T, BAXTER I R, BRETT L, et al. *Arabidopsis* NPCC6/*NaKR1* is a phloem mobile metal binding protein necessary for phloem function and root meristem maintenance[J]. Plant cell, 2010, 22(12): 3963-3979.

[6] LUO Q, ZHAO Z, LI D K, et al. Overexpression of *NaKR3* enhances salt tolerance in *Arabidopsis* [J/OL]. Genetics &

molecular research, 2016, 15(1): 15016378. <https://doi.org/10.4238/gmr.15016378>.

[7] HUNG I H, CASARENO R L, LABESSE G, et al. HAH1 is a copper-binding protein with distinct aminoacidresidues mediating copper homeostasis and antioxidant defense[J]. Journal of biological chemistry, 1998, 273(3): 1749-1754.

[8] DE ABREU-NETO J B, TURCHETTO-ZOLET A C, DE OLIVEIRA L F, et al. Heavy metal-associated isoprenylated plant protein (HIPP): characterization of a family of proteins exclusive to plants[J]. Febs journal, 2013, 280(7): 1604-1616.

[9] BARTH O, VOGT S, UHLEMANN R, et al. Stress induced and nuclear localized HIPP26 from *Arabidopsis thaliana* interacts *via* its heavy metal associated domain with the drought stress related zinc finger transcription factor ATHB29 [J]. Plant molecular biology, 2009, 69(1): 213-226.

[10] ZSCHIESCHE W, BARTH O, DANIEL K, et al. The zinc-binding nuclear protein HIPP3 acts as an upstream regulator of the salicylate-dependent plant immunity pathway and of flowering time in *Arabidopsis thaliana* [J]. The new phytologist, 2015, 207(4): 1084. doi:10.1111/nph.13419.

[11] HUFFMAN D L, O'HALLORAN T V. Function, structure, and mechanism of intracellular copper trafficking proteins[J]. Annual review of biochemistry, 2003, 70(1): 677-701.

[12] HAAS C E, RODIONOV D A, KROPAT J, et al. A subset of the diverse COG0523 family of putative metal chaperones is linked to zinc homeostasis in all kingdoms of life[J/OL]. BMC genomics, 2009, 10(1): 470[2019-03-07]. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-470>.

[13] 陈冉冉, 朱慧慧, 贾博为, 等. 碱胁迫应答基因 *GsARHP* 的克隆及转基因紫花苜蓿的耐碱性分析[J]. 草业学报, 2017, 26(9): 92-103.

[14] 张雪, 孙鑫博, 樊波, 等. 结缕草 *ZjCSD* 基因的克隆及表达分析[J]. 草业学报, 2017, 26(2): 102-110.

[15] 史经昂, 张兵, 肖晓琳, 等. 结缕草肉桂醇脱氢酶基因家族全基因组序列鉴定和表达分析[J]. 草业学报, 2017, 26(6): 111-119.

[16] 张伯阳, 简逸楠, 李梦, 等. 棉花 *GhSEDEG38* 基因调控棉花耐盐性的功能分析[J]. 华中农业大学学报, 2018, 37(5): 1-10.

[17] 罗红松, 刘海涛, 刘海金, 等. 日本结缕草 *ZjSPL4* 基因的克隆、亚细胞定位及表达分析[J]. 分子植物育种, 2018, 16(16): 5290-5298.

[18] 李莹, 柳参奎. 碱茅 6-磷酸海藻糖合成酶基因的克隆及其耐逆性分析[J]. 草业学报, 2015, 24(1): 99-106.

[19] 单鸿轩. 星星草 *PtMAPKK6* 基因的抗逆功能研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨师范大学, 2017.

[20] 孙国荣, 阎秀峰, 李晶, 等. 星星草对碱化土壤化学性质的影响[J]. 草地学报, 2002(3): 179-183.

[21] 段慧荣, 王锁民. 盐地碱蓬高亲和性  $\text{K}^+$  转运蛋白基因 *SsHAK2* 的克隆与表达模式分析[J]. 草业学报, 2016, 25(2): 114-123.

[22] RADAKOVIC Z S, ANJAM M S, ESCOBAR E, et al. *Arabi-*

*dopsis* HIP27 is a host susceptibility gene for the beet cyst nematode *Heterodera schachtii* [J/OL]. Mol Plant Pathol, 2018,19(8): 1917-1928 [2019-03-07]. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/mpp.12668>.

[23] IMRAN Q M, FALAK N, HUSSAIN A, et al. Nitric oxide responsive heavy metal-associated gene *athmad1* contributes to development and disease resistance in *Arabidopsis thaliana* [J]. Front Plant Sci, 2016,7:1712.

Cloning a *PutNaKR3* gene in *Puccinellia tenuiflora*  
and analyzing its stress tolerance

ZHANG Changxu<sup>1</sup> FENG Peng<sup>1</sup> ZHAO Zongbao<sup>1</sup> LI Ying<sup>2</sup> CHANG Ying<sup>1</sup>

1.College of Life Science,Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China ;  
2.Akali Soil Natural Environmental Science Center , Northeast Forestry University ,  
Harbin 150040, China

**Abstract** A *PutNaKR3* gene was screened and identified from the cDNA library of *Puccinellia tenuiflora* under NaCl treatment. Bioinformatics, tissue-specific expression and abiotic stress response expression of the *PutNaKR3* gene and its encoded amino acid sequence were performed. The results showed that *PutNaKR3* gene in *Puccinellia tenuiflora* had a tissue expression specificity, and its expression in roots and leaves was significantly higher than that in other tissues. Over-expression of *PutNaKR3* gene enhanced the viability of yeast strain under salt, alkali, oxidation and osmotic stress, and improved the adaptability of yeast under partial metal stress. It is indicated that the *PutNaKR3* gene plays a certain role in plant stress response, especially in enhancing plant salt tolerance.

**Keywords** *Puccinellia tenuiflora* ; heavy metal-associated plant proteins; sodium potassium root defective3 (*PutNaKR3*) ; salt stress; abiotic stress; stress resistance breeding

(责任编辑:张志钰)