浙 江 农 林 大 学 学 报，2016，**33**(5)：734–741
Journal of Zhejiang A & F University
doi:10.11833/j.issn.2095-0756.2016.05.002

番茄质膜 H^+-ATPase 家族基因的鉴定和表达分析

刘健健，刘俊丽，季敏杰，陈家栋，杨晓峰，陈爱群

（南京农业大学 资源与环境科学学院，江苏 南京 210095）

摘要： 植物质膜 H^+-ATPase(Ec3.6.1.3)是一类普遍存在于细胞质膜上通过水解三磷酸腺苷(ATP)产生能量，将细胞质中的氢离子(H^+)逆浓度泵出细胞的运输蛋白。植物中的质膜 H^+-ATPase 由一个多基因家族所编码，其功能涉及到植物生长发育的多个生理过程。通过对全基因组检索在茄科 Solanaceae 植物番茄 *Solanum lycopersicum* 中共鉴定到 8 个编码质膜 H^+-ATPase 的同源基因(*LHA*1~8)。生物信息学分析显示：这 8 个 LHA 基因具有较高的序列相似性和较为保守的外显子/内含子结构特征。实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)分析显示，*LHA*1~4 在所有被检测的组织器官中都有表达，*LHA*5~7 几乎只在花器官中高量表达，而 *LHA*8 在正常培养和养分(氮、磷、钾和镁)缺乏以及高盐胁迫处理条件下几乎都不表达，但能够在被菌根真菌侵染的根系中强烈表达。将一段 2 669 bp 的 *LHA*8 的启动子融合 GUS 报告基因转入到烟草 *Nicotiana tabacum* 中发现，GUS 基因几乎只在被菌根真菌菌丝侵入形成丛枝的根系细胞中特异性表达。图 5 表 2 参 22

关键词： 分子生物学；番茄；质膜 H^+-ATPase；表达模式；菌根真菌

中图分类号： S641.2；Q943.2　　**文献标志码：** A　　**文章编号：** 2095-0756(2016)05-0734-08

Identification and expression analysis of tomato plasma membrane H^+-ATPase family genes

LIU Jianjian, LIU Junli, JI Minjie, CHEN Jiadong, YANG Xiaofeng, CHEN Aiqun

(College of Resources and Environmental Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu, China)

Abstract: Plasma membrane (PM) H^+-ATPase, which catalyzes ATP hydrolysis coupled with pumping out protons from cells and which is ubiquitously existent in all cell types of plants examined so far, has been characterized to be encoded by a multigene family involved in a number of plant physiological and developmental processes. The aim of this study is to identify and characterize the genes encoding PM H^+-ATPase in *Solanum lycopersicum* (tomato). Through genomic sequence database hunting and bioinformatics analysis, eight putative PM H^+-ATPase genes (named as *LHA*1–8) were identified, and their expression patterns were subsequently analysed by quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR). Bioinformatics analysis revealed a high conservation among these paralogous genes in both coding sequences and Exon/Intron structures. Expression analysis showed that *LHA*1, *LHA*2, *LHA*3, and *LHA*4 were expressed in all tissues examined; whereas *LHA*5, *LHA*6, and *LHA*7 were predominantly expressed in flowers. *LHA*8, the newly identified gene in this study, with barely detectable transcripts in normal growth conditions or in nutrient (N, P, K, and Mg) -deficient conditions, was strongly induced in arbuscular mycorrhizal (AM) fungal-colonized roots. A 2 669 bp *LHA*8 promoter fragment could direct the β-glucuronidase (GUS) reporter expression specifically in transgenic tobacco roots colonized by AM fungi. The results provide new insights into the evolutionary conservation and functional divergence of the tomato PM H^+-ATPase gene family during plant growth and development. [Ch, 5 fig. 2 tab. 22 ref.]

收稿日期：2015-06-27；修回日期：2015-08-06

基金项目：国家自然科学基金资助项目(31372121)

作者简介：刘健健，从事丛枝菌根共生的分子机制研究。E-mail: jianjian2013103114@126.com。通信作者：陈爱群，副教授，博士，从事植物与微生物互作的分子机制研究。E-mail: chenaq8@163.com

Key words: molecular biology; *Solanum lycopersicum* (tomato); plasma membrane H^+-ATPase; expression pattern; mycorrhizal fungi

H^+-ATPase 是广泛存在于植物质膜和各种内膜系统中的一种功能蛋白，在细胞代谢过程中起非常关键的作用[1]。目前，被报道的 H^+-ATPase 按结构可分为 P 型、F 型和 V 型。其中 F 型 H^+-ATPase 位于叶绿体内囊体膜和线粒体内膜上，V 型 H^+-ATPase 定位于液泡膜上，质膜 H^+-ATPase 属于 P 型 ATPase[2]。质膜 H^+-ATPase 能够通过水解三磷酸腺苷(ATP)产生能量，将细胞质中的氢离子(H^+)逆浓度泵出细胞(也称为质膜质子泵)，其功能主要是在细胞膜两侧产生氢离子(H^+)浓度梯度和膜电位，为一系列次级转运体和通道蛋白跨质膜转运各种离子和小分子代谢产物提供驱动力和能量[3]。一系列的实验结果证明：植物质膜 H^+-ATPase 能够参与胞内酸碱度的调节、离子平衡、细胞的伸长生长、气孔的开闭等多种生理过程[4]。植物中的质膜 H^+-ATPase 几乎都是由一个多基因家族所编码，且不同的成员在表达上具有一定的特异性和部分重叠性[5]。例如，在模式植物拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 中共鉴定到 11 个编码质膜 H^+-ATPase 的同源基因(*AHA*1~11)[6]。其中，*AHA*1 和 *AHA*2 在所有的组织器官中都有表达，其表达模式趋向于组成型[7]；*AHA*3 主要在维管组织和生殖器官中表达[8]；*AHA*6，*AHA*8 和 *AHA*9 几乎只在花器官中表达[9]；*AHA*10 主要在发育中的种子种皮的内膜上表达[10]。这些结果暗示了在长期的进化过程中，不同的质膜 H^+-ATPase 基因在植物发育的不同阶段所分化形成的相对保守性和/或特异性的生理功能。植物质膜 H^+-ATPase 活性在基因表达水平的调节还受到激素(如吲哚-3-乙酸等)和环境(如盐害、病菌侵染、菌根真菌共生)因素的影响[11]。番茄 *Solanum lycopersicum* 作为茄科 Solanaceae 作物中的一员，不仅是一种重要的经济作物，而且由于其基因组相对比较简单(大部分品种都为二倍体)，以及全基因组测序和组装工作已经接近完成，也已经成为生物学和遗传学研究的一个理想的模式作物[12]。根据前期研究关于 Southern 印记杂交的结果推测，番茄中可能存在着至少 7 个编码质膜 H^+-ATPase 的基因 *LHA*1~7[13]。现有研究仅对其中的 3 个基因(*LHA*1，*LHA*2 和 *LHA*4)进行了全长 cDNA 序列的克隆和表达调控分析，而其他 4 个可能的 LHA 基因只报道了约 200 bp 的 DNA 序列[14]。本研究通过对番茄全基因组序列文库和 EST/cDNA 文库进行检索，共获得了 8 个具有完整编码区的质膜 H^+-ATPase 基因 *LHA*1~8，其中 *LHA*8 为从未报道过的新基因。对这 8 个基因的序列结构特征、进化关系以及组织表达模式做进一步分析，可为将来深入研究番茄质膜 H^+-ATPase 基因家族的生物学功能奠定工作基础。

1　材料与方法

1.1　供试材料

番茄微型模式品种 *Solanum lycopersicum* ‘Micro-Tom’，成熟期为 70~80 d，株高约为 15 cm。

1.2　试验设计

番茄种子用体积分数为 10%的过氧化氢溶液表面消毒 10 min，自来水冲洗后置灭过菌的石英沙于 25 ℃培养箱中萌发至真叶完全展开，用 1/2 浓度的营养液和完全浓度的营养液各培养 1 周后移栽进行后续实验处理。营养液的配方及浓度为：1.00 mmol·L^{-1} 硝酸铵(NH_4NO_3)，2.00 mmol·L^{-1} 硝酸钾(KNO_3)，0.50 mmol·L^{-1} 硝酸钙($Ca(NO_3)_2$)，1.00 mmol·L^{-1} 磷酸二氢钠(NaH_2PO_4)，0.25 mmol·L^{-1} 氯化钙($CaCl_2$)，0.50 mmol·L^{-1} 硫酸镁($MgSO_4$)，20.00 μmol·L^{-1} 乙二胺四乙酸铁钠(Fe-EDTA)，9.00 μmol·L^{-1} 氯化锰($MnCl_2$)，46.00 μmol·L^{-1} 硼酸(H_3BO_3)，8.00 μmol·L^{-1} 硫酸锌($ZnSO_4$)，3.00 μmol·L^{-1} 硫酸铜($CuSO_4$)，0.03 μmol·L^{-1} 钼酸铵($(NH_4)_6Mo_7O_{24}$)。pH 值调至 pH 5.8。

养分缺乏和高盐处理：试验共设计 4 个养分缺乏(氮、磷、钾和镁)和 1 个高盐(氯化钠)胁迫处理。对照处理为完全营养液培养；养分缺乏处理中的磷、钾和镁的浓度分别降低到对照处理的 1/20，其他养分元素浓度不变；高盐处理为在完全营养液中额外加入 200 mmol·L^{-1} 的氯化钠。生物学重复 3 个·处理$^{-1}$。

接种菌根真菌盆栽试验：试验前将洗净的石英砂灭菌后装到 3 L 的塑料盆中，种番茄小苗 3 株·盆$^{-1}$，苗根部接入 2.0 g·株$^{-1}$ 左右的丛枝菌根真菌 *Rhizophagus irregularis* 孢子菌剂，共设 3 个生物学重复。

1.3　实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)分析

取约 2 μg 的植物组织样品的总 RNA，严格按照 Takara 公司的 PrimeScript RT reagent Kit With cD-

NA Eraser 反转录试剂盒的操作说明进行 cDNA 合成及后续的实时荧光定量 PCR 分析(ABI plus real-time PCR system。表 1)。内参基因为组成型表达的 *Actin* 基因[15]。

表 1 番茄 8 个 *LHA* 基因及 *Actin* 的定量引物

Table 1 Gene-specific primers used for real-time RT-PCR amplification of tomato *LHA* and *Actin* genes

基因	上游引物序列(5′→3′)	下游引物序列(5′→3′)
*LHA*1	CGCGAGCTTCAATGGGCACA	GCTCCCATCACGACACCAACAGT
*LHA*2	GGGCTGCAAGTTCCTGACACC	TCTTCATTCTATCACCCACTCACCAG
*LHA*3	GCCAAACGTCGTGCTGAAGT	CGTAAGGAAGGGAAAGAGGGAAC
*LHA*4	CCGGGAACTGTCTGAAATTGCTG	CTGCCATTCCCTTTTCTTGTGTGTA
*LHA*5	GGGAACTGTCTGAGATTGCTGAAC	TCATCCAACAACATGCCAGCAGC
*LHA*6	TGGTTCCTCTTGATAAATTATTGACA	AGCCATGATAGCAGCACACTCC
*LHA*7	CCACGACAAGAACTACAGGGAATT	TTTCAGCATGTTCCTTTTAGAGTGTA
*LHA*8	AGCAAAAAGGCGCGCAGATAT	AAGGCGAAAAACTCCACAAATGA
Actin	TTCCGTTGCCCAGAGGTCCT	TCGCCCTTTGAAATCCACATC

1.4 进化树分析

HA 蛋白序列的比对分析和系统进化树的绘制分别由 ClustalX 1.83 和 MEGA 4.0 软件完成。构建进化树的算法采用邻接法(Neighbor-Joining)。

1.5 启动子片段融合 pBI121 表达载体的构建

根据 *LHA*8 起始密码子 ATG 上游的启动子序列，设计 5′端分别引入 HindⅢ和 BamHⅠ的正向引物(aagcttagaatccatcattggatcact)和反向引物(ggatccggtagctcaattgattgaaccc)，以番茄基因组 DNA 为模板，进行 PCR 扩增，将扩增得到的 2 669 bp 的启动子片段克隆到 pEASY-Blunt 载体(北京全式金公司产品)。测序验证后用 HindⅢ和 BamHⅠ将启动子片段从克隆载体中切下，回收。同样将双元表达载体 pBI121 用 HindⅢ和 BamHⅠ将 35S 启动子片段切下并回收剩余的线性化的片段，与从克隆载体上切下的目的基因启动子片段通过 T4 DNA Ligase 定向连接。将重组后的表达载体质粒用电击法转化至根癌农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* 感受态细胞(EHA105)中备用。

1.6 烟草 *Nicotiana tabacum* 转基因

采用根癌农杆菌介导的烟草遗传转化方法(叶盘法)[16]。

1.7 GUS 染色

剪取不同转基因株系的根系浸入 Magenta-GUS 染液中，37 ℃反应 6 h 后在 FAA 固定液[*V*(甲醛):*V*(冰醋酸):*V*(70%乙醇)=1:1:18 混合配制而成]中脱色固定 10 h，镜检成像(BX50 OLYPUS 显微镜)。

2 结果与分析

2.1 番茄质膜 H^+-ATPase 编码基因的鉴定及序列分析

为了确认番茄质膜 H^+-ATPase 基因家族中的成员数目，我们以已报道的 3 个番茄质膜 H^+-ATPase 基因 *LHA*1，*LHA*2 和 *LHA*4 的全长编码序列(CDS)作为查询序列，采用 BLASTN 和 TBLASTN 程序分别在番茄基因组数据库和 EST/cDNA 数据库中进行同源序列搜索。通过对所获得的序列进行相似性和结构域分析，最终筛选到 8 个具有完整编码区的 LHA 基因，其中 7 个与之前报道的 *LHA*1~7 序列完全一致，而另外一个(本研究中命名为 *LHA*8)为从未报道过的新基因。序列分析显示，这 8 个 LHA 基因具有相近大小的开放阅读框(ORF)，且编码的氨基酸序列之间具有很高的相似性(表 2)。其中，*LHA*1 和 *LHA*2 以及 *LHA*5 和 *LHA*6 之间的氨基酸序列相似性分别高达 91.5%和 98.3%。

2.2 番茄质膜 H^+-ATPase 编码基因的外显子/内含子结构分析

将 8 个 LHA 基因的编码序列(CDS)和 DNA 序列比对后分析发现，这些基因的编码区中都包含有多个内含子(图 1)。其中 *LHA*1，*LHA*2 和 *LHA*8 含有的内含子最多，为 20 个；而 *LHA*4 含有的内含子最少，只有 10 个。对内含子在 LHA 基因中的分布位置进一步分析发现，这 8 个 LHA 基因具有较为保守的内含子/外显子结构特征，即各 LHA基因中的不同内含子相对于外显子的位置较为一致。从图 1 中还

表 2　番茄 8 个 LHA 基因的氨基酸序列相似性分析

Table 2　Similarity matrix for the predicted amino acid sequences of the eight tomato *LHA* genes

基因	氨基酸序列相似性/%								开放阅读框大小/bp
	*LHA*1	*LHA*2	*LHA*3	*LHA*4	*LHA*5	*LHA*6	*LHA*7	*LHA*8	
*LHA*1	100								2 871
*LHA*2	91.5	100							2 871
*LHA*3	78.0	78.0	100						2 865
*LHA*4	74.6	76.3	79.7	100					2 859
*LHA*5	81.4	79.7	79.7	72.9	100				2 856
*LHA*6	79.7	78.0	78.0	71.2	98.3	100			2 856
*LHA*7	79.7	78.0	78.0	74.6	86.4	84.7	100		2 775
*LHA*8	84.7	84.7	74.6	74.6	79.7	79.7	72.9	100	2 901

可以得知，LHA 基因在进化过程中存在着多处较为明显的内含子丢失(intron loss)现象，如 *LHA*5，*LHA*6和 *LHA*7 相对于 *LHA*1，*LHA*2 和 *LHA*8 这 3 个基因而言在第 5 个和第 7 个内含子处出现了丢失，导致了相应位置的外显子发生了序列合并。

黑色方框代表外显子，方框里面的数字为外显子大小。线条代表内含子，1~20 代表内含子的位置。为了体现番茄 LHA 基因家族外显子/内含子结构的保守性，外显子和内含子的实际大小没有用方框和线条真实反应出来。

图 1　番茄 LHA 基因的外显子/内含子结构分析

Figure 1　Exon/intron structures of the eight tomato LHA genes

2.3　番茄质膜 H+-ATPase 家族基因的进化分析

对番茄 LHA 基因以及其他模式植物中同源基因序列进行的系统进化分析发现，植物质膜 H+-ATPase 基因家族可以大致分为 5 个亚家族(图 2)，与之前其他课题组所报道的结果类似。除了番茄*LHA*3 孤立于这 5 个亚家族之外，其他 7 个 LHA基因分布于 4 个亚家族中，其中 *LHA*1 和 *LHA*2 分布在第 I 亚家族，且聚在同一进化分枝的末端，暗示了 *LHA*1 和 *LHA*2 的进化关系较近，复制产生这 2 个同源基因的事件发生在茄科植物与其他双子叶植物分化之后。与此类似的是，聚集在第Ⅳ亚家族的 *LHA*5，*LHA*6 和 *LHA*7 的进化关系也非常近。由于 *LHA*5 和 *LHA*6 之间的序列相似性非常高(表 1)，且外显子/内含子的结构完全一致(图 1)，暗示 *LHA*5 和 *LHA*6 可能是来源于同一个基因的复制，因此推测这 2 个基因可能具有相似的表达调控模式或行使相似的生物学功能。*LHA*4 和 *LHA*8 分别处于第Ⅱ和第Ⅴ亚家族，与来自于其他双子叶和单子叶植物中的同源基因具有相对较近的进化关系，暗示了 *LHA*4 和 *LHA*8 的进化起源较早，至少出现在双子叶植物和单子叶植物分化之前。值得注意的是，番茄 LHA 基因的内含子/外显子结构特征能够很好地反应这些基因之间的进化关系，即在进化上具有较近关系的 LHA同源基因，其内含子/外显子的结构特征也较为接近。

2.4　番茄质膜 H+-ATPase 家族基因的组织表达模式分析

图 3 显示为番茄 LHA 基因的组织表达特征。结果显示：在正常培养条件下，除了 *LHA*8 在所有被

分析的组织中都检测不到表达信号外，其他 7 个 LHA 基因都能在某些或某个组织中被检测到较为明显的表达。具体而言，*LHA*1，*LHA*2 和 *LHA*4 在所有的组织中都有表达，但在果实中的表达都相对较低，其中 *LHA*2 在所有组织中的表达丰度相对较高。尽管 *LHA*3 在所有被检测的组织中也都有表达，但除了在花中有相对较高的表达之外，在其他组织中的表达都很微弱。*LHA*5，*LHA*6 和 *LHA*7 这 3 个基因的表达模式比较特异，几乎只在花中有表达，其中 *LHA*5 和 *LHA*6 的表达尤为强烈(图 3)。

2.5 *LHA*8 的表达调控模式分析

鉴于 *LHA*8 为新报道的基因，且在正常培养的番茄中不能被检测到表达。为了验证该基因的表达是否受到其他环境因素调控，本研究检测了 *LHA*8 在不同养分(氮、磷、钾和镁)缺乏、高盐(氯化钠)胁迫以及接种菌根真菌处理条件下番茄根系中的表达水平(图 4)。结果表明：*LHA*8 在养分缺乏和高盐处理的番茄根系中也都检测不到表达，但是在接种菌根真菌处理的番茄根系中能够检测到强烈的表达(图 4)。

图 2 番茄LHA基因及其他植物中同源基因的进化分析

Figure 2 Phylogenetic analysis of tomato LHA genes and other plant homologs

为了更直观地证实 *LHA*8 在被菌根真菌侵染根系中的表达部位，我们构建了 *LHA*8 启动子片段(命名为 *pLHA*8)融合 GUS 报告基因的双元表达载体 *pLHA*8-GUS，并通过农杆菌介导的转基因方法转化到了烟草中。对阳性转基因烟草植株的 GUS 染色分析发现，*LHA*8 的启动子能够驱动 GUS 报告基因在被菌根真菌侵染的根系中特异性表达，且表达部位主要集中在被菌根真菌菌丝侵入形成丛枝的细胞中表达，在未被菌丝侵染的细胞中检测不到 GUS 表达(图 5)。

3 结论与讨论

质膜 H^+-ATPase 是植物细胞膜上非常重要的功能蛋白，被认为是植物细胞代谢和生命活动过程的主宰酶[5]。迄今为止，质膜 H^+-ATPase 的活性已被证实与植物生长发育过程中的很多生理过程(如细胞伸长生长、气孔开闭、胞内 pH 调节、养分吸收等)密切相关[4]。鉴于质膜 H^+-ATPase 功能的重要性，植物在漫长的进化过程中进化和保留了多个编码质膜 H^+-ATPase 的同源基因。如在模式植物拟南芥中已被报道存在有 11 个质膜 H^+-ATPase 的编码基因(*AHA*1~11)[7]；在单子叶禾本科 Gramineae 水稻 *Oryza sativa* 中也已经被鉴定到 10 个具有转录活性的质膜 H^+-ATPase 基因(*OsA*1~10)[6]。有意思的是，尽管番茄的基因组大小(约 900 Mb)要比拟南芥(约 125 Mb)和水稻的基因组(约 460 Mb)要大得多[12]，但通过对番茄全基因组序列搜索只获得了 8 个质膜 H^+-ATPase 编码基因，序列分析表明，这些 LHA 基因具有较为保守的编码序列和外显子/内含子结构特征，其中新报道的 *LHA*8 与之前报道过的 *LHA*1 和 *LHA*2 的外显子/内含子结构完全一致。

前期有研究表明，植物中的质膜 H^+-ATPase 基因在进化上可以被大致分为 5 个亚家族(Ⅰ~Ⅴ)[17]。对拟南芥、烟草等植物中质膜 H^+-ATPase 基因的表达分析显示，处于第Ⅰ和第Ⅱ亚家族中的成员，其表达模式偏向于组成型，即几乎在所有的组织器官中都有表达；而处于其他几个亚家族中的成员的表达模式较为特异，只能在少数组织器官中有所表达[18]。在本研究中对番茄 LHA 基因的表达模式分析的结果也获得了类似的结论。*LHA*1，*LHA*2 和 *LHA*4 在所有被检测的组织器官中都有表达，暗示了这几个基因在番茄植株中可能参与了一系列的生理过程。*LHA*5，*LHA*6 和 *LHA*7 表达模式比较特异，几乎只在花中有表达，暗示了这几个基因的功能主要与花器官和生殖器官发育相关，且这些基因之间可能存在着一定程度的功能冗余。之前有研究显示，质膜 H^+-ATPase 基因在转录水平上的表达受到很多因素(如养分缺乏、盐害、病菌侵害和菌根真菌共生等)的影响[11]。*LHA*8 无论是在正常培养条件下，还是在养分缺乏

图 3　番茄 LHA 基因的表达模式分析

Figure 3　Expression analysis of the tomato LHA genes

和高盐处理中都不表达，但能够在菌根真菌侵染的根系中强烈表达。菌根真菌是土壤中一类属于球囊霉门 Glomeromycota 的能够与大多数植物根系形成互惠共生关系的真菌[19]。形成菌根共生体后，菌根真菌的一端(根内菌丝)定殖于根系皮层细胞内，另一端(根外菌丝)穿越根际养分耗竭区。植物根系借助于菌根真菌的根外菌丝可数十倍地扩展在土壤中的吸收空间，增加对土壤中养分(主要是磷)的吸收利用; 作为交换，植物提供给菌根真菌多达 20%的光合产物以维持其生长繁殖[20]。*LHA*8 在接种菌根真菌的番茄根系中特异性表达，暗示了该基因可能参与了植物与菌根真菌共生过程中的养分和信号交换过程。最近在蒺藜苜蓿 *Medicago truncatula* 和水稻中也各发现了 1 个菌根真菌共生特异诱导表达的质膜 H+-ATPase 基因(*MtHA*1 和 *OsHA*1/*OsA*8)[21-22]。在水稻中突变 *OsHA*1/*OsA*8 能够显著影响水稻植株根系与菌根真菌共生，并抑制水稻对土壤中磷素营养的吸收[22]。从进化树上分析可知，*LHA*8 与 *MtHA*1 和 *OsHA*1/*OsA*8 同处于第Ⅴ亚家族，暗示了 *LHA*8 在进化中保留了与 *MtHA*1 和 *OsHA*1/*OsA*8 相似的生物学功能。本研究通过对番茄质膜 H+-ATPase 基因家族各成员的鉴定、序列结构、进化关系和表达模式分析可以为将来深入研究质膜 H+-ATPase 在番茄植物生长发育过程中的作用机制提供理论依据。

图 4 *LHA*8 在不同处理条件下番茄根系中的表达分析

Figure 4 Expression analysis of *LHA*8 in roots of the tomato plants under different treatments

箭头指示的是被菌丝侵染形成丛枝的细胞，三角形为未被菌丝侵染的细胞。

图 5 *LHA*8 启动子驱动 GUS 报告基因在转基因烟草接种菌根真菌的根系中的表达分析

Figure 5 Expression analysis of the GUS reporter driven by *LHA*8 promoter in transgenic tobacco roots colonized by arbuscular mycorrhizal fungi

4 参考文献

[1] MORSOMME P, BOUTRY M. The plant plasma membrane H^+-ATPase: structure, function and regulation [J]. *Biochim Biophysic Acta Biomembr*, 2000, **1465**(1/2): 1 – 16.

[2] KANCZEWSKA J, MARCO S, VANDERMEEREN C, *et al*. Activation of the plant plasma membrane H^+-ATPase by phosphorylation and binding of 14-3-3 proteins converts a dimer into a hexamer [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**(33): 11675 – 11680.

[3] SONDERGAARD T E, SCHULZ A, PALMGREN M G. Energization of transport processes in plants. Roles of the plasma membrane H^+-ATPase [J]. *Plant Physiol*, 2004, **136**(1): 2475 – 2482.

[4] ALSTERFJORD M, SEHNKE P C, ARKELL A, *et al*. Plasma membrane H^+-ATPase and 14-3-3 isoforms of *Arabidopsis* leaves: evidence for isoform specificity in the 14-3-3/H^+-ATPase interaction [J]. *Plant Cell Physiol*, 2004, **45**(9): 1202 – 1210.

[5] GAXIOLA R A, PALMGREN M G, SCHUMACHER K. Plant proton pumps [J]. *FEBS Lett*, 2007, **581**(12): 2204 – 2214.

[6] BAXTER I, TCHIEU J, SUSSMAN M R, *et al*. Genomic comparison of P-type ATPase ion pumps in *Arabidopsis* and rice [J]. *Plant Physiol*, 2003, **132**(2): 618 – 628.

[7] HARUTA M, BURCH H L, NELSON R B, *et al*. Molecular characterization of mutant *Arabidopsis* plants with reduced plasma membrane proton pump activity [J]. *J Biol Chem*, 2010, **285**(23): 17918 – 17929.

[8] ROBERTSON W R, CLARK K, YOUNG J C, *et al*. An *Arabidopsis thaliana* plasma membrane proton pump is essential for pollen development [J]. *Genetics*, 2004, **168**(3): 1677 – 1687.

[9] LAN Ping, LI Wenfeng, LIN Wendai, *et al*. Mapping gene activity of *Arabidopsis* root hairs [J]. *Genome Biol*, 2013, **14**(16): 1 – 20.

[10] BAXTER I R, YOUNG J C, ARMSTRONG G, *et al*. A plasma membrane H^+-ATPase is required for the formation of proanthocyanidins in the seed coat endothelium of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**(7): 2649 – 2654.

[11] SCHALLER A, OECKING C. Modulation of plasma membrane H^+-ATPase activity differentially activates wound and pathogen defense responses in tomato plants [J]. *Plant Cell*, 1999, **11**(2): 263 – 272.

[12] SATO S, TABATA S, HIRAKAWA H, *et al*. The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution [J]. *Nature*, 2012, **485**(7400): 635 – 641.

[13] ROSEWARNE G M, SMITH F A, SCHACHTMAN D P, *et al*. Localization of proton-ATPase genes expressed in arbuscular mycorrhizal tomato plants [J]. *Mycorrhiza*, 2007, **17**(3): 249 – 258.

[14] EWING N N, BENNETT A B. Assessment of the number and expression of P-Type H^+-ATPase genes in tomato [J]. *Plant Physiol*, 1994, **106**(2): 547 – 557.

[15] CHEN Aiqun, CHEN Xiao, WANG Huimin, *et al*. Genome-wide investigation and expression analysis suggest diverse

roles and genetic redundancy of Pht1 family genes in response to Pi deficiency in tomato [J]. *BMC Plant Biol*, 2014, **14**(1): 61.doi: 10.1186/1471-2229-14-61.

[16] HORSCH R B, FRY J E, HOFFMAN N L, *et al*. A simple and general method for transferring genes into plants [J]. *Science*, 1985, **227**(4691): 1229 – 1231.

[17] ARANGO M, GÉVAUDANT F, OUFATTOLE M, *et al*. The plasma membrane proton pump ATPase: the significance of gene subfamilies [J]. *Planta*, 2003, **216**(3): 355 – 365.

[18] ZHU Yiyong, DI Tingjun, XU Guohua, *et al*. Adaptation of plasma membrane H^+-ATPase of rice roots to low pH as related to ammonium nutrition [J]. *Plant Cell Environ*, 2009, **32**: 1428 – 1440.

[19] LIAO Dehua, CHEN Xiao, CHEN Aiqun, *et al*. The characterization of six auxin-induced tomato *GH3* genes uncovers a member, *SlGH3*.4, strongly responsive to arbuscular mycorrhizal symbiosis [J]. *Plant Cell Physiol*, 2015, **56**(4): 674 – 687.

[20] SMITH S E, SMITH F A, JAKOBSEN I. Functional diversity in arbuscular mycorrhizal (AM) symbioses: the contribution of the mycorrhizal P uptake pathway is not correlated with mycorrhizal responses growth or total P uptake [J]. *New Phytol*, 2004, **162**(2): 511 – 524.

[21] KRAJINSKI F, COURTY P E, SIEH D, *et al*. The H^+-ATPase *HA*1 of *Medicago truncatula* is essential for phosphate transport and plant growth during arbuscular mycorrhizal symbiosis [J]. *Plant Cell*, 2014, **26**(4): 1808 – 1817.

[22] WANG Ertao, YU Nan, BANO S A, *et al*. A H^+-ATPase that energizes nutrient uptake during mycorrhizal symbioses in rice and *Medicago truncatula* [J]. *Plant Cell*, 2014, **26**(4): 1818 – 1830.