

超表达*AhNCED1*拟南芥植株在渗透胁迫下抗氧化能力和抗旱相关下游基因表达变化

李嘉怡^{1,*}, 苏良辰^{1,2,*}, 何月容¹, 李玲^{1,**}, 唐慧玲¹, 吴嘉莉¹

¹华南师范大学生命科学学院, 广东省植物发育生物工程重点实验室, 广州510631; ²遵义医学院珠海校区生物工程系, 广东珠海519041

摘要: 利用纯系超表达*AhNCED1*拟南芥植株, 在添加300 mmol·L⁻¹山梨醇的MS培养基上胁迫培养, 分析其表型及抗氧化能力。结果表明, 在正常情况及300 mmol·L⁻¹山梨醇处理10 d条件下, 与*129B08/nced3*突变体和野生型比较, 超表达*AhNCED1*植株生长状况好, 主根长度增加, 幼苗体内O₂⁻含量水平较低, POD和SOD酶活性较高。说明*NCED1*基因对于拟南芥体内抗氧化酶系统的维持有重要意义。用sqRT-PCR方法检测结果表明, 野生型和超表达*AhNCED1*拟南芥植物体内*KINI*、*COR47*和*RAB18*基因表达随脱水延长而明显增强, 且在超表达*AhNCED1*拟南芥中增强幅度大。

关键词: 超表达*AhNCED1*; 拟南芥; 渗透胁迫; 抗氧化水平; 基因表达

Antioxidant Activity and Expression of Downstream Genes Related with Drought Resistance in Transgenic *AhNCED1 Arabidopsis* under Osmotic Stress

LI Jia-Yi^{1,*}, SU Liang-Chen^{1,2,*}, HE Yue-Rong¹, LI Ling^{1,**}, TANG Hui-Ling¹, WU Jia-Li¹

¹Guangdong Key Lab of Biotechnology for Plant Development, College of Life Sciences, South China Normal University, Guangzhou 510631, China; ²Department of Biological Engineering of Zunyi Medical College Zhuhai Campus, Zhuhai, Guangdong 519041, China

Abstract: Pure line of over-expressed *AhNCED1* plants were planted on MS culture medium with 300 mmol·L⁻¹ sorbitol, and the antioxidant activity and their phenotype were analyzed. The results showed that, both in normal conditions and treated by 300 mmol·L⁻¹ sorbitol, over-expressed *AhNCED1* plants were growing better than *129B08/nced3* mutant and wild type, while the main root lengths of over-expressed *AhNCED1* plants were longer than them when planted 10 d. In the meanwhile, over-expressed *AhNCED1* plants had lower O₂⁻ content level than Col-0 and *129B08/nced3* mutant, and SOD and POD activities were higher. The results showed that the *NCED1* gene played an important role in maintaining the antioxidant enzymes system. It could be well studied by sqRT-PCR that the expression of *KINI*, *COR47* and *RAB18* were increasing under the early dehydration treatment in Col-0 and the over-expressed *AhNCED1* plants, while it was markedly increasing in over-expressed *AhNCED1* plants.

Key words: over-expressed *AhNCED1* gene; *Arabidopsis*; osmotic stress; antioxidant activity; gene expression

脱落酸(ABA)参与了植物如种子萌发、幼苗生长等重要生长和发育过程, 是植物重要抗逆境信号因子。在干旱胁迫下植物体内ABA含量提高, 可诱导植物体内多种下游基因的表达, 如引起*RD29A*和*RD29B* (Baker等1994)、*P5CS* (Székely等2008)、*KINI* (Xiong等2002)等相关基因的表达水平提高, 与植物的抗旱性表现为正相关(Xiong等2002)。*P5CS*和*KINI*能够在脱水和ABA处理的条件下快速响应积累, 与渗透胁迫反应过程密切相关(Kurkela和Franck 1990)。

9-顺式环氧类胡萝卜素双加氧酶(9-*cis*-epoxy

carotenoid dioxygenase, *NCED*)是调节ABA生物合成的关键限速酶(Nambara和Marion-Poll 2005)。植物体内*NCED*表达水平与ABA含量呈现正相关(Burbidge等1999; Christmann等2005)。将T-DNA插入到拟南芥*AtNCED3*基因(At3g14440)外显子获得*129B08/nced3*突变体, 该突变体在水分胁迫下不

收稿 2012-09-17 修定 2012-11-15

资助 国家自然科学基金(30771297)和广东省自然科学基金(06025049和10251063101000010)。

* 共同第一作者。

** 通讯作者(E-mail: liling502@126.com; Tel: 020-85211378)。

能积累ABA,对水分胁迫敏感(Christmann等2005)。

本实验室在2005年从干旱诱导的耐旱花生中克隆得到*AhNCED1* (*Arachis hypogaea nine-cis-epoxycarotenoid dioxygenase*),证明其具有*NCED*基因功能(Wan和Li 2005),并成功转入拟南芥影响抗旱性,转基因拟南芥在甘露醇的渗透胁迫下具有较高的萌发率和较强的抗失水能力(Wan和Li 2006)。但该基因在拟南芥的超表达是否影响植株的抗氧化水平,以及与ABA响应相关基因表达的关系尚不清楚。本实验使用300 mmol·L⁻¹山梨醇对超表达*AhNCED1*拟南芥进行渗透胁迫,与*129B08/nced3*突变体和哥伦比亚野生型(Col-0)相比较,分析植株的抗渗透胁迫能力和ABA响应的抗旱相关下游基因表达,探讨*AhNCED1*基因对植物抗氧化水平和抗旱基因表达的影响以及机理,为全面认识*AhNCED1*功能提供新的依据。

材料与方 法

*129B08/nced3*突变体(Col-0遗传背景)、哥伦比亚生态型野生型拟南芥(Col-0, *Arabidopsis thaliana* L.)和纯合*AhNCED1* (35S::*AhNCED1*, Col-0遗传背景)转基因拟南芥种子由本课题组保存。将消毒后的种子分别均匀分散于1/2MS培养基中,4℃春化3 d后,置于22~24℃、相对湿度60%~70%、光强150 μmol·m⁻²·s⁻¹、日照长度为16 h的条件下培养10 d。将4~6叶幼苗移至含300 mmol·L⁻¹山梨醇培养基中,黑暗8 h培养。以未处理转基因拟南芥幼苗为对照。取八叶期拟南芥幼苗移出土,清水浸泡冲洗干净。用吸水纸将不同种拟南芥上水分全部吸干,置于22℃、相对湿度60%、16 h光照/8 h黑暗的条件下自然脱水,处理时间分别为0、0.5、1.0和2.0 h。

参照Wan和Li (2005)的方法:取T₁代的种子播种于含25 μg·mL⁻¹潮霉素的固体筛选培养基上。挑选存活植株移栽至已灭菌的土壤中,植株生长至莲座期时提取DNA,采用花生*AhNCED1*基因特异性引物GP1和GP2进行PCR扩增,检测阳性结果。观察培养10 d的植株,使用Digimizar软件测定植株主根根长,每个处理各统计20株材料。分别以NBT光还原法(魏金凤等2009)和愈创木酚法(白宝璋等1993)测定地上部分SOD和POD活性,酶活性

以每毫克蛋白的酶单位数表示。同时将幼苗置入1 mL 1% NBT染液的离心管中,白炽灯下染色20 min,用脱色液(冰醋酸:乙醇1:3)脱色3次,每次30 min,蒸馏水洗3次,观察染色情况。

实验中计量资料以均数±标准差表示,采用SPSS13.0统计软件进行单因素方差分析(One-Way ANOVA),方差齐性时采用LSD法(Least-Significant Difference Test)进行组间均数比较,方差不齐时采用Welch进行校正分析,*P*<0.05为差异有统计学意义。

用Trizol法提取拟南芥总RNA,采用一步法RT-PCR半定量基因的转录表达水平,采用TAKARA PrimeScript TM One Step RT-PCR Kit。引物actin-F和actin-R用于扩增拟南芥*actin* rRNA,以做PCR反应的内标。所有引物(表1)合成由上海英骏生物公司完成。

实验结果

1 转基因*AhNCED1*拟南芥植株的分子鉴定

选择转基因T₁代拟南芥植株进行PCR鉴定(图1),其中5、6、7、8号出现分子量为684 bp目标基因的谱带,鉴定为转基因超表达植株。取5号超表达植物T₃代株系,用于后续实验研究。

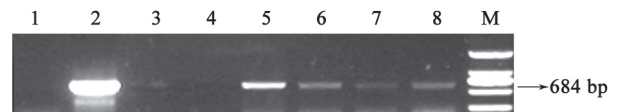


图1 超表达*AhNCED1*拟南芥PCR鉴定

Fig.1 PCR identification of over-expressed *AhNCED1* *A. thaliana*

1: 负对照; 2: 正对照(质粒DNA); 3~8: 已检测*AhNCED1*超表达植株DNA; M: DL2000。

2 超表达*AhNCED1*拟南芥植株抗渗透胁迫能力

种子在正常培养基培养10 d,超表达*AhNCED1*拟南芥的生长状况最好(图2),主根长度较长,叶片生长较快。

在渗透胁迫条件下生长的*129B08/nced3*突变体、Col-0和超表达*AhNCED1*拟南芥主根长度比正常生长条件下分别减少了51.36%、51.94%和40.86%(图3)。正常情况下,*129B08/nced3*突变体和Col-0的主根长比*AhNCED1*的要短;在渗透胁迫

表1 拟南芥抗旱相关下游基因RT-PCR引物

Table 1 RT-PCR primers of downstream genes which related with drought resistance in *Arabidopsis*

| 引物名称 | 引物序列 | 扩增基因 |
|---------|----------------------------|----------------------|
| actin-F | GCTGAGAGATTTCAGACTGCCCA | 拟南芥 <i>actin</i> 基因 |
| actin-R | CACAGTTTTTCGCGATCCAGAC | 拟南芥 <i>actin</i> 基因 |
| GP1 | G TTCACGCCGTGAAATCCACA | 花生 <i>AhNCED1</i> 基因 |
| GP2 | GCGCTTCAATCCACCGGATACCA | 花生 <i>AhNCED1</i> 基因 |
| RD29A-F | TGGAAAATGGATCAAACAGAGGAA | 花生 <i>RD29A</i> 基因 |
| RD29A-R | TCAGTTCTCATATTCTTAAAGCTC | 花生 <i>RD29A</i> 基因 |
| RD29B-F | GCTTTGGAAAATGGAGTCACAGT | 花生 <i>RD29B</i> 基因 |
| RD29B-R | AACCCCAAATCTTCAGTTCCCAG | 花生 <i>RD29B</i> 基因 |
| Kin1-F | TCTGAAAAAATGTCTCAGAGACCAAC | 花生 <i>Kin1</i> 基因 |
| Kin1-R | AAATTTGACCCGAATCGCTACTTG | 花生 <i>Kin1</i> 基因 |
| P5CS1-F | AGACGACGACGACGATAATGGAG | 花生 <i>P5CS1</i> 基因 |
| P5CS1-R | AGAAGTTGAGCTGCCGTCACATC | 花生 <i>P5CS1</i> 基因 |
| RAB18-F | GCTTAAGACAAGAAGAACATGGCG | 花生 <i>RAB18</i> 基因 |
| RAB18-R | GGTGAAGCATTCTCCCAAGCCA | 花生 <i>RAB18</i> 基因 |
| COR47-F | GATTAACTATGGCTGAGGAGTACA | 花生 <i>COR47</i> 基因 |
| COR47-R | CCTCCTACACACAACCTTACACA | 花生 <i>COR47</i> 基因 |

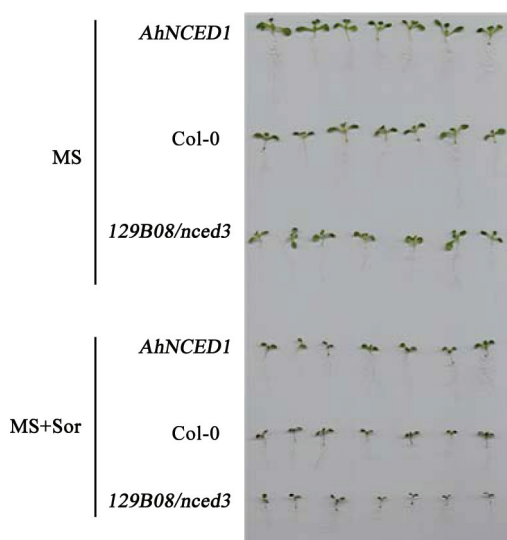


图2 渗透胁迫下各株系拟南芥的生长表型

Fig.2 Phenotype of lines of *A. thaliana* under osmotic stress

MS: MS培养基; MS+Sor: 添加300 mmol·L⁻¹山梨醇的MS培养基。

条件下可观察到同样的现象, 说明超表达*AhNCED1*拟南芥具有较强的生长能力。

3 超表达*AhNCED1*拟南芥植株抗氧化能力

图4结果显示, 渗透胁迫处理前*129B08/nced3*突变体NBT染色较深于Col-0和超表达*AhNCED1*拟南芥。渗透胁迫1 d, 突变体和野生型植株叶片边缘色加深, 超表达拟南芥染色情况基本不变。

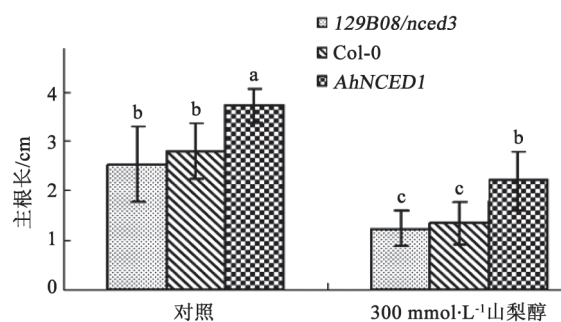


图3 渗透胁迫下超表达*AhNCED1*拟南芥主根长度

Fig.3 Length of main root of over-expressed *AhNCED1 A. thaliana* under osmotic stress

不同小写字母表示不同品种拟南芥在不同测定值比较具有显著性差异($P < 0.05$)。图5、6同此。

处理2 d后, 3个品种拟南芥植株根部均被染色, 其中*129B08/nced3*突变体根部染色最深。处理3 d后, *129B08/nced3*突变体叶片及茎部染色加深, 根部无染色, Col-0和超表达*AhNCED1*拟南芥染色稍有加深。处理第4天, 3个品种拟南芥几乎不被染色, 这可能与第4天植物体内抗氧化酶活力上升有关系, 其中*129B08/nced3*突变体植株茎部带有红色, 叶片边缘隐约有蓝色。处理第5天, *129B08/nced3*突变体整体出现黄色, 叶片染色仍然较深且集中于叶片中部; Col-0整株均有染色, 但总体较浅; 超表达*AhNCED1*拟南芥染色已恢复至处理前水平。



图4 渗透胁迫下超表达*AhNCED1*拟南芥NBT染色
Fig.4 NBT staining of over-expressed *AhNCED1* *A. thaliana* under osmotic stress

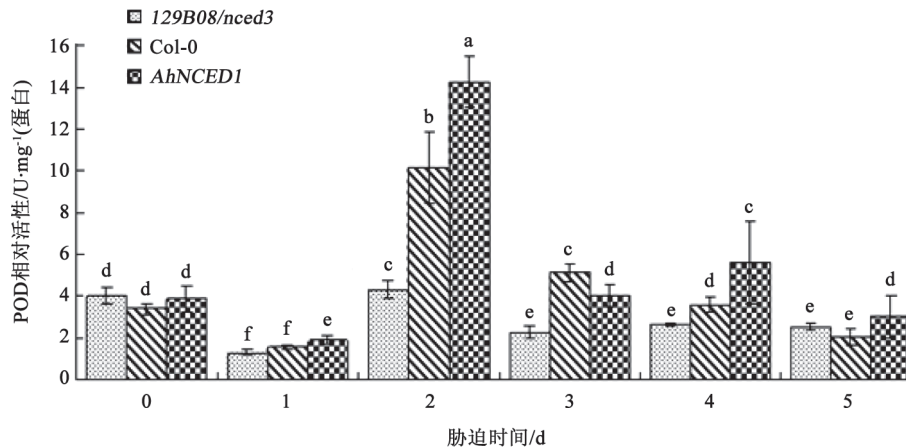


图5 渗透胁迫下超表达*AhNCED1*拟南芥POD活性变化
Fig.5 Change of POD activity of over-expressed *AhNCED1* *A. thaliana* under osmotic stress

均逐步提高,而在*129B08/nced3*中随着脱水处理延长,基因表达却逐渐下降;*COR47*和*RAB18*基因在*Col-0*和超表达*AhNCED1*拟南芥中随脱水时间延长表达提高显著,而在*129B08/nced3*中随着脱水加深基因表达提升不明显。

正常条件下超表达*AhNCED1*拟南芥植株的POD活性与*129B08/nced3*突变体和*Col-0*的活性没有显著差异。渗透胁迫1 d后植株的酶活性显著下降,第2天显著升高,随后酶活下降并维持在正常水平,但仍显著高于胁迫1 d时的酶活性;其中,超表达*AhNCED1*和*Col-0*拟南芥POD活性于胁迫处理第2天升幅显著,分别为正常水平的6.95和3.65倍(图5)。

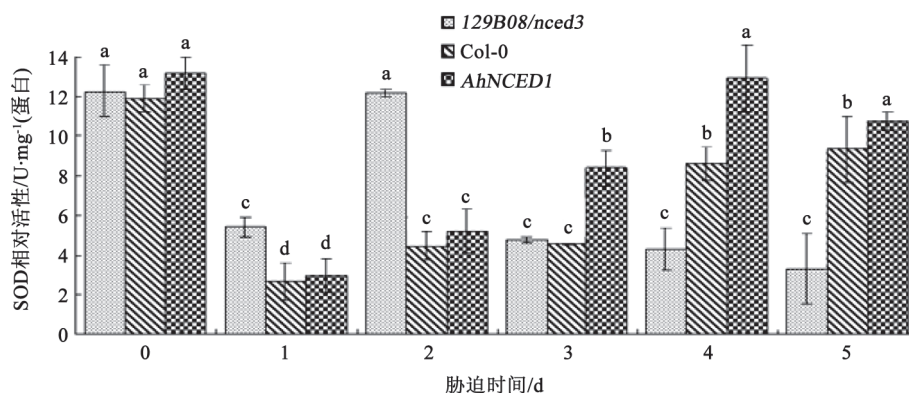
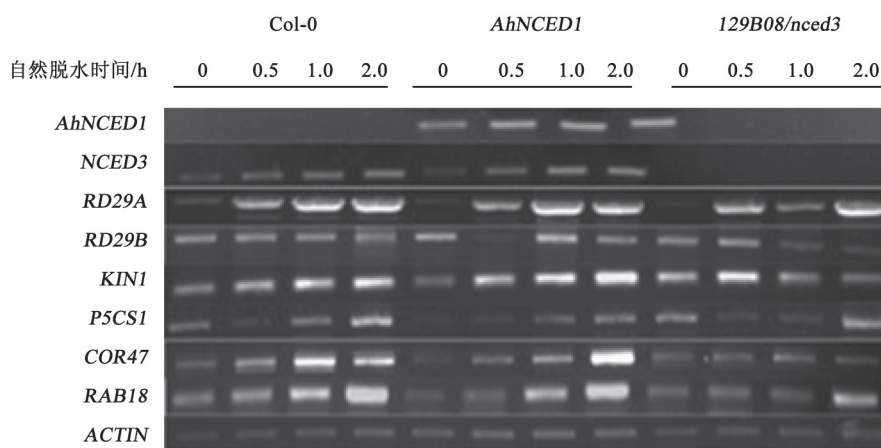
正常条件下超表达*AhNCED1*拟南芥体内SOD活性高于突变体和野生型。渗透胁迫处理1 d后,*129B08/nced3*突变体SOD活性显著下降,处理第2天恢复至正常水平,随后持续下降(图6);*Col-0*和*AhNCED1*超表达植株均在处理后显著下降,于第2天开始逐渐上升。

4 超表达*AhNCED1*拟南芥抗旱相关下游基因的表达

分析渗透胁迫下抗旱下游相关基因的表达发现,*RD29A*在超表达*AhNCED1*植株、突变体和野生型植株随着脱水时间延长表达量增加(图7),*RD29B*在*Col-0*和超表达*AhNCED1*植株中表达无显著变化,在*129B08/nced3*中表达出现下降趋势;在*Col-0*和超表达*AhNCED1*拟南芥中的*KIN1*表达

讨 论

我们的前期研究结果表明,在甘露醇渗透胁迫的条件下,超表达*AhNCED1*拟南芥具有较高的萌发率(Wan和Li 2006)。本实验结果表明,与

图6 渗透胁迫下超表达*AhNCED1*拟南芥SOD活性变化Fig.6 Change of SOD activity of over-expressed *AhNCED1* *A. thaliana* under osmotic stress图7 Col-0、*AhNCED1*和*129B08/nced3*植株抗旱相关下游胁迫响应基因表达Fig.7 Expression of stress induced gene which related with anti-drought in Col-0, *AhNCED1* and *129B08/nced3*

*129B08/nced3*突变体和野生型幼苗相比, 超表达*AhNCED1*拟南芥幼苗的根系发育速度快, 在渗透胁迫条件下生存率高, 抗渗透能力明显。超表达*AhNCED1*拟南芥无论在正常条件还是渗透胁迫处理下, 体内 $O_2^{\cdot-}$ 始终低于*129B08/nced3*突变体和野生型, 说明其清除体内 $O_2^{\cdot-}$ 的能力较强。本实验结果也表明, 正常条件下超表达*AhNCED1*拟南芥SOD和POD活性均高于野生型和*129B08/nced3*突变体。有报道指出, SOD和POD共同作用能够有效地清除植物体内的活性氧及其他过氧化物自由基(Kar 2011)。超表达*AhNCED1*拟南芥的POD活性在胁迫处理第4天出现小幅度上升, 而*129B08/nced3*突变体胁迫处理3 d后SOD和POD活性分别维持在22.5%~40%和55%~65%之间, 不能恢复至正常水平, 与其*NCED3*基因缺失有关, 说明*NCED*

基因的存在与植物维持拟南芥体内过氧化酶系统的稳定有关。

黎瑞敏等(2008)指出干旱胁迫的条件下*AhNCED1*转基因拟南芥植株比野生型植株矮壮, 侧根发生多, 根系发育好, 在正常培养及干旱条件下, 叶片气孔开度和气孔密度均比野生型小, 认为超表达*AhNCED1*植株可能通过增强植株体内ABA含量, 影响气孔发育和开合来增强抵抗干旱的能力。本实验结果表明, 在超表达*AhNCED1*拟南芥中, *KIN1*、*COR47*和*RAB18*表达量高, 在渗透胁迫条件下表达增强, 而这些基因在*129B08/nced3*突变体中的表达提高不明显。目前认为, 植物对干旱胁迫应答的基因调控网络, 通常分为ABA依赖与非依赖两大调控网络(张洪霞和郭岩2012), 相关的转录因子会随之调控不同下游基因的表达(Shino-

zaki和Yamaguchi-Shinozaki 2000)。该结果可能与在渗透胁迫条件下,超表达*AhNCEDI*拟南芥的抗渗透胁迫能力提高,植株体内*NCED*表达促进ABA合成,提高体内ABA依赖基因的表达增强相关。

总之,超表达*AhNCEDI*促进拟南芥的根系发育,提高体内抗氧化酶活性,使植物体在渗透胁迫下快速恢复并维持过氧化酶系统稳定,诱导ABA下游胁迫相关基因*KINI*、*COR47*和*RABI8*的表达增强,影响了相关的生理生化反应,促进植株抗胁迫能力提高。*AhNCEDI*基因可能通过提高植物体内抗氧化酶活性和相关下游基因的表达增强植物的抗旱性。

参考文献

- 白宝璋,王景安,孙玉霞,靳占忠(1993). 植物生理学测试技术. 北京: 中国科学技术出版社, 148~149
- 黎瑞敏,郭栋梁,万小荣,李玲(2008). 转*AhNCEDI*基因拟南芥形态特征和抗旱性研究. 生物技术, 18 (5): 16~18
- 魏金凤,郭敬功,张清德,李坤,白玲(2009). UV辐射对拟南芥叶片抗氧化酶系统和膜系统的影响. 河南大学学报(自然科学版), 39 (5): 500~504
- 张洪霞,郭岩(2012). 植物渗透胁迫适应、耐盐性和抗冷性. 见: 陈晓亚,薛红卫编. 植物生理与分子生物学. 北京: 高等教育出版社, 630~632
- Baker SS, Wilhelm KS, Thomashow MF (1994). The 5'-region of *Arabidopsis thaliana cor15a* has cis-acting elements that confer cold-, drought- and ABA-regulated gene expression. Plant Mol Biol, 24 (5): 703~713
- Burbidge A, Grieve TM, Jackson A, Thompson A, McCarty DR, Taylor IB (1999). Characterization of the ABA-deficient tomato mutant *notabilis* and its relationship with maize *Vp14*. Plant J, 17: 427~431
- Christmann A, Hoffmann T, Teplova I, Grill E, Müller A (2005). Generation of active pools of abscisic acid revealed by *in vivo* imaging of water-stressed *Arabidopsis*. Plant Physiol, 137: 209~219
- Kar RK (2011). Plant responses to water stress: role of reactive oxygen species. Plant Signal Behav, 6 (11): 1741~1745
- Kurkela S, Franck M (1990). Cloning and characterization of a cold- and ABA-inducible *Arabidopsis* gene. Plant Mol Biol, 15 (1): 137~144
- Nambara E, Marion-Poll A (2005). Abscisic acid biosynthesis and catabolism. Annu Rev Plant Biol, 56: 165~185
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2000). Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. Curr Opin Plant Biol, 3 (3): 217~23
- Székely G, Abrahám E, Csépló A, Rigó G, Zsigmond L, Csiszár J, Ayaydin F, Strizhov N, Jásik J, Schmelzer E, Koncz C, Szabados L (2008). Duplicated *P5CS* genes of *Arabidopsis* play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis. Plant J, 53 (1): 11~28
- Wan XR, Li L (2005). Molecular cloning and characterization of a dehydration-inducible cDNA encoding a putative 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase in *Arachis hyogaea* L. DNA Seq, 16 (3): 217~223
- Wan XR, Li L (2006). Regulation of ABA level and water-stress tolerance of *Arabidopsis* by ectopic expression of a peanut 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase gene. Biochem Biophys Res Commun, 347 (4): 1030~1038
- Xiong L, Schumaker KS, Zhu JK (2002). Cell signaling during cold, drought, and salt stress. Plant Cell, 14: S165~S183