

盐胁迫下过量表达腺苷甲硫氨酸合成酶基因的转基因烟草的生长

戚元成*, 王菲菲

河南农业大学生命科学学院, 郑州 450002

摘要: 以转腺苷甲硫氨酸合成酶基因(*SsSAMS2*)烟草纯合子 ST8-9 为实验材料, 研究盐胁迫下过量表达 *SsSAMS2* 对转基因烟草生长影响的结果表明, 200 mmol·L⁻¹ NaCl 处理后的转基因烟草的光合速率和生物量都比野生型烟草高, 积累的自由多聚胺比较多, 同时精氨酸脱羧酶的转录本也更丰富。显示转基因烟草的耐盐性比野生型烟草高, 多聚胺在烟株缓解盐胁迫中可能是起了重要作用。

关键词: 腺苷甲硫氨酸合成酶; 盐胁迫; 多聚胺; 转基因烟草

The Growth of Transgenic Tobacco Over-Expressing *S-adenosylmethionine synthetase* under Salt Stress

QI Yuan-Cheng*, WANG Fei-Fei

College of Life Sciences, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China

Abstract: The effect of *S-adenosylmethionine synthetase* overexpression on the growth of transgenic tobacco under salt stress was studied by using homozygous ST8-9, transgenic tobacco plants over-expressing *Suadea salsa S-adenosylmethionine synthetase* (*SsSAMS2*). The transgenic plants showed higher photosynthetic rate, biomass, polyamine (PA) content and abundance *arginine decarboxylase* (*ADC*) transcription than wild-type (WT) plants under 200 mmol·L⁻¹ NaCl treatment. These results indicated that transgenic plants were more tolerant to salt stress than WT plants and PAs might play an important role in attenuating salt stress.

Key words: *S-adenosylmethionine synthetase*; salt stress; polyamine; transgenic tobacco

腺苷甲硫氨酸合成酶(*S-adenosylmethionine synthetase*, SAMS)可催化底物ATP和蛋氨酸生成腺苷甲硫氨酸(*S-adenosylmethionine*, SAM) (Cantoni 1953)。腺苷甲硫氨酸是腺苷甲硫氨酸脱羧酶(*S-adenosylmethionine decarboxylase*)的底物, 脱羧基后的腺苷甲硫氨酸在多聚胺(polyamine, PA)的生物合成中提供氨基(Chiang 等 1996)。我们实验室曾从盐地碱蓬中克隆到一个腺苷甲硫氨酸合成酶基因(*SsSAMS2*, GenBank 登录号为 AF321001) (Ma 等 2003)。戚元成等(2009)以土壤农杆菌介导的转化方法将盐地碱蓬的腺苷甲硫氨酸合成酶 cDNA (*SsSAMS2*)转化到烟草(*Nicotiana tabacum* L. K326)中, 分析转基因纯合系的基因表达和自由多聚胺含量, 结果表明 *SsSAMS2* 可在转基因烟草中表达, 且转基因烟草中的自由多聚胺含量明显高于野生型烟草(WT)。自由多聚胺是一类低分子量的渗透保护物质, 它在一定程度上可以缓解逆境对植物的胁迫 (Groppa 和 Benavides 2008; Kusano 等 2008)。本文以转基因纯合系ST8-9为实验材料, 研究盐胁迫下过

量表达 *SsSAMS2* 后的转基因烟草生长情况。

材料与方法

植物材料为转基因系烟草 ST8-9 和野生型烟草(*Nicotiana tabacum* L. K326)。

烟草幼苗长至 6 cm 左右时, 转移到盛有蛭石、腐殖质和草皮(1:1:1)的盆中, 在温室中用 1/2 Hoagland 营养液培养 30 d 后, 一组烟株用含有 200 mmol·L⁻¹ NaCl 的 1/2 Hoagland 营养液处理, 另一组用不加 NaCl 的 1/2 Hoagland 营养液做对照, 每隔 5 d 处理一次, 连续处理 4 周后, 用于生理指标检测和基因表达分析。

用便携式光合作用测定系统 LI6400 (LI-COR, USA) 测定上部伸展烟叶的光合速率, CO₂ 浓度为 400 μmol·mol⁻¹, 叶温为 25 °C, 相对湿度为 70%~

收稿 2009-11-09 修定 2009-12-18

资助 国家“863”计划(2002AA629080)。

* 通讯作者(E-mail: qiyuancheng@yahoo.com.cn; Tel: 0371-63555153)。

80%, 测定的叶面积为 6 cm^2 。

自由多聚胺含量测定用烟株上部伸展烟叶, 参照戚元成等(2009)文中的方法进行。

收获烟株, 烘干, 称单株干重。

Northern杂交分析精氨酸脱羧酶在转基因烟株内的表达。采用 Trizol 试剂盒提取转基因烟草和野生型烟草叶中的总 RNA, 用 RT-PCR 扩增精氨酸脱羧酶(arginine decarboxylase)基因 *ADC* 和 18S rRNA, RT-PCR 反应按照说明书(One Step RT-PCR kit; Takara, Shiga, Japan)进行。18S rRNA 的引物为 18S-F (5' ATGATAACTCGACGGATCGC 3')和 18S-R (5' CTTGGATGTGGTAGCCGTTT 3')。ADC (GenBank 登录号为 AF127241)扩增引物为 ADC-F (5' TCAGGACCAAGCATTTCAGG 3')和 ADC-R (5' AAGGGCATCTTCGTTGAGC 3')。反应体系为 $50 \mu\text{L}$; 反应条件为 $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s, $58 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 1 min, 共 20 个循环。以 1% 琼脂糖凝胶作电泳分析, 并用 DNA 凝胶试剂盒回收片段, 作探针标记的模板。转基因烟草和野生型烟草的总 RNA 依据 Sambrook 等(2001)文中的步骤转膜。 ^{32}P dCTP 随机标记 *ADC* 和 18S rDNA 做探针。探针标记和杂交步骤参照戚元成等(2004)文中的方法。

结果与讨论

1 盐胁迫对转基因和野生型烟株光合速率的影响

如图 1 所示, 在正常条件下, 转基因烟株和野生型烟株的光合速率均比较高, 虽然转基因烟株的光合速率高于野生型, 但变化幅度不是太大。在 $200 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 胁迫下, 转基因烟株和野生型烟株的光合速率较 NaCl 处理前均下降, 但野生型烟株比胁迫前降低约 40%, 而转基因烟株降低约 14% 左右。这表明, NaCl 胁迫下转基因烟株比野生型烟株维持较高的光合速率。

2 盐胁迫对转基因和野生型烟株生物量的影响

如图 2 所示, 在正常条件下, 虽然转基因烟株的干重高于野生型, 但变化幅度不大。在 $200 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 胁迫下, 转基因烟株和野生型烟株的干重比 NaCl 处理前均下降, 但野生型较胁迫前降低约 38%, 而转基因烟株降低约 17% 左右, 野生型烟株降低的幅度高于转基因型烟株; 这表明, NaCl 胁迫下转基因烟株比野生型烟株生长好。

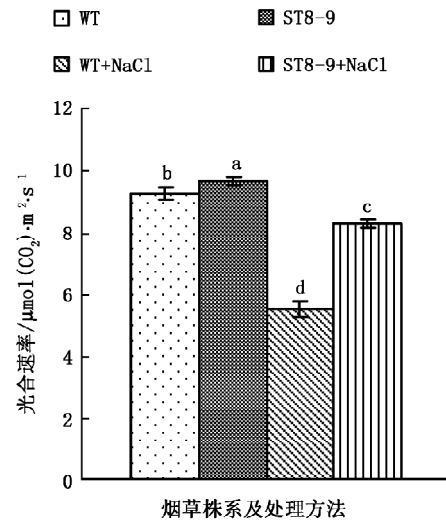


图 1 NaCl 胁迫对转基因和野生型烟株光合速率的影响
Fig.1 Effects of NaCl stress on photosynthetic rate of the transgenic and WT tobacco plants

每个系列 10 个重复, 数据用平均数 ± 标准误差表示。柱状图上不同字母表示 0.05 水平上的差异显著性。

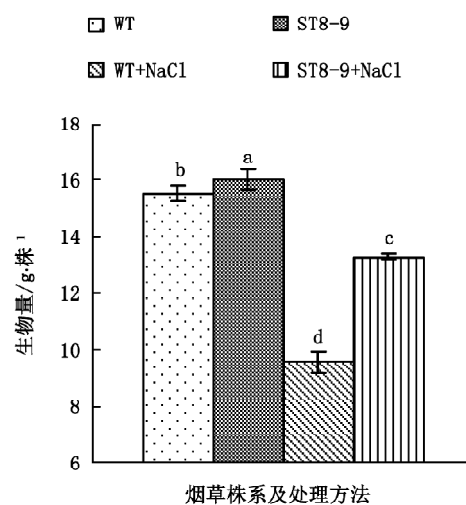


图 2 NaCl 胁迫对转基因和野生型烟株生物量的影响
Fig.2 Effects of NaCl stress on biomass of the transgenic and WT tobacco plants

每个系列 10 个重复, 数据用平均数 ± 标准误差表示。柱状图上不同字母表示 0.05 水平上的差异显著性。

3 盐胁迫下转基因和野生型烟株的自由多聚胺含量的比较

从图 3 可以看出, 在 NaCl 胁迫下, 转基因烟株的自由多聚胺含量均高于野生型; 但就转基因烟株或野生型烟株自身而言, NaCl 胁迫下自由多聚胺含

量比未经NaCl处理的均升高,只不过转基因烟株的增幅大一些(为17%),而野生型仅为10%。这说明过量表达 *SsSAMS2* 导致了转基因烟株内自由多聚胺含量的升高。

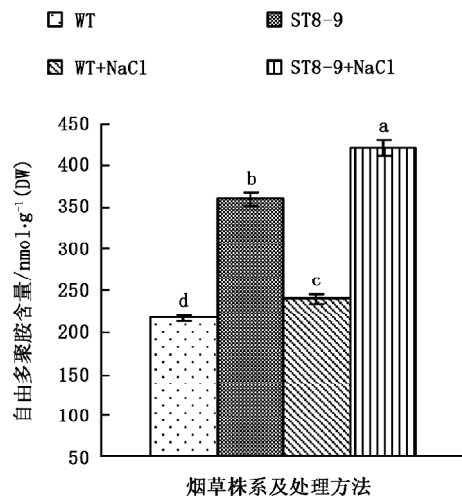


图3 NaCl胁迫对转基因和野生型烟株中自由多聚胺含量的影响

Fig.3 Effects of NaCl stress on total free PAs contents of the transgenic and WT tobacco plants

每个系列10个重复,数据用平均数±标准误表示。柱状图上不同字母表示0.05水平上的差异显著性。

4 盐胁迫下转基因和野生型烟株中ADC的表达的比较

多聚胺主要包括腐胺、亚精胺和精胺,其中腐胺是合成亚精胺的前体物(Groppa和Benavides 2008; Kusano等2008)。过量表达腺苷甲硫氨酸合成酶基因可以增加脱羧基甲硫氨酸的前体物腺苷甲硫氨酸的合成,从而生成大量的脱羧基腺苷甲硫氨酸,为从腐胺到亚精胺、亚精胺到精胺的转化提供氨丙基。为了分析转基因烟株中腐胺积累的原因,我们测定合成腐胺的关键酶——精氨酸脱羧酶的转录。结果表明(图4),转基因烟株中ADC的表达量高于野生型,且200 mmol·L⁻¹ NaCl胁迫下,转基因型和野生型烟株的ADC表达量均高于胁迫前。这表明过

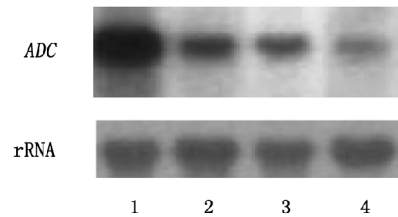


图4 NaCl胁迫下ADC在转基因和野生型烟株中表达量的Northern杂交分析

Fig.4 Northern blotting analysis of ADC in transgenic and WT tobacco plants under NaCl stress

1: ST8-9+NaCl; 2: ST8-9; 3: WT+NaCl; 4: WT。

量表达 *SsSAMS2* 导致了ADC表达量的升高。

总之,腺苷甲硫氨酸合成酶基因在转基因烟草中过量表达后,转基因烟株内多聚胺含量增加,因而在盐胁迫条件下转基因烟株比野生型烟株有较高的光合速率和生物量,生长较好。

参考文献

- 威元成, 马雷, 王菲菲, 刘卫群(2009). 过量表达甲硫氨酸合成酶基因能提高转基因烟草中多聚胺的生物合成. 植物生理学通讯, 45 (8): 791~793
- 威元成, 张世敏, 王丽萍, 王明道, 张慧(2004). 谷胱甘肽转移酶基因过量表达能加速盐胁迫下转基因拟南芥的生长. 植物生理与分子生物学学报, 30 (5): 517~522
- Cantoni GL (1953). *S*-adenosylmethionine: a new intermediate formed enzymatically from *L*-methionine and adenosinetriphosphate. J Biol Chem, 204: 403~416
- Chiang PK, Gordon RK, Tal J, Zeng GC, Doctor BP, Pardhasaradhi K, McCann PP (1996). *S*-adenosylmethionine and methylation. FASEB J, 10 (4): 471~480
- Groppa MD, Benavides MP (2008). Polyamines and abiotic stress: recent advances. Amino Acids, 34 (1): 35~45
- Kusano T, Berberich T, Tateda C, Takahashi Y (2008). Polyamines: essential factors for growth and survival. Planta, 228 (3): 367~381
- Ma XL, Wang ZL, Qi YC, Zhao YX, Zhang H (2003). Isolation of *S*-adenosylmethionine synthetase gene from *Suaeda salsa* and its differential expression under NaCl stress. Acta Bot Sin, 45 (11): 1359~1365
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (2001). Molecular cloning. A laboratory manual (3rd ed). Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press