

研究报告 Original Papers

拟南芥抗旱突变体 *vem1* 对 NaCl 和 ABA 胁迫的响应杨杰², 江力^{1,*}, 张娇娇¹, 陈子平¹¹合肥工业大学生物与食品工程学院, 合肥230009; ²合肥师范学院生命科学系, 合肥230601

摘要: 我们从拟南芥突变体库中筛选获得一抗旱突变体 *vem1*。本文通过观察突变体表型, 测定其脯氨酸、可溶糖、叶绿素含量和相对电导率等抗逆相关的生理指标, 研究突变体 *vem1* 对 NaCl 和 ABA 胁迫的响应。NaCl 胁迫下, 突变体 *vem1* 比野生型 (WT) 积累更多的脯氨酸和可溶性糖, 而相对电导率、叶绿素含量均比 WT 低。ABA 胁迫下, *vem1* 积累的脯氨酸、可溶糖和叶绿素含量均低于 WT, 而相对电导率和胁迫相关基因 *RD29A* 表达量高于 WT。结果表明, *vem1* 对 NaCl 胁迫具有一定的抗性, 对 ABA 胁迫表现敏感。研究为抗旱基因 *VEM1* 克隆及功能分析奠定基础。

关键词: 拟南芥; 抗旱突变体 *vem1*; 甘露醇; NaCl 胁迫; ABA 胁迫

Responses of the Drought-Resistant *vem1* Mutant to NaCl and ABA Stress in *Arabidopsis*

YANG Jie², JIANG Li^{1,*}, ZHANG Jiao-Jiao¹, CHEN Zi-Ping¹¹School of Biotechnology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China; ²Department of Life Science, Hefei Normal University, Hefei 230601, China

Abstract: We have isolated a drought-resistant mutant *vem1* from the *Arabidopsis* mutant pool. In this work, wild-type (WT) and *vem1* phenotypes were observed, and resistance-related physiological indexes, including proline content, soluble carbohydrate, chlorophyll content, and relative conductivity were measured to study response of mutant *vem1* to NaCl and ABA stress. Under NaCl stress, *vem1* mutant plants showed higher proline and soluble sugar levels but lower relative conductivity and chlorophyll content compared with WT plants. Under ABA stress, contents of proline and soluble sugar as well as chlorophyll in *vem1* mutant plants were lower than those of WT plants; however, relative conductivity and the expression level of related stress-responsive gene *RD29A* in the *vem1* mutant were higher than those in WT. These results suggest that the *vem1* mutant was more resistant to NaCl stress but sensitive to ABA stress. This study provides a basis for cloning and functional analysis of the drought-resistant gene *VEM1*.

Key words: *Arabidopsis thaliana*; drought-resistant mutant *vem1*; mannitol; NaCl; ABA

干旱是影响植物生长和发育的主要环境因子之一, 全球干旱、半干旱地区约占耕地面积的一半, 全世界由于干旱导致减产超过其他因素造成的减产的总和 (Neumann 2008)。植物在长期的逆境条件下形成一系列生理或发育的机制来响应环境中的这种胁迫。植物抗旱机制存在多种调控途径并可能发生交叉 (Zhu 2002; Qin 等 2008; Pose 等 2009; Alexandersson 等 2010; Yoshida 等 2010; 胡守景 等 2008): 如依赖于脱落酸 (ABA) 的途径; 被 *DREB2A* 转录因子调控的途径; 通过 *ERD1* 基因调控的途径; 通过 *SIZ1* 介导的途径等。渗透调节和 ABA 调节, 能够使植物抵御干旱胁迫所造成的伤

害 (刘琳 等 2009)。

在前期工作中, 我们利用正向遗传学途径, 采用不同浓度的甘露醇模拟干旱胁迫, 以发芽率为筛选指标, 从购自美国拟南芥种质资源中心 (The *Arabidopsis* Biological Resource Center, ABRC) 的拟南芥突变体库中筛选抗旱突变体, 得到一个功能获得性抗旱突变体 *vem1* (张娇娇 等 2012)。该

收稿 2012-11-09 修定 2013-03-20

资助 安徽省自然科学基金重大项目 (KJ2011ZD08) 和安徽省自然科学基金项目 (1208085MC47)。

* 通讯作者 (E-mail: jiangli@ustc.edu.cn; Tel: 0551-62919366)。

突变体为本实验室首次获得, 基因未知。在此基础上, 本文进一步对突变体*vem1*表型进行鉴定, 分析突变体特征; 通过观察突变体表型, 测定其脯氨酸、可溶糖、叶绿素含量和相对电导率等抗逆相关的生理指标以及胁迫相关基因表达, 研究突变体对NaCl和ABA胁迫的响应, 为该抗旱基因克隆及功能分析奠定基础。

材料与方 法

1 材料

拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)野生型(WT)种子(Columbia生态型), 购自美国拟南芥种质资源中心(The *Arabidopsis* Biological Resource Center, ABRC; Ohio State University, Columbus, OH)。抗旱突变体(*vem1*)为本实验室从拟南芥突变体库(ABRC)中筛选得到。

2 材料培养

2.1 培养基培养

种子经0.1%HgCl₂消毒3~5 min后, 用无菌水冲洗3~5次, 然后将种子点种在加入1.5%蔗糖、0.8%琼脂和一定含量NaCl或ABA的MS培养基中; 并用封口膜封装, 于4 °C条件下处理3 d后转至光周期16 h光/8 h暗、光照强度为100 μmol·m⁻²·s⁻¹的培养室内培养。

2.2 土壤培养

种子播种于装有灭菌营养土(蛭石:黑土:珍珠岩=9:3:0.5)的盆钵中, 置于光周期16 h光/8 h暗、光照100 μmol·m⁻²·s⁻¹、温度22~23 °C的培养室内培养, 播种和开花时各浇一次土培营养液, 并根据植株生长需要浇以适量水。

3 实验处理

3.1 干旱处理

将WT和*vem1*播种于不同盆钵中, 取4周大的WT和*vem1*植株进行干旱处理。处理前吸水充足, 干旱处理7 d、14 d, 再复水处理7 d, 观察表型并拍照。

3.2 *vem1*对NaCl胁迫响应

分别将WT和*vem1*种子点种在含有0、50和100 mmol·L⁻¹ NaCl的MS培养基中, 竖直培养3周, 观察表型并拍照。取幼苗(分别用0、100 mmol·L⁻¹ NaCl处理)用于测定脯氨酸含量、叶绿素含量、可溶性糖含量和相对电导率, 各项测定重复3次。

3.3 *vem1*对ABA胁迫响应

分别将WT和*vem1*种子点种在含有0、0.5、1和2 μmol·L⁻¹ ABA的MS培养基中, 竖直培养3周, 观察表型并拍照。取幼苗(分别用0、2 μmol·L⁻¹ ABA处理)用于测定脯氨酸含量、叶绿素含量、可溶性糖含量和相对电导率。取MS培养基中3周大WT和*vem1*幼苗, 分别置于0、2 μmol·L⁻¹ ABA溶液中处理12 h, 进行干旱相关基因*RD22*和*RD29A*表达量的检测。各项测定重复3次。

4 测定方法

脯氨酸含量采用酸性茚三酮显色法(职明星和李秀菊2005)测定, 可溶糖含量采用蒽酮比色法(林炎坤1989)测定, 叶绿素含量采用常温浸提比色法测定, 相对电导率采用浸泡法(陈爱葵等2010)测定。相关基因表达采用qRT-PCR方法进行检测(Wang等2011)。Trizol法提取总RNA, 利用ReverseAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit进行反转录, 利用Oligo (dT)引物合成cDNA第一链。设计引物三步法PCR扩增进行了荧光定量PCR检测。引物序列见表1。

表1 qRT-PCR检测引物序列

Table 1 Sequences of primer pairs used for qRT-PCR detection

基因	引物序列(5'→3')
<i>RD22</i>	fw: TAGGAGTCGGTAAAGCGGT rv: CATCGGTGCGTCTCTTAGC
<i>RD29A</i>	fw: GAGGAACCACCACTCAACAC rv: TCCAGAAAGCAGAGAGACCG
<i>ACTIN</i>	fw: GATTTGGCATCACACTTCTACAATG rv: GTTCCACCACTGAGACAATG

实验结果

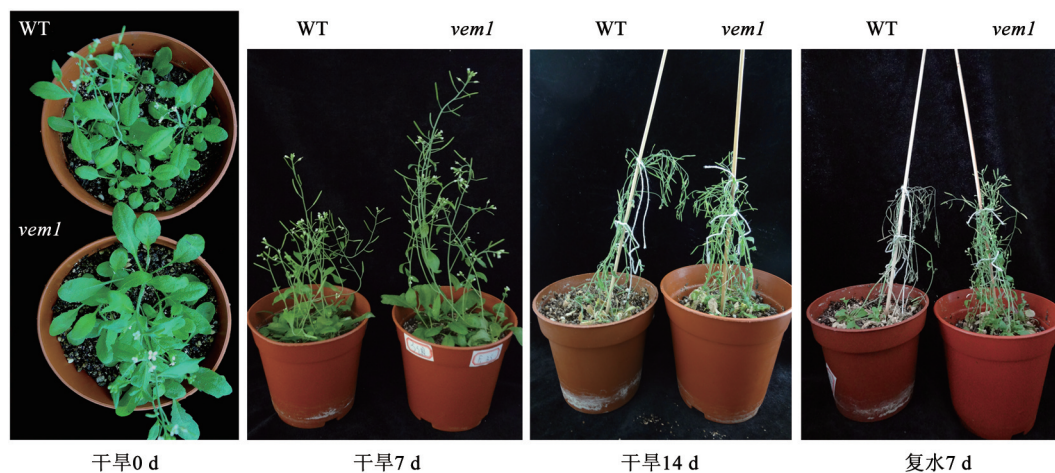
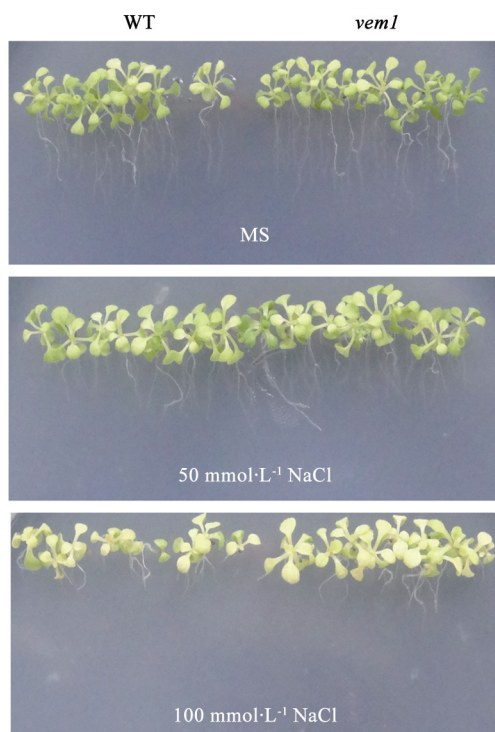
1 干旱处理下WT和*vem1*的生长

干旱处理7 d, WT和*vem1*生长尚可; 干旱处理14 d, WT和*vem1*都呈萎蔫状, 但WT萎蔫更严重; 复水7 d后, *vem1*恢复活力, 而野生型仍然萎蔫, 不能存活(图1)。表明突变体*vem1*相对WT具有抗旱性。

2 拟南芥抗旱突变体*vem1*对NaCl胁迫的响应

2.1 NaCl胁迫下WT和突变体*vem1*生长

图2所示, 在MS培养中WT和*vem1*生长状况无明显差异, 50、100 mmol·L⁻¹ NaCl胁迫下, *vem1*和WT

图1 干旱胁迫下WT和突变体*vem1*表型Fig.1 Phenotype of WT and mutant *vem1* under drought stress图2 NaCl胁迫下WT和突变体*vem1*表型Fig.2 Phenotype of WT and mutant *vem1* under NaCl stress

生长均受到的抑制,根长变短叶片发黄。但*vem1*比WT长势稍好,尤其是100 mmol·L⁻¹ NaCl胁迫下。

2.2 NaCl胁迫下WT和突变体*vem1*生理指标

分析NaCl胁迫下几个抗逆相关的生理指标(图3)。在无NaCl胁迫(MS)下WT和*vem1*积累的脯氨酸含量、可溶糖含量、叶绿素含量以及电导率

基本相同;而100 mmol·L⁻¹ NaCl胁迫下, *vem1*脯氨酸含量、可溶糖含量分别比WT增加了73.0% (图3-A)、22.4% (图3-B), 叶绿素含量、相对电导率分别比WT降低了7.52% (图3-C)、16.2% (图3-D)。NaCl胁迫下, *vem1*增加了较多的脯氨酸含量和可溶性糖含量,且相对电导率较低,说明突变体*vem1*具有一定的耐盐性,叶绿素含量下降与NaCl胁迫下WT和*vem1*的表型相一致。

3 拟南芥抗旱突变体*vem1*对ABA胁迫的响应

3.1 ABA胁迫下WT和*vem1*生长

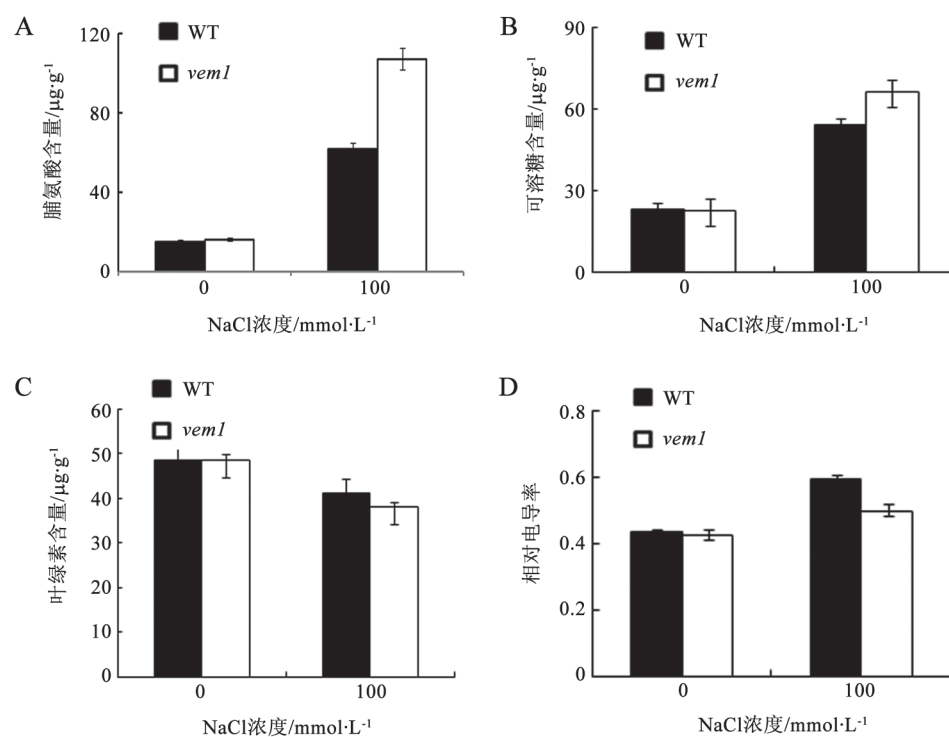
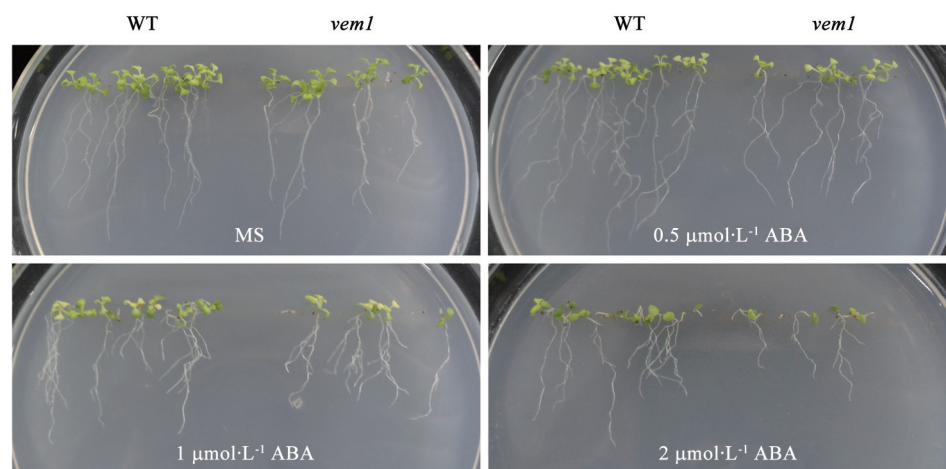
图4可见,在MS培养基中WT和*vem1*生长状况无明显差异。随着ABA浓度的增加,至2 μmol·L⁻¹时, *vem1*根长明显减小,说明突变体*vem1*对ABA胁迫敏感。

3.2 ABA胁迫下WT和*vem1*生理指标

在无ABA胁迫(MS)下WT和*vem1*积累的脯氨酸含量、可溶糖含量、叶绿素含量以及电导率基本相同(图5);而2 μmol·L⁻¹ ABA胁迫下, *vem1*脯氨酸含量、可溶糖含量、叶绿素含量分别比WT降低了35.8% (图5-A)、18.0% (图5-B)、46.8% (图5-C), 相对电导率增加了1.3% (图5-D)。数据进一步说明了*vem1*对ABA胁迫敏感。

3.3 ABA胁迫下WT和*vem1*相关基因的qRT-PCR分析

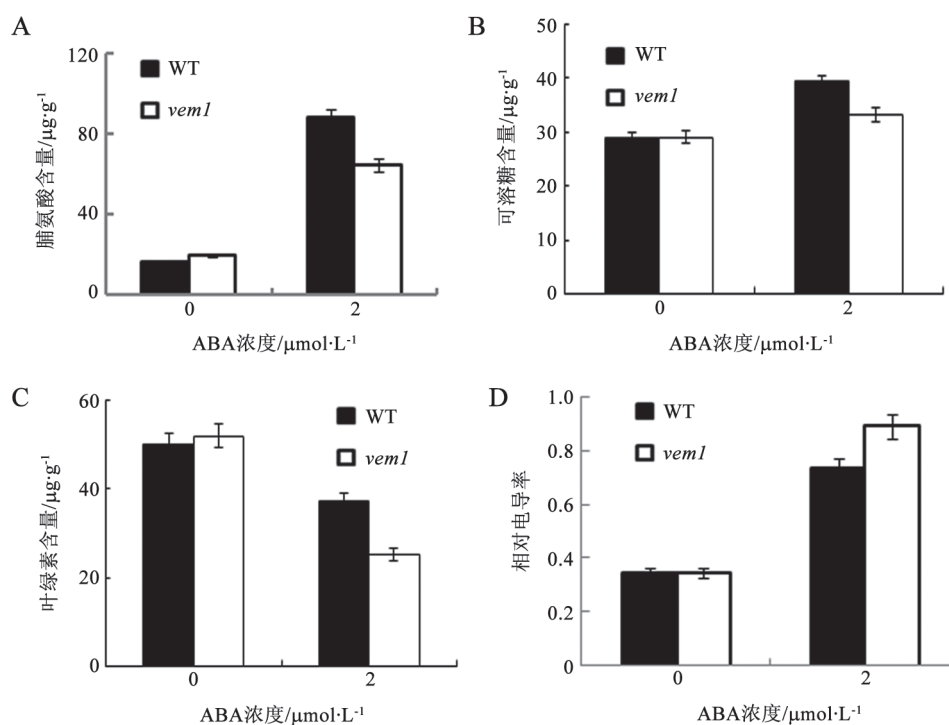
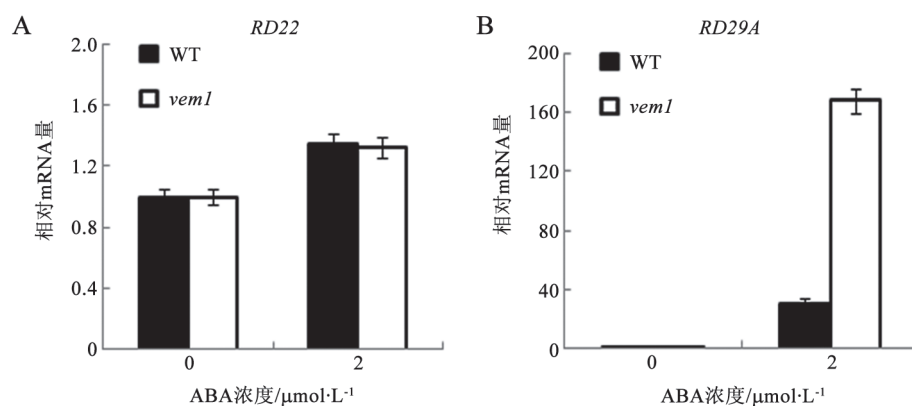
qRT-PCR分析了ABA胁迫下*RD22*和*RD29A*表达量(图6)。*RD22*和*RD29A*为胁迫应答基因,分别

图3 NaCl胁迫下WT和突变体*vem1*的生理指标Fig.3 Physiological indexes of WT and mutant *vem1* under NaCl stress图4 ABA胁迫下WT和突变体*vem1*表型Fig.4 Phenotype of WT and mutant *vem1* under ABA stress

编码胁迫响应蛋白RD22和RD29A, 响应ABA、干旱、低温等胁迫。无ABA胁迫(MS)下2种基因在WT和*vem1*中的表达量一致; 2 μmol·L⁻¹ABA胁迫下RD22在WT和*vem1*中表达相差无几(图6-A), 而*vem1*中RD29A的表达量显著高于WT (图6-B), 显示突变体*vem1*的抗旱性一定程度上与RD29A基因激活有关。

讨 论

我们利用正向遗传学途径, 筛选获得抗旱突变体*vem1*。进一步研究耐盐(NaCl)胁迫, 发现突变体*vem1*对NaCl的耐受性比野生型强。ABA胁迫下, 表型分析和生理指标结果都表明, 突变体*vem1*对ABA胁迫敏感, 相关基因表达分析推测突

图5 ABA胁迫下WT和突变体*vem1*的生理指标Fig.5 Physiological indexes of WT and mutant *vem1* under ABA stress图6 ABA胁迫下WT和突变体*vem1*中相关基因的qRT-PCR分析Fig.6 qRT-PCR analysis of stress-responsive genes in WT and mutant *vem1* plants under ABA stress

突变体*vem1*的抗旱性与*RD29A*的表达量显著增加有关, 说明突变体*vem1*的抗旱调控途径可能是ABA依赖型。干旱信号转导过程中胁迫相关基因的表达存在ABA依赖和ABA非依赖型两种调控途径。ABRE和DRE/CRT分别是ABA依赖和ABA不依赖途径中基因表达对干旱胁迫做出反应的顺式作用元件(Xiong等2002; Shinozaki等2003)。依赖ABA的基因表达有两种途径: 一条途径是ABA通

过一种具有亮氨酸拉链结构域的调节蛋白AREB、ABA结合因子ABF与具有ACGT或G盒的ABA保守顺式作用元件ABRE特异结合, 引起抗旱功能基因的表达(Uno等2000; Shinozaki等2003; Yoshida等2010)。另一途径是ABA通过逆境诱导合成的蛋白转录因子和顺式作用元件特异结合, 从而引起相应的抗旱功能基因的表达(Shinozaki等2000; Lee等2012)。

逆境条件下,植物体内脯氨酸和可溶糖含量在一定程度上反映了植物的抗逆性。研究表明,植物脯氨酸和可溶糖含量的升高有利于细胞水势的降低,提高保水能力,对盐胁迫下的拟南芥幼苗有显著渗透调节作用(陈吉宝等2010; Ashraf和 Foolad 2007);植物受到离子毒害,过量的Cl⁻离子渗入细胞后,使原生质凝聚,叶绿素破坏,叶绿素含量显著降低(许兴等2002)。此外,逆境下植物细胞膜容易破裂,膜蛋白受伤害因而使胞质液外渗而相对电导率增大。因此相对电导率被用来作为逆境对植物的伤害程度的一个重要指标,也是鉴定植物抗逆性的一个指标。在NaCl胁迫下,突变体*vem1*中脯氨酸、可溶性糖含量均比WT高,而相对电导率、叶绿素含量均比WT低。说明突变体*vem1*对于NaCl胁迫具有一定的耐受性,且这种耐盐抗旱性很可能是与渗透胁迫以及离子平衡都有关。而在ABA胁迫条件下,突变体*vem1*中脯氨酸、可溶性糖、叶绿素含量均低于WT,而相对电导率明显高于WT。一定浓度的外源ABA能够调节植物气孔关闭,影响气体交换,并降低了植物的脱水能力,此外,影响叶绿体的超微结构,使叶绿体的外膜破裂,影响植物的光合作用,从而使得植物的生长受到抑制(谭云等2001)。

拟南芥抗旱突变体*vem1*对NaCl胁迫耐受,对ABA胁迫敏感,进一步克隆*VEMI*基因,转基因互补验证,研究*VEMI*基因调控抗旱的信号途径及分子机理。

参考文献

- 陈爱葵,韩瑞宏,李东洋,凌连连,罗慧霞,唐上剑(2010). 植物叶片相对电导率测定方法比较研究. 广东教育学院学报, 30: 88~91
- 陈吉宝,赵丽英,毛新国,王述民,景蕊莲(2010). 转*PvP5CS1*基因拟南芥植株对干旱和盐胁迫的反应. 作物学报, 36: 47~153
- 胡守景,张治礼,黄荣峰(2008). 植物应答干旱胁迫的基因表达调控. 中国农业科技导报, 10: 1~6
- 林炎坤(1989). 常用的几种蒽酮比色定糖法的比较和测定. 植物生理学通讯, 25: 53~55
- 刘琳,曾幼玲,张富春(2009). ABA与植物的耐盐性. 植物生理学通讯, 45: 187~194
- 谭云,叶庆生,李玲(2001). 植物抗旱过程中ABA生理作用的研究进展. 植物学通报, 18: 197~201
- 许兴,李树华,惠红霞,米海莉(2002). NaCl胁迫对小麦幼苗生长、叶绿素含量及Na⁺、K⁺吸收的影响. 西北植物学报, 22: 278~284
- 张娇娇,江力,杨杰,慈凌坤,卢云峰,曹树青(2012). 拟南芥抗旱突变体的筛选和鉴定. 合肥工业大学学报, 35: 531~535
- 职明星,李秀菊(2005). 脯氨酸测定方法的改进. 植物生理学通讯, 41: 355~357
- Alexandersson E, Danielson JAH, Rade J, Moparthy VK, Fontes M, Kjellbom P, Johanson U (2010) Transcriptional regulation of aquaporins in accessions of *Arabidopsis* in response to drought stress. *Plant J*, 61: 650~660
- Ashraf M, Foolad MR (2007). Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environ Exp Bot*, 59: 206~216
- Lee SJ, Jung HJ, Kang HS, Kim SY (2012). *Arabidopsis* zinc finger proteins AtC3H49/AtTZF3 and AtC3H20/AtTZF2 are involved in ABA and JA responses. *Plant Cell Physiol*, 53: 673~686
- Neumann PM (2008). Coping mechanisms for crop plants in drought-prone environments. *Ann Bot*, 101: 901~907
- Pose D, Castanedo I, Borsani O, Nieto B, Rosado A, Taconnat L, Ferrer A, Dolan L, Valpuesta V, Botella MA (2009). Identification of the *Arabidopsis dry2/sqe1-5* mutant reveals a central role for sterols in drought tolerance and regulation of reactive oxygen species. *Plant J*, 59: 63~76
- Qin F, Sakuma Y, Tran LS P, Maruyama K, Kidokoro S, Fujita Y, Fujita M, Umezawa T, Sawano Y, Miyazono KI, et al (2008). *Arabidopsis* DREB2A-interacting proteins function as Ring E3 ligases and negatively regulate plant drought stress-responsive gene expression. *Plant Cell*, 20: 1693~1707
- 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: 217~223
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, Seki M (2003). Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Curr Opin Plant Biol*, 6: 410~417
- Uno Y, Furihata T, Abe H, Yoshida R, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2000). *Arabidopsis* basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97: 11632~11637
- Wang Y, Zong K, Jiang L, Sun JJ, Ren YB, Sun ZH, Wen C, Chen XP, Cao SQ (2011). Characterization of an *Arabidopsis* cadmium-resistant mutant *cdr3-ID* reveals a link between heavy metal resistance as well as seed development and flowering. *Planta*, 233: 697~706
- Xiong LM, Schumaker KS, Zhu JK (2002). Cell signaling during cold, drought and salt stress. *Plant Cell*, 14: 165~183
- Yoshida T, Fujita Y, Sayama H, Kyonoshin S, Maruyama K, Mizoi J, Shinozaki K, Shinozaki KY (2010). AREB1, AREB2, and ABF3 are master transcription factors that cooperatively regulate ABRE-dependent ABA signaling involved in drought stress tolerance and require ABA for full activation. *Plant J*, 61: 672~685
- Zhu JK (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 53: 247~273