

转獐茅 ANHX 基因烟草的耐盐生理研究

张高华, 苏乔*, 安利佳 (大连理工大学环境与生命学院, 辽宁大连 116024)

摘要 [目的] 研究从禾本科盐生植物獐茅中分离的液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因 ANHX 在盐胁迫下的功能和表达。[方法] 转化 ANHX 的烟草经过抗生素和 PCR 筛选后, 用不同浓度的 NaCl 处理 30 d, 测定其单株干重、相对电导率、细胞渗透压以及 K^+/Na^+ 比。[结果] 在不同浓度 NaCl 处理下, 转基因烟草的相对干重和细胞渗透压均高于对照烟草。在 300 mmol/L NaCl 处理下, 转基因烟草的相对电导率明显低于对照。 K^+/Na^+ 含量测定表明在盐胁迫下转基因烟草的根部和叶片均维持一个相对较高的 K^+/Na^+ 水平。[结论] ANHX 是一个有效的耐盐基因, 可进一步应用于单子叶农作物的基因改良研究。

关键词 獐茅; NHX 基因; 转基因烟草; 耐盐性

中图分类号 S311 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)18-07564-02

Study on Physiology of Salt Tolerance in ANHX Transgenic Tobacco

ZHANG Gao-Hua et al (School of Environmental & Biological Science, Dalian University of Technology, Dalian, Liaoning 116024)

Abstract [Objective] The aim of the research was to investigate the function and expression of ANHX isolated from a graminaceous halophyte *Aeluropus litoralis* under salt stress. [Method] After screened by kanamycin and PCR, the ANHX transgenic tobacco was treated with different NaCl concentration for 30 days, then the dry weight, relative electronic conductivity, osmotic potential as well as K^+/Na^+ ratio was measured. [Result] The results indicated that with different NaCl concentration treatment, both the dry weight and osmotic potential of transgenic plants were higher than wild-type tobacco. Under 300 mmol/L NaCl treatment, the relative electronic conductivity of transgenic plants was significantly lower than wild-type tobacco ($P < 0.01$). The analysis of ion content suggested that under high salt stress the transgenic plants kept a relative high K^+/Na^+ ratio in the leaves and roots compared with wild-type plants. [Conclusion] ANHX was an effective gene for improving the salt tolerance of monocot crops via genetic engineering.

Key words *Aeluropus litoralis*; NHX gene; Transgenic tobacco; Salt tolerance

土壤盐分是制约农作物生长的主要因素之一, 它不仅造成农作物品质低劣, 产量降低, 同时还使土壤板结, 大大降低土壤的利用率^[1]。盐分对植物的伤害主要包括 2 方面: 其一, 土壤中较高的溶质浓度导致的水分亏缺; 其二, 植物吸收水分的同时吸收了过多的盐离子所带来的离子毒害, 特别是 Na^+ 毒害^[2]。植物在受到盐胁迫时, 都会采取一定的耐盐策略, 包括渗透调节、 Na^+ 外排以及 Na^+ 液泡区隔化等^[3]。 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白(NHX) 是位于质膜和液泡膜上, 介导 Na^+ 和 H^+ 跨膜运输的载体蛋白, 它依靠 H^+ -ATPase 或 H^+ -PPase 产生的质子驱动力来运输 Na^+ , 使 Na^+ 逆浓度梯度跨膜运输, 将细胞质内的 Na^+ 外排或将 Na^+ 区隔到液泡中, 从而减少盐离子对细胞质中细胞器的毒害。 Na^+ 在液泡内区隔化促使细胞从外界环境中吸水维持渗透平衡, 具有调节细胞质内 pH 值和 Na^+ 浓度的功能, 对植物耐盐性起着非常重要的作用^[4]。目前从很多植物中已经克隆了 NHX 基因, 并转化到各种植物中, 转化 NHX 基因的植物都不同程度地提高了耐盐性^[5]。但是, 至今很少有来源于单子叶盐生植物的 NHX 基因的报道, 鉴于很多农作物都属于单子叶植物, 从单子叶盐生植物中分离该基因并进行功能和表达研究将有助于单子叶农作物的耐盐改良基因工程。

獐茅(*Aeluropus litoralis*) 是一种耐盐性很高的禾本科盐生植物, 据报道它能在含盐量 1%~3% 的土壤中正常生长^[6], 生理研究表明在高盐环境下, 獐茅根部依然保持较高的 K^+/Na^+ 比^[7]。目前对于獐茅的耐盐性研究仅限于对其耐盐生理和解剖结构研究, 而对其在分子水平上的耐盐机制研究则很少。大连理工大学植物分子生物学实验室从单子叶禾本科盐生植物獐茅中克隆了液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因 ANHX, 并将其成功表达在烟草中。为了进一步研

究 ANHX 基因的功能和表达, 笔者对 T_2 代转化 ANHX 烟草在盐胁迫条件下的生长状况和生理指标进行了调查, 包括单株干重、相对电导率、细胞渗透势以及 K^+/Na^+ 比的测定。

1 材料与方 法

1.1 试验设计 转化 ANHX 基因的烟草株系 N2、N3、N5 由大连理工大学植物分子生物学实验室保存, 已经过 PCR 和 Southern 杂交鉴定。 T_2 代转基因烟草的种子经过 70% 酒精和 0.1% 升汞消毒后种植于含有 50 mg/L 卡那霉素的 MS 培养基中, 生长 20 d 的烟草幼苗移栽于温室中, 并用 1/2 Hoagland 培养液浇灌。生长 1 个月的烟草苗经过 PCR 检测后用含 0、100、200、300 mmol/L NaCl 的 1/2 Hoagland 营养液浇灌, 每 2 d 换水 1 次, 期间适当补水, 以保持 NaCl 浓度恒定。连续处理 30 d 后分别取样进行各项生理指标的测定, 每个处理至少 3 个重复。同样处理的野生型烟草用于对照。数据采用 GraphPad Prism 软件处理。

1.2 转基因烟草 PCR 检测 以转化烟草基因组 DNA 为模板, ANHX 编码区特异性引物 01 (5'-GACGGATCCAGGAGGAAGA-CAACTGCCATG-3') 和 02 (5'-GGCGGTACCGTCAAA-GICTTCGTTCTTCTCA-3') 为引物进行 PCR 扩增, 反应条件为: 94℃ 变性 5 min; 94℃, 30 s; 58℃, 30 s; 72℃, 2 min, 共 30 个循环; 72℃ 延伸 7 min。

1.3 单株干重测定 生长 1 个月的烟草经过不同浓度 NaCl 处理 30 d 后, 将植株从盆内取出, 冲洗干净, 105℃ 迅速杀青 10 min, 于 80℃ 下烘干至恒重, 记录干重。

1.4 相对电导率的测定 称取经 300 mmol/L NaCl 胁迫的烟草新鲜叶片 0.5 g, 加 5 ml 去离子水, 室温下浸泡 2 h, 然后用 DDS-11A 数字显示电导仪(上海精密科学仪器有限公司)测定溶液电导率 R_c , 再将叶片和浸泡液一起置于沸水浴中加热 15 min, 再次测定溶液电导率 R_c , 最后计算 R_c/R_c 的值即为相对电导率 R_{ec} 。

1.5 细胞渗透势的测定 取同一部位叶片立即浸入去离子

作者简介 张高华(1976-), 女, 甘肃兰州人, 博士研究生, 研究方向: 植物分子生物学。* 通讯作者。

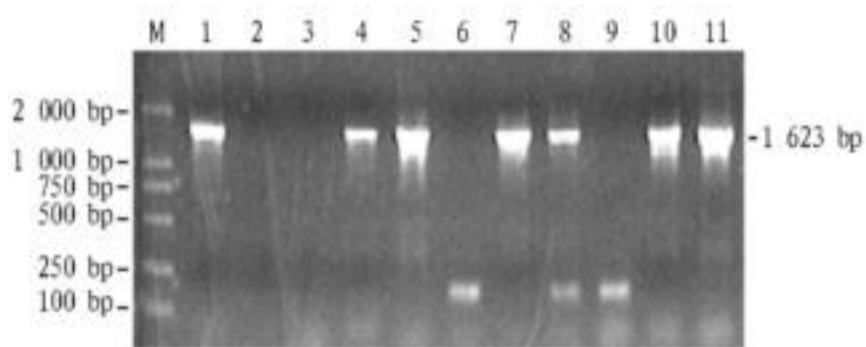
收稿日期 2008-02-19

水中饱和8 h, 取出叶片用去离子水冲洗干净, 用吸水纸吸净表面水分, 立即放入液氮中, 叶片变脆, 将叶片组织置于医用注射器中, 室温融化, 用力挤压注射器, 挤出约0.5 ml 汁液即可。使用FM- 8P 型全自动冰点渗透压计(上海医大仪器厂)测定细胞溶质渗透摩尔浓度。

1.6 Na⁺ 与 K⁺ 含量测定 将待测的烟草叶片和根部组织置于恒温干燥箱中, 120 ℃ 杀青 2 h, 然后 80 ℃ 烘干至恒重。准确称取烘干样品 0.1 g 于 100 ml 三角瓶中, 加入 10 ml 4:1 的浓硝酸与高氯酸混合液消化 24 h。高温加热至生成大量白烟且溶液由棕黄色变为无色为止, 冷却至室温, 分别加入双蒸水定容至 100 ml。使用 WFX- 120B 原子吸收分光光度计(北京瑞利分析仪器公司)进行测量。

2 结果与分析

2.1 转基因烟草的 PCR 检测 T₂ 代转化 ANHX 的烟草种子经过抗生素筛选萌发后, 对抗生素筛选阳性的烟草进行 PCR 检测(图1), PCR 检测阳性的烟草进一步用于耐盐生理测定。



注: M, DL2000 Marker; 1, 阳性质粒 pUC- ANHX; 2, 野生型烟草; 3-11, 转基因株系。

Note: M. DL2000 Marker; 1. Positive plasmid pUC ANHX; 2. Wild tobacco; 3- 11. Transgenic plants

图1 转化 ANHX 基因烟草 PCR 鉴定

Fig.1 PCR identification of transgenic tobacco ANHX in tobacco

2.2 NaCl 处理对烟草生长状况的影响 植物单株干重是显示植物生长状况的重要指标之一, 对经过不同浓度 NaCl 处理 30 d 的烟草干重进行测定, 试验结果显示所有的转基因烟草株系在不同浓度盐胁迫下的单株干重均明显高于对照烟草(图2), 表明转基因烟草在盐胁迫下的生长状况要明显好于对照烟草。

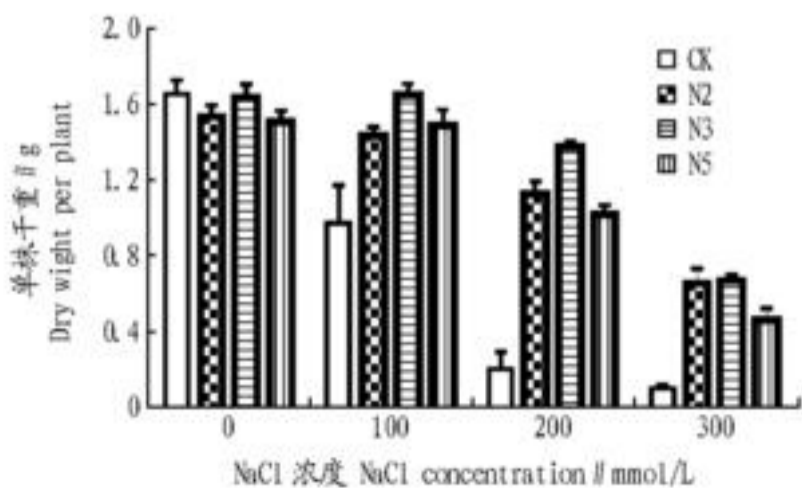


图2 不同浓度 NaCl 处理对烟草干重的影响

Fig.2 Effects of NaCl treatments with different concentrations on tobacco dry weight

2.3 NaCl 处理对转基因烟草相对电导率的影响 相对电导率是通过测定电解质的相对外渗率来了解植物在受到胁迫情况下细胞受伤害程度的指标之一。测定转基因烟草及

对照烟草在 300 mmol/L NaCl 处理后的相对电导率发现, 转基因烟草的相对电导率明显低于对照烟草, 且差异达到极显著 ($P < 0.01$), 表明盐胁迫对转基因烟草的伤害明显小于对照植株(图3)。

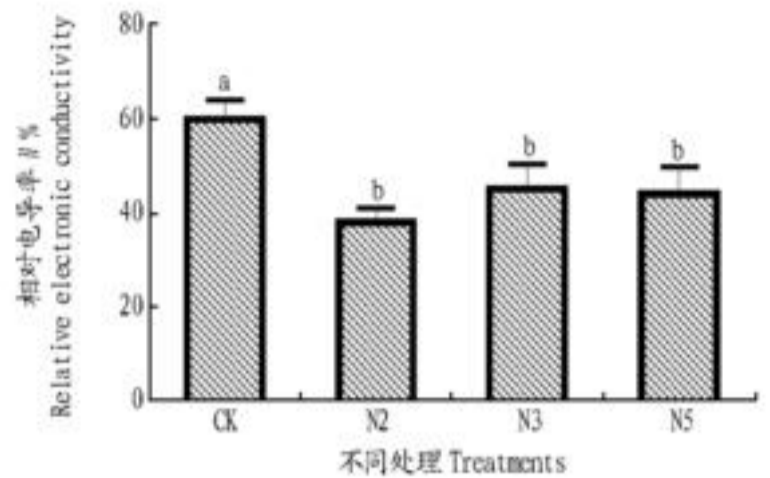


图3 转基因烟草在 300 mmol/L NaCl 处理下相对电导率的测定

Fig.3 Measurement of the relative electronic conductivity of transgenic tobacco under 300 mmol/L NaCl treatment

2.4 NaCl 处理对转基因烟草细胞渗透势的影响 土壤中盐分过多使土壤溶液水势下降, 导致植物吸水困难, 甚至体内水分外渗。植物在受到渗透胁迫时, 细胞内的渗透调节物质, 包括无机离子 K⁺、Na⁺ 浓度的改变以及一些可溶性有机大分子物质如可溶性糖和脯氨酸等含量的增加, 可以提高细胞液溶质浓度, 降低细胞渗透势, 增加细胞吸水能力。在受到盐胁迫时, 转基因烟草的细胞液溶质含量高于相应盐浓度处理下的野生型烟草(图4)。细胞液溶质含量越高, 细胞渗透势越低, 因此转基因烟草相对于野生型烟草更容易吸收和保存水分, 这种差别在高浓度盐处理(200、300 mmol/L)的条件下更为明显。

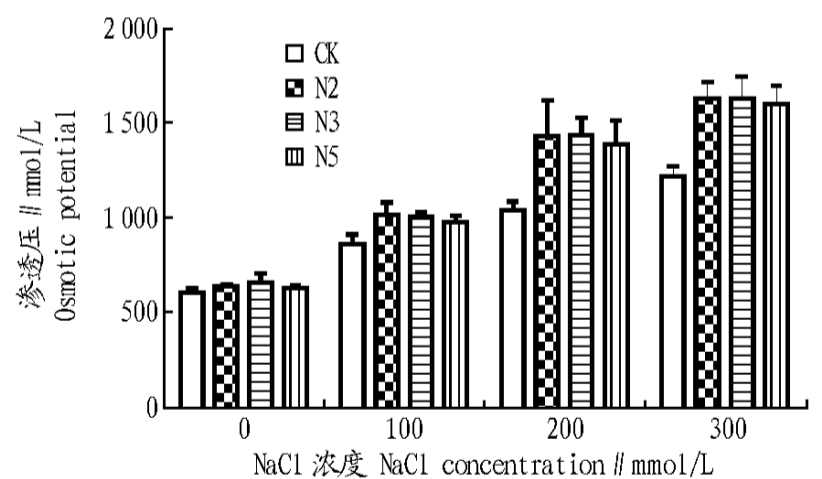


图4 转基因烟草渗透压测定

Fig.4 Measurement of osmotic pressure of transgenic tobacco

2.5 转基因烟草 K⁺/Na⁺ 的测定 植物在正常生长条件下, 细胞内保持相对较高的 K⁺/Na⁺ 比值, 但受到盐胁迫时, 高浓度 Na⁺ 抑制了植物对 K⁺ 的吸收, 使细胞内 K⁺/Na⁺ 离子比失衡, 从而引起一系列细胞内生理代谢紊乱。试验证明在盐胁迫下, 依然维持较高的细胞内 K⁺/Na⁺ 比值是植物耐盐的重要指标之一^[8]。笔者对不同盐浓度处理的转基因烟草的 K⁺、Na⁺ 含量进行了测定(图5)。由图5可知, 在盐胁迫条件下, 转基因和对照烟草根部与叶片的 K⁺/Na⁺ 均有降低, 但是转基因烟草的 K⁺/Na⁺ 比值明显高于野生型烟草, 表明 ANHX 在烟草中表达可以使细胞内维持相对较高的 K⁺/Na⁺ 比, 从而保证植株正常生长, 提高了植物的耐盐性。

(下转第7614页)

高达8 cm,叶鞘光滑,大部分长于节间;叶片长1.5~5.0 cm,宽1.0~1.5 mm,叶舌长0.5~1.0 mm;偶见有花序呈圆锥卵形,长2.0~3.5 cm。

2.3.5 西藏垂穗披碱草。疏丛型禾草,根系发达,纤维状。茎秆直立,株高已达30 cm,具3节,基部的节稍呈膝曲状;叶片扁平,长约6 cm,两面粗糙;花序为细长穗状,小穗排列稍偏于一侧,结果很少;根系以须根为主,多达25条以上,最长达18.5 cm,直径达3.5 mm,须根上还有丰富的毛根,具有较强的固土保水能力。

2.3.6 赖草。出苗不整齐,7月上旬出苗约70%以上。根茎横走及下伸,秆单生(少数丛生)、直立,高达15 cm,分3节,光滑无毛;叶鞘只在幼嫩时长有纤毛,叶片长5~10 cm,宽约2~4 cm,扁平或内卷,呈灰绿色,上面及边缘粗糙或具短柔毛,下面无毛或微粗糙,叶舌膜质,长约1.0~1.5 cm;未见有花序形成。

2.3.7 矮生蒿草。出苗不整齐,茎多数,成丛,褐色,高有10 cm,斜向上分枝,茎枝叶初密被灰白或淡灰黄色绢质柔毛,后毛变稀疏或脱落无毛;叶质稍厚,叶卵形或长卵形,长1.0~2.0 cm,宽0.5~1.5 cm,二回羽状全裂,每侧裂片3~4枚,小裂片线形或线状披针形;叶柄长0.5~1.5 cm,上部叶无柄;未形成花序。

3 结论与讨论

(1) 从原样种子的外观、种子净度、种子生活力指标来看,省科技厅提供的样品应该是采收不久的新种子,只有7号矮生蒿草生活力较低,这可能是由于采收种子有点早,或是品种的自然属性。

(2) 从出苗情况看,1号、4号出苗较整齐,其他几个品种相对较差,这可能与牧草种间差异和土地条件以及播种深度有一定关系。7个西藏抗风沙牧草在冀西北地区夏秋季节完全能生长发育,长势较好。当年开花结果的有西藏垂穗披碱草、波伐早熟禾、高原茅牧草3个品种。从当年生植株根系生长情况来看,西藏垂穗披碱草、高原茅根系较发达,且以侧根系为主,防风固沙能力较强。而从植株形态和环境美化来看,沙生地蔷薇、波伐早熟禾可作为城市绿化的品种。

(3) 试验期间,6~7月降水量很少,6月10~12日和7月下旬天气情况突变,气温下降到5℃以下,各种作物生长发育都受到较大影响,而这7个牧草表现出较好的抗旱性和耐低温性。

参考文献

- [1] 韩建国.实用牧草种子学[M].北京:中国农业出版社,1997.
- [2] 内蒙古农牧学院.牧草及饲料作物栽培学[M].北京:中国农业出版社,1981.

(上接第7565页)

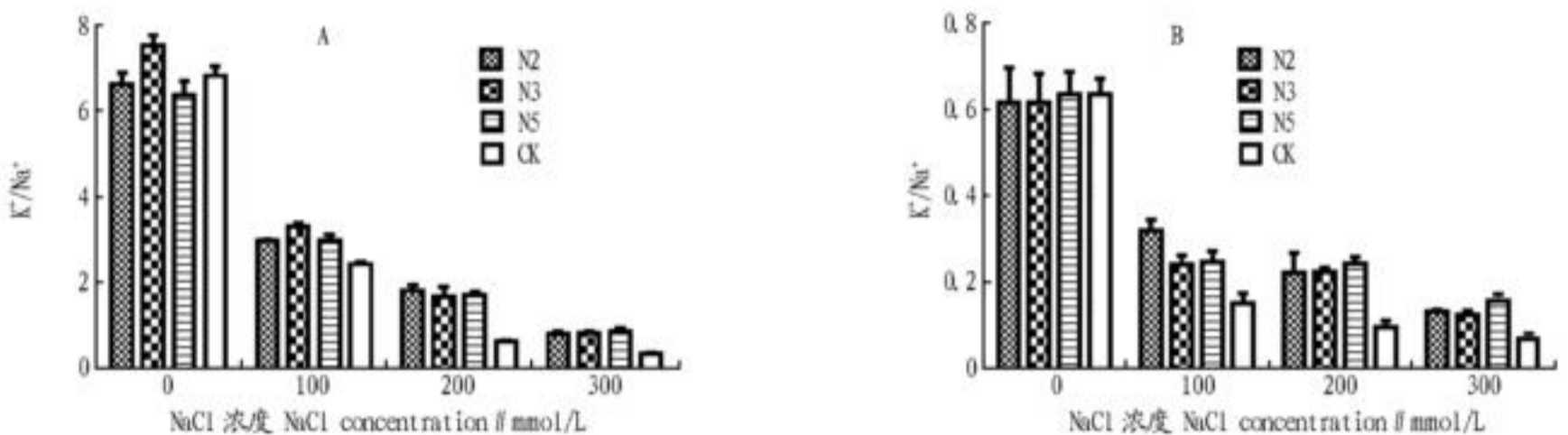


图5 NaCl对转基因烟草叶片(A)与根部(B)的 K^+/Na^+ 比的影响

Fig.5 Effects of NaCl on the K^+/Na^+ ratios in leaves (A) and roots (B) of transgenic plants

3 小结与讨论

獐茅是一种单子叶盐生植物,相对于很多双子叶盐生植物而言,它具有特殊的耐盐结构和机制。在以往的研究中,笔者从獐茅中分离了液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因ANHX,该基因在其推测的蛋白结构及基因转录表达中具有不同于一些单子叶甜土植物和双子叶盐生植物的特点^[9]。在该研究中,笔者对转化ANHX基因的烟草在盐胁迫下的生长状况和生理状态进行测定,试验结果表明:在不同浓度NaCl处理30 d后,转基因烟草的相对干重和细胞液渗透压均高于对照烟草;在300 mmol/L NaCl处理下,转基因烟草的相对电导率明显低于对照; K^+ 、 Na^+ 含量测定表明转基因烟草的根部和叶片均维持一个相对较高的 K^+/Na^+ 水平。各项生理指标的检测结果表明转ANHX基因烟草的耐盐性有了明显提高,由此可以证明ANHX是一个有效的耐盐基因。由于该基因来源于单子叶植物,如果应用于单子叶农作物基因工

程中,将更有利于基因的表达,因而具有良好的应用前景。

参考文献

- [1] 赵可夫.植物抗盐生理[M].北京:中国科学技术教育出版社,1993:222-223.
- [2] BLUMWALD E.Sodium transport and salt tolerance in plants[J].Curr Opin Cell Biol,2000,12:431-434.
- [3] HIDEKI N,TOMOKI H,IKUKO Y,et al.Improving salt tolerance in plant cells[J].Hort Biotech,2005,22:477-487.
- [4] 吕慧颖,李银心,孔凡江,等.植物 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白研究进展[J].植物学通报,2003,20(3):363-369.
- [5] RAJAGOPAL D,AGARWAL P,TYAGI W,et al.Pennisetum glaucum Na^+/H^+ antiporter confers high level of salinity tolerance in transgenic Brassica juncea[J].Mol Breeding,2007,19(2):137-151.
- [6] 赵可夫,李法曾.中国盐生植物[M].北京:科学出版社,1999:311.
- [7] BARHOUM Z,DJEBALI W,SMAOU A,et al.Contribution of $NaCl$ excretion to salt resistance of *Aeluropus litoralis*(Willd) Parl[J].J Hort Physiol,2007,164:842-850.
- [8] VISWANATHAN C,ANDREJ,ZHUJ K.Understanding and improving salt tolerance in plants[J].Gop Sci,2005,45:437-448.
- [9] ZHANG G H,SU Q,ANLJ,et al.Characterization and expression of a vacuolar Na^+/H^+ antiporter gene from the monocot halophyte *Aeluropus litoralis*[J].Hort Physiol Biochem,2008,46:117-126.