

大豆 *GmNHX1* 在百脉根中的过表达研究: 体内 Na^+ 含量的降低是耐盐性提高的基础

孙艳香 王丹 白艳玲 王宁宁 王勇*

(南开大学生命科学学院, 天津 300071; 天津市农业生物技术研究中心, 天津 300192; 廊坊师范学院生物系, 廊坊 060051. * 联系人, E-mail: wangyong@nankai.edu.cn)

摘要 从大豆中克隆到了液泡膜 Na^+/H^+ 反向转运蛋白编码基因(*GmNHX1*)的全长cDNA, 包括 5'端非翻译区 464 bp, 编码区 1641 bp, 3'端非翻译区 486 bp, 共 2591 bp. 该cDNA编码的*GmNHX1* 蛋白共 546 个氨基酸, 具有典型的液泡膜 Na^+/H^+ 反向转运蛋白特征, 与已知功能的液泡膜 Na^+/H^+ 反向转运蛋白 *AtNHX1*, *OsNHX1* 及 *AgNHX1* 具有较高的同源性. *GmNHX1* 在大豆基因组中为单拷贝基因, 其表达具有组织特异性, 并能受到 NaCl , KCl , LiCl , ABA 以及脱水等胁迫上调; 耐盐品种 *GmNHX1* 的转录水平在叶片中低于而在根系和下胚轴中均高于敏盐品种. 将 *GmNHX1* cDNA 置于两个串联的 CaMV35S 启动子控制下在豆科模式植物百脉根中过表达, 提高了转基因百脉根的耐盐性. Na^+ 及 K^+ 含量测定表明, 与对照相比, 过表达 *GmNHX1* 的百脉根小苗中 Na^+ , K^+ 含量显著降低, K^+/Na^+ 比率显著增加, 显示了百脉根中过表达 *GmNHX1* 所导致的耐盐性与减少转基因植物中 Na^+ 的积累有密切关系.

关键词 大豆 *GmNHX1* 百脉根转化 耐盐性

土壤盐渍化是抑制植物生长、降低作物产量的主要因子之一. 盐对于植物的毒害作用主要是由于水分亏缺导致的渗透胁迫以及过量的 Na^+ 对重要生化过程的毒害^[1,2]. 植物克服盐胁迫的机制是 Na^+ 的外排和液泡区室化^[3]. 质膜 Na^+/H^+ 反向转运蛋白利用质膜 H^+ -ATPase 产生的跨膜质子梯度将 Na^+ 排出细胞, 减少 Na^+ 向叶片中的长距离转运而保护光合组织免受盐的毒害^[4]. 液泡膜 Na^+/H^+ 反向转运蛋白则利用液泡膜质子泵 (H^+ -ATPase 和 H^+ -PPase) 产生的跨膜质子梯度将 Na^+ 区室化进入液泡, 不仅减轻了过多 Na^+ 的累积对细胞质的毒害, 而且可以利用 NaCl 作为溶质维持渗透势以驱动水分进入细胞^[3]. 因此, Na^+/H^+ 反向转运蛋白在植物耐盐性中发挥着重要作用. 过表达质膜 Na^+/H^+ 反向转运蛋白的蓝细菌 (*Synechococcus* sp.)^[5] 及拟南芥^[6,7] 和过表达液泡膜 Na^+/H^+ 反向转运蛋白的拟南芥^[2]、甜菜^[8]、番茄^[9]、水稻^[10,11] 以及小麦^[12] 均有效提高了转基因植物的耐盐性. 研究发现, 过表达质膜 Na^+/H^+ 反向转运蛋白能降低转基因植物体内 Na^+ 的含量^[6,7], 但对过表达液泡膜 Na^+/H^+ 反向转运蛋白的转基因植株进行 Na^+ 含量的测定结果不尽相同.

大豆为重要的经济作物. 盐胁迫不仅抑制大豆种子萌发与生长, 导致叶片失绿、白化或坏死, 也减少根瘤、降低生物产量甚至引起植物死亡^[13]. 尽管有

些研究认为盐胁迫对大豆的伤害主要是由于大豆体内 Cl^- 的过度累积所致^[13,14], 一些耐盐性强的品种具有较强的 Cl^- 外排能力, 但是 Na^+ 对大豆生长的抑制也有报道^[15,16], 大豆品种耐盐性的差异可能也取决于大豆根中 Na^+ 的排除能力和限制 Na^+ 向叶片运输的能力^[17~19]. 这些能力很可能与 Na^+/H^+ 反向转运蛋白有关. 但目前尚缺乏从分子生物学角度进行研究的证据. 为此, 本研究克隆了大豆液泡膜 Na^+/H^+ 反向转运蛋白 (*GmNHX1*) 的编码 cDNA, 对其在 NaCl , KCl , LiCl , ABA 及脱水胁迫下的表达进行了分析, 并且比较了耐盐性不同的品种在 *GmNHX1* 表达上存在的差别. 通过将此 cDNA 在豆科模式植物、优质牧草百脉根中进行表达, 表明过表达 *GmNHX1* 能提高百脉根的耐盐性, 并且发现在盐胁迫下转基因百脉根中 Na^+ 的累积远远低于对照植株.

1 材料与方法

() 材料. 大豆 (*Glycine max* (L). Merr.) 品种科丰 34 用于基因的克隆和表达分析. 抗盐品种为中黄 4 号、中黄 20 号; 敏盐品种为早熟 6 号和冀豆 12 号, 由中国农业科学院作物科学研究所邱丽娟博士惠赠. 用于转基因研究的百脉根品种为 Leo. 大肠杆菌转化的受体菌为 *E. coli* DH5a, 根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 为 EHA105. 克隆质粒载体为 pUCm-T.

植物转化的中间空载体 pGN 及表达载体 pGNG 均为本研究组构建。

() 植物材料的培养与处理. 在 Hoagland^[20] 水培溶液中进行大豆幼苗的培养. 13 d 苗龄的大豆幼苗分别转移到含有 100 mmol/L NaCl, 200 mmol/L KCl, 40 mmol/L LiCl 的新鲜 Hoagland 溶液中继续培养 24 h 后, 采集所需样品. 100 μmol/L ABA 喷洒于叶片, 10 h 后采集叶片作为样品. 取离体叶片放于室温下 0, 1, 2, 3 h 后收集叶片作为样品. 采集的样品于液氮中速冻后, 贮于 -70 °C 冰箱中用于后续分析.

() *GmNHX1* cDNA 的克隆和序列分析. 用异硫氰酸胍法提取总 RNA^[21]. 总 RNA 经 DNase (TaKaRa, Japan) 处理后取 1 μg 用于反转录合成 cDNA 第一链. 依据 GenBank 中大豆 EST 标签信息设计一对引物: 正向引物 N-UP (5'-GGAGGGTGTGTGAATGATGCTAC-3') 和反向引物 N-DP (5'-TCAAACCTACGCCACAAACGAT-3'), 并进行 RT-PCR. 纯化后的 PCR 产物克隆进 pUCm-T 载体, 测序后依据所得信息及 Clontech 公司的 SMART RACE cDNA Amplification Kit 说明进行 5'-RACE 和 3'-RACE. 全长序列信息获得后, 设计一对引物 NHX1S (5'-CTGTCTAGAGGTACCGACAAAATGGTTTTGAAATC-3') 和 NHX1AS (5'-TATTCTAGAGGATCCTCAACGCCATGTATGG-3'), 并获得可读框片段, 导入 pUCm-T 载体, 正反向测通后, 将全长序列信息提交 GenBank 注册. 序列分析采用 Blast 在线软件及 DNAMAN 软件包.

() Southern blot 和 Northern blot 分析. 通过 CTAB 法^[22] 提取大豆基因组 DNA. 10 μg 的基因组 DNA 分别经 *EcoR* 和 *Xho*, *BamH* 和 *Xho* 以及 *Xba* 和 *Kpn* 双酶切后用于 Southern blot 分析. 10 μg 的总 RNA 用于 Northern 杂交分析. ³²P 标记的 3'-UTR 片段为探针. 杂交分析依 Sambrook 等人^[23] 的方法进行.

() 植物表达载体的构建和工程菌的制备. 将经 *Kpn* 和 *BamH* 双酶切得到的 *GmNHX1* cDNA 完整表达可读框 (ORF) 连接到 pGN 经相同酶切获得的大片段上, 构建得到双元表达载体 pGNG. *GmNHX1* ORF 框由两个串联的 35S 启动子启动, 终止子序列包含着 CaMV Cabb B-D 的 PolyA 加尾信号^[24]. 卡那霉素抗性基因 (*NPTII*) 作为筛选标记基因. pGN 和 pGNG 分别经电转化转入根癌农杆菌品系 EHA105 中得到工程菌株, 用于百脉根的转化.

() 根癌农杆菌介导的百脉根的遗传转化. 取苗龄 5~6 d 的生长健壮的无菌苗子叶, 在工程菌液 ($A_{600} = 0.5$) 中侵染 30 min 后 25 °C 条件下暗培养 3 d, 然后移到筛选培养基上 (分化培养基 + 头孢霉素 (300 mg/L) + 卡那霉素 (50 mg/L)) 选择培养, 培养温度为 25 °C, 光照强度为 100 μmol·m⁻²·s⁻². 每 2 周换 1 次培养基. 2 个月后, 待转化芽长度达 2 cm 左右, 转入加有 50 mg/L 卡那霉素的生根培养基中生根培养.

() 卡那霉素抗性植株的 PCR 检测及杂交分析. 采用 CTAB 法提取百脉根基因组 DNA. 以上述 NHX1S 和 NHX1AS 引物进行 PCR 扩增. PCR 阳性株系的基因组 DNA 经 *EcoR* 酶切后, 以 *GmNHX1* ORF 框片段为探针, 按照 Sambrook 等人^[23] 的方法进行杂交以确定外源基因的拷贝数. 为了鉴定 *GmNHX1* cDNA 是否能正常转录, 参照 Chang 等人^[25] 的方法提取叶片总 RNA 进行 RT-PCR 分析.

() 转基因植株耐盐性测定. 在无菌条件下, 取生长状况一致的转基因苗的中部茎段作为外植体, 在含有 0, 100 mmol/L NaCl 的 MS 分化培养基上培养 3 周后, 对比观察转 *GmNHX1* 和转空载体的植株再生和生长状况. 将另外已生根的无菌苗转入水培溶液中继续培养 20 d 后, 取生长状况一致的苗, 分别转入含有 0, 200 mmol/L NaCl 的 0.5 × Hoagland 溶液的水培罐中进行水培处理, 对比分析两者间抗盐性的差异.

() 叶绿素荧光的测定. 利用 Handy PEA (Hansatech, UK) 非调制式荧光仪测定叶片的初始荧光 (F_0)、最大荧光 (F_m), 然后按公式 $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$ 计算出 PS II 的原初光化学效率. 每次测定前叶片均暗适应 10 min, 测定时的作用光强为 3000 μmol·m⁻²·s⁻².

() 转基因植株 Na⁺, K⁺ 含量的测定. 对转基因植株在水培条件下进行 0, 200 mmol/L NaCl 胁迫处理 3 d 后, 分别采集植株上部茎叶和下部根系, 80 °C 烘干, 灰化后用 1 mol/L HCl 浸提液浸提过夜, 采用原子分光光度计进行原子吸收分析. 以转空载体 pGN 的植株作为对照.

2 结果与分析

2.1 *GmNHX1* cDNA 的克隆和序列分析

依据 GenBank 中大豆 EST 标签信息以及利用 5'-RACE 和 3'-RACE 技术, 获得了一个全长为 2591 bp 的 cDNA 序列, 该 cDNA 包括 5' 端非翻译区 (5'-UTR

区) 464 bp, 可读框 1641 bp 以及 3' 端非翻译区 (3'-UTR 区) 486 bp. ORF 框编码 546 个氨基酸, 推测的分子量为 60 kD, pI 为 6.85. 利用 TMpred 程序进行预测, 该 cDNA 产物有 12 个跨膜区段, N 端较短, 亲水性的 C 端较长 (图 1), 与植物中已知功能的液泡膜 Na^+/H^+ 反向转运蛋白具有较高的同源性 (图 2): 与拟南芥 *AtNHX1* [26], 水稻 *OsNHX1* [27] 和盐生植物北滨藜 (*Atriplex gmelini*) *AgNHX1* [28] 的同源性分别为 75.8%, 75.3% 和 78%, 而与植物中质膜 Na^+/H^+ 反向转运蛋白 [29] 的同源性较低. 因此, 将该基因命名为 *GmNHX1* (GenBank 登录号: AY392759). *GmNHX1* 具有高度保守的氨基吡嗪咪结合位点 LFFIYLLPPI, 氨基吡嗪咪为真核生物 Na^+/H^+ 反向转运蛋白的竞争性抑制剂 [30,31]. 此外, 在 *GmNHX1* 中还存在两个糖基化位点 (Asn-50 和 -293), 暗示着 *GmNHX1* 为一糖基化蛋白.

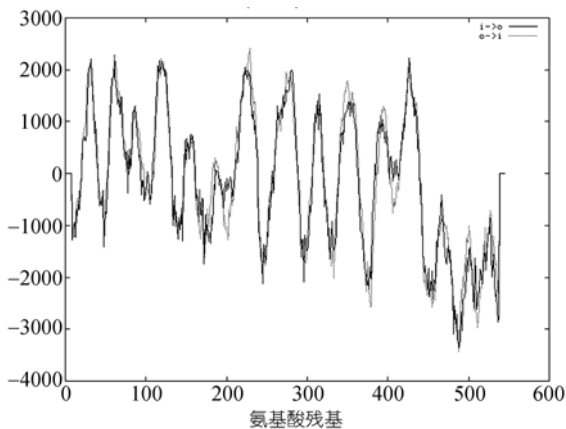


图 1 *GmNHX1* 的跨膜区分析

2.2 *GmNHX1* 的 Southern blot 分析

为了确定 *GmNHX1* 基因在大豆基因组中的拷贝数, 本研究以 *GmNHX1* 3'-UTR 区长 410 bp 的片段为探针, 进行 Southern 杂交分析. 结果 (图 3) 显示, 该基因在大豆基因组中只有一个拷贝.

2.3 *GmNHX1* 的 Northern 杂交分析

() 盐胁迫条件下 *GmNHX1* 在不同组织中的表达. 根、下胚轴、子叶和上胚轴采自对照和经 100 mmol/L NaCl 处理 24 h 后的 13 d 苗龄大豆, 第一真叶、第一和第二复叶采自经相同处理的 23 d 苗龄的大豆. 提取采集样本的总 RNA 进行 Northern 杂交分析. 结果 (图 4(a)) 表明, 在非盐处理条件下, 除下胚轴和上胚轴外, *GmNHX1* 的表达水平均较低, 而盐胁迫

提高了所有检测组织中 *GmNHX1* 的表达水平.

() ABA, LiCl, KCl 以及脱水胁迫对 *GmNHX1* 表达的诱导. 取经过 100 $\mu\text{mol/L}$ ABA, 40 mmol/L LiCl 和 200 mmol/L KCl 以及脱水胁迫后的叶片, 提取总 RNA, 通过 Northern 杂交进行 *GmNHX1* 转录水平的表达分析. ABA, LiCl 和 KCl 处理都能诱导叶片中 *GmNHX1* 基因的转录 (图 4(b)). 3 h 脱水处理后显著地提高了 *GmNHX1* 基因的转录水平 (图 4(c)).

() 盐胁迫条件下不同的耐盐品种中 *GmNHX1* 的表达. 选取大豆耐盐品种和敏盐品种各 2 个, 其 13 d 苗龄的幼苗经 100 mmol/L NaCl 处理 24 h 后, 分别提取根、下胚轴及叶片的总 RNA 进行 Northern 杂交分析, 以检测 *GmNHX1* 在不同耐盐性品种中的差别. 结果如图 5 所示, 无论是敏盐品种还是耐盐品种, 盐胁迫条件下均可检测到 *GmNHX1* 的转录, 但转录水平存在差别: 在根系和下胚轴中耐盐品种的 *GmNHX1* 的转录水平均高于敏盐品种, 而在叶片中耐盐品种的 *GmNHX1* 的转录水平则低于敏盐品种.

2.4 *GmNHX1* 在百脉根中的过表达

将 *GmNHX1* cDNA 的编码区置于两个串联的 CaMV35S 启动子调控下转化百脉根, 经多次卡那霉素抗性筛选, 得到抗性株系 16 个. 提取基因组 DNA 进行 PCR 检测, 检测结果证明全部为转基因植株 (图略). 以 *GmNHX1* 基因 ORF 框片段为探针, 以空载体 pGN 转化得到的转基因植株 (只有卡那霉素抗性基因) 为对照, 对转基因植株进行 Southern 杂交分析以进一步确定其在转基因植株中的拷贝数, 并通过 RT-PCR 方法检测 *GmNHX1* 基因在转基因株系中是否转录. 结果 (选取 1 个对照和 2 个 *GmNHX1* 过表达的株系 D12, D15 作为代表, 图 6(a) 和 (b)) 显示, 对照植株, Southern 杂交未出现信号, RT-PCR 分析未出现扩增产物; 转 *GmNHX1* 植株中出现清晰的 Southern 杂交信号, D12 为 1 条, D15 为 2 条, 而且 RT-PCR 分析均出现了与 pGNG 质粒正对照大小相同的扩增产物, 表明大豆 *GmNHX1* 已整合进入了百脉根基因组中, D12 为 1 个拷贝, D15 为 2 个拷贝, 并且可进行正常转录.

2.5 过表达 *GmNHX1* 的百脉根的耐盐性检测

将对照和转 *GmNHX1* 的株系 D12 和 D15 的茎段分别转入含有 0 和 100 mmol/L NaCl 的 MS 分化培养基中, 3 周内观察生长情况并拍照. 在无盐的分化培养基中, 对照和 *GmNHX1* 转基因株系的生长无显著

```

GmNHX1      MGFEISTVVS-KLQTLSTSDHASVVMNLFVALLCGCIVLGHLEENRWMNESITALLIG 59
AtNHX1      ---MLDSLVS-KLPSLSTSDHASVVALNLFVALLCACIVLGHLEENRWMNESITALLIG 56
OsNHX1      --MGMEVAAARLALYTTSDYASVVSINLFVALLCACIVLGHLEENRWMNESITALIIG 58
AgNHX1      MWSQLSLLSGKMDALTTSDHASVVMNLFVALLCGCIVIGHLEENRWMNESITALLIG 60
      :.  :      :***:***:;*****. ***:*****:*****:**
GmNHX1      VCTGIVILLFSGGKSSHILVFEDELFFIYLLPPIFNAGFQVKKKQFFVNFMTIMLFGAI 119
AtNHX1      LGTGVTILLISKGSSHLLVFEDELFFIYLLPPIFNAGFQVKKKQFFRNFVITIMLFGAV 116
OsNHX1      LCTGVVILLMTKGKSSHLVFEDELFFIYLLPPIFNAGFQVKKKQFFRNFMTITLFGAV 118
AgNHX1      LATGVVILLSGGKSSHLLVFEDELFFIYLLPPIFNAGFQVKKKQFFRNFITIVLFGAV 120
      : **:.***:; *****:*****:*****: ***** **:** *****:
GmNHX1      GTLISCTIITLGATQIFKRLDVGPLELGDFLAIGAIFAATDSVCTLQVLNQDETPLLYSL 179
AtNHX1      GTIISCTIISLGVTFQFKKLDIGTDLGDLAIGAIFAATDSVCTLQVLNQDETPLLYSL 176
OsNHX1      GTMISFFTISIAAIAIFSRMNIIGTLDVGDFLAIGAIFSATDSVCTLQVLNQDETPFLYSL 178
AgNHX1      GTLVSFTIISLGALSIFKKLDIGTLELADYLAIGAIFAATDSVCTLQVLNQDETPLLYSL 180
      **:;*   *:. . .  :*. . .:*. . .:*. . .:*****:*****:*****: *****
GmNHX1      VFGEGVNDATSVVLFNAIQSFDLNQIDPSIAGHFLGNFLYLFIASMLGVLTGLLSAYI 239
AtNHX1      VFGEGVNDATSVVVFNAIQSFDLTHLNHEAAPHLLGNFLYFLSTLLGAATGLISAYV 236
OsNHX1      VFGEGVNDATSVVLFNALQNFDLVHIDAAVLKFLGNFFYFLSSTFLGVFAGLLSAYI 238
AgNHX1      VFGEGVNDATSVVLFNAIQSFDLTRIDHRIALQFMGNFLYLFIASMLGAFTGLLSAYI 240
      *****:***:* ** * . . . :*:***:***: **:**. **:* **:* **:*
GmNHX1      IKKLYIGRHSTREVALMMLMAYLSYMLAELSYLGSILTVFFCGIVMSHYTWHNVTSSR 299
AtNHX1      IKKLYFGRHSTREVALMMLMAYLSYMLAELFDLSGILTVFFCGIVMSHYTWHNVTSSR 296
OsNHX1      IKKLYIGRHSTREVALMMLMAYLSYMLAELDLGILTVFFCGIVMSHYTWHNVTSSR 298
AgNHX1      IKKLYFGRHSTREVALMMLMAYLSYMLAELFYLSGILTVFFCGIVMSHYTWHNVTSSR 300
      *****:*****:*****:***** *****:*****:*****:*****
GmNHX1      ITTKHSFATLSFVAEIFIFLYVGMMDALDIEKWKFPVSDSPGTSVATSSVLLGLLGRAAF 359
AtNHX1      ITTKHTFATLSFLAETFIFLYVGMMDALDIDKWRVSDTPGTSIAVSSILMGLVMVGRAAF 356
OsNHX1      VTTKHAFATLSFIAETFIFLYVGMMDALDIEKWEFASDRPGKSIGISSILLGLVLIGRAAF 358
AgNHX1      VTTKHAFATLSFVAEVFLFLYVGMMDALDIEKWRVSDSPGISVAVSSILLGLVMVGRAAF 360
      :****:*****:** *:*****:***. . ** * * . **:*:***:*****
GmNHX1      VFPLSFLSNLAKKSPNEKISFRQQV I IWWAGLMRGAVSIALAYNQFTMSGHTSLRSNAIM 419
AtNHX1      VFPLSFLSNLAKKNQSEKINFNMQVVIWWSGLMRGAVSMALAYNKFTRAGHTDVRGNAIM 416
OsNHX1      VFPLSFLSNLTKKAPNEKITWRQQV I IWWAGLMRGAVSIALAYNKFTRSGHTQLHGNAIM 418
AgNHX1      VFPLSFLSNLTKKAPNEKITWRQQV I IWWAGLMRGAVSMALAYNKFTRSGHTQLRGNNAIM 420
      *****:* *:. ** . **:. . *:.***:*****:*****:***:* **:. **:*
GmNHX1      ITSTITVFLFSTVVFGLLTKPLIRLLPHTPHHKESSITITDPSLTKSVTIPLLGSA 479
AtNHX1      ITSTITVCLFSTVVFGLLTKPLISYLLP----HQNATTSMLSDDNTP--KSIHIPLD-- 468
OsNHX1      ITSTITVFLFSTVMVFGMMTKPLIRLLP-----ASGHPVTSEPPSP--KSLHSPLLTSM 470
AgNHX1      ITSTISVFLFSTMVFGLLTKPLIMFLLPQP--KHFTSCSTVSDVGSPP--KSYSLPLLEG 476
      *****:* *****:***:***** ** * : . . :.* ** **
GmNHX1      QESEVDIDG-----HDIHRPSSIRALLTPTHTVHRLWRKFDADFMRPVFGRGTV 530
AtNHX1      QDSFIEPSGN-----HNVPRPDSIRGFLTRPRTVHYYWRQFDDSFMRPVFGRGTV 520
OsNHX1      QGSDESTTN-----IVRPSSRLMLLTKPTHTVHYYWRKFDALMRPMPFGRGTV 520
AgNHX1      QDYEVVVGNGNHEDTTEPTIVRPSSRLMLLNAPHTVHYYWRKFDDSFMRPVFGRGTV 536
      *  :      : **:* * * . **:* **:* **:* **:* **:* **:*
GmNHX1      PVEPGSPTERNGHQWR--- 546
AtNHX1      PFVPGSPTERNPPDLKA- 538
OsNHX1      PFSPTSPTESQSHGGR---- 535
AgNHX1      PFVPGSPTESQSTNNLVDR 555
      * .*****.
    
```

图 2 *GmNHX1* 推测的氨基酸序列与已知功能的液泡膜 Na⁺/H⁺ 反向转运蛋白序列的同源性比对
阴影部位为氨基吡嗪结合位点; 方框部位为推测的糖基化位点

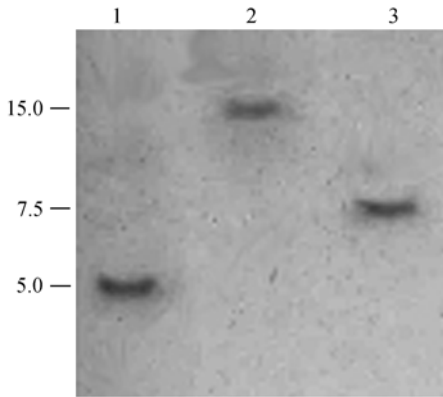


图3 *GmNHX1* 的 Southern 杂交分析

1, *EcoR* 和 *Xho* 双酶切; 2, *BamH* 和 *Xho* 双酶切; 3, *Xba* 和 *Kpn* 双酶切. 探针为³²P标记的*GmNHX1* 3'-UTR片段. 10 μg 基因组DNA用于杂交分析

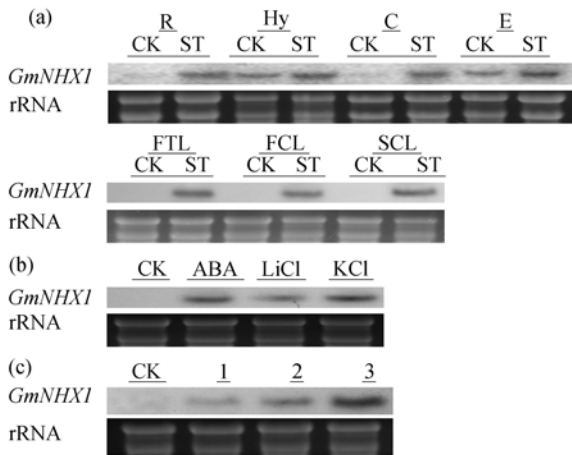


图4 *GmNHX1* mRNA 水平的 Northern 检测

(a) 在正常生长条件下(CK)和 100 mmol/L NaCl 盐胁迫条件下(ST)表达的 组织特异性分析; (b) 在 100 μmol/L ABA, 40 mmol/L LiCl 和 200 mmol/L KCl 处理条件下; (c) 在脱水处理条件下. R 示根系; Hy 示下胚轴; C 示子叶; E 示上胚轴; FTL 示第一真叶; FCL 示第一复叶; SCL 示第二复叶; 1~3 分别示脱水处理 1, 2 和 3 h

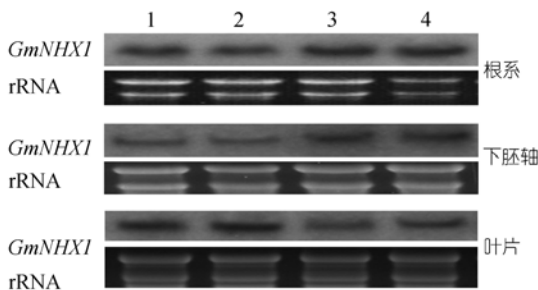


图5 盐胁迫条件下 *GmNHX1* 在耐盐性不同的大豆品种中的表达

1 和 2 分别为敏盐大豆品种冀豆 12 和早熟 6 号; 3 和 4 分别为耐盐大豆品种中黄 4 号和中黄 20 号

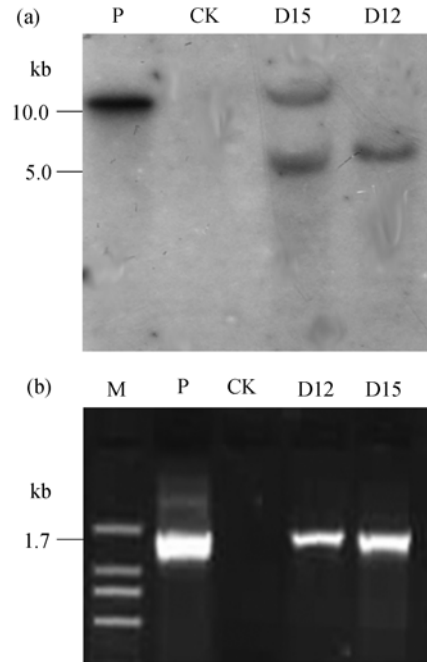


图6 转 *GmNHX1* 百脉根的 Southern blotting(A)和 RT-PCR(B)分析

P 示 pNGG 质粒正对照; CK 示转入空载体的对照百脉根植株; D12 和 D15 为过表达 *GmNHX1* 的百脉根株系; M 为 DL2000 DNA Marker

差别(图略). 在含 100 mmol/L NaCl 的 MS 分化培养基中, 对照外植体基部褐化, 未出现新的再生苗; *GmNHX1* 转基因株系 D12 和 D15 均能进行不定芽的再生(图 7(a)), 再生的生长量分别为对照的 2.9 和 3.4 倍(图 7(b)).

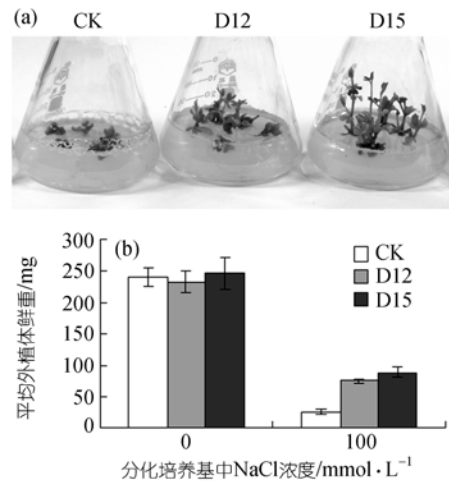


图7 在 100 mmol/L NaCl 的分化培养基中生长 3 周的对照和过表达 *GmNHX1* 的百脉根植株(a)及其再生生长量(b)比较

CK 为转空载体的对照; D12 和 D15 为过表达 *GmNHX1* 的百脉根

将对照和 *GmNHX1* 转基因株系分别转入含有 0 和 200 mmol/L NaCl 的水培溶液中, 进行耐盐性鉴定. 转入 200 mmol/L NaCl 的水培溶液中第 3 天, 对照植株部分叶片开始失水萎蔫, 第 4 天时部分植株茎叶部位完全失水干枯(图 8(a)), 第 5 天时几乎全部死亡(上部茎叶完全干枯); 此时转基因百脉根生长未受到严重影响, 2~3 d 以后才出现失水现象. 统计分析了处理 4 d 时植株(每处理 30 株, 重复 3 次)的鲜重(图 8(b)), 可以发现对照植株的鲜重显著($P < 0.05$)低于转基因植株 D12 和 D15.

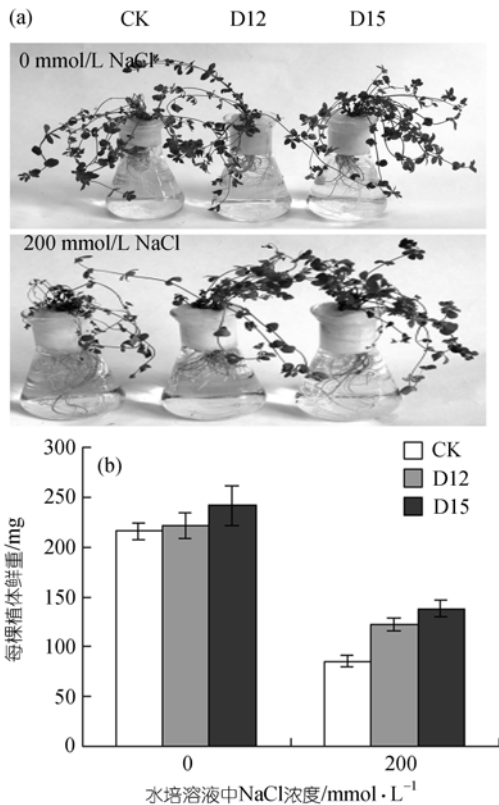


图 8 在 200 mmol/L NaCl 的水培溶液中生长 4 d 的对照 (CK) 和过表达 *GmNHX1* 的百脉根植株 (D12 和 D15) 及其生长的比较

(a) 处理 4 d 时的照片; (b) 处理 4 d 时的鲜重

对上述处理过程中植株的原初光化学效率也进行了测定. 结果显示(图 9), 盐胁迫条件下, 过表达 *GmNHX1* cDNA 的转基因百脉根和对照植株的光化学效率呈下降趋势. 盐处理 2 d 后, 对照植株的量子产量急剧下降, 过表达 *GmNHX1* 的转基因植株的量子产量则下降较缓慢. 上述结果暗示着在盐胁迫条件下过表达 *GmNHX1* 的转基因植株可能比对照植株

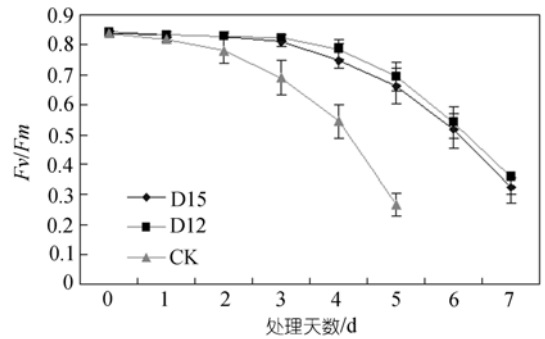


图 9 转空载体对照(CK)和过表达 *GmNHX1* 的百脉根植株 (D12 和 D15)

在 200 mmol/L NaCl 胁迫条件下原初光化学效率的变化

具有较强的光吸收能力和光合作用能力.

2.6 NaCl胁迫条件下转基因百脉根植株中的Na⁺, K⁺含量

对转基因百脉根进行 200 mmol/L NaCl 处理 3 d 后, 分别取根系和上部茎叶进行Na⁺, K⁺含量的测定, 结果(图 10)显示, 过表达*GmNHX1* 的转基因株系D12 和D15 中, Na⁺, K⁺含量均显著低于对照植株($n = 3$, $P < 0.05$), 同时K⁺/Na⁺比率也显著高于对照植株. 在根系中, 与对照相比, D12 和D15 的Na⁺含量分别降低了 63%和 54%, K⁺含量分别下降了 37%和 22%, K⁺/Na⁺比率分别提高了 72%和 71%; 在茎叶中, 与对照相比, D12 和D15 的Na⁺含量分别降低了 51%和 49%, K⁺含量分别下降了 12%和 13%, K⁺/Na⁺比率分别提高了 82%和 79%.

3 讨论

大豆是具有重要经济价值的豆科作物, 盐胁迫是造成其产量下降的重要环境因子之一. Na⁺/H⁺反向转运蛋白基因是目前世界植物耐盐性研究领域中最热门的基因, 以拟南芥SOS1, AtNHX1 和水稻OsNHX1 为代表, Na⁺/H⁺反向转运蛋白在植物耐盐生理中的功能已通过酵母互补实验、反义遗传学以及过表达研究等多种途径被逐渐揭示. 为了探讨Na⁺/H⁺反向转运蛋白基因在大豆耐盐性中的作用, 本研究从大豆中克隆了一个Na⁺/H⁺反向转运蛋白编码基因的cDNA, 命名为*GmNHX1* (GenBank登录号: AY392759), 其编码序列具有 12 个跨膜区(图 1)、氨基吡嗪咪结合位点LFFIYLLPPI以及糖基化位点(图 2), 与已知功能的Na⁺/H⁺反向转运蛋白特点相符; *GmNHX1* 与已知功能液泡膜Na⁺/H⁺反向转运蛋白

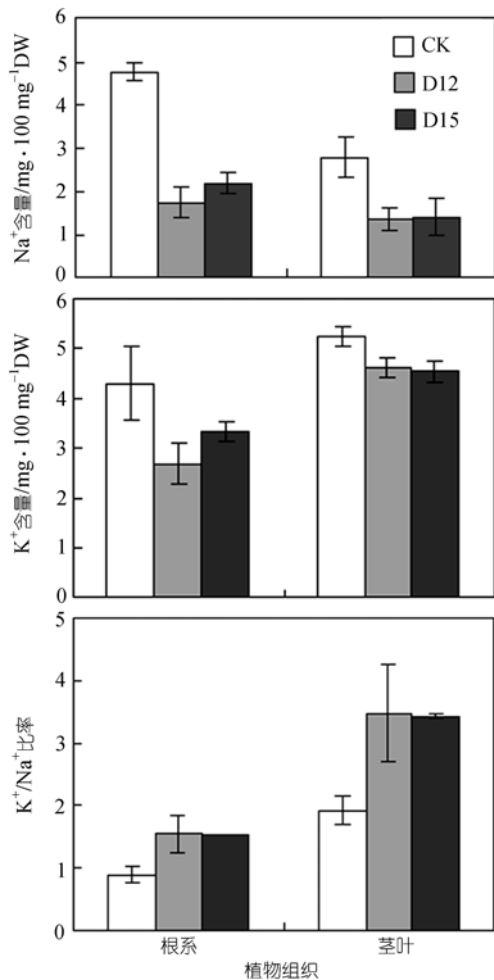


图 10 200 mmol/L NaCl处理 3 d后对照和过表达*GmNHX1*的转基因植株中Na⁺, K⁺含量以及K⁺/Na⁺的比较

AtNHX1, *OsNHX1* 及 *AgNHX1* 都具有较高的同源性 (图 2), 因此 *GmNHX1* 属于液泡膜Na⁺/H⁺反向转运蛋白基因家族。

对目前已鉴定的液泡膜Na⁺/H⁺反向转运蛋白的表达模式进行分析表明, 在正常生长情况下, 该类基因在不同的植物中的表达存在差别: 在拟南芥中, Northern杂交分析显示 *AtNHX1* 在不同的组织中均有表达^[32]; 在日本的Morning Glory (*Ipomoea tricolor*) 中, 利用InNHX1 特异抗体进行免疫学分析证明InNHX1 表达具有组织特异性^[33]。本研究对 *GmNHX1* 基因的Northern杂交分析表明, 在正常生长情况下, *GmNHX1* 的表达具有组织特异性: 叶片、根和子叶中的转录水平非常低, 而在上胚轴和下胚轴中则存在适度的表达(图 4(a))。该结果可能与所用样品中, 上胚轴和下胚轴正在迅速伸长有关。在成熟的细胞中,

中央液泡占细胞体积的 80%以上, 因此, 上胚轴和下胚轴的迅速延伸和生长必然伴随着液泡的膨大。为了维持正在扩大的液泡中的高渗透势, 液泡必然积极吸收溶质分子如糖和无机离子^[34], 该过程可能上调 *GmNHX1* 的表达。Nakanishi和Maeshima^[34]研究认为, V-H⁺-PPase和V-H⁺-ATPase A亚基基因在绿豆 (*Vigna radiata*)正在生长的下胚轴中具有较高的转录水平, 而在成熟组织中转录水平非常低。液泡膜Na⁺/H⁺反向转运蛋白依赖液泡膜质子泵V-H⁺-PPase和V-H⁺-ATPase提供的质子电化学梯度执行其功能, 因此这些分析暗示 *GmNHX1* 和液泡膜质子泵基因的表达在液泡伸长过程中具有重要作用。

NaCl, KCl, LiCl以及ABA处理可上调 *AtNHX1*, *OsNHX1* 以及 *GhNHX1* 的转录水平^[32,11,35]。本文的研究结果(图 4(b))与已报道的结果一致。此外, 对拟南芥 *AtNHX1* 的表达模式分析还显示 30 min的脱水处理未提高其转录水平^[32], 但对 *AtNHX1* 和 *AtNHX2* 的启动子进行分析发现其启动子上游区存在着与 *RD22* 基因相似的MYC/MYB相互作用元件(MYC/MYB-interaction elements)的一致模序AACNG/CACGTG (the consensus AACNG/CACGTG motifs)^[36]。已知 *RD22* 基因是脱水和ABA诱导表达的^[36]。本研究中 13 d苗龄的大豆叶片在室温下脱水处理 1 h后, 检测到 *GmNHX1* 微弱表达, 2~3 h时表达量提高(图 4(c)), 暗示着脱水诱导该基因的表达可能需要较长时间的信号传导过程。

盐胁迫条件下, Na⁺和Cl⁻均可造成对大豆的毒害。有些耐盐大豆具有Cl⁻排除机制^[37], 而有些大豆品种耐盐性的差别则取决于大豆根系对Na⁺的排除能力和限制Na⁺向地上部和叶片运输的能力^[17-19]。罗庆云等人^[38]对耐盐性不同的大豆品种进行苗期耐盐性指标鉴定时发现, 在高、中盐胁迫强度下, 耐盐性较强的品种(系)茎和叶片中的Na⁺含量都低于敏盐品种。本文对耐盐性不同的大豆品种进行 *GmNHX1* 基因转录水平的分析结果, 似乎可以解释上述现象。与敏盐品种相比, 在耐盐性较强的大豆品种中, 其根系和下胚轴具有较高的 *GmNHX1* 基因转录水平, 而叶片中的转录水平较低(图 5)。可能是由于耐盐性品种中根系和下胚轴具有较强的将Na⁺区室化进入液泡的能力, 因而对根系吸收的Na⁺起到了截留作用, 阻止了更多的Na⁺向叶片中的累积, 进而造成叶片中Na⁺含量较低, *GmNHX1* 基因转录水平较低。敏盐品种的根部和下

胚轴中 *GmNHX1* 的表达较弱, 区室化进入液泡的 Na^+ 较少, 而更多的 Na^+ 通过木质部液流向叶片中运输, 造成叶片中 Na^+ 的累积而上调 *GmNHX1* 的表达. 上述分析暗示着 *GmNHX1* 在大豆不同组织中的表达差异与大豆的耐盐性相关, 另外也暗示着其产物在大豆中可能参与 Na^+ 长距离转运的调节.

将克隆得到的 *GmNHX1* 基因 cDNA 在豆科模式植物百脉根中进行过表达研究, 进一步揭示了 *GmNHX1* 基因在植物耐盐性中的作用. 与对照相比, 过表达 *GmNHX1* 基因的百脉根在盐胁迫条件下具有较强的再生能力(图 7)、较长的存活时间(图 8)和较好的光合作用能力(图 9), 结果再次证实了过表达液泡膜 Na^+/H^+ 反向转运蛋白对提高植物的抗盐性是非常有效的. 令人感兴趣的是, 对过表达 *GmNHX1* 的百脉根株系进行盐胁迫条件下的 Na^+ , K^+ 含量测定显示, 无论是在根中还是在茎叶中, 过表达 *GmNHX1* 的转基因百脉根均具有较低的 Na^+ , K^+ 含量(图 10). 到目前为止, 已有多种过表达 *GmNHX1* 同源基因的植物被报道^[2,8-12,39]. 一般认为, 这些液泡膜 Na^+/H^+ 反向转运蛋白的过表达, 提高了 Na^+ 区室化进入液泡的能力, 减少了 Na^+ 在细胞质中过多累积所引起的毒害并有利于细胞对周围水分的吸收, 从而提高了转基因植物的耐盐性. 但对过表达液泡膜 Na^+/H^+ 反向转运蛋白的转基因植株进行 Na^+ 含量的测定结果不尽相同. 在过表达 *AtNHX1* 的拟南芥^[2]和甜菜^[8]中, 转基因植株的被测组织中具有较高的 Na^+ 含量; Ohta 等人^[10]对耐盐性提高的过表达 *AgNHX1* 的水稻在 300 mmol/L NaCl 水培处理 3 d 后进行叶片中 Na^+ 含量测定未发现其与野生型对照间存在差别, 因而提出可能 Na^+ 向成熟组织的区室化可以保护幼嫩组织免受盐的危害从而提高植株的抗盐性; 但在过表达 *OsNHX1* 的转基因水稻的研究中, Na^+ 在组织培养状态的细胞中含量高于对照, 而在植株的叶片中则与对照无显著差异^[11]; 过表达 *AtNHX1* 的小麦在经 100 或 150 mmol/L NaCl 处理 30 d 后其 Na^+ 含量在根系中与野生型对照相近而在叶片中则比对照显著降低^[12].

在本研究中, 在百脉根中过表达的 *GmNHX1*, 可能加强了 Na^+ 区室化的同时, 减少了 Na^+ 的吸收或增加了 Na^+ 的外排, 从而造成整个植株中 Na^+ 含量的降低. 因此, 百脉根中 *GmNHX1* 的过表达可能涉及到对质膜上参与 Na^+ 转运的某个(些)组分的调控. 在拟南芥中, Na^+ 的吸收是由质膜上低亲和性的转运蛋白

HKT1 及其他非选择性离子通道控制; 而 Na^+ 的外排则由质膜 Na^+/H^+ 反向转运蛋白 SOS1 控制, SOS1 的活性又受到 SOS2 和 SOS3 蛋白复合体的调控^[40]. 研究显示, 作为一种蛋白激酶 SOS2 在参与调控 SOS1 活性的同时, 也正向调控 *AtNHX1* 和负向调控 HKT1 的活性^[40]. 此外, 质膜 Na^+/H^+ 反向转运蛋白 SOS1 和液泡膜 Na^+/H^+ 反向转运蛋白 *AtNHX1* 功能的完成分别需要质膜 H^+ -ATPase 和液泡膜 H^+ -ATPase、 H^+ -PPase 提供跨膜质子梯度以驱动 Na^+ 的外排和区室化. Li 等人^[41]最近报道, 液泡膜 H^+ -PPase (AVP1) 在拟南芥中的过表达不仅提高了液泡膜 H^+ -PPase 的活性也提高了质膜 H^+ -ATPase 的活性. 在本实验室所作的另一项工作中, 过表达 AVP1 基因提高了百脉根的耐盐性同时也降低了其叶片和根系中 Na^+ 的含量(数据未发表). 因此, 百脉根中 Na^+ 的区室化和外排可能存在一定的相关性, 而植物细胞对于细胞质中 Na^+ 浓度的调节则是一个相当复杂的过程, 值得深入研究和进一步阐明.

本文对克隆得到的大豆液泡膜 Na^+/H^+ 反向转运蛋白基因 *GmNHX1* 的表达分析及在异源植物百脉根中的过表达分析对理解大豆的耐盐机理和通过基因工程手段提高豆科植物的耐盐性具有重要价值.

致谢 感谢南开大学生命科学学院杨红梅同学对本研究工作给予的帮助. 本工作受天津市科委项目(批准号: 043123711)和天津市农业生物技术研究中心项目(批准号: 002122011-6)资助.

参 考 文 献

- 1 Wyn Jones R G. Salt tolerance. In: Johnson C B, ed. *Physiological Processes Limiting Plant Productivity*. London: Butterworths, 1981. 271–292
- 2 Apse M P, Aharon G S, Snedden W A, et al. Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na^+/H^+ antiporter in *Arabidopsis*. *Science*, 1998, 285: 256–1258
- 3 Blumwald E, Aharon G S, Apse M P, Sodium transport in plant cells. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1465: 140–151
- 4 Shi H Z, Quintero F J, Pardo J M, et al. The putative plasma membrane Na^+/H^+ antiporter SOS1 controls long-distance Na^+ transport in plants. *Plant Cell*, 2002, 14: 465–477 [DOI]
- 5 Waditee R, Hibino T, Tanaka Y, et al. Overexpression of a Na^+/H^+ antiporter confers salt tolerance on a freshwater cyanobacterium, making it capable of growth in sea water. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 4109–4114 [DOI]
- 6 Gao X, Ren Z, Zhao Y, et al. Overexpression of SOD2 increases salt tolerance of *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2003, 133: 1873–1881 [DOI]
- 7 Shi H Z, Lee B H, Wu S J, et al. Overexpression of a plasma membrane Na^+/H^+ antiporter gene improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Biotechnol*, 2002, 21: 81–85 [DOI]

- 8 Zhang H X, Hodson J N, Williams J P, et al. Engineering salt-tolerant *Brassica* plants: Characterization of yield and seed oil quality in transgenic plants with increased vacuolar sodium accumulation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 12832—12836[DOI]
- 9 Zhang H X, Blumwald E. Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. *Nat Biotechnol*, 2001, 19: 765—768[DOI]
- 10 Ohta M, Hayashi Y, Nakashima A, et al. Introduction of a Na^+/H^+ antiporter gene from *Atriplex gmelini* confers salt tolerance to rice. *FEBS Lett*, 2002, 532: 279—282[DOI]
- 11 Fukuda A, Nakamura A, Tagiri A, et al. Function, intracellular localization and the importance in salt tolerance of a vacuolar Na^+/H^+ antiporter from rice. *Plant Cell Physiol*, 2004, 45: 146—159[DOI]
- 12 Xue Z Y, Zhi D Y, Xue G P, et al. Enhanced salt tolerance of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) expressing a vacuolar Na^+/H^+ antiporter gene with improved grain yields in saline soils in the field and a reduced level of leaf Na^+ . *Plant Sci*, 2004, 167: 859—899
- 13 Lee G J, Carter T E J, Villagarcia M R, et al. A major QTL conditioning salt tolerance in S-100 soybean and descendent cultivars. *Theor Appl Genet*, 2004, 109: 1610—1619[DOI]
- 14 Yang J, Blanchard R W. Differentiating chloride susceptibility in soybean cultivars. *Agron J*, 1993, 85: 880—885
- 15 Shereen A, Ansari R. Salt tolerance in Soybean (*Glycine max* L.): Effect on growth and water relations. *Pak J Biol Sci*, 2001, 4: 1212—1214
- 16 van Hoom J W, Katerji N, Hamdy A, et al. Effect of salinity on yield and nitrogen uptake of four grain legumes and on biological nitrogen contribution from the soil. *Agric Water Manage*, 2001, 51: 87—98[DOI]
- 17 Lunchli A. Salt exclusion: An adaptation of legumes for crops and pastures under saline conditions. In: Staples R C, Toeniessen G H, eds. *Salinity Tolerance in Plants*. New York: John Wiley & Sons, 1984. 171—187
- 18 Lacan D, Durand M. Na^+ and K^+ transport in excised soybean roots. *Physiologia Plantarum*, 1995, 93: 132—138[DOI]
- 19 An P, Inanaga S, Kafkafi U, et al. Different effect of humidity on growth and salt tolerance of two soybean cultivars. *Biologia Plantarum*, 2001, 44: 405—410[DOI]
- 20 Hoagland D, Arnon D I. The water culture method for growing plants without soil. *Calif Agr Expt Sta Circ*, 1938, 347
- 21 Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acidguanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987, 162: 156—159[DOI]
- 22 Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight DNA. *Nucleic Acids Res*, 1980, 8: 4321—4325
- 23 Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989
- 24 Topfer R, Matzeit V, Gronenborn B, et al. A set of plant expression vectors for transcriptional and translational fusions. *Nucleic Acids Res*, 1987, 15: 5890
- 25 Chang S, Puryear J, Cairney J. Simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol Biol Rep*, 1993, 11: 113—116
- 26 Gaxiola R A, Rao R, Sherman A, et al. The *Arabidopsis thaliana* proton transporters, AtNhx1 and Avp1, can function in cation detoxification in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 1480—1485[DOI]
- 27 Fukuda A, Nakamura A, Tanaka Y. Molecular cloning and expression of the Na^+/H^+ exchanger gene in *Oryza sativa*. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1446: 149—155
- 28 Hamada A, Shono M, Xia T, et al. Isolation and characterization of a Na^+/H^+ antiporter gene from the halophyte *Atriplex gmelini*. *Plant Mol Biol*, 2001, 46: 35—42[DOI]
- 29 Shi H, Ishitani M, Kim C, et al. The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na^+/H^+ antiporter. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 6896—6901[DOI]
- 30 Counillon L, Scholz W, Lang H J, et al. Pharmacological characterization of stably transfected Na^+/H^+ antiporter isoforms using amiloride analogs and a new inhibitor exhibiting anti-ischemic properties. *Mol Pharmacol*, 1993, 44: 1041—1045
- 31 Darley C P, van Wuytswinkel O C, van der Woude K, et al. *Arabidopsis thaliana* and *Saccharomyces cerevisiae* NHX1 genes encode amiloride sensitive electroneutral Na^+/H^+ exchangers. *Biochem J*, 2000, 351: 241—249[DOI]
- 32 Shi H, Zhu J K. Regulation of expression of the vacuolar Na^+/H^+ antiporter gene AtNHX1 by salt stress and abscisic acid. *Plant Mol Biol*, 2002, 50: 543—550[DOI]
- 33 Yoshida K, Kawachi M, Mori M, et al. The involvement of tonoplast proton pumps and $\text{Na}^+(\text{K}^+)/\text{H}^+$ exchangers in the change of petal color during flower opening of morning glory, *Ipomoea tricolor* cv. Heavenly blue. *Plant Cell Physiol*, 2005, 46: 407—415[DOI]
- 34 Nakanishi Y, Maeshima M. Molecular cloning of vacuolar H^+ -pyrophosphatase and its developmental expression in growing hypocotyl of mung bean. *Plant Physiol*, 1998, 116: 589—597[DOI]
- 35 Wu C A, Yang G D, Meng Q W, et al. The cotton *GhNHX1* gene encoding a novel putative tonoplast Na^+/H^+ antiporter plays an important role in salt stress. *Plant Cell Physiol*, 2004, 45: 600—607[DOI]
- 36 Yokoi S, Quintero F J, Cubero B, et al. Differential expression and function of *Arabidopsis thaliana* NHX Na^+/H^+ antiporters in the salt stress response. *Plant J*, 2002, 30: 529—539[DOI]
- 37 Abel G H. Inheritance of the capacity for chloride inclusion and chloride exclusion by soybeans. *Crop Sci*, 1969, 9: 697—698
- 38 罗庆云, 於丙军, 刘友良. 大豆苗期耐盐性鉴定指标的检验. *大豆科学*, 2001, 20: 177—182
- 39 王树耀, 陈其军, 王文龙, 等. 转 *OsNHX1* 基因耐盐 84K 杨的培育. *科学通报*, 2005, 50 (2): 140—144
- 40 Zhang J Z, Creelman R A, Zhu J K. From laboratory to field: Using information from *Arabidopsis* to engineer salt, cold, and drought tolerance in crops. *Plant Physiol*, 2004, 135: 615—621[DOI]
- 41 Li J, Yang H, Peer W A, et al. *Arabidopsis* H^+ -PPase AVP1 regulates auxin-mediated organ development. *Science*, 2005, 310(5745): 121—125[DOI]

(2006-01-24 收稿, 2006-03-01 接受)