

过量表达霸王 *ZxNHX* 和 *ZxVPI-1* 基因增强甜菜对渗透胁迫的耐受性伍国强<sup>1\*</sup>, 冯瑞军<sup>1</sup>, 魏金魁<sup>1</sup>, 王锁民<sup>2</sup>, 王春梅<sup>3</sup><sup>1</sup>兰州理工大学生命科学与工程学院, 兰州730050; <sup>2</sup>兰州大学草地农业科技学院, 草地农业生态系统国家重点实验室, 兰州730020; <sup>3</sup>中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所, 兰州730050

**摘要:** 以过量表达霸王液泡膜 $\text{Na}^+/\text{H}^+$ 逆向转运蛋白 $\text{ZxNHX}$ 和 $\text{H}^+$ -PPase  $\text{ZxVPI-1}$ 基因的甜菜植株和野生型植株为材料, 探究渗透胁迫下其生长、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、脯氨酸和可溶性糖含量的变化, 分析转基因植株对渗透胁迫的耐受性。结果表明, 渗透胁迫下野生型植株的生长受到抑制, 叶片发黄和萎蔫; 而转基因植株仍能维持正常生长。渗透胁迫下转基因植株的鲜重和组织含水量较野生型植株高41%和38%, 地上部 $\text{Na}^+$ 浓度是野生型植株的1.2~1.5倍, 其脯氨酸浓度较野生型植株增加40%~60%。野生型植株地上部和根中 $\text{K}^+$ 浓度显著性降低, 而转基因植株叶片中 $\text{K}^+$ 分配比例增加20%。与野生型植株相比, 转基因植株叶片、叶柄中的果糖和葡萄糖含量高35%~100%, 贮藏根中蔗糖含量高6%~16%。因此, 过量表达 $\text{ZxNHX}$ 和 $\text{ZxVPI-1}$ 基因能够增强甜菜离子区域化能力, 使其地上部积累更多的 $\text{Na}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、脯氨酸、果糖和葡萄糖, 贮藏根中积累更多蔗糖, 从而增强甜菜植株对渗透胁迫的耐受性。

**关键词:** 甜菜; 抗旱性; 可溶性糖;  $\text{ZxNHX}$ ;  $\text{ZxVPI-1}$

干旱是制约全球作物产量和品质的主要非生物胁迫因子之一(Berkov等2010; 赵建华等2012; 孙卫红等2013)。我国是世界上干旱最为严重的国家之一, 北方干旱、半干旱地区约占我国国土总面积的1/3, 频繁的季节性干旱对当地生态环境和农牧业生产构成了极大威胁(山仑2005)。生长于干旱半干旱地区的植物在长期适应干旱环境过程中, 逐渐形成了独特的抗旱机制, 蕴含着丰富的抗逆基因资源(Farooq等2009)。深入解析这些植物的抗旱机制, 进而发掘和鉴定抗旱功能基因, 将为我国北方干旱半干旱地区作物抗逆性遗传改良提供理论支持。

在我国北方地区广泛分布的荒漠旱生植物霸王(*Zygophyllum xanthoxylum*)为典型的积盐型植物, 具有极强的抗旱性和耐贫瘠能力(Wu等2011; Yue等2012)。霸王能从含盐量很低的土壤中吸收大量 $\text{Na}^+$ 并将其区域化至液泡中, 作为一种有益的渗透调节剂适应干旱环境(Wang等2004; Wu等2011)。 $\text{Na}^+$ 在液泡的区域化是通过液泡膜质子泵 $\text{H}^+$ -PPase (VP)和 $\text{H}^+$ -ATPase产生的跨膜质子动力驱动液泡膜 $\text{Na}^+/\text{H}^+$ 逆向转运蛋白(tonoplast  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter,  $\text{NHX}$ )完成的(Gaxiola等2001; Qiu 2012; Schilling等2014)。这一过程一方面可减缓过量 $\text{Na}^+$ 对细胞质的毒害作用; 另一方面可降低细胞渗透势, 增强细胞吸水能力(Flowers等2015; 张金林等2015)。Wu等(2011)从霸王中克隆到液泡膜 $\text{Na}^+/\text{H}^+$ 逆向转运蛋白 $\text{ZxNHX}$ 和 $\text{H}^+$ -PPase  $\text{ZxVPI-1}$ 基因, 发现在盐和干

旱胁迫下叶中 $\text{ZxNHX}$ 转录水平与 $\text{Na}^+$ 积累量呈正相关, 可见 $\text{ZxNHX}$ 在霸王响应盐和干旱胁迫中起着重要作用。Bao等(2014, 2015)研究发现, 过量表达 $\text{ZxNHX}$ 和 $\text{ZxVPI-1}$ 的转基因百脉根(*Lotus corniculatus*)和紫花苜蓿(*Medicago sativa*)能将细胞质内 $\text{Na}^+$ 区域化至液泡中, 使植物组织中积累更多的 $\text{Na}^+$ , 从而提高转基因植株的耐盐性和抗旱性。可见, 荒漠旱生植物霸王的离子区域化功能基因在农作物抗逆遗传改良方面具有重要的应用价值。

甜菜(*Beta vulgaris*)是全球第二大糖料作物, 其糖产量仅次于甘蔗(*Saccharum sinensis*), 约占世界糖总产量的35% (Liu等2008; 王华忠2009; 李承业等2010)。甜菜也是一种具有潜力的能源作物, 相比于甘蔗、玉米(*Zea mays*)和甜高粱(*Sorghum bicolor*), 其在开发燃料乙醇产业方面具有更广阔的应用前景(金明亮和贾海龙2011)。然而, 甜菜的耐旱能力不强, 耗水量大, 且大多数栽培品种的苗期对水分亏缺较为敏感(Ober和Rajabi 2010)。最近, 我们通过农杆菌介导法将霸王 $\text{ZxNHX}$ 和 $\text{ZxVPI-1}$ 基因聚合转化到甜菜中, 发现转基因甜菜植株的耐盐性显著性提高(Wu等2015a)。然而, 这两个基因的过量表达能否增强甜菜对渗透胁迫的

收稿 2017-05-12

资助 国家自然科学基金(31460101和31260294)、兰州市人才创新创业专项(2014-2-6)和兰州理工大学“红柳杰出人才”培养计划项目(J201404)。

\* 通讯作者(E-mail: wugq08@126.com)。

耐受性尚不清楚。因此,本试验在前期研究基础上,通过分析渗透胁迫下过量表达*ZxNHX*和*ZxVPI-1*基因的甜菜植株生长,Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、脯氨酸和可溶性糖含量的变化,以期揭示霸王离子区域化功能基因在提高甜菜抗旱性中的作用。

## 材料与方法

### 1 植物材料及培养

以过量表达霸王(*Zygophyllum xanthoxylum* Maxim) *ZxNHX*和*ZxVPI-1*的转基因甜菜(*Beta vulgaris* L.)植株和野生型植株为材料(Wu等2015a),将其移栽于装有蛭石的塑料盆(高11 cm×直径10 cm, 1株·盆<sup>-1</sup>)中,并浇灌改良的Hoagland营养液进行培养。营养液配方为: 0.25 mmol·L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、2 mmol·L<sup>-1</sup> KNO<sub>3</sub>、0.1 mmol·L<sup>-1</sup> Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O、0.5 mmol·L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.5 mmol·L<sup>-1</sup> Fe-citrate、18 μmol·L<sup>-1</sup> MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O、92 μmol·L<sup>-1</sup> H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>、1.6 μmol·L<sup>-1</sup> ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、0.7 μmol·L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O和0.6 μmol·L<sup>-1</sup> CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O。培养室昼夜温度为(28±2)°C/(23±2)°C,光照16 h·d<sup>-1</sup>,空气相对湿度为60%~80%,光照强度为500~600 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>。

### 2 试验处理

待甜菜植株生长至60 d后,挑选株高、叶片数量一致的转基因和野生型植株,用含80 mmol·L<sup>-1</sup>山梨醇的营养液处理,山梨醇的浓度每隔12 h以80 mmol·L<sup>-1</sup>逐渐递增,使其终浓度达到320 mmol·L<sup>-1</sup>(渗透势为-1.0 MPa),以未加山梨醇作为对照,每隔2 d更换一次处理液,保持终浓度5 d。每个处理设6次重复。

### 3 相关指标测定

鲜重、干重的测定和组织含水量的计算参考Yue等(2012)的方法。Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>和Ca<sup>2+</sup>浓度采用火焰光度计法测定(Wu等2014, 2015b),Na<sup>+</sup>和K<sup>+</sup>在不同组织中的相对分配比例的计算参考Ma等(2012)方法。总糖采用80%乙醇提取,蔗糖、果糖和葡萄糖含量的测定参考Liu等(2008)的方法。脯氨酸含量测定采用茚三酮比色法(Bates等1973)。

### 4 数据处理

采用SPSS 19.0软件对实验数据进行统计分析,采用Duncan检验法对差异显著性( $P < 0.05$ )进行多重比较,用Excel制图。

## 实验结果

### 1 渗透胁迫下过量表达*ZxNHX*和*ZxVPI-1*的转基因甜菜的形态和生物量

在对照条件下,转基因和野生型甜菜植株均生长良好;在渗透胁迫下,野生型植株的大部分叶片发黄和萎蔫,甚至开始死亡,而转基因植株仍能维持正常生长(图1-A)。在对照条件下,转基因植株的鲜重和组织含水量与野生型植株相比差异不显著。与对照相比,渗透胁迫使转基因和野生型植株的鲜重和组织含水量均显著性下降,但野生

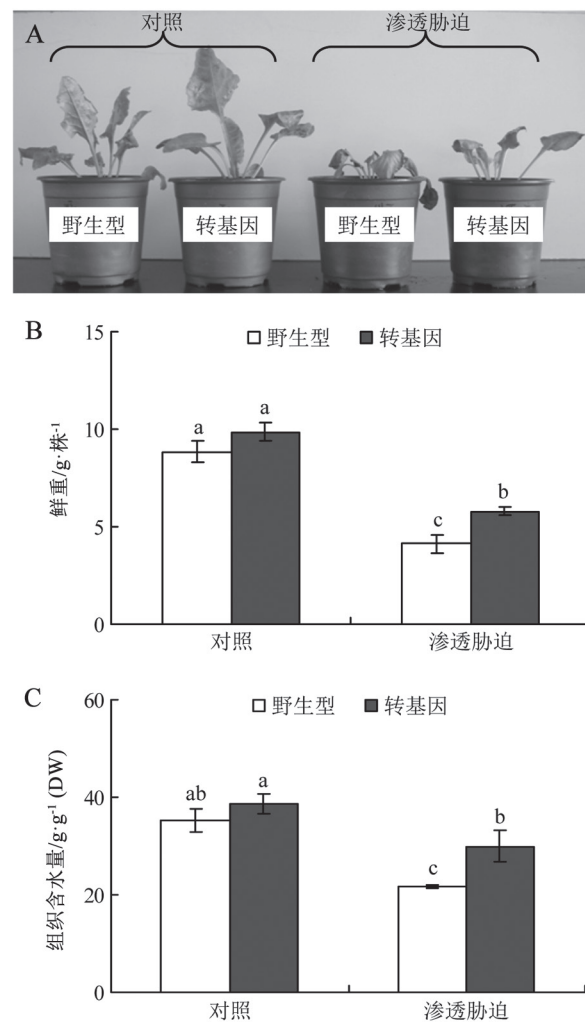


图1 渗透胁迫下野生型和转基因甜菜植株的形态、鲜重和组织含水量

Fig. 1 Morphology, fresh weight and tissue water content in wild-type and transgenic sugar beet plants under osmotic stress

各柱形上不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。

型植株下降幅度更大; 转基因植株的鲜重和组织含水量比野生型植株分别高41%和38% (图1-B和C)。可见, 渗透胁迫显著抑制甜菜的生长; 过量表达ZxNHX和ZxVPI-1基因则能增强甜菜对渗透胁迫的耐受性。

## 2 渗透胁迫下过量表达ZxNHX和ZxVPI-1的转基因甜菜的阳离子积累量

在对照条件下, 转基因甜菜植株的叶片、叶柄、贮藏根和侧根中Na<sup>+</sup>浓度与野生型植株相比差异不显著。在渗透胁迫下, 野生型植株所有组织的Na<sup>+</sup>浓度没有显著性变化; 然而, 转基因植株叶片和叶柄中Na<sup>+</sup>浓度显著性增加, 分别是野生型植株的1.2倍和1.5倍(表1)。与对照相比, 渗透胁迫使野生型植株叶片、叶柄和侧根中K<sup>+</sup>浓度分别下降26%、28%、8%和29%。此外, 渗透胁迫对野生型甜菜植株所有组织的Ca<sup>2+</sup>浓度没有显著性影响, 而使转基因植株叶片中Ca<sup>2+</sup>浓度显著性增加, 是野

生型植株的1.6倍(表1)。

由表2可以看出, 野生型植株的叶片和叶柄中积累了大量Na<sup>+</sup>, 分别占植株总Na<sup>+</sup>含量的61%和28%。渗透胁迫下野生型植株叶片、叶柄和侧根的Na<sup>+</sup>相对分配保持稳定水平, 在贮藏根中增加33%。与野生型相比, 渗透胁迫并没有显著改变转基因植株叶片和叶柄的Na<sup>+</sup>分配比例, 但其贮藏根和侧根中的分配比例分别降低39%和11%。与野生型相比, 无论在正常还是渗透胁迫下, 转基因植株叶片中K<sup>+</sup>相对分配比例分别增加10%和20%, 然而叶柄中分别下降11%和9%。可见, 过量表达ZxNHX和ZxVPI-1基因增加甜菜地上部Na<sup>+</sup>和Ca<sup>2+</sup>浓度, 降低根中Na<sup>+</sup>的分配, 且叶中K<sup>+</sup>的分配比例显著性增加。

## 3 渗透胁迫下过量表达ZxNHX和ZxVPI-1的转基因甜菜的可溶性糖含量

贮藏根是甜菜糖的主要储存组织, 其糖含量

表1 渗透胁迫下野生型和转基因甜菜植株的Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>和Ca<sup>2+</sup>浓度

Table 1 The concentrations of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> in wild-type and transgenic sugar beet plants under osmotic stress

植株部位	处理	Na <sup>+</sup> 浓度/mmol·g <sup>-1</sup> (DW)		K <sup>+</sup> 浓度/mmol·g <sup>-1</sup> (DW)		Ca <sup>2+</sup> 浓度/μmol·g <sup>-1</sup> (DW)	
		野生型	转基因	野生型	转基因	野生型	转基因
叶片	对照	0.56±0.01 <sup>a</sup>	0.54±0.03 <sup>b</sup>	1.59±0.07 <sup>b</sup>	1.60±0.04 <sup>b</sup>	30.38±2.41 <sup>b</sup>	33.87±3.11 <sup>b</sup>
	渗透胁迫	0.53±0.02 <sup>a</sup>	0.62±0.01 <sup>a</sup>	1.17±0.08 <sup>c</sup>	1.27±0.04 <sup>c</sup>	30.98±2.52 <sup>b</sup>	49.58±3.07 <sup>a</sup>
叶柄	对照	0.27±0.02 <sup>b</sup>	0.34±0.05 <sup>c</sup>	2.02±0.14 <sup>a</sup>	2.09±0.05 <sup>a</sup>	27.51±2.99 <sup>b</sup>	33.49±2.92 <sup>b</sup>
	渗透胁迫	0.29±0.05 <sup>b</sup>	0.44±0.04 <sup>d</sup>	1.67±0.06 <sup>b</sup>	1.58±0.05 <sup>b</sup>	32.06±2.03 <sup>b</sup>	40.11±2.80 <sup>ab</sup>
贮藏根	对照	0.07±0 <sup>e</sup>	0.07±0.01 <sup>f</sup>	0.63±0.07 <sup>de</sup>	0.65±0.04 <sup>de</sup>	27.35±3.71 <sup>b</sup>	32.41±2.82 <sup>b</sup>
	渗透胁迫	0.08±0.01 <sup>de</sup>	0.07±0.01 <sup>f</sup>	0.58±0.04 <sup>de</sup>	0.51±0.04 <sup>f</sup>	26.62±2.68 <sup>b</sup>	27.63±2.05 <sup>ab</sup>
侧根	对照	0.13±0.01 <sup>cd</sup>	0.10±0.02 <sup>ef</sup>	0.80±0.04 <sup>d</sup>	0.77±0.05 <sup>d</sup>	42.86±4.78 <sup>a</sup>	51.33±6.47 <sup>a</sup>
	渗透胁迫	0.16±0.03 <sup>c</sup>	0.17±0.02 <sup>e</sup>	0.57±0.05 <sup>c</sup>	0.54±0.05 <sup>ef</sup>	49.54±4.16 <sup>a</sup>	53.28±9.42 <sup>a</sup>

同列数据后不同小写字母表示差异显著(P<0.05), 下表同此。

表2 渗透胁迫下野生型和转基因甜菜植株的Na<sup>+</sup>和K<sup>+</sup>相对分配比例

Table 2 Relative distribution of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> in wild-type and transgenic sugar beet plants under osmotic stress

植株部位	处理	Na <sup>+</sup> 相对分配比例/%		K <sup>+</sup> 相对分配比例/%	
		野生型	转基因	野生型	转基因
叶片	对照	61.25±2.42 <sup>a</sup>	62.69±2.29 <sup>a</sup>	38.02±1.54 <sup>b</sup>	41.82±0.78 <sup>ab</sup>
	渗透胁迫	61.47±2.63 <sup>a</sup>	60.90±1.98 <sup>a</sup>	37.11±1.57 <sup>b</sup>	44.03±1.45 <sup>a</sup>
叶柄	对照	28.06±2.29 <sup>b</sup>	28.03±2.61 <sup>b</sup>	44.68±1.52 <sup>a</sup>	39.8±0.727 <sup>bc</sup>
	渗透胁迫	26.12±2.49 <sup>b</sup>	30.09±2.16 <sup>b</sup>	42.55±1.58 <sup>a</sup>	38.57±1.10 <sup>c</sup>
贮藏根	对照	5.50±0.51 <sup>c</sup>	5.83±0.48 <sup>c</sup>	10.59±0.38 <sup>d</sup>	12.37±0.91 <sup>d</sup>
	渗透胁迫	7.26±0.57 <sup>c</sup>	4.43±0.41 <sup>c</sup>	15.26±1.37 <sup>c</sup>	12.22±0.91 <sup>d</sup>
侧根	对照	5.19±0.46 <sup>c</sup>	3.45±0.41 <sup>c</sup>	6.70±0.31 <sup>e</sup>	5.94±0.46 <sup>e</sup>
	渗透胁迫	5.14±0.51 <sup>c</sup>	4.58±0.43 <sup>c</sup>	5.08±0.48 <sup>e</sup>	5.17±0.29 <sup>e</sup>



占植株总糖的60%~70%，其中蔗糖含量最高，果糖次之，葡萄糖最少(表3)。在正常条件下，转基因植株贮藏根中的蔗糖含量显著高于野生型植株，果糖和葡萄糖含量差异不显著。渗透胁迫下，转基因和野生型植株贮藏根中蔗糖含量均显著性增加，且转基因植株叶柄和贮藏根中蔗糖含量显著高于野生型植株，分别高53%和15%。此外，转基因植株叶片中果糖和葡萄糖含量较野生型植株分别高83%和120%，叶柄中分别高35%和60% (表3)。这些结果表明，过量表达*ZxNHX*和*ZxVPI-1*基因能促进甜菜植株叶片和叶柄中积累更多蔗糖、果糖和葡萄糖，贮藏根中积累更多蔗糖和果糖。

#### 4 渗透胁迫下过量表达*ZxNHX*和*ZxVPI-1*的转基因甜菜的脯氨酸浓度

在正常条件下，与野生型植株相比，转基因植株叶片、叶柄、贮藏根和侧根中脯氨酸浓度差异不显著(表4)。渗透胁迫下，转基因和野生型植株

叶片、叶柄和侧根中脯氨酸浓度均显著性增加，但转基因植株叶片和叶柄中增幅更大，比野生型植株分别高40%和58% (表4)。

## 讨 论

### 1 渗透胁迫下过量表达*ZxNHX*和*ZxVPI-1*基因使甜菜维持较高的生物量和含水量

干旱胁迫是制约植物生长和发育的主要非生物胁迫因子，表现为降低光合速率和蒸腾速率(Gong等2005; Tahi等2007)，抑制 $K^+$ 的吸收(Wu等2014)，减少胞内膨压、抑制细胞伸长(Tahi等2007)等。我们前期发现，渗透胁迫严重抑制甜菜幼苗的生长，显著性降低植物组织含水量(Wu等2014; 2015b)。本研究发现，渗透胁迫下野生型甜菜植株叶片发黄和萎蔫，而转基因植株能维持正常生长，其植株鲜重和组织含水量显著高于野生型植株(图1)。类似结果在过量表达*ZxNHX*和*ZxVPI-1*的转基因

表3 渗透胁迫下野生型和转基因甜菜植株的蔗糖、果糖和葡萄糖含量

Table 3 The contents of sucrose, fructose and glucose in wild-type and transgenic sugar beet plants under osmotic stress

植株部位	处理	蔗糖含量/mg·g <sup>-1</sup> (DW)		果糖含量/mg·g <sup>-1</sup> (DW)		葡萄糖含量/mg·g <sup>-1</sup> (DW)	
		野生型	转基因	野生型	转基因	野生型	转基因
叶片	对照	29.68±4.13 <sup>de</sup>	25.09±1.04 <sup>d</sup>	21.12±2.10 <sup>c</sup>	20.07±2.14 <sup>de</sup>	12.42±1.75 <sup>b</sup>	9.70±1.57 <sup>d</sup>
	渗透胁迫	23.71±1.02 <sup>c</sup>	27.86±1.13 <sup>d</sup>	18.88±1.43 <sup>c</sup>	34.68±2.99 <sup>de</sup>	11.32±1.17 <sup>b</sup>	25.07±2.73 <sup>c</sup>
叶柄	对照	38.52±2.09 <sup>cd</sup>	36.02±2.26 <sup>d</sup>	44.39±5.78 <sup>b</sup>	36.81±3.10 <sup>d</sup>	33.69±8.31 <sup>a</sup>	28.09±3.37 <sup>c</sup>
	渗透胁迫	43.19±1.79 <sup>c</sup>	66.15±3.14 <sup>c</sup>	51.79±4.31 <sup>b</sup>	70.12±5.82 <sup>c</sup>	40.93±4.82 <sup>a</sup>	65.53±8.81 <sup>a</sup>
贮藏根	对照	283.49±7.92 <sup>b</sup>	299.08±5.38 <sup>b</sup>	206.90±9.22 <sup>a</sup>	191.44±8.50 <sup>b</sup>	44.32±3.45 <sup>a</sup>	42.82±4.37 <sup>b</sup>
	渗透胁迫	296.99±6.73 <sup>a</sup>	341.81±9.65 <sup>a</sup>	214.43±9.32 <sup>a</sup>	229.57±10.77 <sup>a</sup>	39.79±2.56 <sup>a</sup>	34.58±4.99 <sup>bc</sup>
侧根	对照	26.50±1.65 <sup>de</sup>	30.11±1.62 <sup>d</sup>	18.83±2.32 <sup>c</sup>	21.29±2.32 <sup>de</sup>	4.84±0.78 <sup>b</sup>	4.13±0.75 <sup>d</sup>
	渗透胁迫	33.70±1.22 <sup>cd</sup>	31.33±2.10 <sup>d</sup>	19.74±2.10 <sup>c</sup>	18.00±2.98 <sup>c</sup>	3.38±0.67 <sup>b</sup>	4.37±1.06 <sup>d</sup>

表4 渗透胁迫下野生型和转基因甜菜植株的脯氨酸浓度

Table 4 The proline concentration in wild-type and transgenic sugar beet plants under osmotic stress

植株部位	处理	脯氨酸浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW)	
		野生型	转基因
叶片	对照	1.02±0.10 <sup>c</sup>	1.17±0.06 <sup>c</sup>
	渗透胁迫	2.90±0.08 <sup>b</sup>	4.05±0.31 <sup>b</sup>
叶柄	对照	1.01±0.09 <sup>c</sup>	1.20±0.05 <sup>c</sup>
	渗透胁迫	3.97±0.12 <sup>a</sup>	6.27±0.61 <sup>a</sup>
贮藏根	对照	0.93±0.05 <sup>cd</sup>	1.01±0.13 <sup>cd</sup>
	渗透胁迫	0.14±0.06 <sup>c</sup>	1.59±0.06 <sup>c</sup>
侧根	对照	0.40±0.10 <sup>c</sup>	0.38±0.06 <sup>d</sup>
	渗透胁迫	0.72±0.59 <sup>d</sup>	1.23±0.10 <sup>c</sup>

因百脉根和紫花苜蓿中也有发现(Bao等2014, 2015)。另外， $H^+$ -PPase过量表达能提高植物生长素的极性运输(Li等2005)，促进转基因植株根系的活力，使其在逆境胁迫下从生长介质中吸收更多的水分和养分，进而增强植物的抗逆性(Park等2005)。可见，过量表达*ZxNHX*和*ZxVPI-1*基因增强甜菜对渗透胁迫的耐受性，维持较高的生物量和组织含水量。

### 2 渗透胁迫下过量表达*ZxNHX*和*ZxVPI-1*基因使甜菜积累更多的阳离子

维持细胞内 $Na^+$ 和 $K^+$ 的稳态是植物适应逆境胁迫的重要策略之一(Bassil等2011)。大量研究表

明, 过量表达液泡膜 $\text{Na}^+/\text{H}^+$ 逆向转运蛋白和 $\text{H}^+$ -PPase的转基因植物积累大量 $\text{Na}^+$ , 从而增强抗逆性(Bao等2009, 2014, 2015)。渗透胁迫下过量表达ZxNHX和ZxVPI-1基因使甜菜地上部积累更多的 $\text{Na}^+$ (表1)。由此表明, ZxNHX和ZxVPI-1的过量表达可能通过提高液泡膜 $\text{Na}^+/\text{H}^+$ 交换活性(Yamaguchi等2013)及质子驱动力(Bao等2009, 2015), 增强转基因甜菜植株 $\text{Na}^+$ 在液泡的区域化能力。

同时,  $\text{Na}^+$ 区域化能力的增强能促进转基因植物细胞对 $\text{K}^+$ 的吸收, 这是因为液泡膜 $\text{Na}^+/\text{H}^+$ 逆向转运蛋白也可作为 $\text{K}^+/\text{H}^+$ 交换器转运 $\text{K}^+$ 至液泡中(Leidi等2010; Bassil等2011)。Leidi等(2010)研究发现, 过量表达拟南芥*AtNHX1*的转基因番茄(*Lycopersicon esculentum*)  $\text{K}^+$ 吸收能力和在液泡的积累量均显著高于野生型植株。然而, 拟南芥*atnhx1/atnhx2*双突变体的 $\text{K}^+$ 含量仅是野生型的30% (Bassil等2011)。Yuan等(2015)研究发现, 霸王ZxNHX-RNA干扰植株 $\text{K}^+$ 浓度较野生型植株显著性下降, 究其原因ZxNHX的沉默能负向调控与 $\text{K}^+$ 吸收和转运相关蛋白ZxAKT1和ZxSKOR。本研究发现, 尽管渗透胁迫下过量表达ZxNHX和ZxVPI-1的转基因甜菜植株 $\text{K}^+$ 含量没有显著性增加, 但其叶片中 $\text{K}^+$ 分配比例显著性增加(表2)。可见, ZxNHX和ZxVPI-1的过量表达可改变转基因植株 $\text{K}^+$ 的分配格局, 进而在整株水平上调控和重建 $\text{K}^+$ 的稳态平衡。

此外,  $\text{Ca}^{2+}$ 在植物抗逆性方面也起着重要作用, 如稳定细胞壁和细胞膜、调节细胞内水分平衡、促进细胞对 $\text{K}^+$ 吸收及充当第二信使等(Conn等2011; Pittman 2011; Yang和Poovaiah 2002)。渗透胁迫下过量表达ZxNHX和ZxVPI-1的转基因甜菜植株在地上组织中积累了更多的 $\text{Ca}^{2+}$ (表1)。这与珍珠粟(*Pennisetum glaucum*) *PgNHX*和拟南芥*AtVPI*在番茄(Bhaskaran和Savithramma 2011)以及小麦(*Triticum aestivum*) *TaNHX1*和*TaVPI*在烟草(*Nicotiana tabacum*) (Gouiaa等2012)中过量表达的结果相一致。

### 3 渗透胁迫下过量表达ZxNHX和ZxVPI-1基因使甜菜积累更多的糖和脯氨酸

甜菜贮藏根中糖含量是决定甜菜品质的关键因素之一(Liu等2008; Ober和Rajabi 2010)。研究表明,  $\text{H}^+$ -PPase定位于韧皮部筛管-伴胞(sieve ele-

ment-companion cell, SE-CC)复合体质膜上, 其在质膜两侧形成的 $\text{H}^+$ 驱动力为韧皮部蔗糖装载具有重要作用(Paez-Valencia等2011; Regmi等2016)。渗透胁迫下转基因甜菜植株地上部组织中积累更多的果糖和葡萄糖, 贮藏根中积累更多的蔗糖(表3)。这与拟南芥*AtNHX3*基因在甜菜中超表达的结果(Liu等2008)相一致。ZxNHX和ZxVPI-1的过量表达可能激活与蔗糖合成相关酶活性(Liu等2008), 从而增加转基因植株糖含量。

另外, 脯氨酸是植物体重要的渗透调节物质, 在稳定细胞膜和蛋白质结构、清除活性氧等中发挥着重要作用(Szabados和Savouré 2009; 黄国宾等2012)。渗透胁迫下, 无论是野生型还是转基因植株, 其叶片、叶柄和侧根中脯氨酸积累量较对照均显著性增加; 然而, 相比之下, 转基因植株叶片和叶柄脯氨酸含量显著高于野生型植株(表4)。在过量表达*AtNHX1*的转基因红薯(*Ipomoea batatas*) (Fan等2015)和过量表达绿豆(*Vigna radiata*) *VrNHX1*的转基因豇豆(*Vigna unguiculata*) (Mishra等2014)中也得到了相类似的结果。

综上所述, ZxNHX和ZxVPI-1的过量表达可增强转基因甜菜的离子区域化能力, 使其地上部积累更多的 $\text{Na}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、脯氨酸、果糖和葡萄糖, 贮藏根中积累更多蔗糖, 从而提高转基因植株对渗透胁迫的耐受性。

### 参考文献

- Bao AK, Wang SM, Wu GQ, Xi JJ, Zhang JL, Wang CM (2009). Overexpression of the *Arabidopsis*  $\text{H}^+$ -PPase enhanced resistance to salt and drought stress in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Sci*, 176: 232–240
- Bao AK, Wang YW, Xi JJ, Liu C, Zhang JL, Wang SM (2014). Co-expression of xerophyte *Zygophyllum xanthoxylum* ZxNHX and ZxVPI-1 enhances salt and drought tolerance in transgenic *Lotus corniculatus* by increasing cations accumulation. *Funct Plant Biol*, 41 (2): 203–214
- Bao AK, Du BQ, Touil L, Kang P, Wang QL, Wang SM (2015). Co-expression of tonoplast Cation/ $\text{H}^+$  antiporter and  $\text{H}^+$ -pyrophosphatase from xerophyte *Zygophyllum xanthoxylum* improves alfalfa plant growth under salinity, drought and field conditions. *Plant Biotech J*, 14 (3): 964–975
- Bassil E, Tajima H, Liang YC, Ohto M, Ushijim K, Nakano R, Esumi T, Coku A, Belmonte M, Blumwald E (2011). The *Arabidopsis*  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporters *nhx1* and *nhx2* control vacuolar pH and  $\text{K}^+$  homeostasis to regulate growth, flower development, and reproduction. *Plant Cell*, 23: 3482–3497

- Bates LS, Waldren RP, Teare ID (1973). Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil*, 39 (1): 205–515
- Berkov S, Bastida J, Viladomat F, Codina C (2010). Does habitat of *Atriplex halimus* L. affect plant strategy for osmotic adjustment? *Acta Physiol Plant*, 32: 325–331
- Bhaskaran S, Savithramma DL (2011). Co-expression of *Pennisetum glaucum* vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter and *Arabidopsis* H<sup>+</sup>-pyrophosphatase enhances salt tolerance in transgenic tomato. *J Exp Bot*, 62 (15): 5561–5570
- Conn SJ, Gilliham M, Athman A, Schreiber AW, Baumann U, Moller I, Cheng NH, Stancombe MA, Hirschi KD, Webb AA, et al (2011). Cell-specific vacuolar calcium storage mediated by CAX1 regulates apoplastic calcium concentration, gas exchange, and plant productivity in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 23 (1): 240–257
- Fan W, Deng G, Wang H, Zhang HX, Zhang P (2015). Elevated compartmentalization of Na<sup>+</sup> into vacuoles improves salt and cold stress tolerance in sweet potato (*Ipomoea batatas*). *Physiol Plant*, 154 (4): 560–571
- Farooq M, Wahid A, Kobayashi N, Fujita D, Basra SMA (2009). Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agron Sustain Dev*, 29 (1): 185–212
- Flowers TJ, Munns R, Colmer TD (2015). Sodium chloride toxicity and the cellular basis of salt tolerance in halophytes. *Ann Bot*, 115: 419–431
- Gaxiola RA, Li JS, Undurraga S, Dang LM, Allen GJ, Alper SL, Fink GR (2001). Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H<sup>+</sup>-pump. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98 (20): 11444–11449
- Gong HJ, Zhu XY, Chen KM, Wang SM, Zhang CL (2005). Silicon alleviates oxidative damage of wheat plants in pots under drought. *Plant Sci*, 169 (2): 313–321
- Gouiaa S, Khoudi H, Leidi EO, Pardo JM, Masmoudi K (2012). Expression of wheat Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter *TaNHX1* and H<sup>+</sup>-pyrophosphatase *TaVPI* genes in tobacco from a bicistronic transcriptional unit improves salt tolerance. *Plant Mol Biol*, 79 (1-2): 137–155
- Huang GB, Zhang XH, Yang SL, Li JY, Xu CH, Rong ZY, Yang LY, Gong M (2012). Involvement of osmotic regulation in enhancement of drought resistance in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) plants through circular drought-hardening. *Plant Physiol J*, 48 (5): 465–471 (in Chinese with English abstract) [黄国宾, 张晓海, 杨双龙, 李军营, 徐超华, 荣智媛, 杨利云, 龚明(2012). 渗透调节参与循环干旱锻炼提高烟草植株抗旱性的形成. *植物生理学报*, 48 (5): 465–471]
- Jin ML, Jia HJ (2011). Potential for energy beet and development prospect. *Sugar Crop China*, (1): 58–66 (in Chinese with English abstract) [金明亮, 贾海龙(2011). 甜菜作为能源作物的优势及其发展前景. *中国糖料*, (1): 58–66]
- Leidi EO, Barragan V, Rubio L, El-Hamdaoui A, Ruiz MT, Cubero B, Fernandez JA, Bressan RA, Hasegawa PM, Quintero FJ, et al (2010). The AtNHX1 exchanger mediates potassium compartmentation in vacuoles of transgenic tomato. *Plant J*, 61: 495–506
- Li CY, Wang YF, Huang R, Dong XJ (2010). Research progress in stress resistance of sugar beet. *Sugar Crop China*, (1): 56–58 (in Chinese with English abstract) [李承业, 王燕飞, 黄润, 董心久 (2010). 我国甜菜抗逆性研究进展. *中国糖料*, (1): 56–58]
- Li J, Yang H, Peer WA, Richter G, Blakeslee J, Bandyopadhyay A, Taptiwantakun B, Undurraga S, Khodakovskaya M, Richards EL, et al (2005). *Arabidopsis* H<sup>+</sup>-PPase AVP1 regulates auxin-mediated organ development. *Science*, 310: 121–125
- Liu HL, Wang QQ, Yu MM, Zhang YY, Wu YB, Zhang HX (2008). Transgenic salt-tolerant sugar beet (*Beta vulgaris* L.) constitutively expressing an *Arabidopsis thaliana* vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene, *AtNHX3*, accumulates more soluble sugar but less salt in storage roots. *Plant Cell Environ*, 31 (9): 1325–1334.
- Ma Q, Yue LJ, Zhang JL, Wu GQ, Bao AK, Wang SM (2012). Sodium chloride improves the photosynthesis and water status in succulent xerophyte *Zygophyllum xanthoxylum*. *Tree Physiol*, 32 (1): 4–13
- Mishra S, Behura R, Awasthi J P, Dey M, Sahoo D, Bhowmik SSD, Panda SK, Sahoo L (2014). Ectopic overexpression of a mungbean vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene (*VrNHX1*) leads to increased salinity stress tolerance in transgenic *Vigna unguiculata* L. *Mol Breed*, 34 (3): 1345–1359
- Ober ES, Rajabi A (2010). Abiotic stress in sugar beet. *Sugar Tech*, 12 (3–4): 294–298
- Paez-Valencia J, Patron-Soberano A, Rodriguez-Leviz A, Sanchez-Lares J, Sanchez-Gomez C, Valencia-Mayoral P, Diaz-Rosas G, Gaxiola R (2011). Plasma membrane localization of the type I H<sup>+</sup>-PPase AVP1 in sieve element-companion cell complexes from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci*, 181 (1): 23–30
- Park S, Li J, Pittman JK, Berkowitz GA, Yang H, Undurraga S, Morris J, Hirschi KD, Gaxiola RA (2005). Up-regulation of a H<sup>+</sup>-pyrophosphatase (H<sup>+</sup>-PPase) as a strategy to engineer drought-resistant crop plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102: 18830–18835
- Pittman JK (2011). Vacuolar Ca<sup>2+</sup> uptake. *Cell Calcium*, 50: 139–146.
- Qiu QS (2012). Plant and yeast NHX antiporters: roles in membrane trafficking. *J Integr Plant Biol*, 54 (2): 66–72
- Regmi KC, Zhang SJ, Gaxiola RA (2016). Apoplasmic loading in the rice phloem supported by the presence of sucrose synthase and plasma membrane-localized proton pyrophosphatase. *Ann Bot*, 117 (2): 257–268.
- Schilling RK, Marschner P, Shavrukov Y, Berger B, Tester M, Roy SJ, Plett DC (2014). Expression of the *Arabidopsis* vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase gene (*AVP1*) improves the shoot biomass of transgenic barley and increases grain yield in a saline field. *Plant Biotech J*, 12 (3): 378–386
- Shan L (2005). Accelerate the development of water saving agriculture in China. *Qiushi J*, (22): 42–44 (in Chinese) [山仑(2005). 加速发展我国节水农业. *求是杂志*, (22): 42–44]
- Sun WH, Sun ZZ, Wu QX, Liu HX, Chen M, Chen Z (2013). Effects of elevated CO<sub>2</sub> concentration on drought tolerance in transgenic tomato plants under drought stress. *Plant Physiol J*, 49 (12): 1393–1399 (in Chinese with English abstract) [孙卫红, 孙祺祺, 吴秋霞, 刘汉玄, 陈梅, 陈喆(2013). 干旱胁迫下CO<sub>2</sub>浓度升高对转StAPX番茄植株耐旱能力的影响. *植物生理学报*, 49 (12): 1393–1399]
- Szabados L, Saviouré A (2009). Proline: a multifunctional amino acid.

- Trends Plant Sci, 15: 89–97
- Tahi H, Wahbi S, Wakrim R, Aganchich B, Serraj R, Centritto M (2007). Water relations, photosynthesis, growth and water use efficiency in tomato plants subjected to partial rootzone drying and regulated deficit irrigation. *Plant Biosyst*, 141: 265–274
- Wang HZ (2009). Present situation and development trend of sugar beet production in China. *New Agric*, (10): 9–11 (in Chinese) [王华忠(2009). 我国甜菜生产现状与发展趋势. *新农业*, (10): 9–11]
- Wang SM, Wan CG, Wang YR, Chen H, Zhou ZY, Fu H, Sosebee RE (2004). The characteristics of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> and free proline distribution in several drought-resistant plants of the Alxa Desert, China. *J Arid Environ*, 56: 525–539
- Wu GQ, Feng RJ, Liang N, Yuan HJ, Sun WB (2015b). Sodium chloride stimulates growth and alleviates sorbitol-induced osmotic stress in sugar beet seedlings. *Plant Growth Regul*, 75 (1): 307–316
- Wu GQ, Feng RJ, Wang SM, Wang CM, Bao AK, Wei L, Yuan HJ (2015a). Co-expression of xerophyte *Zygophyllum xanthoxylum* ZxNHX and ZxVPI-1 confers enhanced salinity tolerance in chimeric sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Front Plant Sci*, 6: 1–11
- Wu GQ, Wang CM, Su YY, Zhang JJ, Feng RJ, Liang N (2014). Assessment of drought tolerance in seedlings of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) cultivars using inorganic and organic solutes accumulation criteria. *Soil Sci Plant Nutr*, 60: 565–576
- Wu GQ, Xi JJ, Wang Q, Bao AK, Ma Q, Zhang JL, Wang SM (2011). The ZxNHX gene encoding tonoplast Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter from the xerophyte *Zygophyllum xanthoxylum* plays important roles in response to salt and drought. *J Plant Physiol*, 168: 758–767
- Yamaguchi T, Hamamoto S, Uozumi N (2013). Sodium transport system in plant cells. *Front Plant Sci*, 4: 410
- Yang T, Poovaiah BW (2002). Hydrogen peroxide homeostasis: activation of plant catalase by calcium/calmodulin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99: 4097–4102
- Yuan HJ, Ma Q, Wu GQ, Wang P, Hu J, Wang SM (2015). ZxNHX controls Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> homeostasis at the whole-plant level in *Zygophyllum xanthoxylum* through feedback regulation of the expression of genes involved in their transport. *Ann Bot*, 115: 495–507
- Yue LJ, Ma Q, Li SX, Zhou XR, Wu GQ, Bao AK, Zhang JL, Wang SM (2012). NaCl stimulates growth and alleviates water stress in the xerophyte *Zygophyllum xanthoxylum*. *J Arid Environ*, 87: 153–160
- Zhang JL, Li HR, Guo SY, Wang SM, Shi HZ, Han QQ, Bao AK, Ma Q (2015). Research advances in higher plant adaptation to salt stress. *Acta Pratac Sin*, 24 (12): 220–236 (in Chinese with English abstract) [张金林, 李惠茹, 郭姝媛, 王锁民, 施华中, 韩庆庆, 包爱科, 马清(2015). 高等植物适应盐逆境研究进展. *草业学报*, 24 (12): 220–236]
- Zhao JH, Li HX, Zhou X, An W, Shi ZG, Wang YJ, Wang HF (2012). Influence of drought stress on plant growth and sugar accumulation in fruit of *Lycium barbarum* L. *Plant Physiol J*, 48 (11): 1063–1068 (in Chinese with English abstract) [赵建华, 李浩霞, 周旋, 安巍, 石志刚, 王亚军, 王华芳(2012). 干旱胁迫对宁夏枸杞生长及果实糖分积累的影响. *植物生理学报*, 48 (11): 1063–1068]



## Overexpression of *ZxNHX* and *ZxVPI-1* genes from *Zygophyllum xanthoxylum* enhances sugar beet (*Beta vulgaris*) resistance to osmotic stress

WU Guo-Qiang<sup>1\*</sup>, FENG Rui-Jun<sup>1</sup>, WEI Jin-Kui<sup>1</sup>, WANG Suo-Min<sup>2</sup>, WANG Chun-Mei<sup>3</sup>

<sup>1</sup>School of Life Sciences and Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China; <sup>2</sup>State Key Laboratory of Grassland Agro-ecosystems, College of Pastoral Agriculture Science and Technology, Lanzhou University, Lanzhou 730020, China;

<sup>3</sup>Lanzhou Institute of Husbandry and Pharmaceutical Science, CAAS, Lanzhou 730050, China

**Abstract:** In the present study, to analyze drought tolerance of transgenic sugar beet (*Beta vulgaris*) plants overexpressing *ZxNHX* and *ZxVPI-1* from *Zygophyllum xanthoxylum*, the changes of plant growth and accumulations of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, proline and soluble sugars were investigated in transgenic and wild-type plants subjected with osmotic stress induced by sorbitol. The results indicated that osmotic stress significantly inhibited the growth of wild-type plants, and their leaf blade showed chlorosis and shrink, whereas transgenic plants still maintained the normal phenotype. Under osmotic stress, fresh weight and tissue water content in transgenic plants were higher 41% and 38% than those in wild-type plants, and the concentrations of Na<sup>+</sup> and proline in shoot of transgenic plants increased by 1.2–1.5 folds and 40%–60%, respectively. Furthermore, K<sup>+</sup> concentrations in shoot and root of wide-type plants were significantly decreased, while the Na<sup>+</sup> relative distribution in leaf blade in transgenic plants were increased by 20% under osmotic stress. In addition, glucose and fructose contents in leaf blade and leaf petiole of transgenic plants were higher 35%–100% than wild-type plants subjected with osmotic stress. It was also observed that sucrose contents of storage root in transgenic plants were higher 6%–16% than those in wild-type plants. These results suggested that sugar beet plants overexpressing *ZxNHX* and *ZxVPI-1* genes increased the sequestration of Na<sup>+</sup> into vacuoles, and accumulated more Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, proline, fructose and glucose in shoot, and more sucrose in storage root, thus led to enhance resistance to osmotic stress.

**Key words:** sugar beet (*Beta vulgaris*); drought tolerance; soluble sugar; *ZxNHX*; *ZxVPI-1*

---

Received 2017-05-12

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant Nos. 31460101 and 31260294), the Special Funds of Talent Innovation in Lanzhou City (Grant No. 2014-2-6) and the Elitist Program of Lanzhou University of Technology (Grant No. J201404).

\*Corresponding author (E-mail: wugq08@126.com).