

过量表达菠菜*SoCYP85A1*基因增强烟草的耐盐性

鲁雪莉, 段方猛, 万芳源, 李宝笃, 宋雯雯*

青岛农业大学农学与植物保护学院, 山东青岛266109

摘要: 本研究以转菠菜*SoCYP85A1*基因稳定表达的烟草植株为试验材料, 检测了其耐盐性。利用NaCl模拟盐胁迫处理野生型和转基因烟草, 结果表明: 在高盐胁迫下, 转基因烟草种子的发芽率显著高于野生型; 二者的超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)活性均增强, 转基因植株的酶活性显著高于野生型; 二者的脯氨酸(Pro)含量升高, 并且转基因烟草积累量显著高于野生型, 而转基因植株的丙二醛(MDA)含量增幅小于野生型; 高盐处理后, 野生型和转基因烟草的9个胁迫相关的基因表达倍数都增加, 同野生型相比, 转基因烟草的*NtADC1*、*NtAPX*、*NtCAT*、*NtLEA5*、*NtGST*、*NtSOD*和*NtERD10C*的表达量显著升高, 而*NtNCED1*和*NtSAMDC*基因的表达量变化不显著。本研究结果证实了过量表达*SoCYP85A1*基因能够通过增强烟草的抗氧化胁迫能力和调节胁迫相关基因的表达来提高烟草的耐盐性, 为进一步阐明菠菜*SoCYP85A1*基因的耐盐机制奠定了理论基础。

关键词: 菠菜*SoCYP85A1*基因; 高盐胁迫; 过量表达; 荧光定量PCR

高盐是影响植物生长发育的重要环境因子(杨红霞等2016)。在高盐胁迫下, 植物体内的离子分布和水平衡遭到破坏, 从而导致分子损伤、生长停滞甚至死亡(Zhu 2001)。植物在长期的进化中形成的抗逆机制主要有两种途径: 一是通过植物体内的激素调节(Gruszka 2013), 二是通过调节相关基因的表达(Pushpika等2016; Wang等2015), 从而抵御非生物胁迫的影响。油菜素类固醇(brassinosteroids, BRs)是植物体内一类甾醇类激素, 在植物的生长发育以及抵御非生物胁迫中发挥重要的作用(Divi和Krishna 2009; Bajguz和Hayat 2009)。研究发现, BRs可以减轻水稻(Bajguz和Hayat 2009)、茄子(吴雪霞等2011)种子萌发和幼苗生长期间的盐抑制作用; 提高盐胁迫下黄瓜的抗氧化酶活性, 缓解盐胁迫造成的伤害(陆晓民和杨威2013); 防止小麦叶片在盐胁迫下的叶绿素降解, 保护植物细胞结构不受破坏, 进而促进植物的生长(Shahbaz等2008); 减少盐胁迫下棉花幼苗根、茎和叶的钠离子含量, 降低叶片中丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量, 提高脯氨酸(proline, Pro)含量(束红梅等2016); BRs还对作物中逆境相关基因具有调控作用(Dhaubhadel和Krishna 2008; Goetz等2000)。以上研究都仅限于外源BRs调控植物生长发育以及抗逆性等方面的报道, 而关于内源BRs的调控机理知之甚少。

在BRs的生物合成途径中, *CYP85A1*基因编码的酶是催化其合成的重要酶之一(李辉等2015), 由它合成的栗甾醇(castasterone, CS)在*CYP85A2*酶的催化下生成具有生物活性的油菜素内酯(Nomura

等2005; Shimada等2001)。*CYP85A1*基因编码的*CYP85A1*蛋白属于细胞色素P450蛋白家族, 最近有报道发现: 番茄的*CYP85A1*基因的过量表达, 提高了内源BRs的含量, 从而促进种子萌发(Li等2016a), 提高光合效率(Li等2016b)。而*SoCYP85A1*基因是否参与逆境胁迫响应以及调节机制尚未见报道。

本实验室前期工作中从菠菜克隆了*SoCYP85A1*基因(GenBank登录号为KT900949), 为验证菠菜*SoCYP85A1*基因的功能, 将其转入到野生烟草中, 得到过量表达并稳定遗传的转菠菜*SoCYP85A1*基因的烟草种子。本研究采用转菠菜*SoCYP85A1*基因的烟草种子为材料, 在同一培养条件下种植野生烟草和转基因烟草, 比较两种烟草在高盐胁迫下种子的发芽率, 测定高盐胁迫下二者的超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化物酶(peroxidase, POD)和过氧化氢酶(catalase, CAT)的活性, Pro和MDA的含量, 以及荧光定量PCR检测胁迫相关的9个基因的表达情况, 以期揭示*SoCYP85A1*基因调控植物高盐胁迫耐受性的作用机制。

材料与方法

1 实验材料

野生烟草(*Nicotiana tabacum* L.)种子和转菠

收稿 2017-01-04 修定 2017-03-02

资助 山东省自然科学基金(ZR2013CQ028)、青岛市应用基础研究计划(16-5-1-54-jch)和青岛农业大学博士基金(663/1111316)。

* 通讯作者(E-mail: songwenwen2002@163.com)。

菜*SoCYP85A1*基因的烟草种子。

2 转基因烟草的分子检测

利用经典CTAB法提取烟草基因组DNA, 采用*SoCYP85A1*基因开放阅读框(open reading frame, ORF)的特异性引物(正向引物: 5'-ATGGCCGTTTTTATGGTGGTTTTTGTCTGT-3'; 反向引物: 5'-CTAATAA-CTCGAAACTCGAATGC-3')进行PCR扩增, 1%琼脂糖电泳检测目的条带, 筛选出基因组中有*SoCYP85A1*基因整合的烟草植株。利用Plant RNA Kit (OMEGA, 美国)试剂盒提取烟草RNA, 经gDNA酶消化处理, 反转录后用*SoCYP85A1*基因ORF区特异性引物进行RT-PCR, 选用烟草*NtActin*基因作为内参基因, 1%琼脂糖电泳检测结果, 以验证*SoCYP85A1*基因是否能在烟草中正常表达。

3 发芽率的测定

配制NaCl浓度为0.2 mol·L⁻¹的MS培养基, 以不加NaCl的MS培养基为对照。取圆润饱满的野生型烟草和转*SoCYP85A1*基因烟草T₃代种子, 分别放入1.5 mL灭菌离心管中。依次采用70%的乙醇、3%的次氯酸钠和无菌水进行种子消毒。将消毒后的种子接种至NaCl浓度为0.2 mol·L⁻¹的MS培养基中, 以不加NaCl的MS培养基中的相同类型的种子为对照, 每个处理5个培养皿, 每个培养皿平均分布9粒种子, 3次重复实验。将其置于光照培养箱中培养(25°C, 湿度60%, 16 h光照/8 h黑暗, 光照强度36 μmol·m⁻²·s⁻¹), 观察生长状况, 7 d后统计发芽率。

4 高盐胁迫下野生型和转基因烟草的生理指标测定

将野生型和转基因烟草种子在上述培养条件

下培养至七叶期, 各取15棵幼苗为实验材料。每棵苗浇100 mL浓度为0.2 mol·L⁻¹的NaCl溶液, 每隔一天浇一次, 10 d后剪取相同部位的健康叶片, 立即液氮速冻, 迅速转移至-80°C冰箱中保存备用。以上述烟草叶片为实验材料, 测定SOD、POD、CAT的活性及Pro和MDA的含量。根据试剂盒(南京建成生物研究所, 试剂盒货号A001-4、A084-3、A007-1、A107、A003-3)说明书进行测定。

5 胁迫相关基因的表达分析

取胁迫处理前后的样品, 在液氮中迅速研磨成粉末, 使用Plant RNA Kit (OMEGA, 美国), 按照操作手册从烟草叶片中提取RNA; 使用Prime-Script™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (宝生物工程(大连)有限公司), 按照操作手册将RNA反转录为cDNA (统一浓度为100 ng·μL⁻¹); 基因特异性引物(表1)设计由Primer 5.0和NCBI在线引物设计完成。

qRT-PCR分析使用TaKaRa SYBR Green PCR Master Mix试剂盒, 在德国耶拿的qTOWER实时定量PCR系统中进行, 10 μL的PCR反应体系包括5 μL 2×SYBR® Premix Ex Taq II、1 μL上下游引物、1 μL模板(反转录cDNA)、2 μL ddH₂O。PCR反应程序为: 95°C变性5 min; 95°C 10 s, 引物退火温度30 s, 72°C 30 s, 共40个循环。以*NtActin*为内参基因, 样品设3次重复。

6 数据处理

所有试验数据均由3次重复实验获得, 差异显著性分析采用SPSS 16.0软件, 应用最小显著性差数法(LSD)进行单因素方差分析; Duncan多重比较分析, 显著性水平为P<0.05。

表1 用于实时定量PCR分析的引物信息

Table 1 Genes specific primers used for quantitative RT-PCR analysis

基因名称	引物序列(5'→3')		产物长度/bp	退火温度/°C
	正向	反向		
<i>NiNCED1</i>	CTATTTCCAACCTCAAAAACCAACCAC	GGCACTTTCCACGGCATCT	131	62
<i>NiADC1</i>	GGGAGGTAATGTTGGGGTTTG	TTTTGAGCAGCCGAGGTGT	306	62
<i>NiSAMDC</i>	ATTGGTTTTGAAGTTTTGAGAAG	TCACGTCTTGACTTTGAGAGACAG	313	60
<i>NiAPX</i>	CAAATGTAAGAGGAAACTCAGAGGA	AGCAACAACCTCCAGCTAATTGATAG	262	60
<i>NiCAT</i>	AGGTACCGCTCATTACACACC	AAGCAAGCTTTTGACCCAGA	151	60
<i>NiGST</i>	GGCAACAAAAGGAGAAGAGCA	CCAATCAGAGCAATATCCACAAAC	135	62
<i>NiSOD</i>	CCGTCGCCAAAATTGCATAG	CGATAGCCCAACCAAGAGAAC	238	62
<i>NiERD10C</i>	ACGTGGAGGCTACAGATCGTGGTTTG	TCTCCACTGGTACAGCCGTGTCCTCAC	366	70
<i>NiLEA5</i>	GAACCCAACAAGAGCGAGAGA	CGACAGGAAGCATTGACGAG	350	62
<i>NtActin</i>	CAAGGAAATCACCGCTTTGG	AAGGGATGCGAGGATGGA	106	60

实验结果

1 转基因烟草的分子检测

剪取烟草叶片, 提取基因组DNA, 用目的片段引物进行PCR检测, 1%琼脂糖电泳出现目的条带, 大小为1 410 bp (图1-A), 表明*SoCYP85A1*基因已经成功整合到烟草基因组中。进一步提取植株RNA, 进行RT-PCR检测(图1-B), 结果显示*SoCYP85A1*基因能够在烟草中正常表达。

2 高盐胁迫下野生型和转基因烟草发芽率的比较

由图2可见, 在对照和含0.2 mol·L⁻¹ NaCl的MS培养基上培养的野生型烟草种子发芽率均低于转

基因烟草种子, 并且在0.2 mol·L⁻¹ NaCl的胁迫处理下, 野生型烟草种子的发芽率同未处理前相比显著降低, 而转基因烟草种子的发芽率差异不显著。

3 高盐胁迫对烟草生理指标的影响

3.1 高盐胁迫下烟草的SOD、POD和CAT活性

在高盐胁迫处理前, 野生型和转基因烟草的SOD活性基本一致; 高盐胁迫处理10 d后, 野生型烟草的SOD活性由1 259.2 U·g⁻¹ (FW)下降至822.65 U·g⁻¹ (FW), 下降了34.67%, 而转基因型烟草的SOD活性相比较来说变化不太明显, 下降了9.34%, 转基因烟草的SOD活性显著高于野生型(图3-A)。

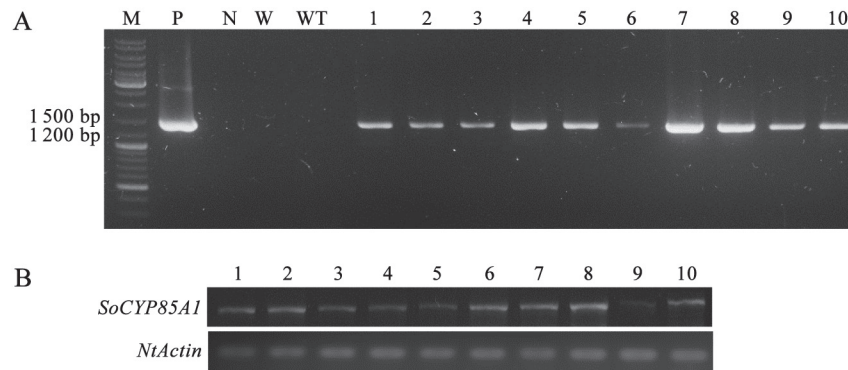


图1 转基因烟草植株的分子鉴定

Fig.1 Molecular identification of transgenic tobacco lines

A: 转基因烟草植株的PCR鉴定; B: 转基因烟草植株的RT-PCR表达分析。M: 分子标尺; P: 质粒; N: 空载体; W: 双蒸水; WT: 野生型; 1~10: 转基因株系。

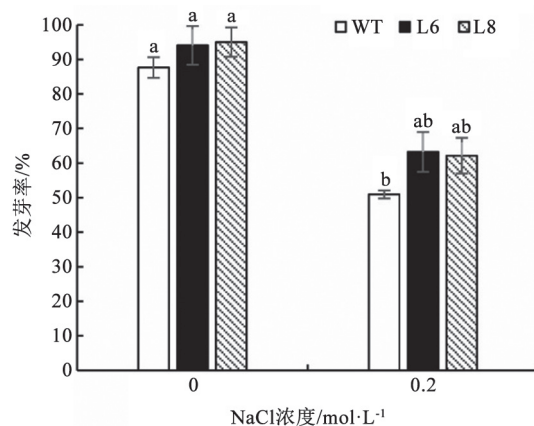


图2 高盐胁迫前后野生型和转基因型种子的发芽率

Fig.2 Seed germination rates of wild type and transgenic lines before and after high-salt stress

各柱形上不同小写字母表示在 $P < 0.05$ 水平上差异显著。WT: 野生型; L6和L8: 转基因型。图3~5同。

高盐胁迫处理前, 野生型烟草的POD活性低于转基因烟草; 高盐胁迫处理10 d后, 野生型烟草的POD活性下降了约2倍, 而转基因烟草的POD活性一直保持较高水平, 转基因型烟草的POD活性约为野生型的3倍(图3-B)。

在高盐胁迫处理前, 野生型和转基因烟草的CAT活性都很低; 高盐胁迫处理10 d后, 转基因烟草的CAT活性升高约4.5倍, 而野生型烟草的CAT活性仅升高约1.6倍, 转基因烟草的CAT活性显著高于野生型, 约为野生型的3倍(图3-C)。

3.2 高盐胁迫下烟草的Pro和MDA含量

在高盐胁迫处理前, 野生型和转基因烟草的Pro含量都很低; 高盐胁迫处理10 d后, 野生型烟草和转基因烟草的Pro含量都升高, 但是野生型烟草的Pro含量升高不显著, 而转基因烟草的Pro含量升

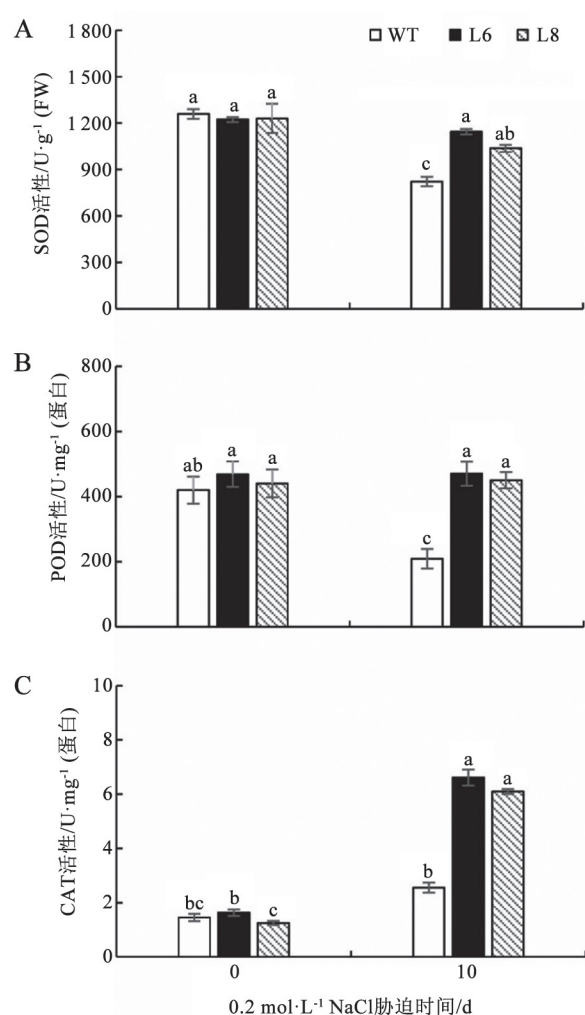


图3 高盐胁迫前后野生型和转基因烟草的SOD、POD和CAT活性

Fig.3 SOD, POD and CAT activities of wild type and transgenic lines before and after high-salt stress

高至少3倍, 转基因型烟草的Pro含量远高于野生型(图4-A)。

在高盐胁迫处理前, 野生型和转基因烟草的MDA含量相差不大; 在高盐胁迫处理10 d后, 野生型烟草的MDA含量升高了83.41%, 而转基因烟草的MDA含量升高了27.63%, 野生型烟草的MDA含量明显高于转基因烟草(图4-B)。

4 高盐胁迫对9个胁迫相关基因表达的影响

为了揭示转基因型烟草的耐盐分子机制, 在高盐胁迫下, 对9个胁迫相关基因进行实时定量PCR分析其表达量。这9个胁迫相关基因分别是ABA合成关键酶基因(*NtNCED1*)、多胺类物质合成的关

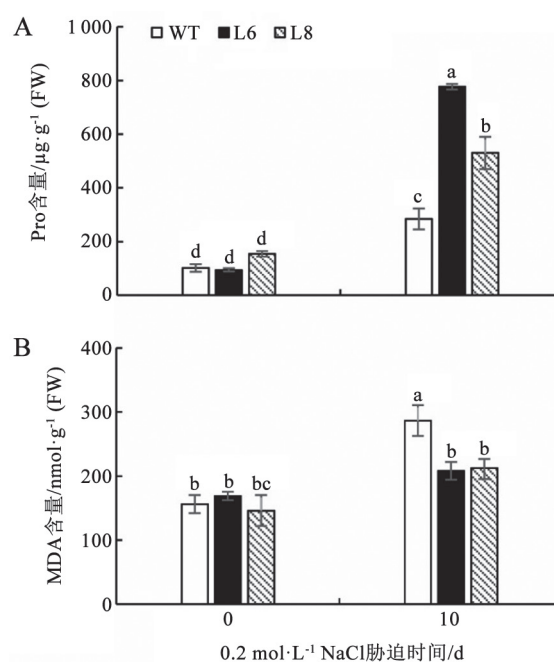


图4 高盐胁迫前后野生型和转基因烟草的Pro和MDA含量
Fig.4 Pro and MDA contents of wild type and transgenic lines before and after high-salt stress

键酶基因(*NtADC1*和*NtSAMDC*)、活性氧解毒酶的合成关键酶基因(*NtAPX*、*NtCAT*、*NtGST*和*NtSOD*), 以及逆境响应蛋白的合成关键酶基因(*NtERD10C*和*NtLEA5*)。结果显示: 高盐胁迫处理后, 转基因烟草中这9个胁迫相关基因的表达倍数都增加。另外, 同野生型烟草相比, 转基因烟草中*NtADC1*、*NtAPX*、*NtCAT*、*NtLEA5*、*NtGST*、*NtSOD*和*NtERD10C*的表达倍数显著增加, 而*NtNCED1*和*NtSAMDC*的表达倍数增加不明显(图5)。

讨 论

1 高盐胁迫下的种子发芽率

BRs具有促进种子萌发和减轻幼苗生长期间的盐抑制作用, 缓解盐害对植物体的影响(Bajguz和Hayat 2009; 吴雪霞等2011)。*CYP85A1*基因编码的酶是BRs生物合成的关键酶, 过量表达*CYP85A1*基因可以增加植物内源BRs含量(Li等2016)。本研究发现: 在不含NaCl的MS培养基上, 转基因烟草种子的发芽率略高于野生型, 而在盐浓度为0.2 mol·L⁻¹的MS培养基上, 转基因烟草种子的发芽率显著高于相同处理下的野生型烟草种子。推测原因可能

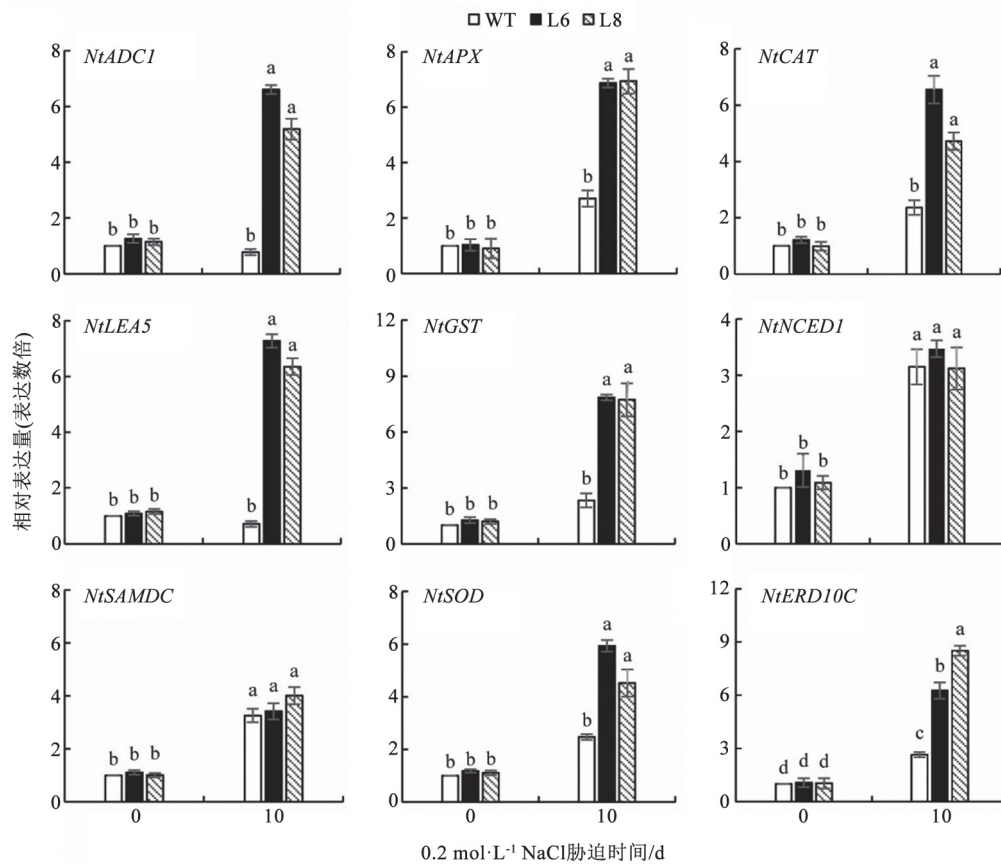


图5 高盐胁迫前后野生型和转基因烟草的9个胁迫相关基因的表达

Fig.5 Expression profiles of the nine stress-responsive genes in wild type and transgenic lines before and after high-salt stress

是：处理前，转基因烟草种子的BRs含量稍高于野生型，从而使得转基因烟草种子的发芽率略高于野生型；而高盐胁迫处理诱导了转基因烟草种子的BRs显著增加，促进了转基因烟草种子响应高盐胁迫有更强的耐受力。上述结果表明BRs是一类胁迫诱导型的次生代谢产物，这与Gruszka等(2016)的研究结果一致。这一推测还需要测定野生型和转基因烟草的BRs含量来证实。

2 高盐胁迫下野生型和转基因烟草生理指标的变化

植物在受到非生物胁迫后可以通过抗氧化酶防御系统来保护自身免受伤害(陈晓丽等2015)。在盐胁迫下，植物体内抗氧化酶基因的表达产物能够相互协同清除过量的活性氧，保护和稳定蛋白复合体和膜结构，从而提高细胞耐脱水能力(孙瑞芬等2015)。SOD是抵御活性氧伤害的第一道防线(丁林云等2014)，POD协同SOD消除植物体内氧自由基(Li等2016)，CAT也是消除活性氧的重要酶(孙瑞芬等2015)。本研究发现：高盐胁迫处理前，

野生型和转基因烟草的SOD、POD和CAT活性基本一致，而高盐胁迫处理后，转基因烟草的SOD、POD和CAT活性均显著高于野生型，证实转基因烟草在高盐胁迫下消除氧自由基的能力远高于野生型，能更好地缓解盐胁迫对细胞的毒害作用，从而提高了对高盐胁迫的耐受性。

Pro和MDA的含量也是反映植物抗逆水平的重要指标(Li等2016)。本研究结果发现高盐胁迫处理前，野生型和转基因烟草的Pro含量差异不显著，表明植物在正常条件下Pro含量很低，但遇到高盐胁迫时，二者Pro含量显著增加，这与秦利军等(2015)和Krasensky和Jonak(2012)的结果一致，并且转基因烟草体内的Pro积累量显著高于野生型。MDA是植物脂质过氧化的产物，是检测植物膜伤害的一个重要指标，其含量可以表示膜脂过氧化的程度(陈晓丽等2015)。高盐胁迫处理后野生型烟草中MDA含量同胁迫前相比显著增加，而转基因烟草的MDA含量在胁迫前后无明显差异，说明

转基因烟草细胞的膜脂过氧化程度较轻, 通过自身调节能力及时消除MDA, 保护细胞避免伤害。可见, *SoCYP85A1*基因的过量表达可延缓由于盐胁迫引起的植物体内Pro含量下降及脂膜氧化产物MDA的积累。

3 高盐胁迫下胁迫相关基因的表达情况

植物在受到非生物胁迫后通过调节逆境响应基因的表达, 形成植物抗逆的分子机制(Umezawa等2006; Chinnusamy等2007; Hirayama等2010)。本研究发现转基因烟草的活性氧解毒酶基因(*NtAPX*、*NtCAT*、*NtGST*和*NtSOD*)的表达倍数显著增加, 这与在其体内检测到的抗氧化酶在胁迫后仍保持高活性的结果一致。在逆境条件下, 保护生物大分子及膜结构的蛋白基因主要是LEA蛋白基因家族(Xiong等2002; Liu等2013), *NtERD10C*和*NtLEA5*属于LEA蛋白基因家族, 这两个基因的表达量显著增加有助于减轻转基因烟草因盐胁迫脱水引起的离子强度增大对生物膜和功能蛋白的毒害, 提高转基因烟草的耐盐性。*NtNECD1*调节ABA的生物合成, 但其表达倍数增加不显著, 表明*SoCYP85A1*基因增加转基因烟草的耐盐性是通过不依赖ABA的调节途径。Divi等(2010)也曾证实ABA不参与BRs调节植物胁迫应答进程。

参考文献

- Bajguz A, Hayat S (2009). Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses. *Plant Physiol Bioch*, 47: 1–8
- Bancos S, Nomura T, Sato T, Molnár G, Bishop GJ, Konec C, Yokota T, Nagy F, Szekeres M (2002). Regulation of transcript levels of the *Arabidopsis* cytochrome P450 genes involved in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Physiol*, 130 (1): 504–513
- Chen XL, Li HB, Sun ZM, Li MJ, Li YL, Kwak SS, Deng XP (2015). Overexpression of *IbMYB1* gene enhanced tolerance to soil drought stress in sweet potato. *Plant Physiol J*, 51 (9): 1440–1446 (in Chinese with English abstract) [陈晓丽, 李红兵, 孙振玫, 李孟洁, 李雨霖, 郭尚洙, 邓西平(2015). 过表达*IbMYB1*基因甘薯增强了对土壤干旱胁迫的抗性. *植物生理学报*, 51 (9): 1440–1446]
- Dhaubhadel S, Krishna P (2008). Identification of differentially expressed genes in brassinosteroid-treated *Brassica napus* seedlings. *J Plant Growth Regul*, 27: 297–308
- Ding LY, Zhang W, Wang JC, Tian LL, Li NN, Guo Q, Yang SM, He ML, Guo W (2014). Overexpression of a *Gossypium hirsutum* stress-associated protein gene (*GhSAPI*) improves salt stress tolerance in transgenic tobacco. *Sci Agric Sin*, 47 (8): 1458–1470 (in Chinese with English abstract) [丁林云, 张微, 王晋成, 田亮亮, 李妮娜, 郭琪, 杨淑明, 何曼林, 郭旺珍(2014). 过量表达棉花*GhSAPI*提高转基因烟草的耐盐性. *中国农业科学*, 47 (8): 1458–1470]
- Divi UK, Krishna P (2009). Brassinosteroid: a biotechnological target for enhancing crop yield and stress tolerance. *New Biotechnol*, 26: 131–136
- Divi UK, Rahman T, Krishna P (2010). Brassinosteroid-mediated stress tolerance in *Arabidopsis* shows interactions with abscisic acid, ethylene and salicylic acid pathways. *BMC Plant Biol*, 10: 151
- Goetz M, Godt DE, Roitsch T (2000). Tissue-specific induction of the mRNA for an extracellular invertase isoenzyme of tomato by brassinosteroids suggests a role for steroid hormones in assimilate partitioning. *Plant J*, 22: 515–522
- Gruszka D (2013). The brassinosteroid signaling pathway—new key players and interconnections with other signaling networks crucial for plant development and stress tolerance. *Int J Mol Sci*, 14: 8740–8774
- Gruszka D, Janeczko A, Dziurka M, Pocięcha E, Oklestkova J, Szarejko I (2016). Barley brassinosteroid mutants provide an insight into phytohormonal homeostasis in plant reaction to drought stress. *Front Plant Sci*, 7: 1824
- Kim TW, Chang SC, Lee JS, Takatsuto S, Yokota T, Kim SK (2004). Novel biosynthetic pathway of castasterone from cholesterol in tomato. *Plant Physiol*, 135 (3): 1231–1242
- Krasensky J, Jonak C (2012). Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *J Exp Bot*, 63 (4): 1593–1608
- Li H, Zuo QY, Tu SB (2015). Advances in brassinosteroid biosynthesis and metabolism. *Plant Physiol J*, 51 (11): 1787–1798 (in Chinese with English abstract) [李辉, 左钦月, 涂升斌(2015). 油菜素内酯生物合成和代谢研究进展. *植物生理学报*, 51 (11): 1787–1798]
- Li T, Sun JK, Bi YP, Peng ZY (2016). Overexpression of an MYB-related gene *FvMYB1* from *Fraxinus velutina* increases tolerance to salt stress in transgenic tobacco. *J Plant Growth Regul*, 35 (3): 1–14
- Li XJ, Chen XJ, Guo X, Yin LL, Ahammed GJ, Xu CJ, Chen KS, Liu CC, Xia XJ, Shi K, et al (2016a). *DWARF* overexpression induces alteration in phytohormone homeostasis, development, architecture and carotenoid accumulation in tomato. *Plant Biotechnol J*, 14: 1021–1033
- Li XJ, Guo X, Zhou YH, Shi K, Zhou J, Yu JQ, Xia XJ (2016b). Overexpression of a brassinosteroid biosynthetic gene *Dwarf* enhances photosynthetic capacity through activation of calvin cycle enzymes in tomato. *BMC Plant Biol*, 16 (1): 1–12
- Lu XM, Yang W (2013). Alleviation effects of brassinolide on cucumber seedling under NaCl stress. *Chin J Appl Ecol*, 24 (5): 1409–1414 (in Chinese with English abstract) [陆晓民, 杨威(2013). 油菜素内酯对氯化钠胁迫下黄瓜幼苗的缓解效应. *应用生态学报*, 24 (5): 1409–1414]
- Nomura T, Kushiro T, Yokota T, Kamiya Y, Bishop GJ, Yamaguchi S (2005). The last reaction producing brassinolide is catalyzed by cytochrome P-450s, *CYP85A3* in tomato and *CYP85A2* in *Arabidopsis*. *J Biol Chem*, 280 (18): 17873–17879

- Qin LJ, Song LL, Zhao D, Zhao DG (2015). Overexpression of *Nicotiana tabacum* high-affinity potassium ion transporter protein gene (*HAK1*) improves the salt-tolerance in tobacco (*N. tabacum*) plants. *J Agric Biotechnol*, 23 (12): 1576–1587 (in Chinese with English abstract) [秦利军, 宋拉拉, 赵丹, 赵德刚(2015). 超量表达烟草高亲和钾离子转运体蛋白基因(*NtHAK1*)提高烟草盐胁迫能力. 农业生物技术学报, 23 (12): 1576–1587]
- Shahbaz M, Ashraf M, Athar HR (2008). Does exogenous application of 24-epibrassinolide ameliorate salt induced growth inhibition in wheat (*Triticum aestivum* L.)? *J Plant Growth Regul*, 55: 51–64
- Shimada Y, Fujioka S, Miyauchi N, Kushiro M, Takatsuto S, Nomura T (2001). Brassinosteroid-6-oxidases from *Arabidopsis* and tomato catalyze multiple C-6 oxidations in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Physiol*, 126: 770–779
- Shu HM, Guo SQ, Gong YY, Ni WC (2016). Effects of brassinolide on leaf physiological characteristics and differential gene expression profiles of NaCl-stressed cotton. *Chin J Appl Ecol*, 27 (1): 150–156 (in Chinese with English abstract) [束红梅, 郭书巧, 巩元勇, 倪万潮(2016). 油菜素内酯对NaCl胁迫下棉花叶片生理特征和基因表达谱的影响. 应用生态学报, 27 (1): 150–156]
- Sun RF, Zhang YF, Guo SC, Yu HF, Li SP, Qian HL, Nie H, An YL (2015). Differentially expressed analysis on the responsive genes to salt stress in sunflower by cDNA-AFLP. *China Biotech*, 35 (1): 34–40 (in Chinese with English abstract) [孙瑞芬, 张艳芳, 郭树春, 于海峰, 李素萍, 乔慧蕾, 聂惠, 安玉麟(2015). 向日葵盐胁迫相关基因的cDNA-AFLP差异表达. 中国生物工程杂志, 35 (1): 34–40]
- Udawat P, Jha RK, Sinha D, Mishra A, Jha B (2016). Overexpression of a cytosolic abiotic stress responsive universal stress protein (SbUSP) mitigates salt and osmotic stress in transgenic tobacco plants. *Front Plant Sci*, 7 (14): 518
- Wang XT, Zeng J, Li Y, Rong XL, Sun JT, Sun T, Li M, Wang LZ, Feng Y, Chai RH, et al (2015). Expression of *TaWRKY44*, a wheat *WRKY* gene, in transgenic tobacco confers multiple abiotic stress tolerances. *Front Plant Sci*, 6: 615
- Wu XX, Zha DS, Zhu ZW, Li X (2011). Effects of exogenous 24-epibrassinolide on seed germination, physiological characteristics of eggplant seedlings under NaCl stress. *Plant Physiol J*, 47 (6): 607–612 (in Chinese with English abstract) [吴雪霞, 查丁石, 朱宗文, 李贤(2011). 外源24-表油菜素内酯对盐胁迫下茄子种子萌发和幼苗生理特性的影响. 植物生理学报, 47 (6): 607–612]
- Yang HX, Kong YR, Cui SJ, Zhao HT (2016). The phenotype of *lfr* mutant under salt stress in *Arabidopsis*. *Plant Physiol J*, 52 (9): 1371–1378 (in Chinese with English abstract) [杨红霞, 孔雅然, 崔素娟, 赵红桃(2016). 拟南芥*lfr*突变体盐胁迫表型分析. 植物生理学报, 52 (9): 1371–1378]
- Zhu JK (2001). Plant salt tolerance. *Trends Plant Sci*, 6: 66–71

Overexpression of *SoCYP85A1* gene from *Spinacia oleracea* enhances high-salt tolerance in tobacco

LU Xue-Li, DUAN Fang-Meng, WAN Fang-Yuan, LI Bao-Du, SONG Wen-Wen*

College of Agronomy and Plant Protection, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109, China

Abstract: Transgenic tobacco plants which stably overexpressed spinach *SoCYP85A1* gene were used as plant materials in our study. Both wild types and transgenic lines were analyzed before and after high-salt stress. The results showed that the germination rate of transgenic plants was significantly higher than that of wild type. Under the treatment, activities of SOD, POD and CAT of the two types were increased, and the activities of the three enzymes in transgenic lines were notably enhanced compared with wild type. The contents of proline of the two types were raised, and proline accumulation of the transgenic type was much more than that of the wild type, while the MDA content of the transgenic type was less than that of the wild type. High-salt stress induced upregulation of nine stress-responsive genes at transcriptional level, among which, expressions of *NtADC1*, *NtAPX*, *NtCAT*, *NtLEA5*, *NtGST*, *NtSOD* and *NtERD10C* were significantly increased in transgenic lines compared with wild types, with exception of *NtNCED1* and *NtSAMDC*. The results indicated that overexpression of *SoCYP85A1* gene could improve the salt tolerance in tobacco via enhancing antioxidant capacity and regulating expressions of stress-responsive genes. This research laid the theoretical foundation for further exploration of salt tolerance mechanism of *SoCYP85A1* in spinach.

Key words: *SoCYP85A1* gene; high-salt stress; overexpression; qRT-PCR

Received 2017-01-04 Accepted 2017-03-02

This work was supported by Shandong Province Natural Science Foundation (Grant No. ZR2013CQ028), Qingdao Applied Basic Research Plan (Grant No. 16-5-1-54-jch) and Qingdao Agricultural University Doctor Fund (Grant No. 663/1111316).

*Corresponding author (E-mail: songwenwen2002@163.com).