

过量表达 *SaSOS1* 水稻的幼苗鉴定 及生理特性分析

权 庚,张 侠,尹海波,郭善利*
(烟台大学 生命科学学院,山东 烟台 264005)

摘要: 为研究泌盐盐生植物互花米草(*Spartina alterniflora*)*SOS1* 基因的功能及抗逆机制,对过量表达 *SaSOS1* 的 T_3 代纯合转基因水稻株系幼苗进行了鉴定及生理特性分析。分子鉴定和表型鉴定显示,转基因株系 13-4、15-6、16-1、16-2、19-4、19-6 为阳性转基因株系,其中 13-4、16-2 株系在 250 mmol/L NaCl 处理下表现出更强的耐盐性。生理特性分析表明,与野生型日本晴株系相比,转基因株系 13-4、16-2 植株叶片含水量较高,可溶性糖含量较高,并维持了较低的 MDA 含量和电导率。说明转基因株系能有效减少盐胁迫伤害,保持较好的生长状态。
关键词: 水稻幼苗; 过量表达; 互花米草 *SOS1* 基因; 盐胁迫; 抗逆机制
中图分类号: S511 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2015)03-0014-05

Identification and Physiological Characterization of Rice Seedlings Overexpressing *SaSOS1*

QUAN Geng,ZHANG Xia,YIN Haibo,GUO Shanli*
(Life Science College,Yantai University,Yantai 264005,China)

Abstract: To identify the function of *SOS1* genes in halophytes *Spartina alterniflora* and resilience mechanisms,the transgenic rice seedlings overexpressing *SaSOS1* were analyzed. Molecular identification and phenotypic identification showed that the transgenic lines 13-4,15-6,16-1,16-2,19-4,19-6 were positive. The lines 13-4,16-2 were treated with 250 mmol/L NaCl,showing greater salt tolerance. Physiological characteristics analysis showed that,compared with the wild type *Nipponbare* plants,13-4 and 16-2 plants had high moisture content,high glucose levels,and maintained low MDA content and conductivity. It can be seen that transgenic lines can effectively reduce the salt stress injury and keep good growth state.
Key words: rice seedlings; overexpression; spartina *SOS1* gene; salt stress; resilience mechanisms

盐胁迫是影响植物生长、发育和产量的主要环境胁迫因子之一,可以造成植物细胞脱水,膜系统损伤,膜上酶的活性紊乱,各种代谢活动紊乱等^[1]。植物体中 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白(*SOS1* 和 *NHX1*)可以调节 Na^+ 外排和区隔化,从而维持细胞质中合

适的离子浓度,减少离子毒害对植物的损伤。所以 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白的功能、与植物耐盐性的关系及其分子生物学成为研究的热点问题。Zhu^[2] 利用化学诱变、T-DNA 插入诱变等手段得到 40 多个拟南芥 *sos* 突变体,鉴定出 5 个与耐盐

收稿日期:2014-11-26
基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(31000128,31201185,31370296);山东省自然科学基金青年基金项目(ZR2011CM044);山东省优秀中青年科学家科研奖励基金项目(BS2010SW036);中国农业大学植物生理学与生物化学国家重点实验室开放课题(SKLPBKF1402)
作者简介:权 庚(1991-),女,安徽宿州人,在读硕士研究生,研究方向:植物抗逆生理。E-mail:quangeng910404@163.com
* 通讯作者:郭善利(1964-),男,山东聊城人,教授,博士,主要从事植物发育分子生物学研究。E-mail:gsl@ytu.edu.cn
网络出版时间:2015-03-11 16:58:00
网络出版地址: <http://www.cnki.net/KCMS/detail/41.1092.S.20150311.1658.001.html>

相关的基因,即 *SOS1*、*SOS2*、*SOS3*、*SOS4*、*SOS5*,同时提出了 SOS 信号通路。2000 年,Shi 等^[3]从拟南芥中克隆了 *SOS1* 基因,它是第 1 个从高等植物中克隆到的编码质膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白的基因。拟南芥 *sos* 突变体对盐超敏感,说明 *SOS1* 基因在植物耐盐机制中起重要作用。质膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白 *SOS1* 参与 Na^+ 的外排,同时也调控从根部向地上部分的运输,对植物的耐盐性起着非常重要的作用^[4]。Zhang 等^[5]、Apse 等^[6]利用拟南芥的 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白 *AtNHX1* 的过量表达显著提高转基因拟南芥、番茄 (*Lycopersicon esculentum*) 以及油菜 (*Brassica campestris*) 的耐盐性。近年来,陆续在小麦 (*Triticum aestivum*)、棉花 (*Gossypium hirsutum*) 等农作物^[7-8] 及小盐芥 (*Thellungiella halophila*)、盐地碱蓬 (*Suaeda salsa*) 等耐盐植物^[9-10] 中分离出 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白 (*NHX1*) 基因,这些液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因对于改造农作物的耐盐性状有极其重要的作用^[11]。

互花米草 (*Spartina alterniflora*) 是高度耐盐的泌盐盐生植物,其体内的 *SOS1* 基因 (*SaSOS1*) 是重要的耐盐基因。本研究对过量表达 *SaSOS1* 的转基因水稻株系进行表型鉴定,并分析盐胁迫下转基因水稻幼苗的耐盐生理特性,为进一步挖掘 *SOS1* 的功能,以及摸清盐生植物的耐盐机制提供重要依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

以本单位实验室通过农杆菌介导法获得的 *Sa-SOS1* 过表达转基因水稻株系 (13-4、15-6、16-1、16-2、19-4、19-6) 和对照组野生型日本晴水稻 (*Nipponbare*) 幼苗为试验材料。

1.2 试验方法

转基因水稻的分子检测主要以过表达转基因水稻植株叶片的基因组 DNA 为模板,利用过表达载体上的筛选标记潮霉素基因的引物进行 PCR 检测。

盐胁迫处理采用 250 mmol/L NaCl 溶液对生长 2 周左右、长势一致的幼苗进行浇灌,处理时间分别为 0 h、12 h、24 h、48 h、72 h、96 h,每个处理重复 3 次,每个重复约 10 棵幼苗。进行表型鉴定,并选择生长状态良好的株系进行生理生化指标测定。

丙二醛 (MDA) 含量的测定采用硫代巴比妥酸 (TBA) 法^[12],可溶性糖含量测定采用蒽酮比色法^[13]。将 MDA、含水量 (烘干称质量法) 测定结果与表型鉴定结果相一致的株系进行可溶性糖和电导率的测定。

2 结果与分析

2.1 转基因水稻的分子检测

用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测,目的产物为潮霉素基因片段,大小约为 500 bp。如图 1 所示,对照组野生型日本晴中无扩增产物,转基因株系 1-5、14-3 没有扩增产物,确定为假阳性,其他株系扩增得到目的产物,确定为阳性转基因株系,并选择 13-4、15-6、16-1、16-2、19-4、19-6 株系进行后续表型鉴定。

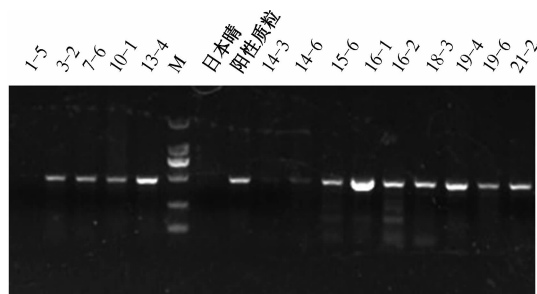
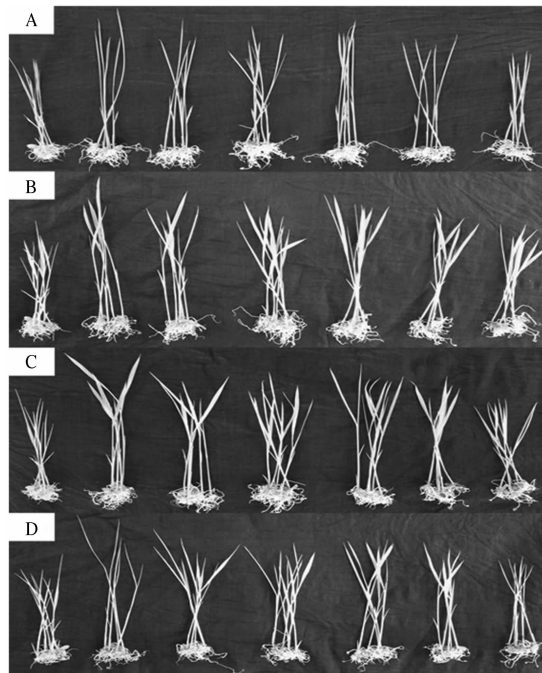


图 1 转基因水稻鉴定结果

2.2 转基因水稻幼苗的表型鉴定

选取长势一致的 2 叶 1 心期的水稻幼苗进行盐处理后,对表型进行鉴定。野生型日本晴和转基因株系 13-4、15-6、16-1、16-2、19-4、19-6,在 250 mmol/L NaCl 处理 12 h、24 h 时表型差异不明显,48 h 后出现表型差异,并且随着处理时间的增加,各水稻株系的叶片都有不同程度的卷曲和变黄 (图 2),以具有明显差异的 48 h、96 h 为例说明 (表 1)。



从左到右依次为日本晴、13-4、15-6、16-1、16-2、19-4、19-6, A~D 分别处理 0 h、48 h、72 h、96 h
图 2 日本晴和转基因株系在 250 mmol/L NaCl 处理不同时间后的生长情况

表 1 盐胁迫处理 48、96 h 后各株系的表型调查结果

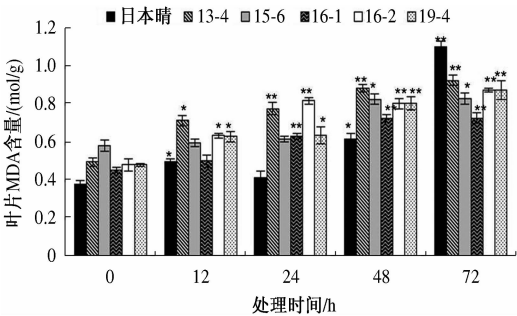
处理 时间/h	野生型	13 - 4	15 - 6	16 - 1	16 - 2	19 - 4	19 - 6
48	第 1、2 片叶发黄	第 1 片叶发黄	第 1 片叶发黄， 第 2 片叶叶尖发黄	第 1 片叶发黄， 第 2 片叶叶尖发黄	第 1 片叶发黄	第 1 片叶发黄， 第 2 片叶叶尖发黄	第 1、2 片叶发黄
96	整株卷成筒状， 且第 2 片干枯严重； 生长减慢	整株叶几乎全卷， 第 2 片叶枯半， 部分心叶长， 但未展开	整株叶几乎全卷， 且第 2 片叶枯半； 生长减慢	整株叶几乎全卷， 且第 2 片叶枯半； 生长减慢	第 1 片叶干枯， 第 2 片叶半卷干枯； 部分心叶生长展开	整株叶几乎全卷， 且第 2 片叶枯半； 生长减慢	整株卷成筒状， 且干枯严重； 生长减慢

处理 48 h 后,野生型和转基因株系 19 - 6 幼苗的第 1 片、第 2 片叶均发黄;而转基因株系 15 - 6、16 - 1、19 - 4 幼苗只有第 1 片叶发黄,第 2 片仅叶尖发黄;转基因株系 13 - 4 和 16 - 2 只有第 1 片叶发黄,第 2 片叶维持正常生长。处理 96 h 后,转基因株系 19 - 6 的叶片完全卷曲,第 2 片干枯严重,表现出生长减慢,与野生型相比没有明显差别;转基因株系 15 - 6、16 - 1、19 - 4 整株叶子几乎全卷,第 2 片叶枯半;但转基因株系 13 - 4 和 16 - 2 仅表现为整株枯黄,并有部分心叶生长。与野生型日本晴相比,19 - 6 株系生长状态较差,其他转基因株系表现出良好的生长状态,其中转基因株系 13 - 4 和 16 - 2 在盐胁迫下表现出更好的生长状态,最终选择 13 - 4、15 - 6、16 - 1、16 - 2、19 - 4 进行生理指标的测定。

2.3 盐胁迫对野生型日本晴和转基因株系 13 - 4、15 - 6、16 - 1、16 - 2、19 - 4 生理特性的影响

2.3.1 MDA 含量 植物在逆境胁迫条件下产生活性氧,过多的活性氧积累会造成膜脂过氧化,其中,MDA 为膜脂过氧化产物之一,通过测定 MDA 的含量可以在一定程度上反映细胞膜在逆境下的损伤程度^[14]。如图 3 可知,在 250 mmol/L NaCl 处理下,各材料 MDA 含量随着时间增加表现为逐步上升的趋势,但变化幅度不尽相同。在 72 h 时达到最大值,野生型日本晴与 0 h 相比增加 192.0%,达到极显著差异;13 - 4 的 MDA 含量与 0 h 相比增加了 87.2%,达到极显著差异;15 - 6 的 MDA 含量与 0 h 相比增加了 43.1%,达显著差异;16 - 1 与 0 h 相比增加了 60.5%,达到极显著差异;16 - 2 的 MDA 含量与 0 h 相比增加了 82.2%,达到极显著差异。这在一定程度上说明 250 mmol/L NaCl 处理对水稻幼苗叶片的细胞膜造成了损伤,与野生型植株相比,转基因植株受损伤程度较小。

2.3.2 叶片含水量 如图 4 所示,随着盐胁迫时间增加,叶片含水量呈现显著下降的趋势,说明盐胁迫



*、** 分别表示与 0 h 差异达 0.05、0.01 显著水平,下同
图 3 不同 NaCl 处理各供试材料叶片 MDA 变化

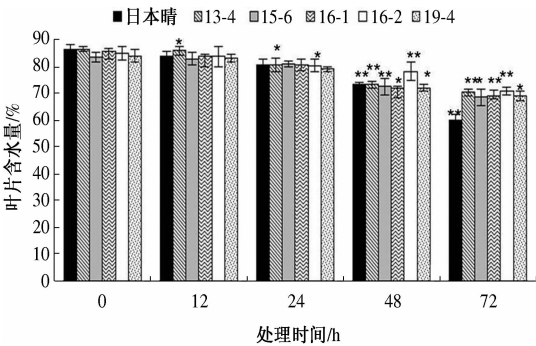


图 4 NaCl 处理各供试材料叶片含水量变化

使植物生长受到抑制。在 72 h 时达到最低点,其中野生型日本晴的含水量与 0 h 相比下降 30.9%,达到极显著差异。而转基因植株的叶片含水量与 0 h 相比下降 20% 左右,其中 13 - 4 含水量与 0 h 相比下降 27.0%,16 - 2 下降 16.6%,均达到极显著差异。可见,在 250 mmol/L NaCl 长时间处理下,植株的生长受到了抑制,但盐胁迫下转基因植株能维持相对较好的生长状态,与表型鉴定结果相一致。

2.3.3 植株电导率 在逆境下,植物细胞膜系统受到破坏,膜的通透性增大,细胞内无机离子及小分子物质外渗^[15-16],导致细胞液的电导率变大,因此,电导率的大小是反映质膜透性的基本生理指标。选取 MDA、叶片含水量测定结果与表型鉴定结果相一致的 13 - 4、16 - 2 株系进行可溶性糖和电导率的测定。对各供试材料叶片电导率测定结果显示(图

5),在短时间处理下供试材料的相对电导率有显著上升,然而随着处理时间的增加,转基因株系增加幅度不再明显,在处理 72 h 时,野生型日本晴叶片相对电导率与 0 h 相比增长 131.0%,13-4 增长 49.4%,16-2 增长 73.6%,均达到极显著性差异。这说明 250 mmol/L NaCl 处理下转基因水稻幼苗与野生型一样,细胞膜都受到了损伤,但长时间处理下转基因株系受到的损伤程度较小。这一结果与 MDA 含量反映的膜受伤的趋势基本一致。

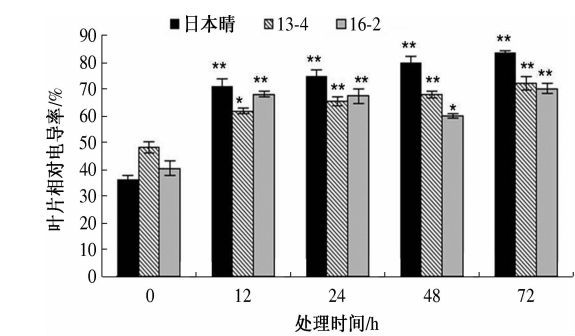


图 5 NaCl 处理各供试材料叶片相对电导率变化

2.3.4 可溶性糖含量 可溶性糖也是植物在逆境胁迫下重要的渗透调节物质之一。由图 6 可知,在 250 mmol/L NaCl 胁迫下,水稻叶片内可溶性糖含量随处理时间出现先上升后下降的趋势,在 48 h 达到最大值。其中,野生型日本晴可溶性糖含量与 0 h 相比增加了 24.3%,达到显著差异;13-4 增加了 41.0%,达到显著差异;16-2 增加了 51.8%,达到极显著差异。其后可溶性糖含量略有下降,但仍比 0 h 有所增加。说明在长时间的盐处理下,转基因株系表现出了较强的适应能力,能有效地通过增加可溶性糖含量进行渗透调节,降低细胞的渗透势,维持更高的细胞膨压。

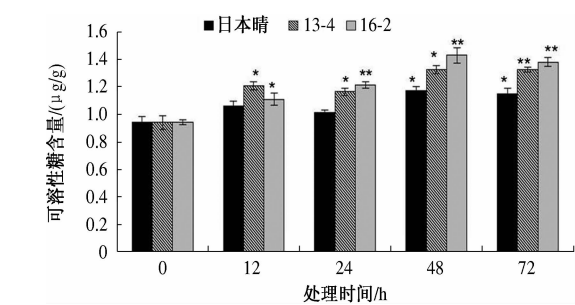


图 6 NaCl 处理各供试材料叶片可溶性糖变化

3 结论与讨论

植物处于逆境时,各种生理生化过程和生长状况会受到不同程度的伤害,最后使植物的生长发育

受到不同程度的抑制。但对于盐生植物互花米草来说,其独特的抗逆机制可以耐受一定程度的逆境胁迫。因此,本研究将本单位实验室获得的过量表达互花米草 *SOS1* 的水稻进行了相关鉴定和生理特性分析。

在本试验中过量表达 *SaSOS1* 的转基因纯合水稻株系的分子鉴定结果显示,转基因株系 13-4、15-6、16-1、16-2、19-4、19-6 为阳性转基因株系。通过表型鉴定和叶片含水量、MDA 的测定发现,250 mmol/L NaCl 处理 48 h 后,与野生型日本晴相比,转基因株系 13-4 和 16-2 只有第 1 片叶发黄,第 2 片叶维持正常生长,而野生型日本晴幼苗的第 1 片、第 2 片叶均发黄;处理 96 h 后,转基因株系 13-4 和 16-2 仅表现为整株枯黄,但有部分心叶生长,而野生型日本晴叶片完全卷曲,第 2 片干枯严重,表现出生长减慢。盐处理下,MDA 含量随着时间增加表现为逐步上升的趋势,在 72 h 时达到最大值,其中 13-4 的 MDA 含量与 0 h 相比增加了 87.2%,16-2 增加了 82.2%,而野生型日本晴增加了 192.0%。可见盐处理对水稻幼苗造成了损伤,但转基因幼苗受到损伤较小。叶片含水量随时间增加呈现显著下降的趋势,在 72 h 时达到最低点,其中转基因 13-4 的含水量与 0 h 相比下降了 27.0%,16-2 下降了 16.6%,而野生型日本晴下降了 30.9%。可见,植株的生长受到了抑制,但转基因植株能维持相对较好的生长状态,与表型鉴定结果相一致。

在短时间处理下供试材料的相对电导率有显著的上升,然而随着处理时间的增加,转基因株系增加幅度不再明显,在处理 72 h 时,野生型日本晴叶片相对电导率与 0 h 相比增长了 131.0%,13-4 增长了 49.4%,16-2 增长了 73.6%,可见长时间的 NaCl 处理下转基因株系受到的损伤程度较小。水稻叶片内可溶性糖含量随处理时间出现先上升后下降的趋势,在 48 h 达到最大值,其中,野生型日本晴可溶性糖含量与 0 h 相比增加了 24.3%,13-4 增加 41.0%,16-2 增加 51.8%。其后可溶性糖含量略有下降,但仍比 0 h 有所增加。可见,转基因株系表现出了较强的适应能力。

综上所述,13-4 和 16-2 株系表现出有较高的叶片含水量和较高的可溶性糖含量,预示着转基因植株在盐胁迫下具有较强的适应能力,可以有效地进行渗透调节,降低损伤程度。同时,与野生型日本晴相比,这 2 个株系表现出较低的 MDA 含量和较低的电导率,说明转基因植株能有效降低膜损伤程

度。可见,过量表达 *SaSOS1* 的转基因水稻株系在盐胁迫下,植株的生长和生理特性明显好于野生型日本晴,*SOS1* 基因可以提高植株耐受盐胁迫的能力,在植物耐受盐胁迫的机制中发挥了重要作用。

参考文献:

- [1] 杨晓慧,蒋卫杰,魏珉,等. 植物对盐胁迫的反应及其抗盐机理研究进展[J]. 山东农业大学学报:自然科学版,2006,37(2):302-305.
- [2] Zhu J K. Genetic Analysis of Plant Salt Tolerance Using *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology, 2000, 124 (3): 941-948.
- [3] Shi H, Ishitani M, Kim C, *et al.* The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene *SOS1* encodes a putative Na^+/H^+ antiporter[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97 (12): 6896-6901.
- [4] 陈敏,李平华,王宝山. Na^+ 转运体与植物的耐盐性[J]. 植物生理学通讯,2007,43(4):617-622.
- [5] Zhang H X, Blumwald E. Transgenic salt-tolerance tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit[J]. Nat Biotechnol,2001,19:765-768.
- [6] Apse M P, Aharon G S, Snedden WA E. Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na^+/H^+ antiporter in *Arabidopsis*[J]. Science,1999,285:1256-1258.
- [7] Wang Z N, Zhang J S, Guo B H. Cloning and characterization of the Na^+/H^+ antiporter genes from *Triticum aestivum* [J]. Acta Botanica Sinica, 2002, 44: 1203-1208.
- [8] Wu C A, Yang G D, Meng Q W. The cotton *GhNHX1* gene encoding a novel putative tonoplast Na^+/H^+ antiporter plays an important role in salt stress[J]. Plant and Cell Physiol,2004,45:600-607.
- [9] Taji T, Seki M, Satou M, *et al.* Comparative genomics in salt tolerance between *Arabidopsis* and *Arabidopsis*-related halophyte salt cress using *Arabidopsis* microarray [J]. Plant Physiol,2004,135:1697-1709.
- [10] Hamada A, Hibino T, Nakamura T, *et al.* Na^+/H^+ antiporter from *Synechocystis species* PCC 6803, homologous to *SOS1*, contains an aspartic residue and long C-terminal tail important for the carrier activity [J]. Plant Physiol,2001,125:437-446.
- [11] 张耿,王赞,关宁,等. 中间偃麦草 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白的分子克隆及生物信息学分析[J]. 遗传,2007,29(10):1263-1270.
- [12] 张志良. 植物生理学实验指导[M]. 北京:高等教育出版社,2009:56-60,103-104.
- [13] 刘宁,高玉葆,贾彩霞,等. 渗透胁迫下多花黑麦草叶内过氧化物酶活性和脯氨酸含量以及质膜相对透性的变化[J]. 植物生理学通讯,2000,36(1):11-14.
- [14] 韩慧玲. 互花米草抗氧化相关基因克隆及功能鉴定[D]. 烟台:烟台大学,2013.
- [15] 伍林涛,杜才富,邵明波. 植物盐胁迫耐受性研究进展[J]. 吉林农业,2010(9):51-52.
- [16] Loustau D, Crepeau S, Guye M G, *et al.* Growth and water relations of three geographically separate origins of maritime pine under saline conditions [J]. Tree Physiology, 1995,15(9):569-576.