

向日葵转录因子*HB-12*的定位分析及过表达验证

孙瑞芬 张艳芳 郭树春 李素萍 于海峰 聂惠 牛素清 乔慧蕾 安玉麟*

(内蒙古农牧业科学院, 呼和浩特 010031)

摘要 向日葵转录因子*HB-12*属于HD-Zip I类转录因子家族, 在植物逆境胁迫应答中发挥着极其重要的作用。该研究构建*HB-12*基因瞬时表达载体并进行亚细胞定位分析, 表明*HB-12*基因定位于细胞核。构建*HB-12*基因植物超表达载体转化野生型烟草获得了转基因植株。进行了NaCl胁迫对转基因烟草耐盐性检测、生理生化指标测定和胁迫相关基因的表达分析。结果表明, NaCl胁迫条件下, 转基因烟草叶色失绿程度较野生型的轻, 分化情况较野生型的好, 生长速度和生根率均较野生型的高; 转基因烟草叶绿素和脯氨酸含量及POD和SOD活性均高于野生型烟草; 与野生型烟草相比, 转基因烟草*P5CS*、*POD*、*MnSOD*和*GuZnSOD*相对表达水平显著提高。这说明, 向日葵*HB-12*在转基因烟草中的过量表达可抑制叶绿素降解酶的活性, 降低叶绿素的分解, 还可诱导脯氨酸合成酶基因*P5CS*及抗氧化相关基因*POD*、*MnSOD*和*GuZnSOD*的上调表达, 促进脯氨酸的生物合成, 增强POD和SOD的活性, 提高烟草抵抗盐害的能力。该研究结果将为进一步探讨植物的耐盐机理及改良作物的耐盐性状奠定基础。

关键词 向日葵; *HB-12*; 亚细胞定位; 过表达; 生理生化特性; 胁迫相关基因

Subcellular Localization Analysis and Overexpression Verification of Transcription Factor *HB-12* from Sunflower (*Helianthus annuus* L.)

Sun Ruifen, Zhang Yanfang, Guo Shuchun, Li Suping, Yu Haifeng, Nie Hui, Niu Suqing, Qiao Huilei, An Yulin*

(Inner Mongolia Academy of Agriculture and Animal Husbandry Sciences, Huhhot 010031, China)

Abstract Transcription factor *HB-12* from sunflower belongs to HD-Zip I transcription factor family and plays an important role in plant stress response. Subcellular localization analysis showed that *HB-12* protein was located in the nucleus. At the same time, the plant superexpression vector of *HB-12* was constructed and tobacco leaves were transformed by *Agrobacterium*-mediated transformation and transgenic plants were obtained. The salt tolerance of transgenic tobacco was tested, the physiological and biochemical indexes were determined and the expression of stress related genes were analyzed under NaCl stress. The results showed that under NaCl stress, the degree of discoloration in transgenic tobacco leaves was lighter than that of in wild type leaves, and the differentiation of transgenic tobacco was better than that of wild type, the growth rate and rooting rate of transgenic tobacco plants were higher compared to that of wild type tobacco; The contents of chlorophyll and proline and the activities of POD and SOD were higher than wild type tobacco. The relative gene expression level of transgenic tobacco were significantly higher than those of wild tobacco. These indicated that overexpression of *HB-12* in tobacco enhanced its NaCl tolerance, which would set the foundation for further study on the mechanism of salt

收稿日期: 2018-05-07 接受日期: 2018-07-09

内蒙古农牧业科技创新基金(批准号: 2013CXJJN14)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0471-5902957, E-mail: nkyanyulin@163.com

Received: May 7, 2018 Accepted: July 9, 2018

This work was supported by the Inner Mongolia Agricultural and Animal Husbandry Science and Technology Innovation Fund Project Council (Grant No.2013CXJJN14)

*Corresponding author. Tel: +86-471-902957, E-mail: nkyanyulin@163.com

网络出版时间: 2018-08-27 15:09:02

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180827.1508.002.html>

tolerance in plants and the improvement of salt-tolerant traits in crops. The overexpression of *HB-12* from sunflower in transgenic tobacco could inhibit the activity of chlorophyll degrading enzyme and decrease the decomposition of chlorophyll. The proline synthase gene *P5CS* and the antioxidant related gene *POD*, *MnSOD* and *GuZnSOD* were induced to up-regulated expression, promoting the biosynthesis of praline and enhancing the activities of *POD* and *SOD*, improving the ability of tobacco to resist salt damage. The results set the foundation for further study in the mechanism of salt tolerance in plants and the improvement of salt-tolerant traits in crops.

Keywords sunflower; *HB-12*; subcellular localization; gene overexpression; physiological and biochemical characteristic; stress related genes

高盐、干旱和低温等非生物胁迫是导致作物减产的重要环境因素,应用现代分子生物学技术克隆、鉴定抗旱、耐盐相关基因并转化到目标作物中进行作物抗逆性遗传改良已成为研究的热点。转录因子因其可调控许多下游靶基因的表达,被认为是研究植物响应非生物胁迫分子机制非常理想的目标基因。在各种转录因子中,同源异形域亮氨酸拉链蛋白(homeodomain-leucine-zipper protein, HD-Zip)类转录因子在植物生长、发育及非生物胁迫等各个方面起着重要的调节作用。根据其结构域保守性,HD-Zip家族分为4个亚家族,包括HD-Zip I、HD-Zip II、HD-Zip III和HD-Zip IV^[1]。HD-Zip I类转录因子有17个成员,其功能主要参与植物对非生物逆境胁迫等^[1-2]。例如:拟南芥的*ATHB-12*受外源ABA诱导和水分胁迫表达^[3]; *ATHB-7*受干旱、盐胁迫和外源ABA诱导表达^[4]。紫花苜蓿*HsHB2*受NaCl和ABA诱导升高;转*HsHB2*基因拟南芥受NaCl和ABA胁迫的表现较野生型的更明显^[5]。大豆*GmHAT5*受盐诱导表达量显著升高;在百脉根中过量表达*GmHAT5*显著增强百脉根的耐盐能力^[6]。目前,有关向日葵HD-Zip类转录因子的克隆及抗逆功能研究的国外报道甚少,国内迄今未见报道。Dezar等^[7]鉴定的向日葵*Hahb-4*是HD-Zip I类家族成员,在转基因拟南芥中*Hahb-4*基因表达受水分、高盐和ABA的诱导, *Hahb-4*基因过量表达导致转基因植株抗旱能力增强。

本实验室前期从盐胁迫的向日葵叶片中克隆了HD-Zip I类转录因子*HB-12*,表达分析表明,该基因在向日葵幼苗中受NaCl、干旱胁迫和外源ABA诱导,推测*HB-12*很可能参与向日葵中逆境胁迫调控或ABA信号传导^[8]。本研究以此为基础,通过在烟草中过表达*HB-12*基因,研究转基因烟草响应盐胁迫的表型、生理生化及胁迫相关基因表达的变化,进一步验证了*HB-12*基因的功能,为利用该基因提

高作物的抗逆性奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料

野生型烟草种子(*Nicotiana benthamiana*)由本课题组保存。烟草种子用0.1% HgCl₂消毒10 min,无菌水冲洗4~5次后接种于1/2 MS培养基中,培养30天以后其叶片可作为转基因的受体。新鲜洋葱购自市场。

1.2 质粒、菌株及主要试剂

向日葵转录因子*HB-12*基因(GeneBank登录号为KU315052)由本课题组前期克隆(pGM-HB-12)^[8];瞬时表达载体Cam-35S-GFP和农杆菌菌株EHA101由本课题组保存;植物表达载体pPZP221由内蒙古大学生命科学学院哈斯阿古拉教授惠赠;克隆载体pEASY-T5 Zero Cloning Kit购自内蒙古昭程商贸有限公司;Ex Taq PCR Mix、SYBR Premix EX TaqII(Tli RNaseH plus)、cDNA反转录试剂盒、限制性内切酶BamH I、Kpn I和Xba I购自TaKaRa公司;T4 DNA连接酶试剂盒购自NEB公司;叶绿素、脯氨酸、POD和SOD试剂盒购自南京建成生物科技有限公司。

1.3 引物

引物合成和序列测定由南京金斯瑞生物工程技术服务有限公司完成,引物序列见表1。

1.4 *HB-12*基因的亚细胞定位

用引入Kpn I和Xba I限制性内切酶位点的引物*HB-sF*和*HB-sR*(表1),从pGM-HB-12中扩增*HB-12*基因片段,克隆后获得检测正确的阳性克隆。提取阳性克隆质粒,经Kpn I和Xba I双酶切后定向连接到瞬时表达载体Cam-35S-GFP的Kpn I和Xba I酶切位点上,取5 μL连接物转化大肠杆菌Trans-5α感受态细胞,在含Kan(100 mg/mL)的LB培养基上筛选重组子。重组子经PCR检测和酶切鉴定正确后,采用基

表1 引物序列
Table 1 Primer sequences

引物名 Primer name	编号 Number	序列(5'→3') Sequences (5'→3')
Amplified primers of <i>HB-12</i> coding region (carrying <i>Kpn</i> I/ <i>Bam</i> H I sites)	<i>HB</i> -sF <i>HB</i> -sR	CGG <u>GG</u> TAC CAT GTT AGA CAT GGG ATC CGG <u>GAT</u> <u>CCT</u> CCA TAT AAT TTA AG
Amplified primers of <i>HB-12</i> coding region (carrying <i>Bam</i> H I/ <i>Kpn</i> I sites)	<i>HB</i> -F <i>HB</i> -R	CGG <u>GAT</u> <u>CCA</u> TGT TAG ACA TGG GAT C CGG <u>GGT</u> <u>ACC</u> TCC ATA TAA TTT AAG
RT-PCR primers of <i>HB-12</i>	<i>HB</i> -qF <i>HB</i> -qR	AGT TTC ACT GCC TTC TTC A CGA GTT TGG ATT CGG TCT
Primers of internal control 18S rRNA	18S-qF 18S-qR	AGA AAC GGC TAC CAC ATC CA TTG TTA TTT ATT GTC ACT ACC TCC C
qRT-PCR primers of <i>P5CS</i>	<i>P5CS</i> -qF <i>P5CS</i> -qR	TGG TCG TCA GCG GCT TAG AT TGC CAA ACT GTC ATT GTC CC
qRT-PCR primers of <i>POD</i>	<i>POD</i> -qF <i>POD</i> -qR	CCC TGG TGT TGT TTC TTG TG CCT GAG CCT GAA CTT CTT GG
qRT-PCR primers of <i>MnSOD</i>	<i>MnSOD</i> -qF <i>MnSOD</i> -qR	GCA GAC GGA CCT TAG CAA CA GGG AGC CAA AGT TAG TGT CG
qRT-PCR primers of <i>GuZnSOD</i>	<i>GuZnSOD</i> -qF <i>GuZnSOD</i> -qR	CGG GAC CAC ATT ACA ATC CT ATC AGC GTG AAC AAC CAC AG

下划线表示酶切位点。

Underlined were the restriction sites.

因枪轰击法将其转化到洋葱表皮细胞中,使目的基因与绿色荧光蛋白(*GFP*)基因瞬时融合表达,同时用转化空载体Cam-35S-*GFP*作为对照(CK),在激光共聚焦显微镜下观察洋葱表皮细胞中的绿色荧光信号。

1.5 *HB-12*基因植物表达载体的构建及其对烟草的遗传转化

用含有限制性内切酶位点*Bam*H I和*Kpn* I的引物*HB*-F和*HB*-R,从pGM-*HB-12*中扩增目的基因片段,TA克隆后测序。测序正确的克隆质粒经*Bam*H I/*Kpn* I双酶切后定向连接到植物表达载体pPZP221的*Bam*H I和*Kpn* I酶切位点上,通过大肠杆菌扩增后获得阳性克隆。提取阳性克隆质粒,通过冻融法^[9]将其导入农杆菌EHA101感受态细胞中,PCR检测和酶切鉴定重组质粒。通过农杆菌介导法,用含有重组载体的农杆菌EHA101转化烟草叶盘,在含有庆大霉素(50 mg/L)和头孢霉素(500 mg/L)的分化培养基(MS+1.0 mg/L 6-BA)上诱导叶盘分化。当诱导产生的丛生芽长到2 cm左右时,将其从叶盘上切下转移到1/2 MS(含有庆大霉素50 mg/L和头孢霉素500 mg/L)培养基上进行生根培养及抗性植株筛选。

1.6 转基因植株的分子检测及转基因株系扩繁

以重组质粒为阳性对照(CK⁺),野生型烟草为阴性对照(CK⁻),用引物*HB*-F和*HB*-R对获得的抗性植

株进行目的基因的PCR检测,在此基础上进一步用引物*HB*-qF和*HB*-qR对PCR阳性植株进行RT-PCR扩增,以在DNA水平和RNA水平上进行转基因植株检测。将检测阳性的转基因植株与野生型烟草植株进行扩繁。

1.7 转基因烟草耐盐性实验

1.7.1 转基因烟草耐盐能力检测及表型观察 随机切取生长一致的3个转基因株系和1个野生型株系相同部位的叶盘于含有0 mmol/L和150 mmol/L NaCl的分化培养基上培养15天,观察叶片颜色和分化情况。同时将这3个转基因株系和一个野生型株系切段分别接入含有0 mmol/L、150 mmol/L和250 mmol/L NaCl的1/2 MS培养基中(每个株系重复10瓶)培养40天,观察其植株生长及生根情况。

1.7.2 转基因株系生理生化指标的测定 取一个转基因株系和一个野生型株系植株转入1/2 MS液体培养基中培养5天后,分别转入含0 mmol/L和150 mmol/L NaCl的1/2 MS液体培养基中,取处理0 h和24 h后的植株叶片0.1 g,进行叶绿素和脯氨酸含量及POD和SOD活性的测定,方法按照试剂盒说明书进行,重复3次。

1.8 胁迫相关基因在转基因烟草中的表达分析

同时取1.7.2中不同处理植株的叶片,分别提取

总RNA, 将其反转录成cDNA并以其为模板, 以向日葵18S rRNA基因为内参基因, 进行胁迫相关基因*P5CS*、*POD*、*MnSOD*和*GuZnSOD*的实时荧光定量PCR分析并计算目的基因的相对表达量^[8]。

1.9 统计方法

采用SPSS 22.0统计学软件进行显著性差异分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 *HB-12*基因亚细胞定位分析

以pGM-*HB-12*为模板, 用引物*HB-sF*和*HB-sR*扩增目的基因, 获得约570 bp预期大小的目的片段(图1)。将该片段克隆后获得的阳性克隆质粒通过*Kpn* I/*Xba* I酶切位点插入到Cam-35S-GFP中, 转化Trans-5 α 感受态细胞后, 挑取6个单菌落进行菌落PCR检测, 其中5个获得预期大小片段(图2)。提取其中1个单菌落质粒进行*Kpn* I/*Xba* I双酶切鉴定, 获得的目的片段符合预期大小(图3), 表明瞬时表达载体Cam-35S-GFP-*HB-12*构建成功。用基因枪轰击洋葱表皮细胞, 经24 h培养后, 借助激光共聚焦显微镜观察, 发现绿色荧光信号主要集中在洋葱表皮细胞的细胞核, 而对照中荧光信号分布于细胞核、细胞膜和细胞质的各个部位(图4), 表明*HB-12*基因定位在细胞核, 与前期预测结果一致^[8]。

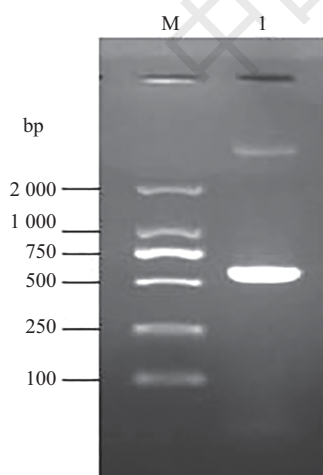
2.2 转基因烟草的获得及转基因植株的检测

为进一步研究向日葵*HB-12*的功能, 构建该基

因的过表达载体, 通过农杆菌介导法将其转入烟草中进行过表达分析。从pGM-*HB-12*中扩增目的基因片段, 获得预期大小*HB-12*片段(图5), 同时引入*Bam*H I和*Kpn* I酶切位点, 电泳回收目的片段进行TA克隆。用*Bam*H I/*Kpn* I将*HB-12*定向插入到植物表达载体pPZP221中, 通过冻融法转化EHA101, PCR检测和酶切鉴定单菌落质粒为重组质粒(图6和图7), 命名为pPZP221-*HB-12*, 至此*HB-12*基因植物超表达工程菌株构建成功。通过农杆菌介导法转化烟草叶盘, 在含有50 mg/L庆大霉素的分化培养基上诱导叶盘分化, 产生的丛生芽在含50 mg/L庆大霉素的生根培养基上进一步筛选, 获得抗性植株(图8A~图8C)。随机选取12株, 提取总DNA并以其为模板, 以重组质粒为阳性对照(CK⁺)、未转基因植株(野生型植株)为阴性对照(CK⁻)、ddH₂O做模板为空白对照(CK⁰), 用引物*HB-F*和*HB-R*进行PCR检测, 其中11个植株扩增出与CK⁺一样的条带, 而CK⁻和CK⁰未扩增出目的条带(图9), 表明*HB-12*已整合到烟草基因组中。随机取PCR检测阳性的5个转基因植株的叶片, 用引物*HB-qF*和*HB-qR*进行RT-PCR检测, 获得条带与目的基因大小一样(图10), 表明*HB-12*基因在转基因烟草中成功表达。对RT-PCR检测阳性的转基因植株进行株系扩繁(图8D), 以备后续实验。

2.3 转基因烟草耐盐性实验

2.3.1 转基因烟草耐盐能力检测及表型观察 随机剪取3个转基因烟草株系(T0-1、T0-3和T0-5)和1

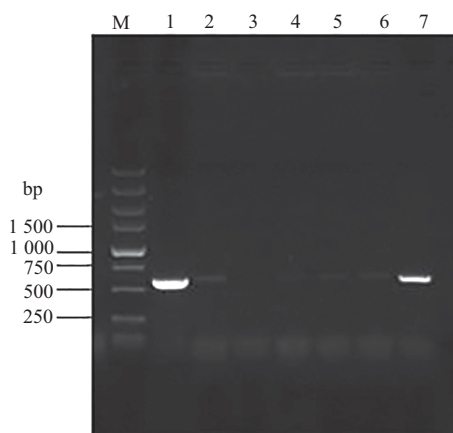


M: DL2000 marker; 1: PCR产物。

M: DL2000 marker; 1: PCR products.

图1 *HB-12*基因的PCR扩增(引入*Kpn* I和*Xba* I酶切位点)

Fig.1 PCR amplification of *HB-12* (introduction of *Kpn* I and *Xba* I enzyme cutting sites)



M: DL5000 marker; 1: pGM-*HB-12*(CK⁺)的PCR产物; 2~7: 单克隆的PCR产物。

M: DL5000 marker; 1: PCR products of pGM-*HB-12* (CK⁺); 2-7: PCR products of single colony.

图2 重组质粒PCR检测

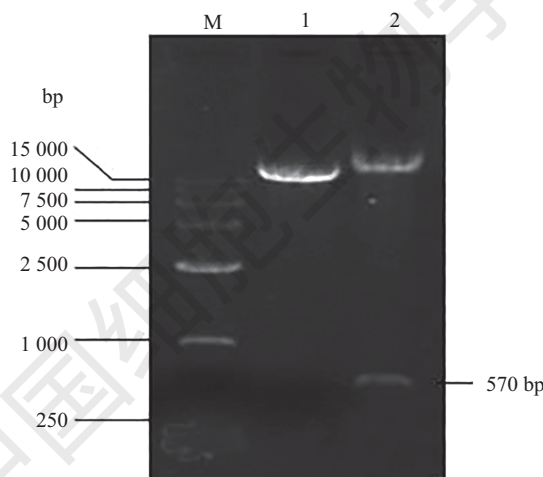
Fig.2 PCR detection of recombinant plasmids

个野生型烟草株系(WT)的叶片,在含有0 mmol/L和150 mmol/L NaCl的叶片分化培养基中培养15天后,发现在正常条件下,转基因烟草与野生型烟草叶片颜色及分化情况相似,叶色较绿且均可正常分化,转基因烟草叶片分化率T0-1为100%,T0-3和T0-5均为90%,野生型烟草叶片分化率为91.7%。在盐胁迫条件下,野生型烟草叶色失绿严重逐渐变黄,分化率为50.0%,转基因烟草叶色失绿程度较野生型的轻,分化情况较野生型的好,分化率T0-1为75%,T0-3为100%,T0-5为75%(图11)。这说明,野生型烟草受到NaCl伤害较转基因烟草的大,即转基因烟草较野生型烟草耐盐能力强。

将这3个转基因株系和一个野生型株系植株分别切段接入含有0 mmol/L、150 mmol/L和250 mmol/L NaCl的1/2 MS固体培养基中培养40天,发现在正常条件下,转基因组培苗的生长情况与野生型的基

本一致,植株生长势强、生根率高,均为100%,但随着盐浓度的增加,烟草幼苗受害程度逐渐加重。150 mmol/L和250 mmol/L NaCl处理下,野生型烟草植株叶片失绿程度较转基因株系的严重,植株生长受阻,生根明显受到抑制(图12A)。而在相同盐浓度胁迫下,转基因烟草植株的生长状况和生根率较野生型的好(图12B),说明转基因烟草较野生型烟草表现出一定的耐盐性。

2.3.2 盐胁迫下转基因烟草生理生化指标的测定
叶绿素代谢是一个动态平衡过程,盐胁迫会打破这种平衡,造成叶绿素含量的变化。盐胁迫下植物叶片叶绿素含量直接影响光合同化过程,因而叶绿素含量也是衡量植物耐盐性的重要生理指标之一^[10]。测定结果表明:正常条件下,转基因烟草与野生型烟草叶片叶绿素含量基本相同;NaCl处理24 h后,二者的叶绿素含量均有下降,分别是处理前的0.9倍和0.8



M: DL15000 marker; 1: Cam-35S-GFP质粒; 2: *Kpn* I和*Xba* I双酶切重组质粒Cam-35S-HB-12-GFP。

M: DL15000 marker; 1: Cam-35S-GFP plasmid; 2: Cam-35S-HB-12-GFP digested by *Kpn* I and *Xba* I.

图3 重组质粒酶切鉴定

Fig.3 Identification of recombinant plasmid

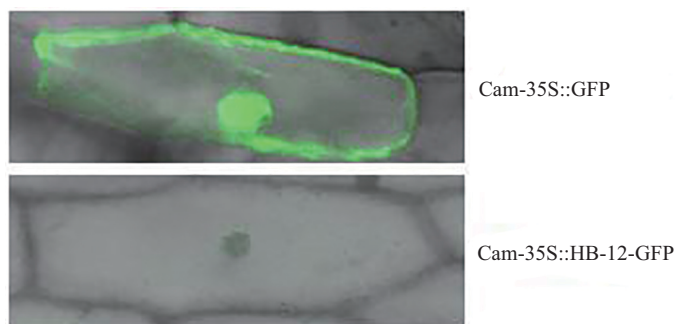


图4 Cam-35S-HB-12-GFP融合蛋白在洋葱表皮细胞中的亚细胞定位情况

Fig.4 Subcellular localization of Cam-35S-HB-12-GFP fusion protein onion epidermal cell

倍, 说明盐处理对细胞造成伤害; 处理后转基因烟草与野生型烟草叶片中叶绿素含量不存在显著差异, 但前者是后者的1.1倍, 表明转基因烟草较野生型烟草受害轻(图13A)。

脯氨酸积累可以有效地抵抗渗透胁迫, 植物在逆境胁迫下体内会积累大量脯氨酸, 维持植物细胞的渗透压, 增加植物的抗逆性^[1]。测定结果表明: 正常条件下, 转基因烟草叶片中脯氨酸含量与野生型基本一致; NaCl处理24 h后, 转基因烟草和野生型烟草叶片中脯氨酸含量迅速增加, 分别是处理前的1.8倍和1.5倍, 转基因烟草是野生型的约1.2倍, 二者没有显著差异(图13B)。这一结果表明, 烟草幼苗受到盐胁迫时, 通过增加脯氨酸的合成来抵抗逆境对细胞造成的伤害。

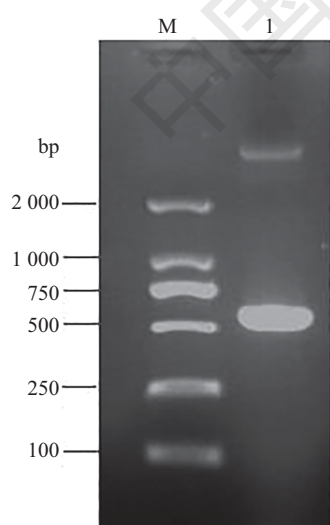
众所周知, 过氧化物酶(POD)和超氧化物歧化酶(SOD)等抗氧化酶广泛存在于植物体内, 在盐碱、水分、低温等非生物胁迫下, 各类抗氧化酶快速合成并诱发植物体产生抗氧化防御系统来清除植物体内产生的活性氧(ROS), 减轻逆境对细胞的伤害。正常条件下, 转基因烟草与野生型烟草的POD、SOD活性无明显差异; NaCl处理24 h后, 转基因烟草和野生型烟草的POD活性均有升高, 分别是处理前的1.5倍和1.1倍, 而且转基因烟草的POD活性升高较明显(但未达到显著差异), 是野生型的1.5倍; 处理后转基因烟草的SOD活性也有所升高(差异不显著), 是处

理前的1.3倍, 是野生型的1.5倍(图13C和图13D)。结果表明, *HB-12*在烟草中的表达提高了细胞内POD和SOD活性, 有助于增强转基因烟草清除活性氧的能力, 从而减轻盐分对细胞的伤害。

2.4 胁迫相关基因在转基因烟草中的表达分析

qRT-PCR结果显示, 正常条件下, 胁迫相关基因*P5CS*、*POD*、*MnSOD*、*GuZnSOD*在转基因烟草和野生型烟草中的相对表达量基本相近, 而在NaCl处理后, 其在转基因烟草中的相对表达量均高于野生型烟草。图14A显示, NaCl处理后, 脯氨酸合成关键酶基因*P5CS*在转基因烟草和野生型烟草中的表达量升高, 分别为处理前的3.1倍和2.4倍, 而且转基因烟草是野生型烟草的1.6倍, 差异极显著, 说明NaCl胁迫强烈诱导了转基因烟草中*P5CS*基因的上调表达, 该结果与转基因烟草叶片中脯氨酸含量高于野生型的结果一致。图14B显示, NaCl处理后, 转基因烟草和野生型烟草中*POD*基因的表达量分别为处理前的2.6倍和1.6倍, 而且转基因烟草是野生型的1.7倍, 呈极显著差异。同样, NaCl处理后, *MnSOD*和*GuZnSOD*在转基因烟草和野生型烟草中的表达量迅速升高, 分别为处理前的3.1倍和7.9倍, 而且转基因烟草分别是野生型烟草的2.0倍和3.2倍, 均达到极显著差异(图14C和图14D)。

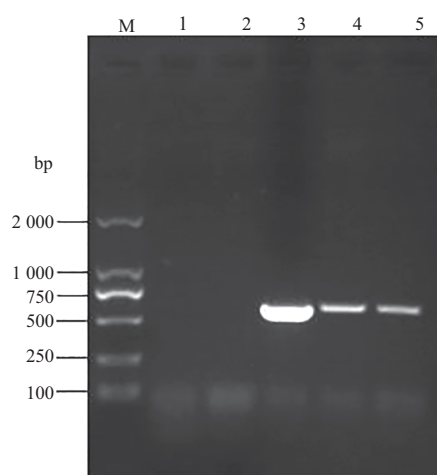
由此验证了*HB-12*转基因烟草中出现的上述生理生化变化的根本原因。



M: DL2000 marker; 1: PCR产物。

M: DL2000 marker; 1: PCR products.

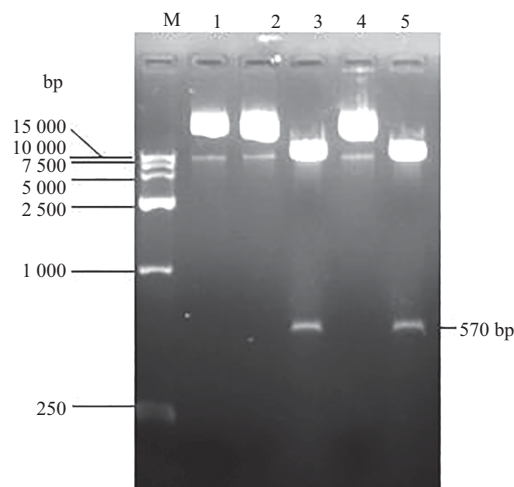
图5 *HB-12*基因的PCR扩增(引入*Bam*H I和*Kpn* I酶切位点)
Fig.5 PCR amplification of *HB-12* (introduction of *Bam*H I and *Kpn* I enzyme cutting sites)



M: DL2000 marker; 1: 空白对照(CK^0); 2: 阴性对照(CK^-); 3: 阳性对照(CK^+); 4、5: 单克隆PCR产物。

M: DL2000 marker; 1: blank control (CK^0); 2: negative control (CK^-); 3: positive control (CK^+); 4,5: PCR products of single colony.

图6 重组质粒PCR检测
Fig.6 PCR detection of recombinant plasmids

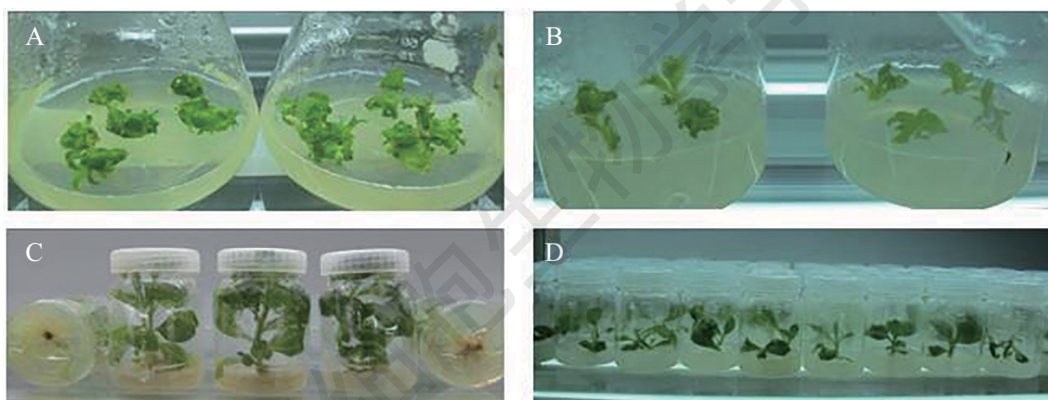


M: DL15000 marker; 1: pPZP221空载体; 2、4: pPZP221-HB-12重组质粒; 3、5: *Bam*H I and *Kpn* I双酶切重组质粒pPZP221-HB-12。

M: DL15000 marker; 1: pPZP221 empty vector; 2,4: pPZP221-HB-12 recombinant plasmids; 3,5: pPZP221-HB-12 digested by *Bam*H I and *Kpn* I.

图7 重组质粒酶切鉴定

Fig.7 Identification of recombinant plasmids

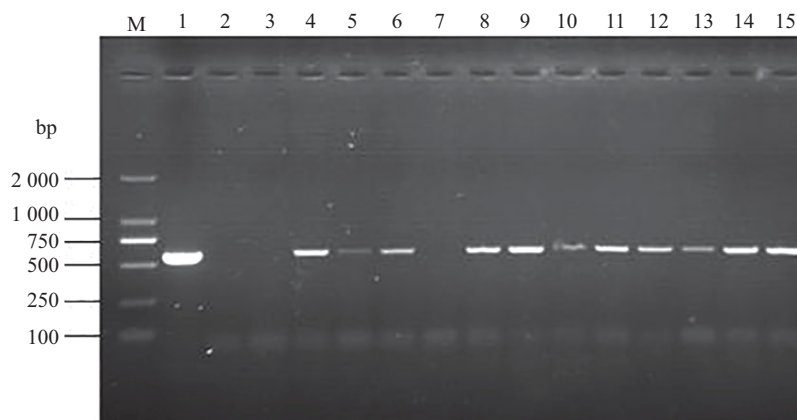


A: 叶盘分化; B: 抗性芽筛选; C: 抗性植株; D: 转基因株系扩繁。

A: leaf discs differentiation; B: selection of resistant buds; C: resistant plants; D: the propagation of transgenic lines.

图8 烟草的遗传转化及庆大霉素抗性无性系的筛选

Fig.8 Genetic transformation of tobacco and selection of transgenic tobacco lines with gentamicin resistance

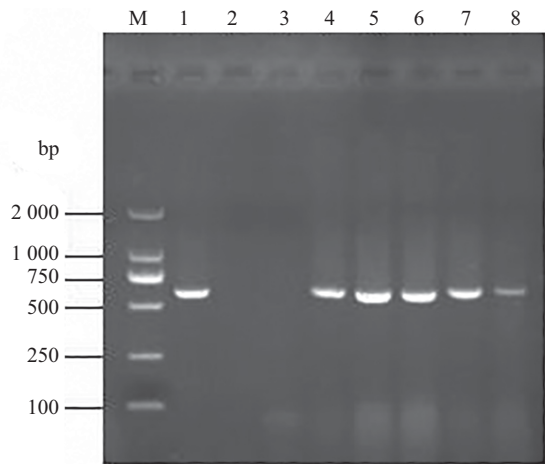


M: DL2000 marker; 1: 阳性对照(CK^+); 2: 阴性对照(CK^-); 3: 空白对照(CK^0); 4~15: 转基因植株。

M: DL2000 marker; 1: positive control (CK^+); 2: negative control (CK^-); 3: blank control (CK^0); 4-15: transgenic plants.

图9 转基因植株的PCR检测

Fig.9 PCR detection of transgenic plants



M: DL2000 marker; 1: 阳性对照(CK⁺); 2: 阴性对照(CK⁻); 3: 空白对照(CK⁰); 4~8: 转基因植株。
M: DL2000 marker; 1: positive control (CK⁺); 2: negative control (CK⁻); 3: blank control (CK⁰); 4-8: transgenic plants.

图10 转基因植株的RT-PCR检测
Fig.10 RT-PCR detection of transgenic plants

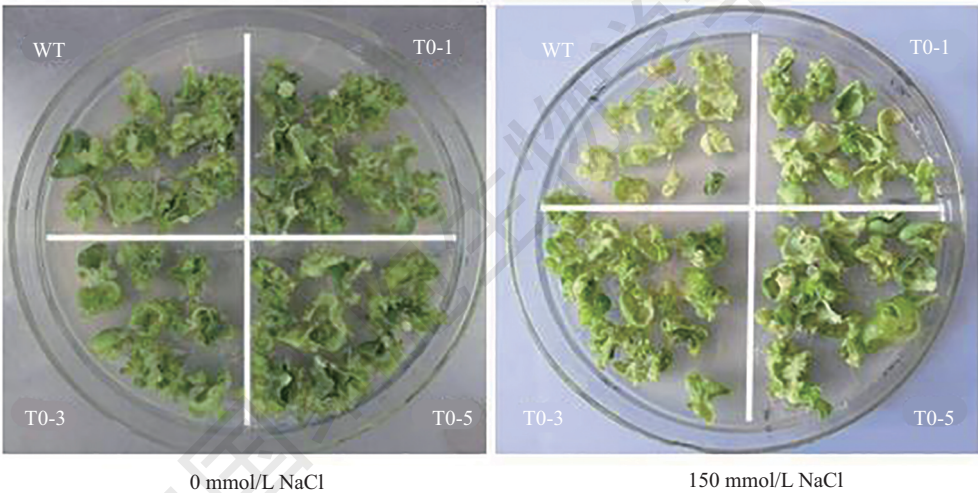


图11 烟草叶片分化情况
Fig.11 Differentiation status of tobacco leaves

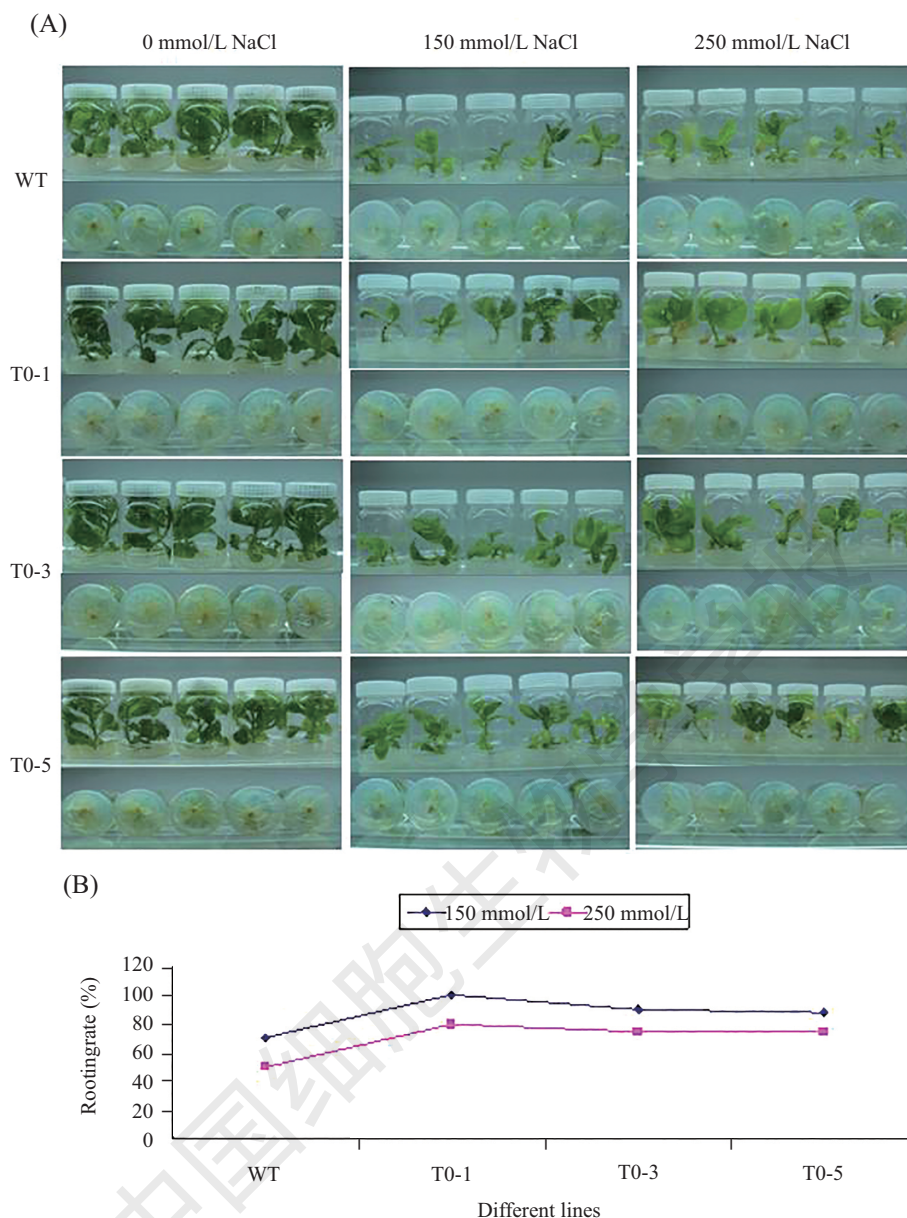
3 讨论

盐胁迫严重影响作物的生长和产量。为了应对高盐胁迫, 通过转基因技术提高作物的耐盐能力成为科学家研究的重要课题。前人研究表明, HD-Zip I类转录因子在植物抗逆中发挥着重要的作用。本研究通过在烟草中过表达向日葵HD-Zip I类转录因子*HB-12*, 初步验证了其耐盐功能。

叶绿素是植物吸收太阳光能进行光合作用的重要物质, 叶绿素水平取决于叶绿素合成与降解的动态平衡。研究表明, 叶绿素的合成与降解有叶绿素合成关键酶(GTS和UROS)和降解酶(PPH)的参与^[12], 其中任何环节出现障碍, 都会影响叶绿素的合成, 而引起叶绿素含量的变化^[13]。高盐、干旱等环境因

素影响叶绿素合成酶的活性, 并加速叶绿素的分解, 导致叶绿素含量明显下降, 从而影响作物的光合作用和生长发育。因此, 植物叶片受害程度或叶绿素降解程度可用作盐害的检测指标^[14]。崔道雷等^[15]认为, 红梨*PybHLH*在烟草中过表达抑制了叶绿素酶的分解, 提高了烟草的抗性。本研究中, 烟草离体叶片的耐盐性实验表明, 盐胁迫下, 转基因烟草叶片失绿程度较野生型的轻, 分化能力较野生型的强, 说明盐胁迫后转基因烟草叶片叶绿素含量较野生型的高, 而叶绿素含量测定结果也证实了这一结果。这表明, *HB-12*的过表达可能抑制了叶绿素降解酶的活性, 从而减轻了细胞受损害的程度。

脯氨酸作为植物应答盐分、干旱和低温等胁迫



A: 不同浓度NaCl处理后烟草植株生长情况; B: 不同浓度NaCl处理后烟草植株生根率统计。

A: growth of tobacco plants treated with different concentrations of NaCl; B: statistics of rooting rate of tobacco plants treated with different concentrations of NaCl.

图12 烟草组培苗耐盐性实验

Fig.12 Salt tolerance test of tobacco tissue culture seedlings

反应的一个重要指标,当植物受到逆境胁迫后,脯氨酸含量呈上升趋势,通过增加脯氨酸的积累维持胞内溶质浓度,防止细胞过度脱水。在植物耐受范围内,脯氨酸积累是植物对抗胁迫产生的一种应对措施,其含量越高,植物体的抗逆能力越强^[16]。研究表明,调节脯氨酸合成的关键酶基因是 $P5CS$,在拟南芥、豌豆、紫花苜蓿和水稻中的研究表明,干旱条件或盐处理下 $P5CS$ 基因表达上调,促使脯氨酸含量增加^[17]。本研究中,盐处理后,转基因烟草与野生型

烟草相比,积累的脯氨酸增多,为野生型的1.8倍,实时荧光定量PCR分析也表明,转基因烟草叶片中脯氨酸合成酶基因 $P5CS$ 的表达量较野生型的高,脯氨酸的增加与 $P5CS$ 表达量呈正相关。这表明, $HB-12$ 可诱导转基因烟草中 $P5CS$ 基因表达上调来促进脯氨酸的合成和积累,从而增加细胞对盐害的耐受程度。

正常条件下,植物细胞内活性氧(ROS)水平很低,不会伤及细胞,而且其产生与清除处于动态平

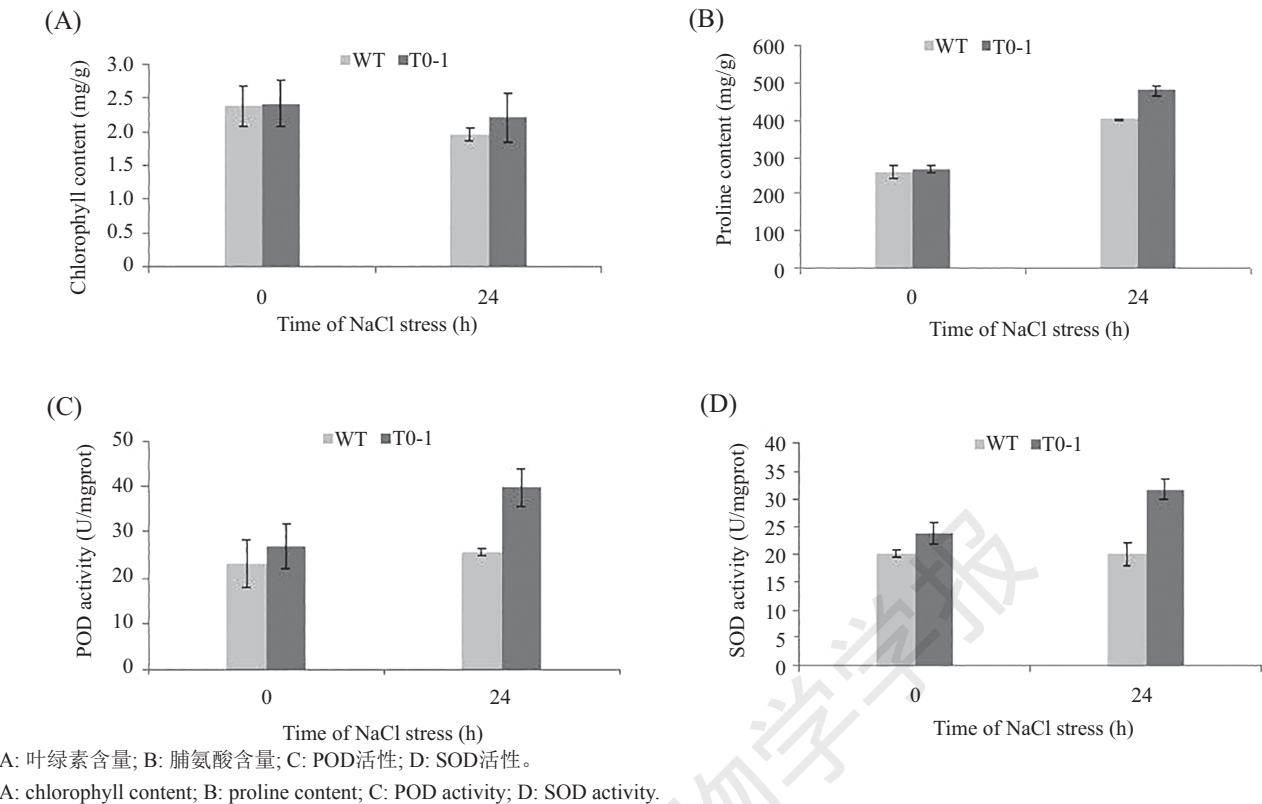


图13 盐胁迫对转基因烟草各项生理生化指标的影响

Fig.13 Effects of salt stress on physiological and biochemical indices of tobacco leaves

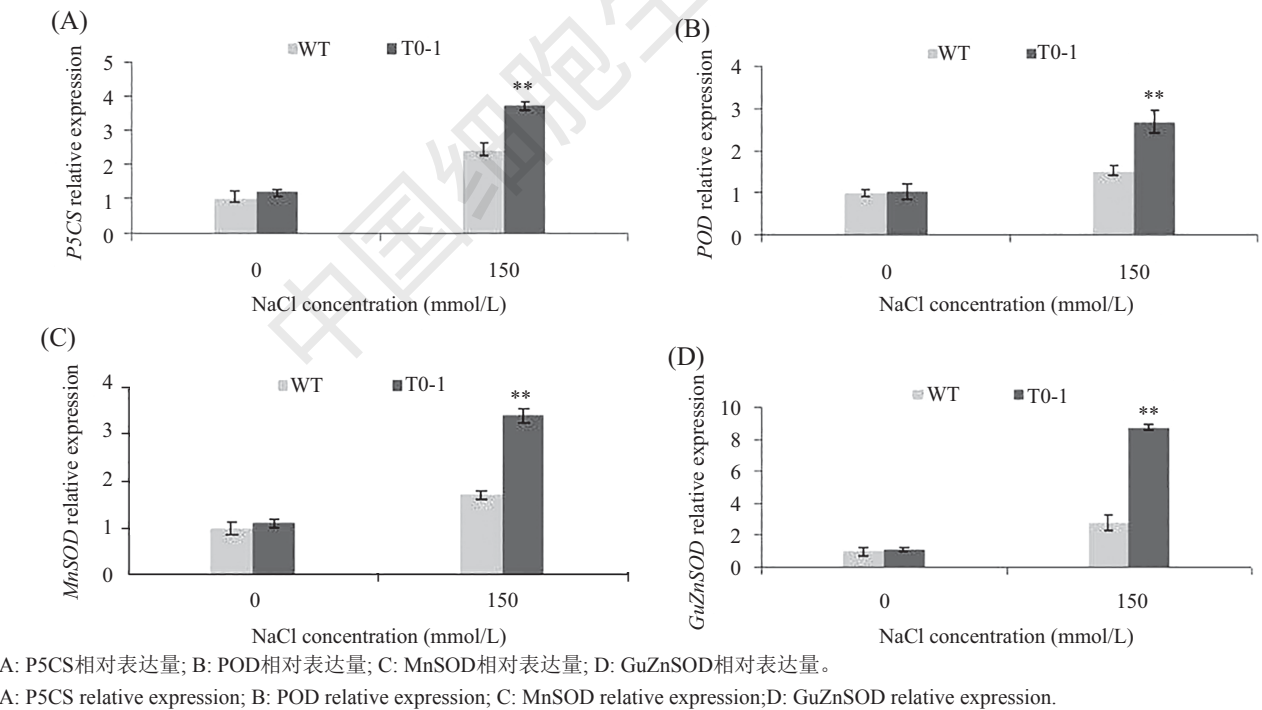


图14 NaCl胁迫下HB-12转基因烟草叶片中胁迫相关基因的表达分析

Fig.14 The relative gene expression level of HB-12 transgenic tobacco leaves under NaCl stress

衡状态; 当植物受到逆境胁迫时, 这种动态平衡遭到破坏, 导致ROS大量累积, 就会对细胞造成多种严重性氧化损伤^[18-19]。研究表明, 在逆境胁迫下, 抗氧

化酶基因的表达产物, 如过氧化物酶(POD)和超氧化物歧化酶(SOD)等, 能够清除细胞内过量的ROS, 保护细胞免受伤害。SOD是金属酶, 根据辅基部

位结合的金属离子的种类,分为FeSOD、MnSOD和GuZnSOD 3种类型,研究显示,非生物胁迫下转基因植物中可监测到不同种类SOD的过量表达^[9]。本研究中,盐处理后转基因烟草叶片中POD和SOD活性均比野生型烟草的高,同时发现转基因烟草中抗氧化酶相关基因POD和MnSOD、GuZnSOD的表达量均较野生型的高,表明转基因烟草通过HB-12基因诱导POD和MnSOD、GuZnSOD基因表达,使转基因烟草叶片中POD和SOD活性增强,更好地清除盐胁迫下植物体内产生的过量ROS,增加其抵抗盐害的能力。该研究结果为进一步探讨HB-12基因的功能提供了依据,为培育耐盐转基因植物提供了重要的候选基因。

参考文献 (References)

- Ariel FD, Manavella PA, Dezar CA, Chan RL. The true story of the HD-Zip family. *Trends Plant Sci* 2007; 12(9): 419-26.
- Elhiti M, Stasolla C. Structure and function of homeodomain-leucine zipper (HD-Zip) proteins. *Plant Signal Behav* 2009; 4(2): 86-8.
- Son O, Hur YS, Kim YK, Lee HJ, Kim S, Kim MR, *et al.* ATHB12, an ABA-inducible homeodomain-leucine zipper (HD-Zip) protein of *Arabidopsis*, negatively regulates the growth of the inflorescence stem by decreasing the expression of a gibberellin 20-oxidase gene. *Plant Cell Physiol* 2010; 51(9): 1537-47.
- Olsson A, Engstrom P, Soderman E. The homeobox genes *ATHB12* and *ATHB7* encode potential regulators of growth in response to water deficit in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* 2004; 55(5): 663-77.
- 李明娜, 龙瑞才, 杨青川, 沈益新, 康俊梅, 张铁军. 紫花苜蓿盐诱导HD-Zip类转录因子MsHB2的克隆及功能分析. *中国农业科学*(Li Mingna, Long Ruicai, Yang Qingchuan, Shen Yixin, Kang Junmei, Zhang Tiejun. Cloning and function analysis of a salt-stress-induced HD-Zip transcription factor *MsHB2* from Alfalfa. *Chinese Agricultural Sciences*) 2014; 47(4): 622-32.
- 柯丹霞, 李祥永, 王磊, 程琳, 刘永辉, 李小艳, 等. 大豆 *GmHAT5* 的克隆及其转基因百脉根的抗盐分析. *中国农业科学*(Ke Danxia, Li Xiangyong, Wang Lei, Cheng Lin, Liu Yonghui, Li Xiaoyan, *et al.* Isolation of *GmHAT5* from *Glycine max* and analysis of saline tolerance for transgenic *Lotus japonicus*. *Chinese Agricultural Sciences*) 2017; 50(9): 1559-70.
- Dezar CA, Gago GM, González DH, Chan RL. *Hahb-4*, a sunflower homeobox-leucine zipper gene, is a developmental regulator and confers drought tolerance to *Arabidopsis thaliana* plants. *Transgenic Res* 2005; 14(4): 429-40.
- 孙瑞芬, 张艳芳, 郭树春, 于海峰, 李素萍, 聂惠, 等. 向日葵盐诱导HD-Zip类转录因子HB-12的克隆及表达分析. *分子植物育种*[Sun Ruifeng, Zhang Yanfang, Guo Shuchun, YuHaifeng, Li Suping, NieHui, *et al.* Cloning and expression analysis of a salt stress induced HD-Zip transcription factor HB-12 from sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Molecular Plant Breeding*] 2017; 15(6): 2077-89.
- 孙瑞芬, 李天然, 安玉麟, 李堃, 石慧芹, 牛素清, 等. 美洲拟鲽抗冻蛋白基因遗传转化草莓的研究. *核农学报*(Sun Ruifeng, Li Tianran, An Yulin, Likun, ShiHuiqin, Niusuqing, *et al.* The genetic transformation of strawberry with winter flounder antifreeze protein gene. *Journal of Nuclear Agricultural Science*) 2009; 23(3): 423-8.
- 尤扬, 贾文庆. NaCl胁迫对三色堇SOD、POD及叶绿素含量的影响. *北方园艺*(You Yang, Jia Wenqing. Effect of NaCl stress on SOD, POD and chlorophyll content in *Viola tricolor*. *Northern Horticulture*) 2012; 6: 64-6.
- 卢瑞克, 杨泽茂, 戴志刚, 唐靖, 谢冬微, 徐英, 等. 黄麻耐盐性评价及盐胁迫下的生理响应. *中国麻业科学*(Lu Ruike, Yang Zema, Dai Zhigang, Tang Qing, Xie Dongwei, Xu Ying, Cheng Chao, *et al.* Evaluation of salt tolerance and the physiological response of jute at seeding growth stages. *Plant Fiber Science in China*) 2017; 39(4): 195-203.
- 刘建新, 丁华桥, 田丹青, 王炜勇, 刘慧春. 擎天凤梨苞片叶绿素代谢关键基因的分离及褪绿的分子机理. *中国农业科学*(Liu Jianxin, Ding Huaqiao, Tian Danqing, Wang Weiyong, Liu Huichun. Isolation of chlorophyll metabolism key genes and molecular mechanism of green fade in *Guzmania* bracts discoloration process. *Scientia Agricultura Sinica*) 2016; 49(13): 2593-602.
- Tanaka A, Tanaka R. Chlorophyll metabolism. *Curr Opin Plant Biol* 2006; 9: 248-55.
- 封伟. 超表达OsSsr1基因烟草的获得及其抗逆性分析(硕士学位论文). 南京农业大学(Feng Wei. The effects of overexpression of OsSsr1 on stress tolerance in tobacco. Nanjing Agricultural University), 2011.
- 崔道雷, 张晓东, 徐慧妮, 陈丽梅, 舒群, 李昆志. 红梨PybHLH基因过表达提高烟草NaCl抗性的研究. *生命科学研究*(Cui Daolei, Zhang Xiaodong, Xu Huini, Chen Limei, Shu Qun, Li Kunzhi. Overexpression of *PybHLH* gene in tobacco enhanced its resistance to NaCl stress. *Life Science Research*) 2013; 17(1): 24-31.
- 赵颖, 王国明, 王美琴, 张玲, 邱海岷. 脯氨酸、叶绿素含量与海岛树种抗逆性之间的关系. *浙江林业科技*(Zhao Ying, Wang Guoming, Wang Meiqin, Zhang Ling, Qiu Haisheng. Relationship between proline and chlorophyll content with tree resistance. *Journal of Zhejiang Forestry Science and Technology*) 2013; 33(5): 35-9.
- 郭蓓, 邱丽娟, 李向华. 植物盐诱导基因的研究进展. *农业生物技术学报*(Guo Bei, Qiu Lijuan, Li Xianghua. Advances of research in plant salt-induced genes. *Journal of Agricultural Biotechnology*) 1999; 7(4): 401-8.
- 陈花, 吴俊林, 李晓军. 叶绿体中活性氧的产生和清除机制. *现代生物医学进展*(Chen Hua, Wu Junlin, Li Xiaojun. Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts. *Progress in Modern Biomedicine*) 2008; 8(10): 1979-81.
- 班兆军, 关军锋, 李莉, 冯建华, 徐新明. 非生物胁迫下植物体内活性氧产生和抗氧化机制的研究概述. *中国果菜*(Ban Zhaojun, Guan Junfeng, Li Li, Feng Jianhua, Xu Xinming. Review on the production and antioxidant mechanism of reactive oxygen species in plants under abiotic stress. *China Fruit Vegetable*) 2012; 5: 40-7.