

p5CS 基因在蒙农杂种冰草植株中的表达及耐盐性研究

王桂花¹, 米福贵², 刘娟², 董淑君², 霍秀文³, 杨宏雁⁴

(1. 内蒙古农业大学 生物工程学院, 内蒙古 呼和浩特 010018; 2. 内蒙古农业大学 生态环境学院, 内蒙古 呼和浩特 010018;
3. 内蒙古农业大学 农学院, 内蒙古 呼和浩特 010018; 4. 呼和浩特市草原工作站, 内蒙古 呼和浩特 010010)

摘要: 为尽快培育出适宜我国干旱荒漠地区大面积推广的耐盐冰草新品种, 试验以经 PCR 和 Southern blot 杂交检测的含有 *p5CS* 基因的蒙农杂种冰草植株为材料, 用 Northern blot 检测目的基因在转化植株中的表达; 并用 1.5% NaCl 盐溶液进行胁迫处理确定转化植株的耐盐性。结果表明: 转基因冰草植株与 DIG 标记探针杂交呈现明显的杂交带; 盐胁迫下, 游离脯氨酸含量增加较快, 质膜透性、丙二醛含量增加较小, SOD 活性较高。说明 *p5CS* 基因能够在冰草基因组的转录水平上表达, 表达植株的耐盐性明显增加。

关键词: *p5CS* 基因; Northern blot; 盐胁迫; 耐盐性

中图分类号: S543.935.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2007)04-0033-04

Studies on the Expression of Exogenous *P5CS* Gene in Transgenic Wheatgrasses (*Agropyron cristatum* × *A. desertorum* cv. 'Hycress-Mengnong') and Drought Resistance

WANG Gui-hua¹, MI Fu-gui², LIU Juan², DONG Shu-jun², HUO Xiu-wen³, YANG Hong-yan⁴

(1. The College of Biological Engineering, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010018, China;
2. College of Ecology and Environment Sciences, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010018, China;
3. College of Agronomy, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010018, China;
4. Huhhot Grassland Station, Huhhot 010010, China)

Abstract: In order to breed a new salt tolerance variety which adapt to extend in drought areas in China, The *p5cs* gene expressed in transgenic hybrid wheatgrass (*Agropyron cristatum* × *A. desertorum* cv. 'Hycress-Mengnong'), which identified by PCR analysis and Southern blot, was investigated with Northern blot and physiological index was determined under 1.5% NaCl stress. The results showed that transgenic wheatgrasses and DIG marker hybridize was present obvious strap; under salt stress, Pro contents was increased quickly, cell membrane permeabilities and MDA contents were increased slowly, SOD activity was high. The results indicated that exogenous gene *p5CS* expressed at transcription level in transgenic plants, and salt tolerance of transgenic plants were enhanced.

Key words: *p5CS* gene; Northern blot; Salt stress; Salt tolerance

我国西北部地区干旱少雨, 土壤沙化、盐渍化现象严重, 干旱区面积约占国土面积的 58.6%, 是经济开发和生态环境建设的重点, 其中培育抗旱、耐盐碱植物, 不仅可以直接利用盐碱地进行生产, 又可以改善当地的生态环境, 成为人们研究的热点。但是, 由于大多数牧草生育周期较长, 性状遗传较为复杂, 用常规育种方法培育新品种难度较大, 造成了我国牧草生产品种数量少、品质差, 抗逆性水平较低, 普遍缺乏抗干旱、耐盐的牧草品种^[1-3]。利用基因工

程技术, 克隆并转化耐盐基因, 使其在其他植物中表达, 可以明显加快耐盐新品种的选育^[4,5]。

本研究是在获得的转 *p5CS* 基因(Δ-吡咯啉 5-羧基合成酶基因)冰草植株的基础上^[6,7], 运用 Northern blot 技术检测目的基因在转化植株中的表达, 并通过盐胁迫鉴定转化植株的耐盐性, 从中筛选耐盐的转基因冰草植株, 希望能够短时间内培育出适合我国西部干旱、半干旱地区大面积推广种植的耐盐冰草新品种。

收稿日期: 2007-01-03

基金项目: 国家转基因植物与产业化研究专项资助项目(J2002-B-008)

作者简介: 王桂花(1972-), 女(蒙古族), 内蒙古开鲁人, 讲师, 博士, 主要从事牧草种质资源、遗传育种与生物技术研究

通讯作者: 米福贵(1959-), 男, 内蒙古凉城人, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事为牧草遗传育种研究工作。

1 材料和方法

1.1 材料

经PCR和Southern blot杂交检测的含有*p5CS*基因的蒙农杂种冰草植株,以非转化的蒙农杂种冰草植株为阴性对照。

1.2 方法

1.2.1 Northern杂交 试剂盒提取植物总RNA(天为时代);质粒DNA经PCR扩增后,用DNA凝胶回收试剂盒回收目的片段,以回收的目的片段为模板,利用DIG High prime DNA Labeling and Detection Starter KitI,采用随机引物方式标记探针;用甲醛变性凝胶进行RNA电泳;用上行毛细管转移法进行转膜;用DIG标记的探针进行杂交、检测^[8,9]。

1.2.2 耐盐性测定 把经过Northern杂交检测的阳性植株与阴性植株分别移栽到相同的塑料花盆中,花盆底部用塑料袋封好,各装大田土5 kg,放置于温室,昼夜温度为25~28℃,使其恢复生长21 d。待苗完全恢复生长时,用1.5% NaCl盐溶液进行胁迫处理,测定胁迫前后植株的质膜透性、丙二醛含量、游离脯氨酸含量和SOD活性。质膜透性采用电导率测定;丙二醛含量采用5%TCA提取,分光光度测定法;游离脯氨酸含量采用乙醇提取,茚三酮测定法;SOD活性用NBT还原法测定。

2 结果与分析

2.1 Northern杂交

转*p5CS*基因的蒙农杂种冰草植株与阴性对照植株的Northern杂交结果见图1。从图1可以看出,转*p5CS*基因的冰草植株与DIG标记探针杂交呈现明显的杂交带,说明外源基因*p5CS*已经在转基因植株中转录水平表达。

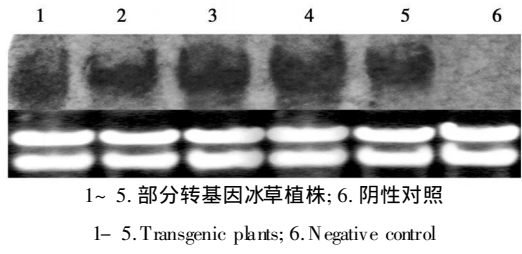


图1 转*p5CS*基因冰草植株Northern杂交检测
Fig.1 Northern blotting of transgenic tobacco plant(*p5CS*)

2.2 耐盐性研究

2.2.1 转基因植株的游离脯氨酸含量 转基因植株的游离脯氨酸含量见图2。从图2看出,随着盐溶液胁迫时间的延长,游离脯氨酸含量增加并且转化植株的游离脯氨酸含量增加幅度大于未转化植

株。盐胁迫下,植物细胞中常积累一些小分子有机物质(如脯氨酸、甜菜碱、糖醇等)以维持高的细胞质渗透压,便于植物在高盐条件下对水分的吸收,以保证细胞的正常生理功能。

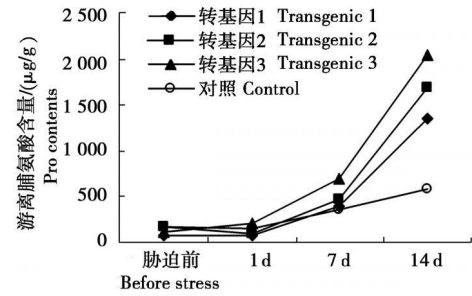


图2 盐胁迫下游离脯氨酸含量的变化
Fig.2 The change of Pro contents under salt stress

2.2.2 转基因植株的质膜相对透性 叶片质膜相对透性变化见图3。随着盐溶液胁迫时间的延长,质膜相对透性增大,盐胁迫时间越长,质膜相对透性增加越快,转化植株的质膜透性的增加程度明显低于未转化植株。质膜透性表示胁迫时质膜受破坏的程度,质膜透性越大说明受破坏的程度越严重。

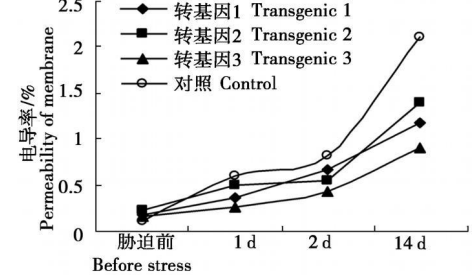


图3 盐胁迫下叶片质膜相对透性的变化
Fig.3 The change of cell membrane permeabilities under salt stress

2.2.3 转基因植株的丙二醛含量 丙二醛含量变化见图4。从图4可以看出,随着NaCl盐溶液胁迫时间的延长丙二醛含量增加,当胁迫到7 d后,丙二醛含量下降;转基因植株的增加速度小于未转基因植株。丙二醛是膜质过氧化产物,其含量的高低可以反映植物遭受逆境伤害的程度,含量越高,说明植物受逆境伤害越大。

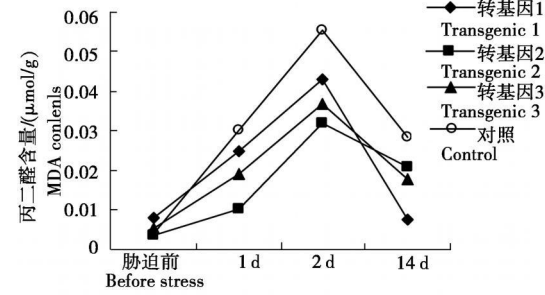


图4 盐胁迫下丙二醛含量的变化
Fig.4 The change of MDA contents under salt stress

2.2.4 转基因植株的SOD活性 SOD活性变化如

图5。从图5可以看出,随着 NaCl 盐溶液胁迫时间的增加,转基因植株的 SOD 活性增大,未转化植株 SOD 活性变化不大,当胁迫时间增加到 7 d 以后,转化植株和未转化植株的 SOD 活性均下降,下降幅度不同,并且转化植株的 SOD 活性相对较高。

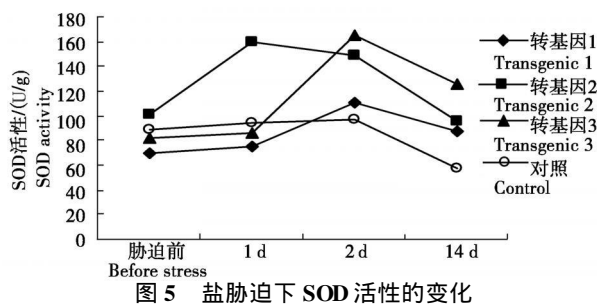


图5 盐胁迫下 SOD 活性的变化

Fig. 5 The change of SOD activity under salt stress

3 讨论与结论

p5CS 在植物中催化脯氨酸生物合成的前两步反应,其活性受到脯氨酸含量的反馈抑制。*p5CSF129A* 是 *p5CS* 去除反馈抑制的突变体,这种反馈抑制的去除,导致植物体中脯氨酸含量成倍增加,加强了植物在渗透压胁迫下的保护。Hong 等将此基因导入烟草,使脯氨酸累积表达量增加 2 倍,转基因的幼苗可在 200 mmol/L NaCl 中正常生长,目前已被转入多种植物(水稻、高羊茅、黑麦草等)中用以提高植物的抗旱、耐盐性^[10-13]。

本研究中的转 *p5CS* 冰草植株是“十五”期间在国家“植物转基因研究和产业化示范”重大专项课题的资助下,霍秀文等以冰草幼穗为外植体建立冰草组织培养的再生体系,用基因枪轰击冰草幼穗诱导的愈伤组织,获得转基因冰草植株,并用 RT-PCR 法检测到 *p5CS* 基因在受体基因组的转录水平表达^[6,7,14,15];徐春波等用不同浓度的 NaCl 溶液胁迫转化植株,测定了转化植株的叶片相对含水量、叶片质膜透性、 Na^+ 、 K^+ 的含量及游离脯氨酸含量,证明转化植株的耐盐性明显增加^[16]。本研究在前人的基础上,进一步用 Northern 杂交检测到外源基因 *p5CS* 在转录水平上表达,得到与霍秀文等一致的结果;在耐盐方面,用 1.5% NaCl 盐溶液对转化植株进行不同时间的胁迫处理下,转化植株较未转化植株的游离脯氨酸含量增加较快;叶片的质膜透性、丙二醛含量增加程度明显低于未转化植株;转化植株的 SOD 活性相对较高。在盐胁迫机理中,脯氨酸作为一类重要的有机渗透调节物质,可以平衡液泡的低水势、保护植物细胞中生物聚合物的结构、维持完整的水合范围并解除 NaCl 对植物叶绿素合成的抑制。因此,在盐胁迫条件下,脯氨酸含量增加越多的

物种,渗透调节能力越强,具有较强的耐盐性;膜透性和丙二醛含量表示质膜伤害程度,膜透性越大,丙二醛含量增加的越快,证明质膜伤害越重,植株的抗性越差;SOD 作为细胞内的主要保护酶,主要功能是清除 O_2^- 产生 H_2O_2 ,减少超氧自由基的生成,减轻对细胞的危害^[17-27];在本研究中,胁迫到一定时间后,丙二醛含量降低和李琼等^[17]结果一致;SOD 活性降低可能是保护酶清除活性氧和自由基的能力有限,当胁迫超出一定范围后,引起保护酶活性就会迅速下降。因此,根据本研究的结果可以进一步说明转基因植株较未转基因植株的耐盐性明显增强。外源基因 *P5CS* 在转基因蒙农杂种冰草植物体内表达。

参考文献:

- [1] 李守明,崔志祥,樊润威,等.绿肥牧草耐盐情况试验简报[J].内蒙古农业科技,1985(2):36-37.
- [2] 樊润威,崔志祥,李守明.土默川地区盐碱化草滩种草利用的研究[J].内蒙古农业科技,1987(1):3-7.
- [3] 李守明,崔志祥,张三粉,等.碱茅等几种牧草耐盐耐碱性的研究[J].内蒙古农业科技,1992(5):31-32.
- [4] 财音青格乐.基因工程及其产业[J].内蒙古农业科技,1999(增刊):26-27,29.
- [5] 李恋.生物技术在植物育种上的新应用[J].内蒙古农业科技,2006(3):52-54.
- [6] Huo Xi-wen, Wei Jian-huan, Xu Chun-bo, et al. Plant regeneration and genetic transformation in wheatgrass (*Agropyron cristatum* × *A. desertorum* cv. 'Mengnong') (English) [J]. Agricultural Sciences in China, 2006, 5(9): 648-654.
- [7] 霍秀文,云锦凤,米福贵,等.共转化法获得蒙农杂种冰草转基因植株[J].中国农业科学,2006,39(10):1977-1983.
- [8] 王关林,方宏筠.植物基因工程原理与技术[M].第2版.北京:科学出版社,2002.
- [9] 萨姆布鲁克 J,拉塞尔 D W.分子克隆实验指南[M].第3版.北京:科学出版社,2002.
- [10] 李志亮,黄丛林,张秀海,等.利用基因枪法向高羊茅导入 *P5CS* 基因的研究[J].园艺学报,2005,32(4):653-657.
- [11] 杨成民,王宏芝,孙振元,等.利用基因枪共转化法获得转 bar 与 *P5CS* 基因黑麦草[J].草地学报,2005,13(1):34-38.
- [12] YU Shun-wu, Li R T, Zhang R D, et al. Fluorescence in situ hybridization of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase (*P5CS*) gene on rice chromosome [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2002, 21(1): 1-4.
- [13] Hong Z, Lakkineni K, Zhang Z, et al. Removal of feedback inhibition of 1 pyrroline-5-carboxylatesynthetase (*P5CS*) re-

- sults in increased praline accumulation and protection of plant from osmotic stress[J]. *Plant Physiol*, 2000, 122: 1129–1136.
- [14] 霍秀文, 魏建华, 徐春波, 等. 冰草种间杂种蒙农杂种组织培养再生和遗传转化体系的建立[J]. *中国农业科学*, 2004, 37(5): 642–647.
- [15] 霍秀文, 魏建华, 张 辉, 等. 冰草属植物组织培养再生体系的建立[J]. *华北农学报*, 2004, 19(1): 17–20.
- [16] 徐春波, 米福贵, 王 勇. 转基因冰草植株耐盐性研究[J]. *草地学报*, 2006, 14(1): 20–23.
- [17] 李 琼, 刘国道, 郁树乾. 盐胁迫下六种禾本科牧草幼苗叶片膜脂过氧化作用及其与耐盐性的关系[J]. *家畜生态学报*, 2005, 26(5): 63–67.
- [18] 赵可夫, 邹 琦. 盐分和水分胁迫对盐生和非盐生植物膜脂过氧化作用的效应[J]. *植物学报*, 1993, 35(7): 519–522.
- [19] Rose-Fricker C, 李保军. 耐盐草坪草育种[J]. *草业科学*, 2005, 22(3): 102–106.
- [20] Bowler C, Slooten L, Larson T J, *et al.* Manganese superoxide dismutase can reduce cellular damage mediated by oxygen radicals in transgenic plants[J]. *EMBO J*, 1991, 10: 1723–1732.
- [21] 阎顺国. 碱茅营养吸收对盐胁迫及渗透胁迫的反应[J]. *草业学报*, 1995, 4(2): 66–70.
- [22] 王 萍, 郭继勋. 碱化草地常见牧草耐盐机理研究[J]. *东北师大学报(自然科学版)*, 1998, 3: 116–119.
- [23] Munns R. Comparative physiology of salt and water stress[J]. *Plant Cell Environ*, 2002, 25(2): 239–250.
- [24] 于海武, 李 莹. 植物耐盐性研究进展[J]. *北华大学学报(自然科学版)*, 2004, 5(3): 257–263.
- [25] 肖 雯, 李恢先, 蒲陆梅. 几种盐生植物抗盐生理指标的研究[J]. *西北植物学报*, 2000, 20(5): 818–825.
- [26] 马旭俊, 朱大海. 植物超氧化物歧化酶(SOD)的研究进展[J]. *遗传*, 2003, 25(2): 225–231.
- [27] 杨秀红, 李建民, 董学会, 等. 盐胁迫对甘草幼苗生长及其生理指标的影响[J]. *华北农学报*, 2006, 21(4): 39–42.

欢迎订阅 2008 年《河南农业科学》

《河南农业科学》是河南省农业科学院主办的综合性农业科技期刊, 主要报道粮食作物、经济作物、土壤肥料、植物保护、果树蔬菜、畜牧兽医、特种种植及养殖等方面的研究成果和先进技术。多年来, 深受省内外农业科技人员, 农业院校师生, 基层干部和农民的喜爱, 曾多次得到有关部门的奖励, 连续被评为“全国中文核心期刊”、“全国优秀农业期刊”, 连续获“河南省优秀科技期刊一等奖”。2006 年被评为“中国科技核心期刊”“中国农业核心期刊”。为了进一步扩大信息量, 满足多层次读者的需求, 本刊将进一步突出创新性、学术性、指导性; 进一步加大对重大、重点项目以及基金项目、创新性成果的报道力度。同时, 继续加强对科技新动态、生产新动向、市场新需求的报道。

本刊为月刊, 国际标准 16 开本, 120 页, 彩色封面, 每期定价 5.00 元, 全年 60 元。各地邮局均可订阅, 邮发代号: 36–32。如错过订期, 可直接与本刊编辑部联系订阅。

地址: 郑州市农业路 1 号

邮编: 450002

电话: 0371–65739041

传真: 0371–65712747

E-mail: hnnykx@163.com

hnny@chinajournal.net.cn