

网络出版时间:2018-11-06 16:58

DOI:10.13207/j.cnki.jnwfufu.2019.05.003

网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20181106.1657.006.html

盐碱胁迫对转 *Lc-CDPK* 基因水稻抗氧化酶活性及基因表达的影响

陈展宇^a, 费小钰^b, 孙帆^a, 崔喜艳^b

(吉林农业大学 a 农学院, b 生命科学学院, 吉林 长春 130118)

[摘要] **【目的】**研究盐碱胁迫对转羊草钙依赖蛋白激酶基因(*Lc-CDPK*)水稻根、叶片抗氧化酶活性及基因表达的影响。**【方法】**以转 *Lc-CDPK* 水稻为试验材料,通过 qRT-PCR 技术,测定根、叶片中 *Lc-CDPK* 基因的表达,确定该基因表达最高时的盐碱胁迫条件,以此条件处理幼苗,并以非转基因水稻为对照,分别测定其根、叶片中甜菜碱、脯氨酸、甘露醇、山梨醇、蔗糖等渗透调节物质含量和超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽还原酶(GR)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)等抗氧化酶活性及相关基因的表达。**【结果】**200 mmol/L NaCl-Na₂CO₃ 胁迫 24 h 时,转基因水稻根和叶片中 *Lc-CDPK* 基因表达的综合水平最高,此时转基因水稻和非转基因水稻(对照)的渗透调节物质含量和抗氧化酶活性有显著差异,转基因水稻根中脯氨酸、甘露醇和山梨醇含量分别较对照增加 116.0%,88.9%和 115.4% ($P<0.01$),GR 活性较对照提高 9.6% ($P<0.05$);叶片中脯氨酸含量较对照增加 129.2% ($P<0.01$),CAT、POD、GR 和 GPX 活性分别较对照提高 52.1%,27.5%,163.5%和 46.7%。叶片中抗氧化酶基因相对表达显著增强,CAT、GPX 基因相对表达量分别是对照的 3.96 和 2.73 倍 ($P<0.01$),根中仅 GR 基因相对表达增强,为对照的 1.6 倍 ($P<0.01$)。相关分析表明,根、叶片抗氧化酶活性与其基因相对表达量呈正相关。**【结论】**推测 *Lc-CDPK* 基因可能参与调控盐碱胁迫过程,能增强植株渗透调节物质的合成能力及抗氧化酶活性,提高水稻对盐碱胁迫的耐受性。

[关键词] 水稻; *Lc-CDPK* 基因; 盐碱胁迫; 渗透调节物质; 抗氧化酶; 基因表达

[中图分类号] S511.034

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2019)05-0015-08

Effects of saline-alkali stress on activities and gene expression of antioxidant enzymes of transgenic *Lc-CDPK* rice

CHEN Zhanyu^a, FEI Xiaoyu^b, SUN Fan^a, CUI Xiyen^b

(a College of Agronomy, b College of Life Science, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118, China)

Abstract: **【Objective】** The effects of saline-alkali stress on antioxidant enzyme activities and gene expression in roots and leaves of transgenic rice with *Leymus chinensis* Ca²⁺-dependent protein kinase gene (*Lc-CDPK*) were analyzed. **【Method】** Using qRT-PCR, the most appropriate treatment conditions for highest gene expression in roots and leaves of transgenic rice were clarified. After saline-alkali stress treatments, the contents of betaine, proline, mannitol, sorbitol and sucrose were measured and the activities and gene expression of antioxidant enzymes including superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD), catalase (CAT), glutathione reductase (GR) and glutathione peroxidase (GPX) in seedlings were assayed. **【Result】** The expression levels of *Lc-CDPK* in roots and leaves of transgenic rice were the highest 24 h after treat-

[收稿日期] 2018-03-09

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31171459);吉林省自然科学基金项目(主题科学家专项)(20180101026);吉林省教育厅“十三五”科学技术项目(JJKH20170307KJS)

[作者简介] 陈展宇(1972—),男,吉林梅河口人,副教授,博士,主要从事作物栽培生理研究。E-mail:chenzhanyu2000@sina.com

[通信作者] 崔喜艳(1971—),女,黑龙江齐齐哈尔人,教授,博士,主要从事分子生物学与生物化学研究。

E-mail:cuixiyan2005@163.com

ment by 200 mmol/L NaCl- Na_2CO_3 . Under this stress condition, difference between transgenic rice and non-transgenic rice (CK) was significant in contents of osmotic regulation solutes and activities of antioxidant enzymes. The contents of proline, mannitol and sorbitol were increased by 116.0%, 88.9% and 115.4% comparing CK ($P < 0.01$), and GR activity was increased by 9.6% ($P < 0.05$). The proline content in leaves was increased by 129.2% ($P < 0.01$), and the activities of CAT, POD, GR and GPX was 52.1%, 27.5%, 163.5% and 46.7% higher than those of CK in leaves. The relative expression levels and antioxidant enzyme activities in leaves of the transgenic rice were enhanced, and relative expression levels of CAT, GPX of transgenic rice were 3.96 and 2.73 times of CK ($P < 0.01$). Relative expression levels of GR were only increased in roots, which was 1.6 times of CK ($P < 0.01$). Correlation analysis indicated that the gene expression was positively correlated with activities of antioxidant enzymes in roots and leaves. 【Conclusion】 This study indicated that the *Lc-CDPK* involved in regulation of saline-alkali stress response, which increased the accumulation of osmotic regulators and activities of antioxidant enzymes, and improved the tolerance to saline-alkali stress.

Key words: rice; *Lc-CDPK* gene; saline-alkali stress; osmotic regulation solutes; antioxidant enzyme; gene expression

土壤盐碱化是一个全球性问题。土壤盐碱化导致我国许多地区农作物产量较低,土壤难以有效利用,土地资源浪费严重^[1]。盐碱土种植水稻一直是众多研究课题的热点,如何高效利用盐碱土、提高水稻的抗盐碱能力是研究的焦点之一^[2]。CDPK(钙依赖蛋白激酶)是一类 Ser/Thr 型蛋白激酶,其通过 Ca^{2+} 浓度的变化向下游传递信号,诱导下游基因的表达,进而在植物逆境信号传递过程中发挥重要作用^[3]。目前在拟南芥中已鉴定了 34 个 CDPK 基因成员,水稻中存在 31 个 CDPK 基因^[4-5]。羊草具有耐旱、耐盐碱的特性,在轻度盐碱化土壤(pH 值 8.0~8.5)上生长良好,其体内蕴含着丰富的抗逆基因和相关蛋白^[6]。崔喜艳等^[7]首次克隆了羊草 *CDPK* 基因(命名为 *Lc-CDPK*),并对其功能及表达特性进行了研究,结果表明 CDPK 基因在羊草抵御盐碱胁迫中发挥着重要作用。Sheen^[8]的研究表明,在盐胁迫和干旱胁迫条件下,拟南芥 *AtCDPK1* 和 *AtCDPK2* 基因转录水平均显著上调。高粱根经渗透胁迫 1 h 后,CDPK 活性增高,通过催化蛋白质的磷酸化引发抗性基因表达^[9-10]。

盐碱胁迫可对植物产生氧化胁迫,造成活性氧伤害,这可能是盐碱逆境伤害的一个重要原因^[11]。许多小分子有机物(如脯氨酸、甘露醇等)不仅是一种重要的渗透调节物质,同时还有清除活性氧的功能^[12]。此外,植物体内的 CAT、SOD 等内源活性氧清除剂,能在逆境胁迫过程中清除植物体内过量的活性氧,维持细胞膜的稳定性,进而增强植物的抗逆性^[13]。目前,利用基因工程手段获得的转基因植物

也可以有效清除体内活性氧^[9,14]。逆境胁迫会对植物抗逆基因的转录水平造成影响。Shirasawa 等^[15]用农杆菌将菠菜的 *CMO* 转化水稻,发现转基因水稻甜菜碱含量增加,耐盐性提高。高温胁迫时,水稻开花期剑叶的 *SOD*、*CAT* 和 *POD* 基因表达量显著增加^[16],盐胁迫还可以加强黑麦草 Cyt Cu/Zn *SOD*、*CAT* 和 *POD* 等基因的表达^[17]。

许多植物 CDPK 的功能与抗氧化酶有密切关系^[9-10]。玉米过量表达 CDPK 基因可以明显提高 SOD 和 APX 等活性^[18],转 CDPK 基因植株中,POD 和 CAT 等酶的活性及基因表达量均高于野生型^[19]。然而,CDPK 基因的抗盐机制研究还未见报道。本研究通过对转 *Lc-CDPK* 基因水稻幼苗进行 NaCl- Na_2CO_3 盐碱胁迫,分析水稻幼苗根、叶片的渗透调节物质含量、抗氧化酶活性及基因表达情况,探索该基因抗盐的生物学功能,以期为 *Lc-CDPK* 基因在耐盐碱作物中的进一步应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验选用转 *Lc-CDPK* 基因水稻“日本晴”(Oryza. sativa L. cv. Nipponbare, T2 代, *Lc-CDPK* 基因由本研究室前期从羊草中克隆,并以 pCAMBIA3301 为载体,除草剂为筛选标记,构建植物表达载体 pCAMBIA3301-*Lc-CDPK*,由北京未名凯拓农业生物技术有限公司完成遗传转化)和非转基因水稻“日本晴”种子为试验材料,在人工气候箱(光暗 12 h/12 h、温度 25 ℃、相对湿度 80%)中对水

稻幼苗进行培养,定期浇灌营养液(国际水稻研究所,IRRI)^[20]。

1.2 试验设计

对 PCR 鉴定为阳性的三叶期转基因水稻幼苗进行 NaCl-Na₂CO₃ 盐碱胁迫。NaCl、Na₂CO₃ 按比例等体积配制 6 个浓度梯度(表 1),选取长势均匀一致的水稻幼苗胁迫处理 24,48,72 h 后取样测定,

用于确定转基因水稻 *Lc-CDPK* 的最适表达条件,以正常营养液培养(0 mmol/L NaCl-Na₂CO₃)的转基因水稻为对照(CK1)。以转基因水稻 *Lc-CDPK* 最适表达时的盐碱浓度处理水稻幼苗,剪取叶片和根,于-70 ℃冰箱保存备用,用于抗氧化酶和有机小分子物质含量的测定,每个处理 3 次重复,同时以相同胁迫条件的非转基因水稻“日本晴”为对照。

表 1 盐碱浓度配比及酸碱度的设置

Table 1 Ratios of complex saline-alkaline solutions and pH values

处理 Treatment	NaCl 浓度/(mmol·L ⁻¹) NaCl solution concentration	Na ₂ CO ₃ 浓度/(mmol·L ⁻¹) Na ₂ CO ₃ solution concentration	NaCl-Na ₂ CO ₃ 溶液 浓度/(mmol·L ⁻¹)	NaCl-Na ₂ CO ₃ solution Concentration	pH
I	25	25	50		10.1
II	50	50	100		10.3
III	100	50	150		10.4
IV	100	100	200		10.6
V	150	100	250		10.9
VI	200	100	300		11.1

注:NaCl 溶液和 Na₂CO₃ 溶液等体积混合配制 NaCl-Na₂CO₃ 溶液。

Note:NaCl-Na₂CO₃ solution was prepared by mixing NaCl and Na₂CO₃ solutions at equal volume.

1.3 测定项目及方法

1.3.1 有机小分子物质含量测定 甜菜碱含量采用紫外比色法测定^[21],脯氨酸含量采用酸性茚三酮法测定^[21],蔗糖含量采用间苯二酚法测定^[21],山梨醇和甘露醇含量分别对照文献[22]和[23],采用分光光度法测定。

1.3.2 抗氧化酶活性测定 称取 0.5 g 新鲜水稻幼苗根、叶片剪碎,加 0.05 mmol/L、pH 7.0 的磷酸缓冲液(内含质量分数 1%的 PVP)5.0 mL,冰浴研磨提取

后,4 ℃、8 000 r/min 离心 20 min,将上清液定容至 10 mL 用于酶活性测定。其中 SOD 活性采用氮蓝四唑(NBT)光化还原法测定^[24],CAT 活性采用 H₂O₂ 分解法测定^[24],POD 活性采用愈创木酚法测定^[24],GR 活性和 GPX 活性均采用紫外吸收法测定^[25-26]。

1.4 qRT-PCR 测定 *CDPK* 基因的相对表达量

以 *Actin* 为内参引物,检测各基因的相对表达情况。各基因的引物序列见表 2,均由上海生工技术有限公司合成。

表 2 荧光定量引物及碱基组成

Table 2 Primers and base compositions for fluorescence quantitative anlysis

基因 Gene	序列号 Sequence number	引物名 Primer	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')
<i>Lc-CDPK</i> *		Lc-CDPK-F	GGTGGATACCGAGATTGTGTA
		Lc-CDPK-R	TCAAGTGTTCCTCCCGCTCTA
<i>Actin</i>	XM_015784227.1	Actin-F	CCAGCAATGTATGTCGCAAT
		Actin-R	GGTCCAAACGAAGGATAGCA
<i>CAT</i>	X61626.1	CAT-F	TGAAGCCAAGCATGTGAAGA
		CAT-R	GCCCAACGACAACAGAAGAT
<i>GR</i>	XM_015771322.1	GR-F	TGAGTGAACAGCAGGCTTTG
		GR-R	CAACCACCAAGTTTCATGACG
<i>GPX</i>	AY100689.1	GPX-F	AGGTCTGGGATCTGTAGAGCA
		GPX-R	AGTGCAAATGCAACCTGTGA
<i>POD</i>	DQ855429.1	POD-F	AAGAACTGCAGGAGGCTCAA
		POD-R	AGCCTTGACGCATTACAACC
<i>SOD</i>	AY770495.1	SOD-F	AACAAAGGCAGGGCTGTAGA
		SOD-R	TAAGGTTCCAGGCATCAAG

注:* 表示本课题组克隆的羊草 *CDPK* 基因,未注册。

Note: * means the *CDPK* gene of *Leymus chinensis* cloned by our research group,which was not registered.

用 RNAiso Reagent 试剂(TaRaKa 公司)提取试验材料总 RNA,测定 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值为 2.0 左右后,使用 TaRaKa 公司反转录试剂盒合成 cDNA,一

20 ℃冰箱保存备用。以 cDNA 为模板,进行 qRT-PCR 扩增,反应条件为:94 ℃预变性 5 min;94 ℃ 15 s,58 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,40 个循环。每个扩增反

应均重复 3 次,扩增完毕后采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法^[27] 对数据进行分析,计算基因相对表达量。

1.5 数据处理

试验数据取 3 次重复试验的平均值,用 Microsoft Excel 2007 处理数据和绘图,DPS 7.05 软件进行数据统计分析和差异显著性检验,差异显著水平用 $P<0.05$ 或 $P<0.01$ 表示。

2 结果与分析

2.1 转基因水稻根和叶片 *Lc-CDPK* 基因最适表达的盐碱胁迫条件

图 1 表明,不同浓度、不同时间盐碱胁迫处理条件下,转基因水稻根和叶片 *Lc-CDPK* 基因的相对

表达量有显著的上调或下调。由图 1-A 可见,在盐碱浓度为 50,100,150 和 300 mmol/L,与对照相比胁迫 24 h 时转基因水稻根中的 *Lc-CDPK* 基因相对表达量均有所下调,但差异不显著,而在盐碱浓度为 200,250 mmol/L 时,根中 *Lc-CDPK* 基因的相对表达量均显著上调($P<0.05$),这可能是因为转基因水稻根中该基因对短时间内较高浓度盐碱胁迫的应激反应较强,但过高浓度盐碱胁迫则会抑制该基因的表达;胁迫 48,72 h 时,在不同浓度处理条件下转基因水稻根中 *Lc-CDPK* 基因相对表达量均极显著下调($P<0.01$),表明较长时间盐碱胁迫均会明显抑制转基因水稻根中 *Lc-CDPK* 基因的表达。

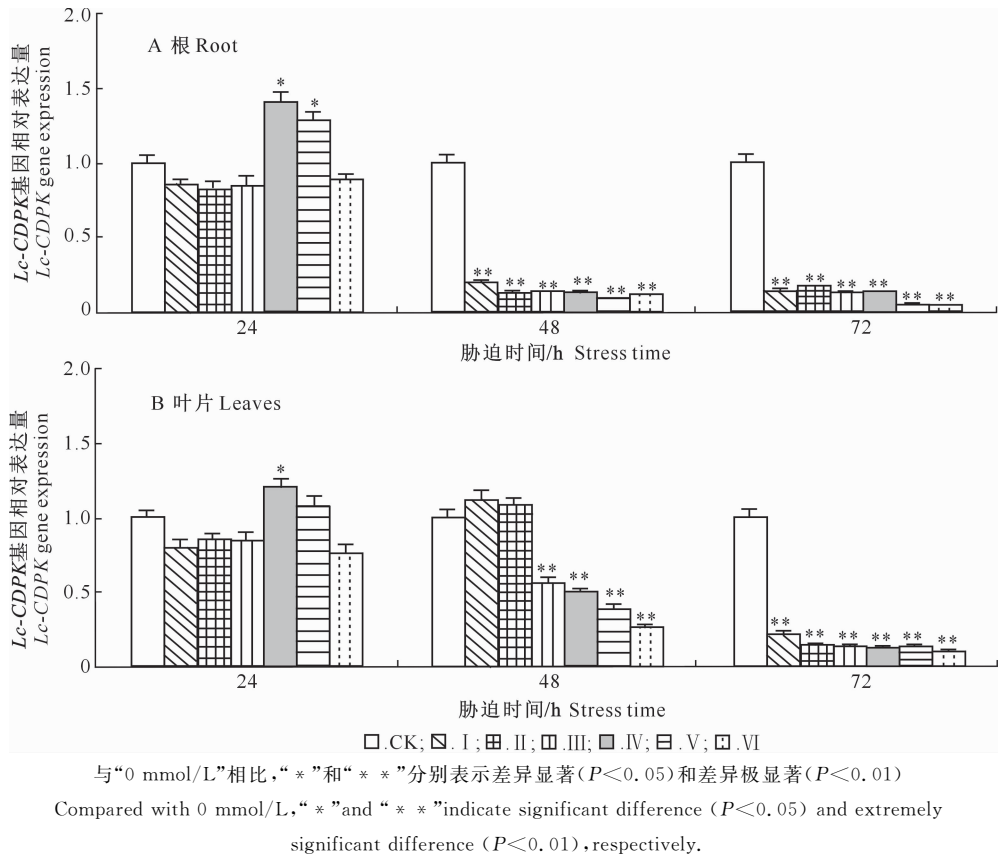


图 1 盐碱胁迫对水稻根、叶片 *CDPK* 基因相对表达量的影响

Fig. 1 Effects of saline-alkaline stress on relative expression of *CDPK* gene in roots and leaves of rice

由图 1-B 可见,当盐碱浓度为 200 mmol/L,与对照相比,胁迫 24 h 时转基因水稻叶片中的 *Lc-CDPK* 基因相对表达量显著上调($P<0.05$),250 mmol/L 时相对表达量也有所上调,但差异不显著,而在其他盐碱浓度胁迫下均有所下调;当盐碱浓度为 50,100 mmol/L,胁迫 48 h 时叶片中的 *Lc-CDPK* 基因相对表达量上调,而其他浓度盐碱胁迫下 *Lc-CDPK* 基因相对表达量均下调,且差异达极显

著水平($P<0.01$);在不同浓度盐碱胁迫 72 h 时,叶片中的 *Lc-CDPK* 基因相对表达量均极显著下调($P<0.01$),推测根 *Lc-CDPK* 基因表达对盐碱胁迫的浓度较叶片敏感,低浓度盐碱胁迫时 *Lc-CDPK* 基因表达的应激时间会有所延迟。

综合转基因水稻根和叶片整体的 *Lc-CDPK* 基因相对表达情况,可知经 200 mmol/L 盐碱胁迫处理 24 h 时,其根和叶片的 *Lc-CDPK* 基因表达水平

最高,由此可以确定 *Lc-CDPK* 基因最适表达的盐碱胁迫条件为 200 mmol/L 盐碱胁迫 24 h。

2.2 盐碱胁迫对转基因水稻渗透调节物质含量的影响

由表 3 可以看出,在 *Lc-CDPK* 基因表达的最适盐碱胁迫处理条件下,除根中的蔗糖和叶中的山梨醇外,转基因水稻根、叶中的其他小分子渗透调节物质含量与对照相比均有所增加。转基因水稻根中脯氨酸、甘露醇和山梨醇含量分别较对照提高 116.0%,88.9%和 115.4%,差异均达极显著水平

($P<0.01$);而蔗糖含量较对照降低 60.1%,差异也达极显著水平($P<0.01$),由此推测转 *Lc-CDPK* 基因能够提高根中可溶性小分子物质含量。转基因水稻叶片中脯氨酸含量较对照高 129.2%,差异极显著($P<0.01$);甜菜碱、甘露醇和蔗糖含量均较对照高,而山梨醇含量较对照低,但差异均不显著($P>0.05$)。脯氨酸是逆境胁迫下易于积累的一种氨基酸,转基因水稻叶片脯氨酸含量增加显著,是对盐碱胁迫的适应反应。

表 3 盐碱胁迫对水稻根、叶片渗透调节物质含量的影响

Table 3 Effects of saline-alkaliness on osmotic adjustment substances in roots and leaves of rice

材料 Materials		甜菜碱/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	脯氨酸/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	甘露醇/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	山梨醇/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	蔗糖/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)
部位 Position	名称 Name	Betaine	Proline	Mannitol	Sorbitol	Sucrose
根 Roots	CK	30.2±1.21	49.4±1.08	0.9±0.03	1.3±0.18	1.43±0.18
	转基因水稻 Transgenic rice	31.2±1.11	106.7±7.75**	1.7±0.04**	2.8±0.32**	0.56±0.06**
叶 Leaves	CK	39.2±0.57	50.6±0.72	3.9±0.11	9.6±0.98	1.56±0.07
	转基因水稻 Transgenic rice	41.2±1.30	116.0±0.81**	4.1±0.14	8.9±0.15	1.57±0.18

注:与对照相比,“*”和“**”分别表示差异显著($P<0.05$)和差异极显著($P<0.01$)。下同。

Note:Compared with the CK,“*”and“**”indicate significant difference($P<0.05$) and extremely significant difference($P<0.01$), respectively. The same below.

2.3 盐碱胁迫对转基因水稻抗氧化酶活性的影响

由表 4 可以看出,在 *Lc-CDPK* 基因表达的最适盐碱胁迫处理条件下,与对照相比,转基因水稻叶片中的抗氧化酶活性均有所增加,而根中只有 GR 活性显著增加,其他酶活性均低于对照。转基因水稻根中的 POD、GPX 活性分别较对照低 25.7%和 17.3%,差异显著($P<0.05$),SOD 和 CAT 活性也较对照低,但差异不显著($P>0.05$);GR 活性较对照高 9.6%,差异显著($P<0.05$)。转基因水稻叶片

中的 CAT、GR 活性分别较对照高 52.1%和 163.5%,差异极显著($P<0.01$);POD、GPX 活性分别较对照高 27.5%和 46.7%,差异显著($P<0.05$);SOD 活性高于对照,但差异不显著($P>0.05$)。由以上结果可知,转基因水稻根、叶片中的抗氧化酶活性与对照相比有一定差异,在根中仅提高了 GR 活性,而叶片中全部抗氧化酶活性均有一定提高,表明 *Lc-CDPK* 基因的过表达更有利于叶片抗氧化能力的提高。

表 4 盐碱胁迫对水稻根、叶片抗氧化酶活性的影响

Table 4 Effects of saline-alkaliness on antioxidant enzyme activities in roots and leaves of rice

U/g

材料 Materials		SOD	POD	CAT	GR	GPX
部位 Position	名称 Name					
根 Roots	CK	155.0±5.86	70.1±0.29	12.2±0.24	1.9±0.76	0.75±0.01
	转基因水稻 Transgenic rice	143.9±13.93	52.3±0.22*	12.1±0.18	2.2±0.54*	0.62±0.02*
叶 Leaves	CK	187.6±2.85	100.4±0.61	17.2±0.25	9.7±0.80	0.45±0.01
	转基因水稻 Transgenic rice	193.6±0.65	128.0±0.70*	26.2±0.24**	25.6±2.03**	0.66±0.02*

2.4 盐碱胁迫对转基因水稻抗氧化酶基因表达的影响

图 2 显示,盐碱胁迫条件下转基因水稻根、叶片抗氧化酶基因表达水平与对照有一定差异。与对照相比,转基因水稻根中只有 GR 基因相对表达量上调,是对照的 1.6 倍,二者差异极显著($P<0.01$);其他基因表达均下调,转基因水稻根中 SOD、POD、

CAT 和 GPX 基因相对表达量分别较对照减少 87%,82%,63%和 76%,差异均极显著($P<0.01$)。与对照相比,转基因水稻叶片中全部抗氧化酶基因相对表达量均上调,SOD、POD 基因相对表达量分别是对照的 1.33 和 1.19 倍,差异均显著($P<0.05$);CAT、GPX 基因相对表达量分别是对照的 3.96 和 2.73 倍,差异均极显著($P<0.01$);GR 基因

相对表达上调,但未见显著差异($P>0.05$)。

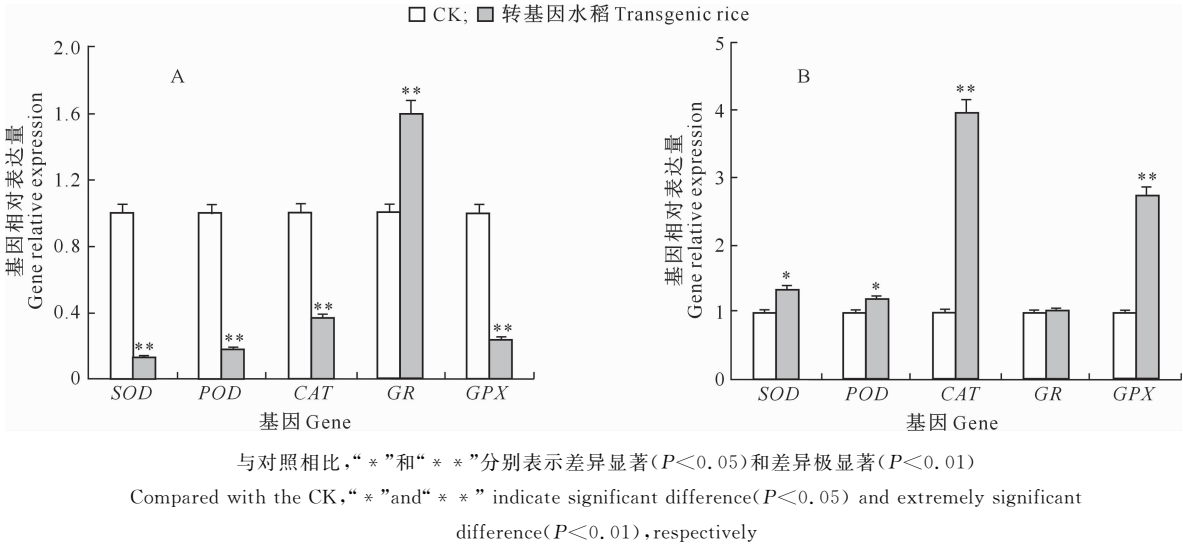


图 2 盐碱胁迫对转基因水稻根(A)和叶片(B)中抗氧化酶基因表达的影响

Fig. 2 Effects of saline-alkaline stress on relative expression of antioxidant enzyme gene in roots (A) and leaves (B) of transgenic rice

抗氧化酶活性与其基因表达量的相关性分析结果表明,根中的 POD、GR 和 GPX 活性与其基因的相对表达量均呈显著正相关($r=0.603^*$, $r=0.712^*$, $r=0.541^*$), SOD、CAT 活性与其基因的相对表达量呈正相关,但相关性未达到显著水平($P>0.05$);叶片中的 SOD、CAT 活性与其基因的相对表达量均呈显著正相关($r=0.488^*$, $r=0.708^*$), POD、GPX 活性与其基因的相对表达量均呈极显著正相关($r=0.861^{**}$, $r=0.813^{**}$), GR 活性与其基因的相对表达量呈正相关,但未达到显著水平($P>0.05$)。说明浓度 200 mmol/L 盐碱胁迫处理 24 h 时,转基因水稻叶片相关抗氧化酶基因表达的上调,提高了酶活性和叶片的抗氧化能力,但在根中并未表现出明显的正向调节作用。

3 讨论与结论

自 Fridovich^[28] 提出生物自由基假说以来,该假说已在植物抗逆研究中受到广泛关注。许多研究表明,脯氨酸和甜菜碱等小分子有机物对防御膜脂过氧化起着很重要的作用^[9,11]。干旱、盐碱胁迫下脯氨酸和可溶性糖积累增加,有助于清除胁迫条件下植株体内的活性氧,这可能与脯氨酸和可溶性糖作为渗透调节物质和调节信号的双重功能有关^[29-30]。植物转逆境相关基因能大量表达低分子量化合物,提高转基因植物抗渗透胁迫的能力^[12]。本试验结果表明,盐碱胁迫下转 *Lc-CDPK* 基因水稻根中脯氨酸、甘露醇、山梨醇等可溶性小分子物质含量较非

转基因水稻极显著增高,而蔗糖含量极显著下降;叶片中脯氨酸含量极显著增加,这与前人研究结果^[11-12] 相似,说明盐碱胁迫下转基因水稻幼苗能进一步提高渗透调节物质的含量。盐碱胁迫下转 *Lc-CDPK* 基因水稻根中蔗糖含量下降,可能是由于蔗糖等有机物向根中的运输受到抑制,碳水化合物主要用于地上部的形态建成。

逆境条件下,植物器官的衰老过程是活性氧代谢失调的过程,而 SOD、POD 和 CAT 等是植物体内最重要的活性氧清除酶^[31]。许多研究表明,盐胁迫下植物抗氧化酶基因表达量在转录水平上调可以提高抗氧化酶的活性,能更有效地减少活性氧的积累^[32-33]。Saijo 等^[34] 研究证明,当水稻受到盐碱胁迫时, *OsCPK7* 基因表达上调,过表达的 *OsCPK7* 基因能够提高水稻耐盐性。在盐胁迫处理下,转 *TsPIP1;1* 基因水稻能显著增加渗透调节物质含量,提高细胞持水能力,增强水稻的耐盐性^[35]。本研究结果表明,在 *Lc-CDPK* 基因最适表达的盐碱胁迫处理条件下,转基因水稻叶片 CAT、POD 等抗氧化酶基因相对表达量均显著上调,其抗氧化酶活性也高于非转基因水稻,这与张庆华等^[19] 的研究结果类似,说明转入 *Lc-CDPK* 基因可能在提高抗氧化酶活性方面有一定的作用,其通过调控抗氧化酶基因的表达水平以维持较高的活性来应答盐碱胁迫。本研究发现,转基因水稻根中 POD、GPX 基因相对表达量极显著下降,其抗氧化酶活性也显著降低,而 SOD、CAT 基因相对表达量虽极显著下降,

但 SOD、CAT 活性降低却不明显,只有 *GR* 基因相对表达量及酶活性均较高,高活性的 *GR* 有利于 GSH(还原型谷胱甘肽)的形成,从而为活性氧清除提供还原力。以上结果说明,转 *Lc-CDPK* 基因可能导致抗氧化酶活性的调节存在组织器官特异性,类似的研究结果在其他方面也有报道^[36]。

本研究结果还表明,在 *Lc-CDPK* 基因表达的最适盐碱胁迫处理条件下,转基因水稻根、叶片的抗氧化酶基因表达量及酶活性变化不同,叶片抗氧化酶基因表达量及酶活性要高于对照,水稻根中只有 *GR* 基因相对表达量及酶活性上调表达,其他基因均低于对照,这可能由于水培条件下根部最先受到毒害,因此根中的抗氧化酶活性先受抑制。从整体上看,转基因水稻根、叶片中的抗氧化酶活性与基因相对表达量均呈正相关。盐碱胁迫条件下,过表达的 *Lc-CDPK* 基因可诱导转基因水稻抗逆基因的响应,从而增强植物抗逆能力,说明外源基因在转基因水稻中的表达对内源功能相关组分产生了一定的影响,推测 *Lc-CDPK* 基因对提高水稻叶片中抗氧化酶基因的表达水平有积极作用,转基因水稻抗盐碱胁迫水平的提高可能是外源基因和内源基因共同作用的结果。

抗氧化酶系的表达水平和渗透调节物质的积累量与水稻对盐碱胁迫的抗性密切相关,*Lc-CDPK* 基因表达可能调控相关抗氧化酶基因表达的变化或其基因产物活性的改变,从而共同发挥作用,提高抗逆水平。转 *Lc-CDPK* 基因能提高水稻根、叶片的渗透调节物质含量,有效诱导小分子渗透调节物质产生,增强水稻叶片中的抗氧化酶活性及其基因的相对表达,使抗氧化酶基因表达量的变化与酶活性变化较为一致,由此推测 *Lc-CDPK* 基因参与调控盐碱胁迫植物的生理过程,提高植物对盐碱胁迫的耐受能力。

[参考文献]

- [1] 肖克飏,吴普特,雷金银,等. 不同类型耐盐植物对盐碱土生物改良研究 [J]. 农业环境科学学报,2013,31(12):2433-2440.
Xiao K B, Wu P T, Lei J Y, et al. Bio-reclamation of different halophytes on saline-alkali soil [J]. Journal of Agro-Environment Science, 2013, 31(12): 2433-2440.
- [2] 王云贺,王志春,杨帆,等. 不同改良物质对苏打碱土盐碱度及水稻生长的影响 [J]. 华南农业大学学报,2013,34(4):445-449.
Wang Y H, Wang Z C, Yang F, et al. Effect of different ameliorate materials on soda alkaline-alkalinity and rice growth [J]. Journal of South China Agricultural University, 2013, 34(4): 445-449.
- [3] Chen Y X, Zhou X J, Chang S, et al. Calcium-dependent protein kinases 21 phosphorylates 14-3-3 proteins in response to ABA signaling and salt stress in rice [J]. Biochem Bioph Res Co, 2017, 493(4): 1450-1456.
- [4] Cheng S H, Willmann M R, Chen H C, et al. Calcium signaling through protein kinases: the *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase gene family [J]. Plant Physiol, 2002, 129(2): 469-485.
- [5] Asano T, Tanakan, Yang G, et al. Genome-wide identification of the rice calcium-dependent protein kinase and its closely related kinase gene family: comprehensive analysis of the *CDPKs* gene family in rice [J]. Plant Cell Physiol, 2005, 46(2): 356-366.
- [6] 李月树,祝廷成. 羊草种群地上生物量形成规律的探讨 [J]. 植物生态学与地植物学丛刊, 1983, 7(4): 289-298.
Li Y S, Zhu T C. The regularities of formation of aboveground biomass of *Leymus chinensis*' population [J]. Acta Phytocologica et Geobotanica Sinica, 1983, 7(4): 289-298.
- [7] 崔喜艳,张继伟,秦思余,等. 羊草钙依赖蛋白激酶基因生物信息学及表达特性分析 [J]. 中国草地学报, 2015, 37(3): 11-18.
Cui X Y, Zhang J W, Qin S Y, et al. Analysis of bioinformatics and expression pattern of calcium-dependent protein kinase gene in *Leymus chinensis* [J]. Chinese Journal of Grassland, 2015, 37(3): 11-18.
- [8] Sheen J. Ca^{2+} -dependent protein kinases and stress signal transduction in plants [J]. Science, 1996, 274(5294): 1900-1902.
- [9] 郑炳松,朱诚,金松恒. 高级植物生理学 [M]. 杭州:浙江大学出版社, 2011: 222-223.
Zheng B S, Zhu C, Jin S H. Advanced plant physiology [M]. Hangzhou: Zhejiang University Press, 2011: 222-223.
- [10] 麻浩,王爽,周亚丽. 植物中钙依赖蛋白激酶的研究进展 [J]. 南京农业大学学报, 2017, 40(4): 565-572.
Ma H, Wang S, Zhou Y L. Research progress of calcium-dependent protein kinases in plants [J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2017, 40(4): 565-572.
- [11] 王俭珍,刘倩,高娅妮,等. 植物对盐碱胁迫的响应机制研究进展 [J]. 生态学报, 2017, 37(16): 5565-5577.
Wang Q Z, Liu Q, Gao Y N, et al. Review on the mechanisms of the response to salinity-alkalinity stress in plants [J]. Acta Ecologica Sinica, 2017, 37(16): 5565-5577.
- [12] 陈芸,郑勇,刘霞,等. 过量表达棉花 *CBF2* 基因提高转基因拟南芥抗旱耐盐能力 [J]. 植物科学学报, 2016, 34(6): 888-900.
Chen Y, Zheng Y, Liu X, et al. Overexpression of the cotton *CBF2* gene enhances salt and drought tolerance in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Science Journal, 2016, 34(6): 888-900.
- [13] 刘文瑜,杨发荣,黄杰,等. NaCl 胁迫对藜麦幼苗生长和抗氧化酶活性的影响 [J]. 西北植物学报, 2017, 37(9): 1797-1804.
Liu W Y, Yang F R, Huang J, et al. Response of seedling growth and the activities of antioxidant enzymes of *Chenopo-*

- dium quinoato* salt stress [J]. Acta Bot Boreal-Occident Sin, 2017, 37(9): 1797-1804.
- [14] Andr s C G, Leandro A S, Luiz G A, et al. Vermicompost humic acids modulate the accumulation and metabolism of ROS in rice plants [J]. J Plant Physiol, 2016, 192(15): 56-63.
- [15] Shirasawa K, Takabe T, Takabe T, et al. Accumulation of glycine-betaine in rice plant that overexpress choline monooxygenase from spinach and evaluation of their tolerance to abiotic stress [J]. Annals of Botany, 2006, 98(3): 565-571.
- [16] Wang Y, Gao P, Huang M, et al. Effects of high temperature on the activity and expression of antioxidative enzymes in rice flag leaves during the flowering stage [J]. Plant Science Journal, 2015, 33(3): 355-361.
- [17] Hu T, Li H Y, Zhang X Z, et al. Toxic effect of NaCl on ion metabolism, antioxidative enzymes and gene expression of perennial ryegrass [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2011, 74(7): 2050-2056.
- [18] 丁艳芬. 玉米 ZmCPK11 在 ABA 诱导的抗氧化防护中的功能分析 [D]. 南京: 南京农业大学, 2012.
Ding Y F. Function analysis of ZmCPK11 in the ABA-induced antioxidant defense in maize leave [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2012.
- [19] 张庆华. 枳两个基因 *ptrABF* 和 *ptrCDPK* 转化枳的抗逆功能及其作用机制解析 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2015.
Zhang Q H. Function characterization of stress-response and elucidation of mechanism underling the enhanced stress tolerance of *ptrABF* and *ptrCDPK* in *Poncirus trifoliata* [D]. Wuhan: Central China Agricultural University, 2015.
- [20] Yoshida S, Forno D A, Cock J H, et al. Laboratory manual for physiological studies of rice [M]. Manila: Int Rice Res Inst, 1976.
- [21] 汤章城. 现代植物生理学实验指南 [M]. 北京: 科技出版社, 1999: 127, 303-304.
Tang Z C. Modern plant physiology experiment [M]. Beijing: Science Press, 1999: 127, 303-304.
- [22] 梁振明. 分光光度法测定山梨醇含量 [J]. 中国食品添加剂, 2007(1): 184-185, 183.
Liang Z M. Determination of sorbitol content by spectrophotometry [J]. China Food Additives, 2007(1): 184-185, 183.
- [23] 焦 锐, 邹 翔, 王 英. 分光光度法测定海藻类中甘露醇的含量 [J]. 连云港师范高等专科学校学报, 2016(1): 106-108.
Jiao R, Zou X, Wang Y. Determination of mannitol in sea algae by spectrophotometry [J]. Journal of Lianyungang Normal College, 2016(1): 106-108.
- [24] 李合生. 植物生理生化实验原理与技术 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 164-168.
Li H S. Principles and techniques of plant physiological biochemical experiment [M]. Beijing: Higher Education Press, 2000: 164-168.
- [25] Khatun S, Ali M B, Hahn E, et al. Copper toxicity in *Withania somnifera*: growth and antioxidant enzymes responses of *in vitro* grown plants [J]. Environmental and Experimental Botany, 2008, 64(3): 279-285.
- [26] Hodges D M, Andrews C J, Johnson D A, et al. Antioxidant enzyme responses to chilling stress in differentially sensitive inbred maize lines [J]. Journal of Experimental Botany, 1997, 48(310): 1105-1113.
- [27] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [28] Fridovich I. Superoxide dismutases [J]. Annu Rev Biochem, 1975, 44: 147-159.
- [29] Bai L P, Sui F G, Ge T D, et al. Effect of soil drought stress on leaf water status, membrane permeability and enzymatic antioxidant system of maize [J]. Pedosphere, 2006, 16(3): 326-332.
- [30] Campos M K F, Carvalho K, Souza F S, et al. Drought tolerance and antioxidant enzymatic activity in transgenic ‘Swin-gle’ citrumelo plants over-accumulating proline [J]. Environ Exp Bot, 2011, 72: 242-250.
- [31] 陈展宇, 李大勇, 刘国宁, 等. 不同产量水平大豆叶片保护酶活性的比较 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2012, 40(3): 99-103.
Chen Z Y, Li D Y, Liu G N, et al. Comparison of protective enzyme activity in leaves of soybean at different yield levels [J]. Journal of Northwest A&F University (Nat Sci Ed), 2012, 40(3): 99-103.
- [32] 肖国增, 腾 珂, 李林洁, 等. 盐胁迫下匍匐剪股颖抗氧化酶活性及基因表达机制研究 [J]. 草业学报, 2016, 25(9): 74-78.
Xiao G Z, Teng K, Li L J, et al. Antioxidant enzyme activity and gene expression in creeping bentgrass under salt stress [J]. Acta Prataculturae Sinica, 2016, 25(9): 74-78.
- [33] 王 艳, 高 鹏, 黄 敏, 等. 高温对水稻开花期剑叶抗氧化酶活性及基因表达的影响 [J]. 植物科学学报, 2015, 33(3): 355-361.
Wang Y, Gao P, Huang M, et al. Effect of high temperature on the activity and expression of antioxidant enzyme in rice flag leaves during the flowering stage [J]. Plant Science Journal, 2015, 33(3): 355-361.
- [34] Saijo Y, Hata S, Kyozuka J, et al. Over-expression of a single Ca^{2+} -dependent protein kinase confers both cold and salt/drought tolerance on rice plants [J]. Plant J, 2000, 23(3): 319-327.
- [35] 李 伟, 韩 娇, 黄升财, 等. 小盐芥 *TsPIP1;1* 与 *TsTIP1;1* 基因增强转基因水稻耐盐性 [J]. 植物营养与肥料学报, 2017, 23(4): 957-963.
Li W, Han J, Huang S C, et al. *Thellungiella salsuginea* *TsPIP1;1* and *TsTIP1;1* enhanced the salt tolerance of transgenic rice [J]. Journal of Plant Nutrition and Fertilizer, 2017, 23(4): 957-963.
- [36] Zhao F Y, Wang X Y, Zhao Y X, et al. Transferring the *Suaeda salsa* glutathione S-transferase and catalase genes enhances low temperature stress resistance in transgenic rice seedlings [J]. J Plant Physiol Mol Biol, 2006, 32(2): 231-238.