

网络出版时间:2015-01-05 08:59 DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2015.02.009
网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20150105.0859.009.html

胡杨 *PeSOS1* 对拟南芥盐诱导 H_2O_2 信号途径的调控

王美娟¹, 王 洋¹, 申泽丹¹, 马旭君¹, 撒 刚¹, 邓澍荣¹,
刘丹丹², 张玉红¹, 沈 昕¹, 陈少良¹

(1 北京林业大学 生物科学与技术学院, 北京 100083; 2 房山区琉璃河镇大陶村村委会, 北京 102403)

[摘要] 【目的】研究胡杨质膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白(SOS1)通过 H_2O_2 信号途径对盐胁迫的感知和适应作用。【方法】克隆胡杨质膜 SOS1 基因(*PeSOS1*), 并将其转化到拟南芥中, 比较野生型和转 *PeSOS1* 基因拟南芥在 100 mmol/L NaCl 胁迫下的萌发率, 根长, 干质量, K^+ 、 Na^+ 和 Ca^{2+} 含量, 活体植株根尖离子流(K^+ 、 Na^+ 和 H^+)的流动情况, H_2O_2 的产生和抗氧化酶活性的变化以及抑制剂对根尖离子流的影响, 分析 100 mmol/L NaCl 胁迫下异源表达 *PeSOS1* 基因拟南芥与野生型拟南芥耐盐性的差异。【结果】在 NaCl 胁迫下, 转 *PeSOS1* 基因拟南芥株系的萌发率、根长和干质量明显高于野生型拟南芥; 转 *PeSOS1* 基因拟南芥 K^+ 和 Ca^{2+} 含量也高于野生型拟南芥, 而 Na^+ 含量较野生型拟南芥低。100 mmol/L NaCl 处理后, 转 *PeSOS1* 基因拟南芥中 K^+ 和 Na^+ 的平衡(K^+/Na^+ 值)与 NaCl 胁迫前相比下降幅度较小。转 *PeSOS1* 基因植株在 NaCl 胁迫下能更快地产生 H_2O_2 , 并使抗氧化酶保持较高的活性。SOS1 抑制剂阿米洛利(Amiloride)对 NaCl 胁迫下野生型和转基因拟南芥根尖离子流的变化有明显影响, 用质膜 NADPH 氧化酶抑制剂 DPI (抑制 H_2O_2 的产生)处理后, 转 *PeSOS1* 基因拟南芥根尖 K^+ 内流减弱, Na^+ 外流和 H^+ 内流增强, 植株维持 K^+ 和 Na^+ 平衡的能力减弱。【结论】在拟南芥中异源表达 *PeSOS1* 基因可促进 H_2O_2 快速产生, 维持了 SOS1 mRNA 的稳定性, 调控了 K^+ 和 Na^+ 平衡, 并激活了抗氧化防御系统, 因而显著提高了其耐盐性。

[关键词] 胡杨; 盐胁迫; 转基因拟南芥; 质膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白(SOS1); H_2O_2 信号; K^+/Na^+ 平衡; 离子流

[中图分类号] S792.119; Q785

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2015)02-0079-13

Modulation of H_2O_2 signaling in salt-stressed *Arabidopsis* by *PeSOS1*

WANG Mei-juan¹, WANG Yang¹, SHEN Ze-dan¹, MA Xu-jun¹,
SA Gang¹, DENG Shu-rong¹, LIU Dan-dan²,
ZHANG Yu-hong¹, SHEN Xin¹, CHEN Shao-liang¹

(1 College of Biological Sciences and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China;

2 Datao Village of Coloured Glaze River Town, Fangshan District, Beijing 102403, China)

Abstract: 【Objective】 This study aimed to investigate the role of *PeSOS1* in salt sensing and adaption through H_2O_2 signaling. 【Method】 Plasma Membrane (PM) Na^+/H^+ antiporter gene *PeSOS1* of *Populus euphratica* was cloned and introduced to *Arabidopsis thaliana*. Then differences in salt tolerance between wild-type and *PeSOS1*-transgenic *Arabidopsis* plants were illustrated by comparing germination, root length, biomass, contents of K^+ , Na^+ and Ca^{2+} , fluxes of root K^+ , Na^+ and H^+ , H_2O_2 production, antioxi-

〔收稿日期〕 2013-10-25

〔基金项目〕 国家自然科学基金项目(31270654, 31170570); 教育部科学技术研究项目(113013A); 北京市自然科学基金项目(6112017); 中央高校基本科研业务费专项(JC2011-2, TD-2012-04); 北京市优秀博士学位论文指导教师专项(YB20081002201); 高等学校学科创新引智计划项目(111 Project, B13007)

〔作者简介〕 王美娟(1983—), 女, 山东济宁人, 博士, 主要从事树木抗逆生理与分子生物学研究。E-mail: colorhail@sina.com

〔通信作者〕 陈少良(1969—), 男, 河北霸州人, 教授, 博士生导师, 主要从事林木抗逆生理与分子生物学研究。
E-mail: Lschen@bjfu.edu.cn

dant enzyme activity and effects of inhibitor on ion fluxes of homozygous seedlings under 100 mmol/L NaCl salt stress. 【Result】 Compared to wild-type, *PeSOS1*-transgenic *Arabidopsis* plants had higher germination rate, root length, and biomass under NaCl stress. *PeSOS1*-transgenic *Arabidopsis* plants also had higher contents of K^+ and Ca^{2+} but lower content of Na^+ . Transgenic plants exhibited lower ratio of Na^+/H^+ antiporter compared to wild-type. In roots of transgenic *Arabidopsis*, H_2O_2 production was more rapidly than wild-type when plants were subjected to NaCl stress and the activities of the antioxidant enzymes were higher. Transgenic plants were unable to remain K^+/Na^+ homeostasis when salt-induced H_2O_2 production was inhibited by diphenylene iodonium (DPI), an inhibitor of NADPH oxidase. 【Conclusion】 *PeSOS1* increased salt tolerance through rapid H_2O_2 production, which maintained the stability of *SOS1* mRNA, controlled K^+/Na^+ homeostasis and triggered antioxidant defense in *Arabidopsis*.

Key words: *Populus euphratica*; salt stress; transgenic *Arabidopsis*; PM Na^+/H^+ antiporter (*SOS1*); H_2O_2 signaling; K^+/Na^+ homeostasis; ion flux

质膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白 (*SOS1*) 基因在植物抗盐中的重要作用已广为人知。2007 年, Wu 等^[1] 用 RACE 技术克隆了胡杨 *SOS1* 蛋白的基因 *PeSOS1* (GenBank 登录号: DQ517530.1), 其 cDNA 全长为 3 665 bp, 包含一个长 3 438 bp 的开放读码框, 编码 1 145 个氨基酸, 理论分子质量为 127 ku, 预测此蛋白 N 端有 12 个跨膜区, 其跨膜区与其他植物和微生物高度相似; C 端有一个位于胞质内的长亲水性尾巴, 其氨基酸序列与拟南芥的质膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白 (*AtSOS1*) 相似度为 64%, 在盐胁迫下其蛋白水平会上调, 转化到缺失 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白 *EcNhaA* 和 *EcNhaB* 活性的盐敏感大肠杆菌 EP432 中后, 发现可以抑制大肠杆菌对盐的敏感性, 提高其耐盐性。抗体定位试验结果证明, *PeSOS1* 定位在质膜上, 其功能是将细胞内的 Na^+ 排出胞外以避免胞质内过多 Na^+ 的积累; 盐胁迫下, 胡杨叶片中 *PeSOS1* 的表达上调, 质膜 H^+ -ATPase 也同时上调; 上调的质膜 H^+ -ATPase 可为 *PeSOS1* 外排 Na^+ 提供动力^[2]。Chung 等^[3] 在拟南芥中发现, 在盐胁迫下本身不稳定的 *AtSOS1* mRNA 稳定性有所增加, 主要是由活性氧介导所致; *AtSOS1* 活性同时受转录后水平的调控^[4]。但目前对 *SOS1* 和 H_2O_2 的相互作用机制尚不清楚。

本试验将胡杨的 *PeSOS1* 基因转到拟南芥中, 通过实时荧光定量 PCR 分析不同转基因株系拟南芥中 *PeSOS1* 表达量的差异; 并利用 3 个 *PeSOS1* 表达量较高的株系进行耐盐性及 *PeSOS1* 与 H_2O_2 相关性研究, 比较野生型拟南芥和转 *PeSOS1* 基因拟南芥在盐胁迫下的萌发率、根长、离子含量、根尖离子流、 H_2O_2 的产生及相关抗氧化酶活性等指标, 以为探明胡杨 *PeSOS1* 响应盐胁迫的作用机制奠

定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试植物 胡杨为新疆 2 年生胡杨实生苗, 4 月份将其栽种在 10 L 塑料花盆里 (1 株/盆), 培养基质为土和砂按 1:1 体积比混合的基质, 置于北京林业大学的苗圃中进行培养, 培养期间视天气情况定期浇水和除草, 且每隔 1 周每桶苗木浇 1 L Hoagland 全营养液。

拟南芥为哥伦比亚生态型 (*Columbia ecotype*, Col-0), 由北京林业大学沈昕实验室留存。培养条件为: 温度 25/22 °C (昼/夜), 相对湿度 70%, 光照强度 150 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, 光照周期为 8 h 黑暗/16 h 光照。

1.1.2 菌株、质粒与试剂 大肠杆菌 TOP10 及感受态, 由北京林业大学沈昕实验室留存或制备; 农杆菌 GV3101, 购自北京科百奥生物科技有限责任公司; 中间载体 pENTR/D-TOPO 试剂盒 (2 580 bp, 筛选标记为卡那霉素), 购自 Invitrogen 公司。植物稳定表达载体 pK7m34GW2-8m21GW3D.0 (pK7, 15 801 bp, 筛选标记为壮观霉素), 由北京林业大学沈昕实验室留存。

r *Taq* DNA polymerase、Ex *Taq* DNA polymerase, Takara (宝生物工程大连有限公司) 生产; Silwet-77, 美国 GE 公司生产; 质粒提取试剂盒和胶回收试剂盒, 购自天根生化科技 (北京) 有限公司; Gateway LR Clonase II Enzyme Mix、RNA 提取试剂 Trizol reagent 和逆转录试剂盒 SuperScript III Reverse Transcriptase 试剂盒, 购自 Invitrogen 公司; Oligo (dT)₁₅, 购自 Promega; 十二烷基硫酸钠 (SDS)、二硫苏糖醇 (DTT)、DEPC、琼脂糖、氨苄青

霉素、卡那青霉素和壮观霉素,为 Sigma 公司生产;胰蛋白胨、酵母提取物,为英国 Oxoid 公司生产;其他普通国产分析纯试剂为北京化工厂生产。

1.2 方法

1.2.1 胡杨 RNA 提取与 cDNA 一链的合成 按照 Trizol 说明书提取胡杨幼嫩叶片的总 RNA^[2],用 SuperScript III Reverse Transcriptase 试剂盒反转录合成 cDNA。

1.2.2 *PeSOS1* 的克隆 根据胡杨质膜 *PeSOS1* (GenBank 登录号:DQ517530.1)的序列,用 Primer Premier 5.0 软件设计引物 (S-P1f: 5'-ATGGG-GAGCGCGATAGAAACAG-3', S-P1r: 5'-CTAA-GAAGCATGATGGAACGAC-3') 进行 PCR 扩增。PCR 体系为: 2.5 μ L 10 \times *Taq* buffer, 17.5 μ L ddH₂O, 1 μ L dNTP mix (10 mmol/L), 引物 (S-P1f、S-P1r)各 1 μ L, 1 μ L DNA 模板, 1 μ L Ex *Taq* DNA polymerase (5 U/ μ L)。反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 3.5 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 反应后延伸 10 min。用 ddH₂O 代替模板为阴性对照。

1.2.3 载体的构建 *PeSOS1* 测序无误后,用带接头的引物,即 CACC + S-P1f 和 S-P1r 扩增 *PeSOS1*,取定量 PCR 产物按照 pENTR/D-TOPO 试剂盒说明书直接构建中间载体 pENTR/D-TOPO-*PeSOS1*;反应产物转化大肠杆菌 TOP10 后铺板,挑单菌落提质粒,鉴定成功后按照 Gateway LR Clonase II Enzyme Mix 说明书重组 pENTR/D-TOPO-*PeSOS1* 与 pK7,构建植物表达载体 pK7-*PeSOS1*。利用 Primer Premier 5.0 软件,设计鉴定检测所用引物 S-P2f: 5'-AGGATGAGGAACTTGGA-CCTG-3', S-P2r: 5'-CCTGAGGAAATGTAACAC-GGAC-3',其 PCR 产物长度约 600 bp。PCR 反应体系 (25 μ L) 为: ddH₂O 18 μ L, 10 \times Buffer 2.5 μ L, dNTP 1 μ L, S-P2f 1 μ L, S-P2r 1 μ L, DNA 1 μ L, r *Taq* DNA polymerase 0.5 μ L。PCR 反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 循环 30 次; 72 $^{\circ}$ C 反应后延伸 10 min, 然后于 10 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.4 拟南芥的转化 将 pK7-*PeSOS1* 和空载体 pK7 质粒(阴性对照)转化农杆菌 GV3101 后,用蘸花侵染方法转化拟南芥^[5]。用卡那霉素筛选拟南芥转 *PeSOS1* 阳性植株,再根据孟德尔分离定律筛选纯合子,用其种子开展后续试验。PCR 鉴定时,阳性对照为用质粒 pK7 作模板进行 PCR 扩增; 阴性

对照为用 ddH₂O 作模板进行扩增。

1.2.5 不同拟南芥株系 *PeSOS1* 表达量的实时荧光定量 PCR (Real Time PCR) 分析 取在人工营养土中生长 4 周并用 0 和 100 mmol/L NaCl 处理 3 d 的野生型 (WT)、转空载体 (VC) 和转 *PeSOS1* 基因拟南芥,提取 RNA (RNA 提取方法同 1.2.1),反转录合成 cDNA (方法同 1.2.1),用荧光定量 PCR 仪 (美国 Bio-Rad MJ Opticon 2) 进行 Real time PCR,检测盐处理对不同株系 *PeSOS1* 基因表达量的影响。PCR 反应体系 (25 μ L) 为: 2.5 μ L 10 \times buffer, 17 μ L ddH₂O, 1 μ L dNTP mix (10 mmol/L), 引物 (S-P3f (5'-GTGAACAGAACGGT-GTAGGG-3'), S-P3r (5'-CGAGTCTCATTTGT-GCCTGT-3') 或内参基因 *Actin* 的 Actin-f (5'-AT-TACCCGATGGGCAAGTCA-3'), Actin-r (5'-TG-CTCATACGGTCAGCGATAC-3')) 各 1 μ L, DNA Evagreen Green I MIX 1 μ L, 1 μ L cDNA 模板, 0.5 μ L r *Taq* DNA polymerase (10 U/ μ L)。反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 20 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 20 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 20 s, 40 个循环; 72 $^{\circ}$ C 反应后延伸 10 min。以 *Actin* 为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算 *PeSOS1* 基因的相对表达量。

1.2.6 转基因拟南芥的耐盐性分析 1) 盐胁迫对转 *PeSOS1* 基因拟南芥萌发率的影响。取野生型和转 *PeSOS1* 基因株系拟南芥的 T₃ 代纯合子种子,先用质量分数 2% 次氯酸钠和体积分数 75% 乙醇无菌消毒处理,再用无菌水洗 3 次,然后播种在盐浓度分别为 0, 100 和 150 mmol/L 的 1/2 MS 培养基上,每天观察并记录其萌发率,至第 5 天结束。

2) 盐胁迫对转 *PeSOS1* 基因拟南芥根长的影响。拟南芥种子萌发 3 d 后 (种子无菌处理方法同上),在无菌条件下转移到含 0 和 100 mmol/L NaCl 的 1/2 MS 培养基上,为了保证试验处理条件的一致性,需要将种子播在同一培养皿的同一水平线上,且培养皿要垂直放,每 1~2 d 观察 1 次,拍照并测量其根长,至第 12 天结束。

1.2.7 盐胁迫下转基因拟南芥生理指标的变化

1) 盐胁迫对拟南芥干质量及 K⁺、Na⁺、Ca²⁺ 含量的影响。野生型与转 *PeSOS1* 基因拟南芥种子萌发 5 d 后,转移到含 0, 50 和 100 mmol/L NaCl 的直径 9 cm 花盆中,花盆中营养土和蛭石的体积比为 1:1 (用 PNS 营养液泡过夜后使用),每盆 4~6 株,每个株系种 6 盆,覆膜后避光培养 2 d 后见光,光照 3 d 后揭膜,培养 3 周后取地上部分称取鲜质量,杀青后

烘干,称干质量,样品粉碎后消煮,用原子吸收分光光度计测定 K^+ 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 含量,材料培养与处理等参见 Wang 等^[6]的方法。

2) 盐胁迫对拟南芥根尖离子流的影响。野生型与转 *PeSOS1* 基因拟南芥种子萌发后,均转移至含 0 和 100 mmol/L NaCl 的 1/2 MS 培养基上生长 1 或 7 d,以 0 mmol/L NaCl 处理作为对照(CK),测定 K^+ 、 Na^+ 、 H^+ 流的变化,具体步骤见 Wang 等^[6]和 Sun 等^[7]的方法。因在 0 mmol/L NaCl 处理培养基上生长 1 与 7 d 时根尖离子流的变化趋势一致,因此对照仅列 1 d 时的结果。

3) *SOS1* 抑制剂阿米洛利(Amiloride)对盐胁迫下拟南芥根尖离子流的影响。野生型与转 *PeSOS1* 基因拟南芥种子萌发 7 d 后,转移至含 0 和 100 mmol/L NaCl 的 1/2 MS 培养基上生长 7 d 左右,测定 K^+ 、 Na^+ 、 H^+ 流的变化。在含 0 和 100 mmol/L NaCl 的 1/2 MS 液体培养基中,加入 100 μ mol/L Amiloride 处理 NaCl 胁迫前后拟南芥 2 h,再用含 100 μ mol/L Amiloride 的测试液泡 30 min,然后测定其 K^+ 、 Na^+ 、 H^+ 流的变化。

1.2.8 盐胁迫下转基因拟南芥根中 H_2O_2 的产生及抗氧化酶活性的变化 1) 产生 H_2O_2 的测定。在 1/2 MS 培养基上播种无菌处理的拟南芥种子,培养拟南芥无菌组培苗,生长 1 周时,分别移到含有 0 (CK)和 100 mmol/L NaCl 的 1/2 MS 固体培养基上(配制培养基时加入相应浓度的 NaCl)分别培养 10 min,24 h 和 7 d,利用含 50 μ mol/L H_2O_2 的探针 H2DCFDA 避光孵育处理 5 min,用 1/2 MS 液体培养基洗去探针,荧光显微镜(Leica DMI4000 B)下检测其荧光强度并采集图像,用图像处理软件 Image Pro-Plus,在根尖上取 6~8 个点进行检测,计算得到平均荧光强度,以其表示 H_2O_2 水平。每个处理取 5 个样本作重复,以降低个体差异带来的误差。

2) 抗氧化酶活性的测定。将野生型和转 *PeSOS1* 基因拟南芥种子直接播种在用液体 1/2 MS 培养基浸泡过夜的培养土中,用保鲜膜覆盖保湿,2 d 后照光,3 d 后揭膜,每周浇 1 次 1/2 MS 液体培养基和 2 次水,生长 4 周后,用 100 mmol/L NaCl 处理 3 d 后采样,将样品立即置于液氮中保存。

超氧化物歧化酶(SOD)活性测定采用氮蓝四唑(Nitro Blue Tetrazolium chloride, NBT)比色法,参考 Giannopolitis 等^[8]和 Wang 等^[9]的方法进行。谷胱甘肽还原酶(GR)活性根据 NADPH 的氧化反应来测定,具体参考 Giannopolitis 等^[8]和 Schaedle^[10]

的方法进行。过氧化氢酶(CAT)和抗坏血酸氧化酶(APX)活性测定参考 Wang 等^[6,8]的方法进行。

1.2.9 H_2O_2 对盐诱导拟南芥根尖离子流的调控 用 DPI (NADPH 氧化酶的抑制剂)处理拟南芥,测定根尖 K^+ 、 H^+ 、 Na^+ 流的变化情况,研究 H_2O_2 对盐诱导根尖离子流的调控作用。

取生长 1 周的拟南芥组培苗,其中野生型和转 *PeSOS1* 基因拟南芥均设 4 个处理:第 I 组为阴性对照,在测试液(含 0.1 mmol/L NaCl、0.1 mmol/L $MgCl_2$ 、0.1 mmol/L $CaCl_2$ 、0.5 mmol/L KCl 和 25 g/L 蔗糖,用 HCl 和 KOH 调节 pH 至 5.5)中适应 0.5 h 后,直接测定 K^+ 、 Na^+ 、 H^+ 流;第 II 组为阳性对照,在含 100 μ mol/L DPI 的 1/2 MS 液体培养基中处理 2 h 后,再在测试液中适应 0.5 h,测定 K^+ 、 Na^+ 、 H^+ 流;第 III 组:在含 100 mmol/L NaCl 的 1/2 MS 液体培养基中处理 2 h 后,再在测试液中适应 0.5 h,然后测定 K^+ 、 Na^+ 、 H^+ 流;第 IV 组:在含 100 mmol/L NaCl 和 100 μ mol/L DPI 的 1/2 MS 液体培养基中处理 2 h 后,在测试液中适应 0.5 h,测定 K^+ 、 Na^+ 、 H^+ 流。以上 4 个处理分别简称为 CK、DPI、NaCl 和 NaCl+DPI。

2 结果与分析

2.1 胡杨 RNA 提取与 cDNA 一链的合成

由图 1 可见,提取的胡杨 RNA 条带清晰,且 28S 条带的亮度约为 18S 的 2 倍,基本无蛋白、盐离子和 DNA 等杂质污染, OD_{260}/OD_{280} 约为 2.0, OD_{260}/OD_{230} 约为 2.0,说明 RNA 质量和完整度好,纯度高。cDNA 一链经电泳检测发现,条带呈弥散状,分子质量在 1~2 kb(图 2),说明 cDNA 质量很好,完全能满足下一步试验需要。

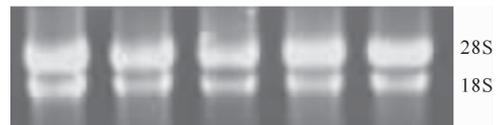


图 1 胡杨的 RNA 电泳结果

Fig. 1 Gel electrophoresis of *Populus euphratica* RNA

2.2 胡杨 *PeSOS1* 的克隆

PeSOS1 的 PCR 扩增结果见图 3。图 3 显示,克隆条带单一清晰,无非特异性条带,大小为 3 000~4 000 bp,符合预期长度。经测序鉴定发现,拼接序列与 Wu 等^[1]克隆的 *PeSOS1* (GenBank 登录号:DQ517530.1)的大小及序列完全一致。

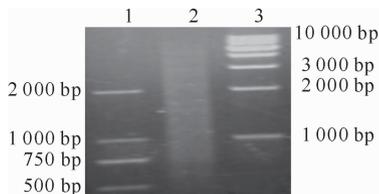


图 2 胡杨 cDNA 一链的电泳结果

1. DNA Marker DL2000; 2. cDNA 一链产物;
3. DNA Marker DL10000

Fig. 2 Gel electrophoresis of *Populus euphratica* cDNA

1. DNA Marker DL2000; 2. cDNA; 3. DNA Marker DL10000

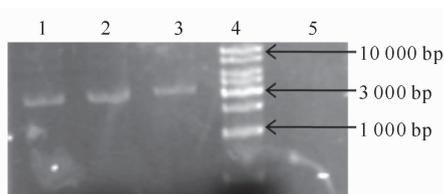


图 3 胡杨 *PeSOS1* 的 PCR 扩增结果

1~3. *PeSOS1* 的扩增产物; 4. DNA Marker DL10000; 5. 阴性对照

Fig. 3 PCR amplification of *Populus euphratica PeSOS1* gene

1-3. PCR product of *PeSOS1*; 4. DNA Marker DL10000; 5. Negative control

2.3 转 *PeSOS1* 载体的构建

图 4-A 显示,构建的中间载体 pENTR/D-TOPO-*PeSOS1* 的大小为 3 000 bp。对构建的中间载体 pENTR/D-TOPO-*PeSOS1* 进行 PCR 鉴定,结果

(图 4-B)显示,该载体构建成功。

由图 5 可知,表达载体 pK7-*PeSOS1* 的 PCR 产物大小为 3 000 bp 左右,符合预期的 PCR 产物 (*PeSOS1* 的全长)大小。

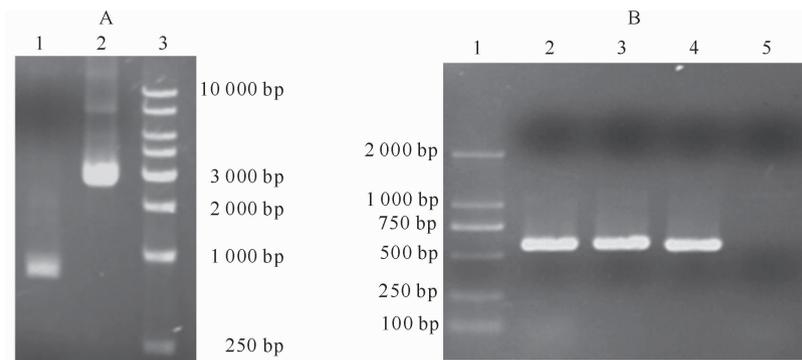


图 4 构建的中间载体 pENTR/D-TOPO-*PeSOS1* (A) 及其 PCR 鉴定结果 (B)

A: 1. pENTR/D-TOPO; 2. pENTR/D-TOPO-*PeSOS1*; 3. DNA Marker DL10000;
B: 1. DNA Marker DL2000; 2~4. pENTR/D-TOPO-*PeSOS1* 质粒; 5. 阴性对照

Fig. 4 Construction (A) and PCR identification (B) of intermediate vector pENTR/D-TOPO-*PeSOS1*

A: 1. pENTR/D-TOPO; 2. pENTR/D-TOPO-*PeSOS1*; 3. DNA Marker DL10000;

B: 1. DNA Marker DL2000; 2-4. Plasmid samples of pENTR/D-TOPO-*PeSOS1*; 5. Negative control

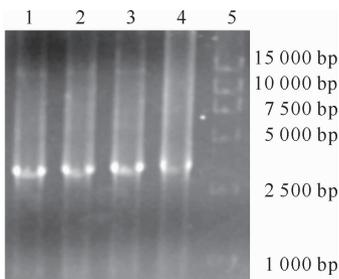


图 5 表达载体 pK7-*PeSOS1* 的 PCR 鉴定结果

1~4. pK7-*PeSOS1* 质粒; 5. DNA Marker DL15000

Fig. 5 Identification of pK7-*PeSOS1* by PCR gel electrophoresis

1-4. Plasmid samples of pK7-*PeSOS1*;

5. DNA Marker DL15000

2.4 拟南芥的转化

转化拟南芥后,顺利获得了 7 个阳性株系,标记

为 S1~S7,从中选取 *PeSOS1* 表达量高的 3 个株系 (S1、S2 和 S5) 进行纯合子筛选及耐盐性试验。转 *PeSOS1* 拟南芥阳性植株的基因组 DNA 见图 6。

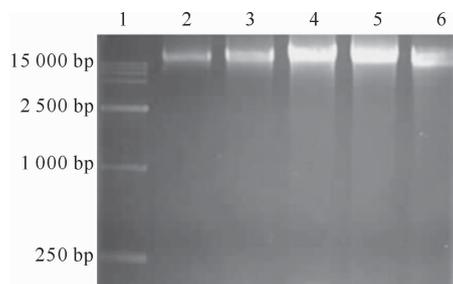


图 6 转 *PeSOS1* 拟南芥阳性植株的基因组 DNA

1. DNA Marker DL15000; 2~6. 不同转基因株系

Fig. 6 Gel electrophoresis of genetic DNA of transgenic *Arabidopsis* lines

1. DNA Marker DL15000; 2-6. Different transgenic lines

由图 6 可知,拟南芥 T₁ 代阳性株系的 DNA 提取结果完好,条带单一,既没有降解,也没有 RNA 的污染,完全可以用作模板进行定性鉴定。图 7 显示,从拟南芥 T₁ 代阳性株系中全部成功鉴定出了目的条带,且条带大小与用质粒 pK7 作模板的阳性对照一致,野生型拟南芥和阴性对照中均没有此条带,说明卡那霉素筛选结果可靠,转基因株系鉴定成功。

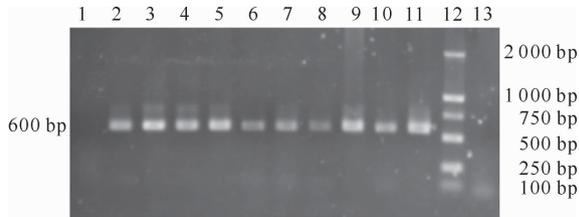


图 7 转 *PeSOS1* 拟南芥阳性植株的 PCR 鉴定结果

1. 野生型;2~8. 转基因株系 S1~S7;9~11. 阳性对照;
12. DNA Marker DL2000;13. 阴性对照

Fig. 7 PCR identification of positive transgenic *Arabidopsis* lines

1. Wild type;2-8. S1-S7;9-11. Positive control;
12. DNA Marker DL2000;13. Negative control

2.5 不同株系拟南芥 *PeSOS1* 表达量的实时荧光定量 PCR 分析

野生型和转 *PeSOS1* 基因拟南芥的 RNA 及 PCR 扩增结果见图 8。

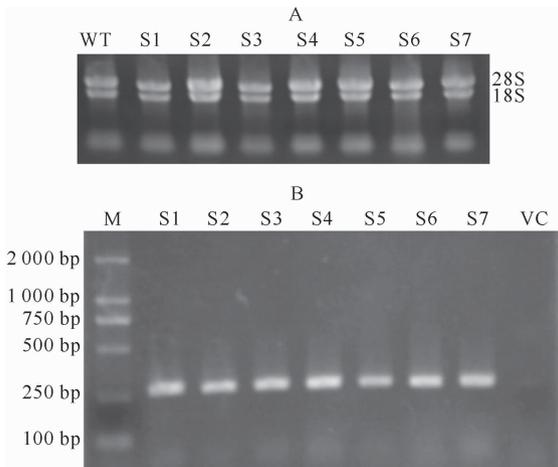


图 8 野生型和转 *PeSOS1* 基因拟南芥的 RNA (A) 及 PCR 扩增结果 (B)

WT. 野生型;S1~S7. 转基因植株;VC. 转空载体 pK7 植株

Fig. 8 Gel electrophoresis of RNA (A) and PCR products of *PeSOS1* (B) from wild-type and transgenic *Arabidopsis* lines

WT. Wild type;S1-S7. Transgenic lines;
VC. Vector control (pK7 transgenic line)

由图 8-A 可知,野生型和转 *PeSOS1* 基因拟南芥的 RNA 提取较为成功,没有降解及基因组 DNA 的污染,条带 28S 的亮度约为 18S 的 2 倍,说明 RNA 质量较高,其 OD₂₈₀/OD₂₆₀、OD₂₈₀/OD₂₃₀ 值均为 1.8~2.0,说明样品 RNA 的质量完全满足后续试验要求。图 8-B 显示,转 *PeSOS1* 基因拟南芥扩增条带单一,亮度良好,没有非特异性条带及引物二聚体的污染。目的模板扩增片段清晰可见,阴性对照(VC)没有目的条带的痕迹,可以满足实时荧光定量 PCR 的要求。

通过检测不同株系拟南芥 *PeSOS1* 的表达量(图 9)发现,在野生型拟南芥和转空载体 pK7 植株中均未检测到 *PeSOS1* 基因,而转基因拟南芥中均检测到 *PeSOS1*。当用 0 mmol/L NaCl 处理后,转基因拟南芥中 *PeSOS1* 表达量均不高,而用 100 mmol/L NaCl 处理后转基因株系 *PeSOS1* 表达量显著提高。

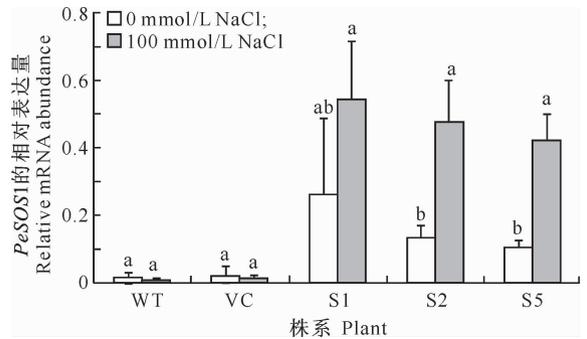


图 9 NaCl 胁迫下野生型和转基因拟南芥中 *PeSOS1* 的相对表达量

WT. 野生型;VC. 转空载体 pK7 植株;S1、S2 和 S5 为转基因株系;图柱上标不同小写字母者表示不同浓度 NaCl 处理间差异显著 ($P < 0.05$)。图 14 和 18 同

Fig. 9 Relative mRNA abundance of *PeSOS1* in wild-type and transgenic *Arabidopsis* lines

WT. Wild-type; VC. Vector-transgenic control; S1, S2, and S5. Different transgenic lines; Different lowercase letters indicate significant differences between 0 and 100 mmol/L NaCl treatments at $P < 0.05$. The same for fig. 14 and fig. 18

2.6 转基因拟南芥的耐盐性

NaCl 胁迫对野生型和转 *PeSOS1* 基因拟南芥萌发率的影响见图 10。图 10 表明,在无盐 (0 mmol/L NaCl) 培养基上,野生型 (WT) 和转 *PeSOS1* 基因拟南芥 (S1、S2、S5) 的萌发率较高,均在 95% 左右;当用 100 mmol/L NaCl 处理后,转 *PeSOS1* 基因拟南芥的萌发率基本没有明显变化,为 70%~90%,而野生型拟南芥萌发率却降到了 30% 左右;在用 150 mmol/L NaCl 处理后,野生型拟南

芥的萌发率降到了约 10%，而转 *PeSOS1* 基因拟南芥株系中的萌发率显著高于野生型拟南芥。说明转 *PeSOS1* 基因后植株的耐盐性显著提高。

观察发现,处理 7 d 后,在无盐(0 mmol/L NaCl)培养基上,野生型和转 *PeSOS1* 基因拟南芥株系的根长没有差异(图 11),同时植株在叶片和根形态上也没有差异;利用 100 mmol/L NaCl 处理后,转基因株系的根长生长优于野生型(图 11),且转基因株系叶片较大、绿色较深,根比较粗壮,说明盐胁迫并没有明显抑制转 *PeSOS1* 基因株系根长的生长,却抑制了野生型拟南芥根长的生长。

监测长期(6~12 d)盐胁迫下野生型和转 *PeSOS1* 基因拟南芥的根长生长,结果见图 12。由图 12 可知,在无盐(0 mmol/L NaCl)培养基上,野生型与转 *PeSOS1* 基因株系拟南芥的根长在胁迫 6~10 d 时差异不显著,但在 12 d 时差异显著。用 100 mmol/L NaCl 处理后,其抑制了拟南芥的根长生长,且对野生型拟南芥的抑制作用更为明显,转 *PeSOS1* 基因株系拟南芥的根长生长显著优于野生型,

说明转 *PeSOS1* 基因拟南芥生长受盐胁迫的影响较小。

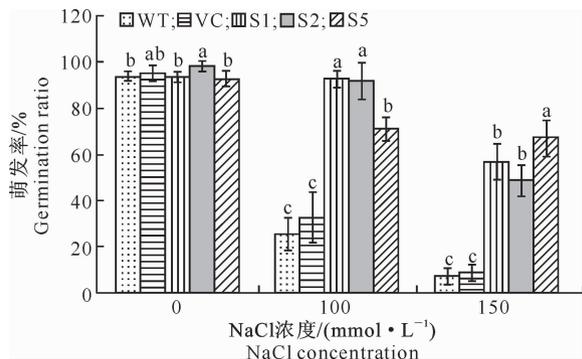


图 10 NaCl 胁迫对野生型和转 *PeSOS1* 基因拟南芥萌发率的影响

图柱上标不同小写字母者表示不同株系拟南芥差异显著 ($P < 0.05$), 下图同(图 14 和 18 除外)

Fig. 10 Effects of NaCl stress on wild-type and transgenic *Arabidopsis* lines seed germination rate

Different lowercase letters show significant differences between wild-type and transgenic lines at $P < 0.05$. The same below except for fig. 14 and fig. 18

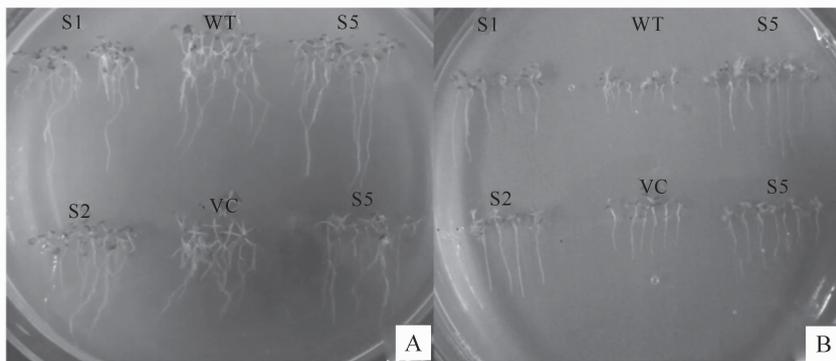


图 11 NaCl 胁迫 7 d 时野生型和转 *PeSOS1* 基因拟南芥根长的比较
A. 0 mmol/L NaCl; B. 100 mmol/L NaCl

Fig. 11 Root lengths of wild-type and *PeSOS1*-transgenic *Arabidopsis* under salt stress of 7 days

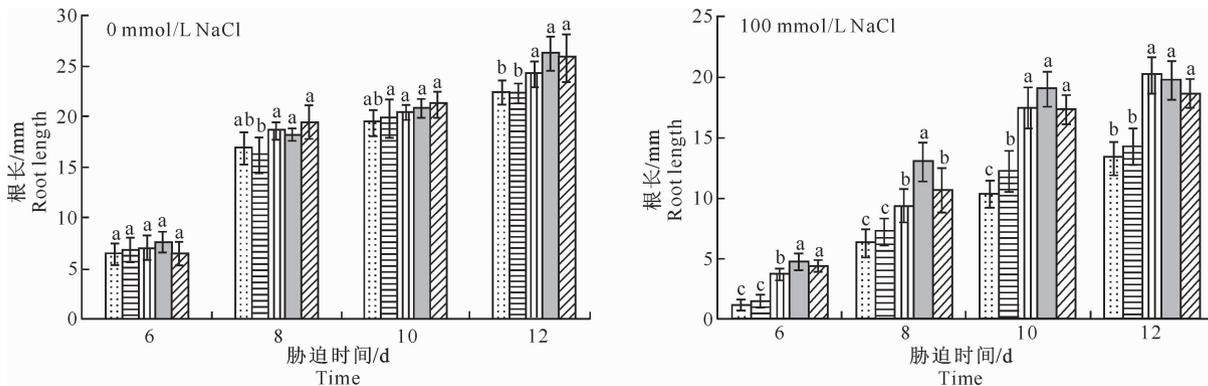


图 12 长期 NaCl 胁迫对野生型和转 *PeSOS1* 基因拟南芥根长的影响

□.WT; ▨.VC; ▩.S1; ▪.S2; ▫.S5

Fig. 12 Effects of long term salt stress on root length of wild-type and *PeSOS1*-transgenic *Arabidopsis*

2.7 盐胁迫下转基因拟南芥生理指标的变化

2.7.1 盐胁迫对干质量及 K^+ 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 含量的影响 图 13 显示,当 NaCl 浓度为 0 mmol/L 时,转 *PeSOS1* 基因拟南芥与野生型拟南芥的干质量差异不显著。用 50~100 mmol/L NaCl 处理后,野生型拟南芥的干质量显著下降,且随着 NaCl 浓度的增加,下降幅度更明显;转 *PeSOS1* 基因拟南芥干质量亦有所下降,但下降幅度低于野生型拟南芥,说明转 *PeSOS1* 基因拟南芥的生物量受盐胁迫的影响明显小于野生型拟南芥。

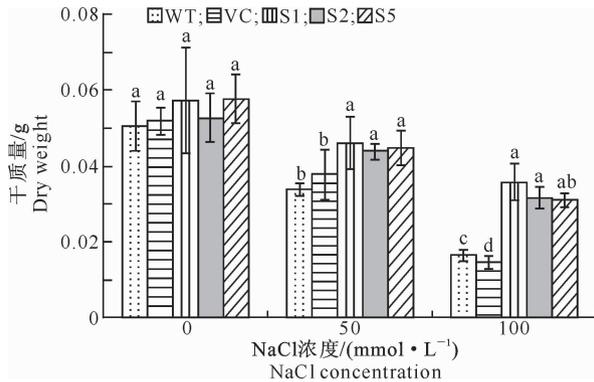


图 13 NaCl 胁迫对野生型和转 *PeSOS1* 基因拟南芥植株干质量的影响

Fig. 13 Effects of NaCl stress on dry weights of wild-type and *PeSOS1*-transgenic *Arabidopsis*

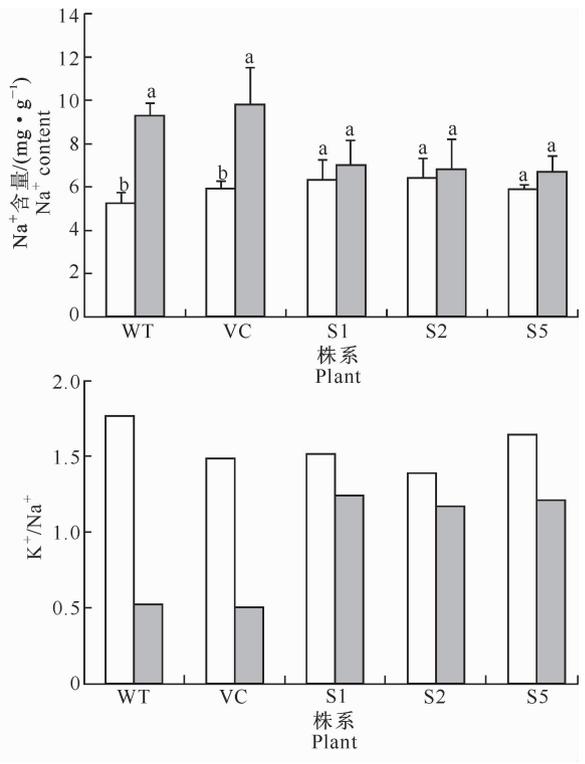
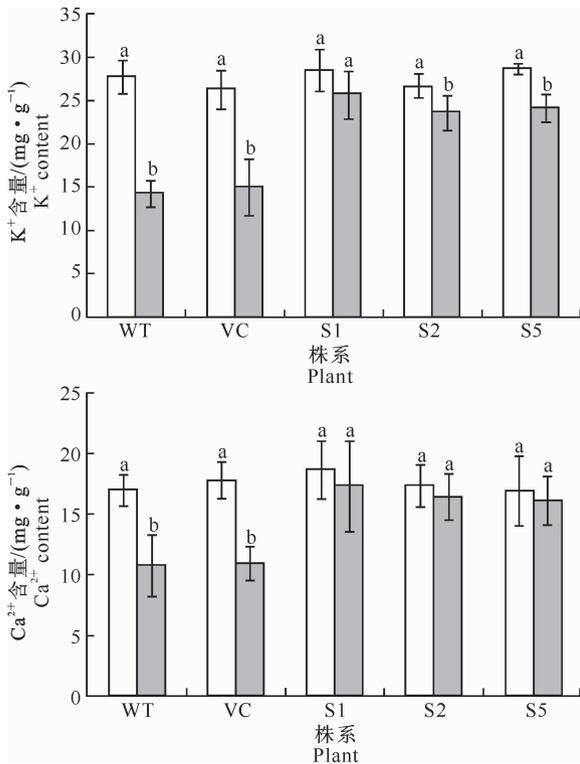


图 14 NaCl 胁迫对野生型和转 *PeSOS1* 基因拟南芥 K^+ 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 含量和 K^+/Na^+ 的影响

□.0 mmol/L NaCl; ■.100 mmol NaCl

Fig. 14 Effects of NaCl stress on Na^+ , K^+ , and Ca^{2+} contents in wild-type and *PeSOS1*-transgenic *Arabidopsis*

图 14 显示,NaCl 处理前野生型与转 *PeSOS1* 基因拟南芥的 K^+ 含量没有显著差异,100 mmol/L NaCl 处理后野生型植株的 K^+ 含量下降了约 50%,而转 *PeSOS1* 基因株系 K^+ 含量虽然也有所下降,但下降幅度较小,为 NaCl 处理前的 80%~90%,说明转 *PeSOS1* 基因拟南芥在盐胁迫下能更好地抑制 K^+ 的流失。100 mmol/L NaCl 处理后,野生型拟南芥比转基因株系积累了更多的 Na^+ ,约为处理前的 2 倍;转 *PeSOS1* 基因株系 Na^+ 含量也有所增加,但其增加幅度较小,约为 NaCl 处理前的 10%。NaCl 处理前后转 *PeSOS1* 基因拟南芥 Ca^{2+} 含量变化趋势与 K^+ 相似,即 NaCl 处理前,野生型与转 *PeSOS1* 基因拟南芥 Ca^{2+} 含量无显著差异;100 mmol/L NaCl 处理后,野生型拟南芥 Ca^{2+} 含量显著下降,而转 *PeSOS1* 基因拟南芥 Ca^{2+} 含量基本上维持了原有的水平,与 NaCl 处理前差异不显著。说明转 *PeSOS1* 基因拟南芥在盐胁迫下营养元素的流失减少。100 mmol/L NaCl 处理后,野生型拟南芥的 K^+/Na^+ 明显下降,其 K^+/Na^+ 失去平衡,对植株的生长造成较大影响,而转 *PeSOS1* 基因拟南芥能有效减少 K^+ 和 Ca^{2+} 的流失,因此受盐胁迫的伤害较轻。可知 100 mmol/L NaCl 处理后转 *PeSOS1* 基因拟南芥对 K^+/Na^+ 平衡的维持能力比野生型拟南芥强。

2.7.2 盐胁迫对根尖离子流的影响 图 15 显示,在非盐胁迫下(用 0 mmol/L NaCl 处理 1 d,CK,下同),野生型和转 *PeSOS1* 基因拟南芥 K^+ 流没有显著差异;100 mmol/L NaCl 处理后野生型和转 *PeSOS1* 基因株系 K^+ 内流均有所减少,短期(1 d)盐处理后转 *PeSOS1* 基因拟南芥的 K^+ 内流显著大于野

生型;在长期(7 d)盐胁迫下,野生型拟南芥还出现了 K^+ 外流的情况,而转 *PeSOS1* 基因拟南芥没有出现 K^+ 外流的情况,说明转 *PeSOS1* 基因拟南芥在盐胁迫下仍能保持对 K^+ 的吸收,而野生型拟南芥在长期盐胁迫下则出现了 K^+ 外流。

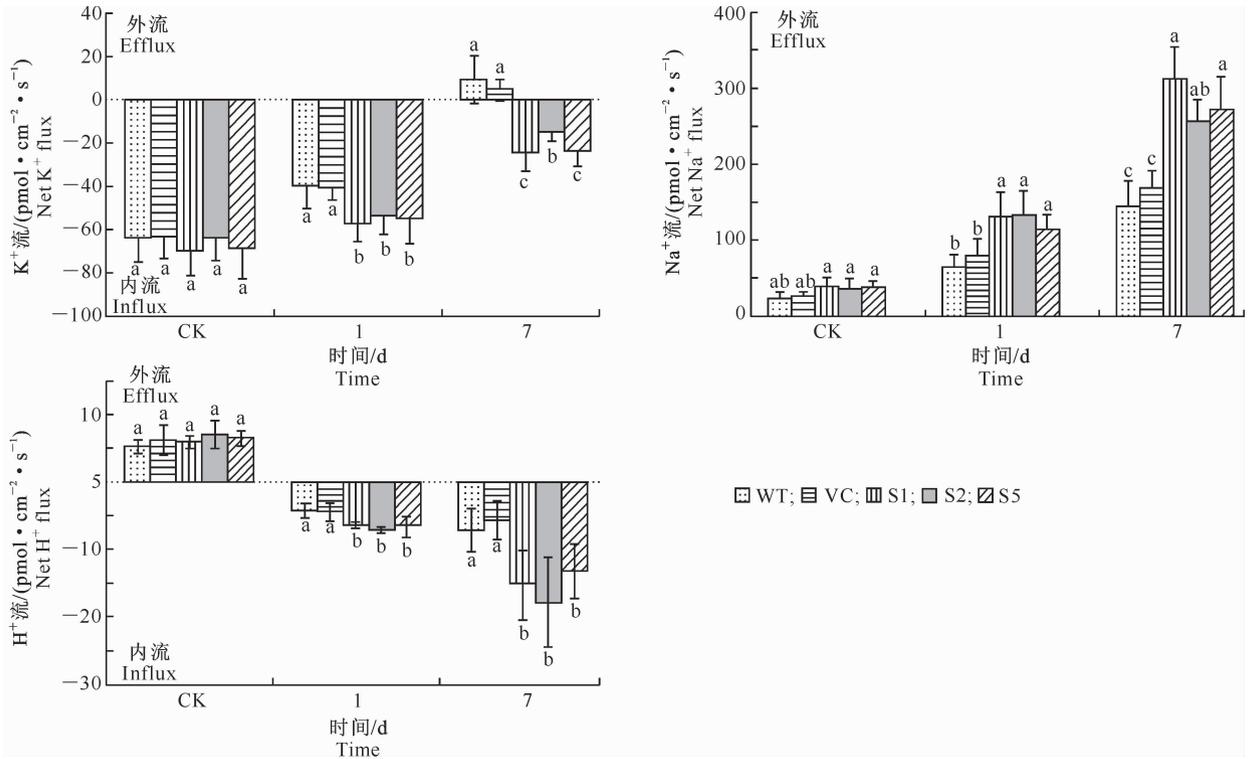


图 15 NaCl 胁迫对野生型和转 *PeSOS1* 基因拟南芥根尖离子流的影响

Fig. 15 Effects of NaCl stress on steady-state K^+ , Na^+ , and H^+ fluxes in root tips of wild-type and *PeSOS1*-transgenic *Arabidopsis*

由图 15 还可见,在非盐胁迫下,转 *PeSOS1* 基因拟南芥 Na^+ 外流高于野生型,但差异不显著。100 mmol/L NaCl 处理 1 d 后,不同株系拟南芥 Na^+ 外流均增加,但是转 *PeSOS1* 基因拟南芥 Na^+ 的外流显著高于野生型;处理 7 d 后,不同株系拟南芥 Na^+ 外流进一步增加,但转 *PeSOS1* 基因拟南芥的 Na^+ 外流仍显著高于野生型拟南芥。

由图 15 可以看出,在非盐胁迫下,转 *PeSOS1* 基因拟南芥 H^+ 外流与野生型差异不显著,但用 100 mmol/L NaCl 处理后,无论是短期(1 d)还是长期(7 d)盐胁迫,均能导致拟南芥出现 H^+ 内流,且野生型拟南芥的 H^+ 内流显著小于转基因株系,说明转 *PeSOS1* 基因拟南芥能及时对盐处理作出响应,激活 *SOS1* 蛋白,外排 Na^+ 的同时将 H^+ 转运到胞内,使得 H^+ 呈内流的趋势。

2.7.3 抑制剂 Amiloride 对 NaCl 胁迫下根尖离子

流的影响 图 16 显示,抑制剂 Amiloride 处理与否,对照组(CK)中不同株系拟南芥的 K^+ 内流差异不显著;但在 100 mmol/L NaCl 胁迫组中,添加 Amiloride 后,其明显抑制了转 *PeSOS1* 基因株系的 K^+ 内流,转 *PeSOS1* 基因株系 K^+ 内流与野生型拟南芥没有显著差异。这说明盐胁迫下转 *PeSOS1* 基因拟南芥与野生型拟南芥的 K^+ 流与 *SOS1* 活性的关系密切。

图 16 表明,添加 Amiloride 与否,对照组(CK)中转 *PeSOS1* 基因拟南芥的 Na^+ 外流与野生型拟南芥无显著差异。用 NaCl 处理后,转 *PeSOS1* 基因拟南芥的 Na^+ 外流高于野生型拟南芥,且差异显著;用 NaCl+Amiloride 处理后,转 *PeSOS1* 基因拟南芥和野生型拟南芥 Na^+ 外流均大幅减小,且转基因拟南芥与野生型没有显著差异。说明抑制剂 Amiloride 处理后消除了 *PeSOS1* 对 Na^+ 外流的促

进作用。

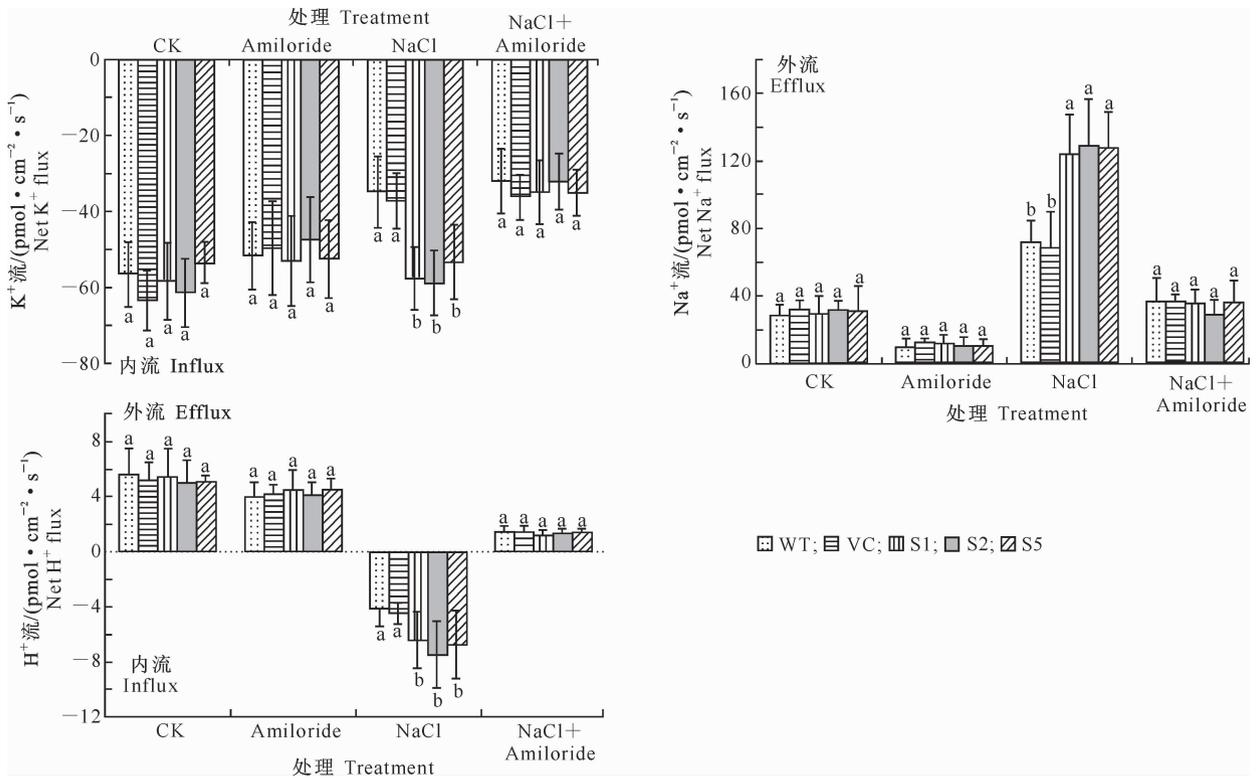


图 16 抑制剂阿米洛利(Amiloride)对 NaCl 胁迫前后野生型和转 *PeSOS1* 基因拟南芥根尖离子流的影响

Fig. 16 Effects of Amiloride on NaCl-induced fluxes of K^+ , Na^+ , and H^+ in root tips of wild-type and *PeSOS1*-transgenic *Arabidopsis*

由图 16 还可知,添加 Amiloride 与否,对照组中不同株系拟南芥 H^+ 外流差异不显著。NaCl 处理后,使 H^+ 流向发生变化,由外流转变为内流,这与 Na^+ 的外流相对应,表明为 Na^+/H^+ 逆向转运。NaCl+Amiloride 处理后,不同株系的 H^+ 内流均大幅度降低,且野生型和转 *PeSOS1* 基因株系间的差异消失,说明 SOS1 被抑制后, Na^+/H^+ 逆向转运受到明显影响。

2.8 盐胁迫下转基因拟南芥根中 H_2O_2 的产生和抗氧化酶活性的变化

图 17 显示,拟南芥根细胞产生的 H_2O_2 随着 NaCl 胁迫时间的延长而增加,但变化趋势有所不同。野生型拟南芥的 H_2O_2 随着盐胁迫时间的延长而逐渐增加,至第 7 天 H_2O_2 水平达到最高;而转 *PeSOS1* 基因拟南芥根细胞中 H_2O_2 水平在 24 h 内呈增加的趋势,之后到第 7 天并未继续增加,与 NaCl 处理 24 h 的水平基本一致。说明转 *PeSOS1* 基因拟南芥能及时抑制 H_2O_2 的过量产生,避免过多的活性氧带来的氧化胁迫,而野生型拟南芥并不能抑制盐诱导的 H_2O_2 过量产生。

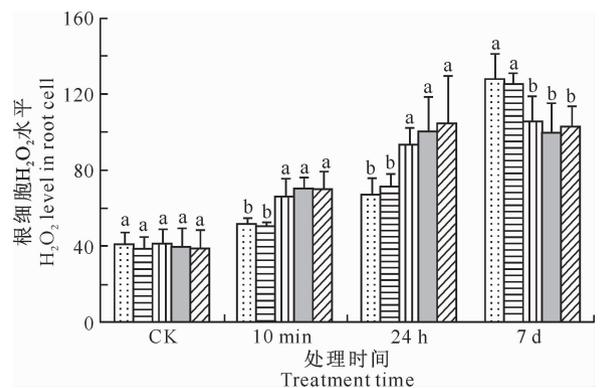


图 17 盐胁迫下野生型和转 *PeSOS1* 基因拟南芥根中 H_2O_2 的动态变化

Fig. 17 Variations of H_2O_2 production in roots of wild-type and *PeSOS1*-transgenic *Arabidopsis* lines under NaCl stress

图 18 表明,在转 *PeSOS1* 基因拟南芥和野生型拟南芥中,抗氧化酶 SOD 和 GR 活性在 NaCl 胁迫前后的变化趋势基本相同,即 NaCl 处理前转 *PeSOS1* 基因拟南芥与野生型拟南芥 SOD 和 GR 活性无显著差异,NaCl 胁迫后 SOD 和 GR 活性均增加,但是转 *PeSOS1* 基因拟南芥 SOD 和 GR 活性增加

的幅度显著大于野生型拟南芥。野生型拟南芥的 CAT 和 APX 活性受 NaCl 胁迫的影响小,而转 *PeSOS1* 基因拟南芥在 NaCl 胁迫后 CAT 和 APX 活

性均显著提高,且 APX 活性平均提高幅度(100%)高于 CAT(30%)。

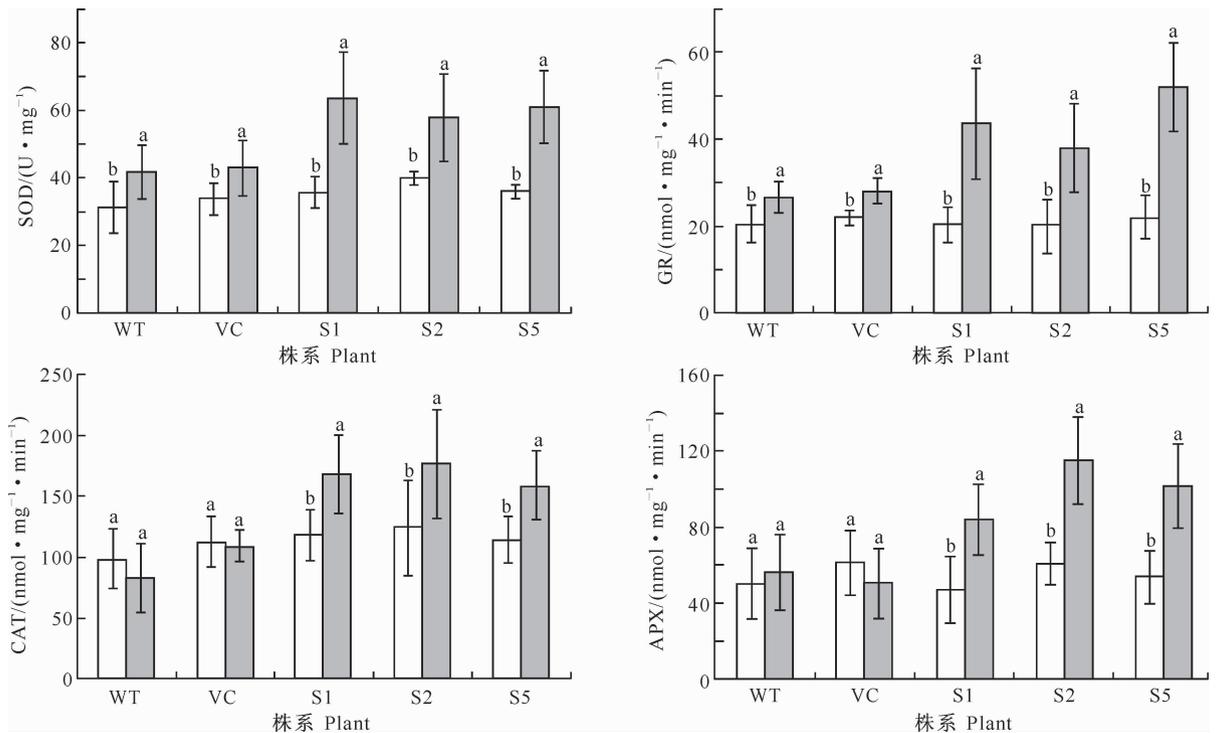


图 18 盐胁迫对野生型和转 *PeSOS1* 基因拟南芥抗氧化酶活性的影响

□.0 mmol/L NaCl;■.100 mmol/L NaCl

Fig. 18 Effects of NaCl on total activities of SOD,GR,CAT and APX in wild-type and *PeSOS1*-transgenic *Arabidopsis*

2.9 H_2O_2 对盐诱导转基因拟南芥根尖离子流的调控

图 19 显示,与 CK 相比,NaCl 处理后拟南芥根尖的 K^+ 内流减弱, Na^+ 外流和 H^+ 内流增强,表明 Na^+/H^+ 逆向转运能力提高。与野生型拟南芥相比,转 *PeSOS1* 基因拟南芥 K^+ 内流减弱的幅度较小, Na^+ 外流和 H^+ 内流的增强幅度均较大, Na^+/H^+ 逆向转运能力较高,且野生型与转 *PeSOS1* 基因型拟南芥差异显著。与 CK 相比,加入 NADPH 氧化酶抑制剂 DPI 后,不同株系拟南芥根尖的离子流未受影响,但却进一步降低了 NaCl 处理拟南芥根尖的 K^+ 和 H^+ 的内流。与 CK 相比,NaCl 和 DPI 共同处理后野生型和转 *PeSOS1* 基因拟南芥 Na^+ 外流均有所增加,但是野生型拟南芥增幅较少,说明 DPI 对 NaCl 处理后野生型拟南芥的影响比转 *PeSOS1* 基因拟南芥大,可能是由于野生型拟南芥在 NaCl 处理后产生了较多 H_2O_2 所致;说明添加 DPI 抑制了 H_2O_2 的产生后,影响了离子的平衡,降低了转 *PeSOS1* 基因拟南芥 Na^+ 外流与野生型拟南芥的差异,即减小了转 *PeSOS1* 基因造成的差异。与

NaCl 处理相比,NaCl 和 DPI 共同处理后,转 *PeSOS1* 基因拟南芥和野生型拟南芥 H^+ 内流均减小,而野生型拟南芥减少幅度较转 *PeSOS1* 基因拟南芥小。可知 NaCl 与 DPI 共同处理后,转 *PeSOS1* 基因拟南芥与野生型拟南芥根尖离子流之间的差异比 NaCl 单独处理造成的差异有所降低。以上结果表明, H_2O_2 调节了 SOS1 的活性,参与盐诱导离子流的调控。

3 讨论

SOS1 在提高植物抗盐性中有着非常重要的作用。质膜 SOS1 外排 Na^+ 的作用降低了植物因盐处理导致的体内 Na^+ 积累,因此减少了 Na^+ 积累带来的离子渗透和氧化胁迫作用^[11-12],进而保证了 K^+ 、 Ca^{2+} 等重要离子所占的比例,维持了 K^+/Na^+ 平衡^[12-14],这为植物细胞内的正常代谢等生命活动提供了必要条件。SOS1 在作为离子转运体的同时还兼顾了信号信使的重要使命^[15-18]。盐胁迫产生的 H_2O_2 也起着信号信使的作用^[2,19]。NaCl 处理植物后,SOS1 和 H_2O_2 信号系统共同作用,调控着植物

体对 NaCl 胁迫的适应性^[8,20]。对胡杨根组织分离原生质体的研究发现,耐盐性的胡杨在盐处理后维持了 K^+/Na^+ 平衡,且在此过程中,SOS1 保持着对 Na^+ 的外排活性^[20]。与对盐敏感的杨树相比,胡杨

的叶片组织在盐处理或正常生长状态下均可保持较高的 SOS1 转录水平^[2]。本研究克隆并表达了 *PeSOS1*,发现 *PeSOS1* 可显著增强转基因拟南芥植株的耐盐性和 K^+/Na^+ 平衡。

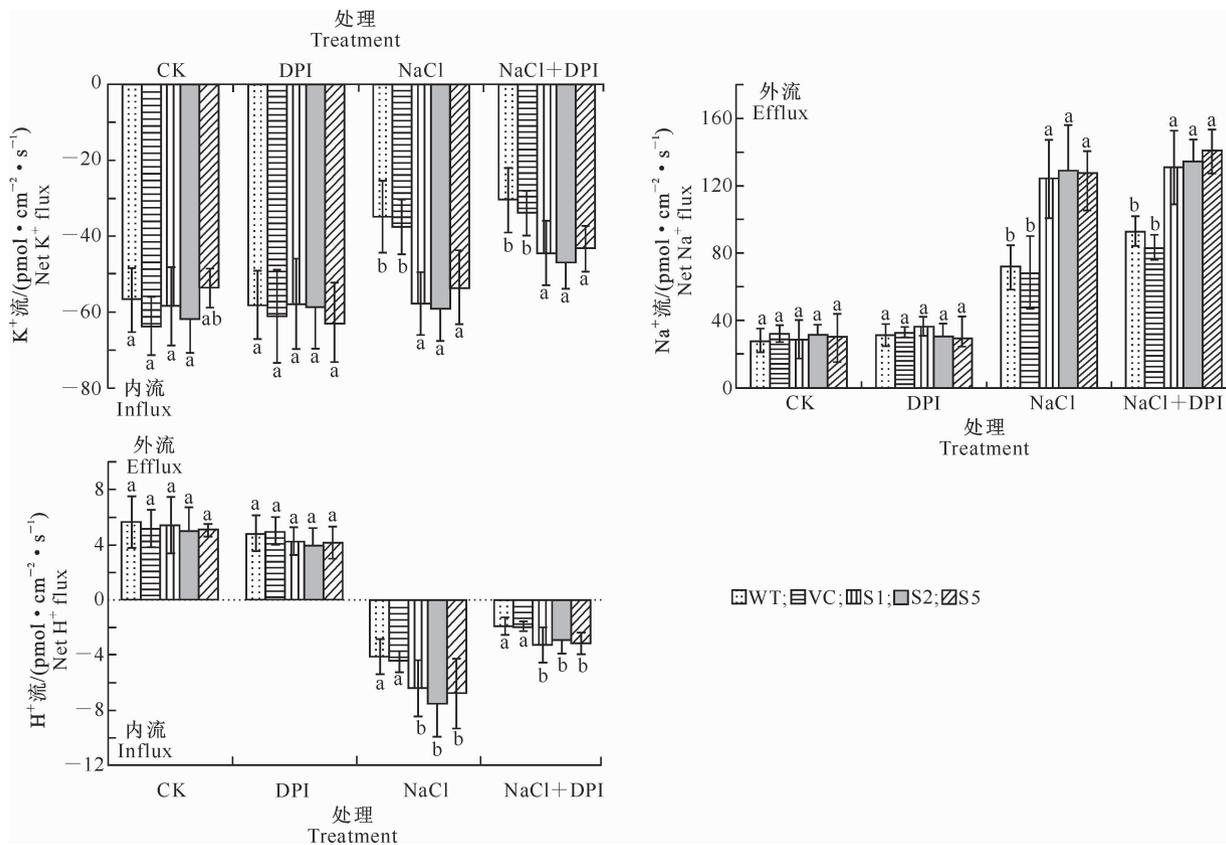


图 19 DPI 对野生型和转 *PeSOS1* 基因拟南芥根尖离子流的影响

Fig. 19 Effects of DPI on NaCl-induced fluxes of K^+ , Na^+ , and H^+ in root tips of wild-type and *PeSOS1*-transgenic *Arabidopsis*

前人在多种植物中均发现,盐和 H_2O_2 均对 SOS1 mRNA 的稳定性起着重要作用^[3,21]。本研究发现,短期(10 min~24 h)NaCl 胁迫下转 *PeSOS1* 基因的拟南芥根细胞中 H_2O_2 水平显著高于野生型拟南芥,而且 H_2O_2 在多种类型细胞中均对刺激生长起到重要作用^[6,21-24],这可能是转 *PeSOS1* 基因拟南芥在盐胁迫下根系快速生长的原因。

Amiloride 和 DPI 分别是 SOS1 和质膜 NADPH 氧化酶的抑制剂,在转基因植株中 Na^+ 外流和 K^+ 内流受 Amiloride 和 DPI 的影响。说明拟南芥可能通过 H_2O_2 来调控 SOS1,以达到维持胞内 K^+/Na^+ 平衡的作用^[25]。很多研究已经证明, H_2O_2 对 SOS1 的活性有调节作用^[3,25]。Sun 等^[26] 研究表明,在胡杨细胞中,NaCl 诱导产生的 H^+ 内流有助于产生过量的 H_2O_2 ^[26]。因此可以推测,由于 H^+ 内流的加强,导致质外体瞬时碱化,可激活质膜 NADPH

氧化酶并导致转基因拟南芥根细胞中 H_2O_2 的积累^[27]。这可能是因为 NaCl 处理后 *PeSOS1* 表达上调,使植物在外排 Na^+ 的同时将大量 H^+ 转入胞内,这有助于激活质膜 NADPH 氧化酶,从而调节 H_2O_2 的产生。

在本研究中,转 *PeSOS1* 基因拟南芥在 NaCl 处理下快速产生 H_2O_2 ,且胁迫早期(10 min~24 h) H_2O_2 的爆发可引起抗氧化防御^[20,28]。本研究发现,转 *PeSOS1* 基因拟南芥在有或无 NaCl 处理的条件下均可保持较高的抗氧化酶活性,这使得 H_2O_2 水平得到了控制。研究表明,盐胁迫下胡杨能调控活性氧平衡主要通过 2 条途径:一是控制胞内离子平衡来减少长期盐胁迫下诱导的活性氧产生,二是迅速上调氧化防御机制来阻止活性氧的伤害^[20,29]。胡杨在盐胁迫前后其 *PeSOS1* 均有较高的表达量^[2]。本试验结果表明,NaCl 胁迫后,转

PeSOS1 基因拟南芥中 H_2O_2 迅速产生,从而有助于通过调控 Na^+/H^+ 逆向转运系统的活性以维持 K^+/Na^+ 平衡;此外, H_2O_2 还能上调氧化防御机制从而防止长期 NaCl 胁迫下的氧化损伤发生。另外,盐诱导 H_2O_2 提高胞内 Ca^{2+} 浓度,胞内 Ca^{2+} 信号通过 SOS 信号通路激活 *SOS1*^[30]。在拟南芥中, H_2O_2 对维持 *SOS1* mRNA 的稳定性还有重要作用^[3]。因此可以推断,在拟南芥和胡杨中 *SOS1* 的高量表达促进了盐胁迫下 H_2O_2 的产生, H_2O_2 信号网络进一步调控胞内的离子平衡。

综上所述,在拟南芥中异源表达 *PeSOS1* 后,转基因植株的耐盐性提高,其机制为通过上调 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白活性及外排 Na^+ 维持了 K^+/Na^+ 平衡;同时转 *PeSOS1* 基因拟南芥通过促进 H_2O_2 的产生,又进一步维持了 *SOS1* mRNA 的稳定性,使之在长期盐胁迫中保持活性,从而对植物的生长起着重要的作用。

[参考文献]

[1] Wu Y, Ding N, Zhao X, et al. Molecular characterization of *PeSOS1*: The putative $Na(+)/H(+)$ antiporter of *Populus euphratica* [J]. *Plant Mol Biol*, 2007, 65(1/2): 1-11.

[2] Ding M, Hou P, Shen X, et al. Salt-induced expression of genes related to $Na(+)/K(+)$ and ROS homeostasis in leaves of salt-resistant and salt-sensitive poplar species [J]. *Plant Mol Biol*, 2010, 73(3): 251-269.

[3] Chung J S, Zhu J K, Bressan R A, et al. Reactive oxygen species mediate Na^+ -induced *SOS1* mRNA stability in *Arabidopsis* [J]. *Plant J*, 2008, 53(3): 554-565.

[4] Shi H, Lee B H, Wu S J, et al. Overexpression of a plasma membrane Na^+/H^+ antiporter gene improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Nat Biotechnol*, 2003, 21(1): 81-85.

[5] Clough S J, Bent A F. Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant J*, 1998, 16(6): 735-743.

[6] Wang M, Wang Y, Sun J, et al. Overexpression of *PeHA1* enhances hydrogen peroxide signaling in salt-stressed *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2013, 71C: 37-48.

[7] Sun J, Dai S, Wang R, et al. Calcium mediates root K^+/Na^+ homeostasis in poplar species differing in salt tolerance [J]. *Tree Physiol*, 2009, 29(9): 1175-1186.

[8] Wang R, Chen S, Zhou X, et al. Ionic homeostasis and reactive oxygen species control in leaves and xylem sap of two poplars subjected to NaCl stress [J]. *Tree Physiol*, 2008, 28(6): 947-957.

[9] Giannopolitis C N, Ries S K. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants [J]. *Plant Physiol*, 1977, 59(2): 309-314.

[10] Schaedle M. Chloroplast glutathione reductase [J]. *Plant Physiol*, 1977, 59(5): 1011-1012.

[11] Yadav N S, Shukla P S, Jha A, et al. The *SbSOS1* gene from the extreme halophyte *Salicornia brachiata* enhances Na^+ loading in xylem and confers salt tolerance in transgenic tobacco [J]. *BMC Plant Biol*, 2012, 12(1): 188.

[12] Garcíadeblas B, Haro R, Benito B. Cloning of two *SOS1* transporters from the seagrass *Cymodocea nodosa*. *SOS1* transporters from *Cymodocea* and *Arabidopsis* mediate potassium uptake in bacteria [J]. *Plant Mol Biol*, 2007, 63(4): 479-490.

[13] Rus A, Lee B H, Muñoz-Mayor A, et al. AtHKT1 facilitates Na^+ homeostasis and K^+ nutrition in planta [J]. *Plant Physiol*, 2004, 136(1): 2500-2511.

[14] Pardo J M, Cubero B, Leidi E O, et al. Alkali cation exchangers: Roles in cellular homeostasis and stress tolerance [J]. *J Exp Bot*, 2006, 57(5): 1181-1199.

[15] Martínez-Atienza J, Jiang X, Garcíadeblas B, et al. Conservation of the salt overly sensitive pathway in rice [J]. *Plant Physiol*, 2007, 143(2): 1001-1012.

[16] Huang G T, Ma S L, Bai L P, et al. Signal transduction during cold, salt, and drought stresses in plants [J]. *Mol Biol Rep*, 2012, 39(2): 969-987.

[17] Quintero F J, Ohta M, Shi H, et al. Reconstitution in yeast of the *Arabidopsis* SOS signaling pathway for Na^+ homeostasis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(13): 9061-9066.

[18] Tang R J, Liu H, Bao Y, et al. The woody plant poplar has a functionally conserved salt overly sensitive pathway in response to salinity stress [J]. *Plant Mol Biol*, 2010, 74(4/5): 367-380.

[19] Zhang F, Wang Y, Yang Y, et al. Involvement of hydrogen peroxide and nitric oxide in salt resistance in the calluses from *Populus euphratica* [J]. *Plant Cell Environ*, 2007, 30(7): 775-785.

[20] Sun J, Wang M J, Ding M Q, et al. H_2O_2 and cytosolic Ca^{2+} signals triggered by the PM H^+ -coupled transport system mediate K^+/Na^+ homeostasis in NaCl-stressed *Populus euphratica* cells [J]. *Plant Cell Environ*, 2010, 33(6): 943-958.

[21] Jhumka Z, Pervaiz S, Clement M V. Resveratrol regulates the expression of NHE-1 by repressing its promoter activity: Critical involvement of intracellular H_2O_2 and caspases 3 and 6 in the absence of cell death [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2009, 41(4): 945-956.

[22] Bassil E, Tajima H, Liang Y C, et al. The *Arabidopsis* Na^+/H^+ antiporters NHX1 and NHX2 control vacuolar pH and K^+ homeostasis to regulate growth, flower development, and reproduction [J]. *Plant Cell*, 2011, 23(9): 3482-3497.

[23] Potocky M, Jones M A, Bezdova R, et al. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase are involved in pollen tube growth [J]. *New Phytol*, 2007, 174(4): 742-751.

- Xu P X. Studies on soft cutting propagation technique and rooting mechanism of *Taxodium mucronatum* × *Cryptomeria fortunei* [D]. Nanjing: Nanjing Forestry University, 2009. (in Chinese)
- [18] 张晓平, 方炎明. 杂种鹅掌楸插穗不定根发生与发育的解剖学观察 [J]. 植物资源与环境学报, 2003, 12(1): 10-15.
Zhang X P, Fang Y M. Anatomical observation of the origin and development of adventitious roots in hybrid tuliptrees during cutting [J]. Journal of Plant Resources and Environment, 2003, 12(1): 10-15. (in Chinese)
- [19] 林金莲, 王馥兰. 黑穗醋栗 (*Ribes nigrum* L.) 茎的解剖结构与不定根形成的研究 [J]. 东北农学院学报, 1990, 21(3): 284-287.
Lin J L, Wang F L. Studies on anatomical structure of stem and adventitious root formation of *Ribes nigrum* L. [J]. Journal of Northeast Agricultural College, 1990, 21(3): 284-287. (in Chinese)
- [20] 林艳, 詹亚光, 刘玉喜, 等. 白桦嫩枝扦插根原基形成的解剖学观察 [J]. 东北林业大学学报, 1996, 24(3): 15-18.
Lin Y, Zhan Y G, Liu Y X, et al. Anatomical observation of root primordial formation of softwood cutting of *Betula platyphylla* Suk [J]. Journal of Northeast Forestry University, 1996, 24(3): 15-18. (in Chinese)
- [21] 张钢民, 杨文利, 贾玉彬, 等. 矮紫杉插条生根的解剖研究 [J]. 园艺学报, 1999, 26(3): 201-203.
Zhang G M, Yang W L, Jia Y B, et al. Anatomical study on the rooting of cutting of *Taxus cuspidata* 'Nana' [J]. Acta Horticulturae Sinica, 1999, 26(3): 201-203. (in Chinese)
- [22] 刘勇, 肖德兴, 黄长干, 等. 板栗嫩枝扦插生根解剖学特征研究 [J]. 园艺学报, 1997, 24(1): 8-12.
Liu Y, Xiao D X, Huang C G, et al. Studies on anatomical characteristics of softwood cuttings rooting of *Castanea mollissima* [J]. Acta Horticulturae Sinica, 1997, 24(1): 8-12. (in Chinese)

(上接第 91 页)

- [24] Carol R J, Dolan L. The role of reactive oxygen species in cell growth; Lessons from root hairs [J]. J Exp Bot, 2006, 57(8): 1829-1834.
- [25] Ma L, Zhang H, Sun L, et al. NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF function in ROS-dependent regulation of Na(+)/K(+) homeostasis in *Arabidopsis* under salt stress [J]. J Exp Bot, 2012, 63(1): 305-317.
- [26] Sun J A, Li L S, Liu M Q, et al. Hydrogen peroxide and nitric oxide mediate K(+)/Na(+) homeostasis and antioxidant defense in NaCl-stressed callus cells of two contrasting poplars [J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2010, 103(2): 205-215.
- [27] Oh D H, Lee S Y, Bressan R A, et al. Intracellular consequences of SOS1 deficiency during salt stress [J]. J Exp Bot, 2010, 61(4): 1205-1213.
- [28] Banakou E, Dailianis S. Involvement of Na⁺/H⁺ exchanger and respiratory burst enzymes NADPH oxidase and NO synthase, in Cd-induced lipid peroxidation and DNA damage in haemocytes of mussels [J]. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, 2010, 152(3): 346-352.
- [29] Wang R G, Chen S L, Deng L, et al. Leaf photosynthesis, fluorescence response to salinity and the relevance to chloroplast salt compartmentation and anti-oxidative stress in two poplars [J]. Trees-Structure and Function, 2007, 21(5): 581-591.
- [30] Quan R, Lin H, Mendoza I, et al. SCABP8/CBL10, a putative calcium sensor, interacts with the protein kinase SOS2 to protect *Arabidopsis* shoots from salt stress [J]. Plant Cell, 2007, 19(4): 1415-1431.