

干旱对转 *AtCuZnSOD* 基因羽衣甘蓝种子萌发和幼苗生长的影响

杨 勇¹, 海 均², 庞可勤¹, 李鸿雁³

(1. 黄淮学院 园林中心, 河南 驻马店 463000; 2. 驻马店市绿化处, 河南 驻马店 463000;
3. 黄淮学院 生物与食品工程学院, 河南 驻马店 463000)

摘 要:以羽衣甘蓝名古屋(*Brassica oleracea* var. *acephala* f. *tricolor*)为试材,采用农杆菌介导、PCR 分析、Southern blot 和 qRT-PCR 等方法,研究了转拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)铜/锌超氧化物歧化酶(*AtCuZnSOD*)基因的羽衣甘蓝的耐旱性,以期增加羽衣甘蓝抗性育种的种质资源。结果表明:*AtCuZnSOD* 基因整合到羽衣甘蓝基因组中,转基因植物中 *AtCuZnSOD* 表达水平明显增加。在 PEG-4000 胁迫下,转 *AtCuZnSOD* 基因羽衣甘蓝种子发芽势与发芽率均高于对照。在干旱胁迫下,转基因植株幼苗的丙二醛含量显著低于野生型植物,而过氧化物酶和过氧化氢酶活性均高于野生型植株;同时转基因植株的平均主根长、存活率和叶绿素含量的增加均显著高于野生植株,而干质量/鲜质量明显低于野生植物。表明转 *AtCuZnSOD* 基因羽衣甘蓝植株耐旱性得到明显改善。

关键词:羽衣甘蓝; *AtCuZnSOD* 基因; 转基因植物; 耐旱性

中图分类号:S 635.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2019)12-0076-07

植物生长发育经常受到环境因素影响,例如干旱、高盐和冷害等^[1-2]。有研究表明^[3]目前世界上约有 1/5 的耕地和超过 30% 的土地不能充分灌溉。我国人均水资源相对较少。城市草坪的灌溉造成水资源严重流失。培育有一定抗旱能力的草坪植物品种对城市园林有重要的意义。

羽衣甘蓝(*Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC.)属十字花科芸薹属二年生草本植物,又名叶牡丹。羽衣甘蓝叶色鲜艳,在中原地区,观赏期可以从当年 11 月到翌年的 3 月,而且在这段时间气温比较低,许多植物叶枯花谢,因此羽衣甘蓝极具观赏价值园林观赏植物,是公园、街头和花坛常用的植物材料^[4]。

第一作者简介:杨勇(1982-),男,河南驻马店人,硕士,工程师,现主要从事园林植物等研究工作。E-mail: 461556594@qq.com.

基金项目:河南省科技计划资助项目(182102110305)。

收稿日期:2019-02-25

超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)是参与活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)降解的第一个酶,能把超氧阴离子转换成 H_2O_2 。SODs 已经在所有需氧生物中被发现。SOD 有几种异构体,这取决于与它的活性位点相互作用的金属辅因子。例如锰(MnSODs)、铜/锌(CuZnSODs)、铁(FeSODs)和镍(NiSODs)等^[5-6]。CuZnSOD 是细胞质、细胞核和线粒体膜间隙中的主要自由基清除剂^[7]。在胁迫状态下,多个研究结果表明 SOD 活性和其转录表达增高^[8-9]。有研究表明在干旱和盐胁迫下玉米^[10]和番茄^[11]中 *MnSOD* 和 *CuZnSOD* 高水平表达。这些有较高活性抗氧化酶的植物更耐盐、干旱或氧化胁迫。已有研究证明高盐和干旱胁迫能够改变抗氧化酶水平,在很大程度上提高幼苗的抗逆性^[12]。逆境条件下,水稻盐敏感品种 SOD 水平显著高于耐盐品种^[13]。过表达水稻叶绿体 *OsCu/Zn-SOD* 基因,转基因植株在 NaCl 和

NaHCO₃ 胁迫下进行发芽试验,发现其锌超氧化物歧化酶过表达株系发芽率显著优于非转基因(NT)^[14]。也有研究表明在烟草叶绿体中增强锌超氧化物歧化酶的表达其耐受甲基紫精铜(MV)也增强^[15]。转基因马铃薯和拟南芥表现出相似的现象^[16-17]。因而,盐胁迫和干旱胁迫下植物SOD活性的增加是缓解逆境损伤的一个步骤^[18]。这些研究有助于开发能够有效地耐受非生物胁迫的转基因作物。

该研究把拟南芥 *AtCuZnSOD* 基因通过农杆菌导入羽衣甘蓝基因组中,在干旱胁迫条件下检测转基因羽衣甘蓝种子萌发与苗期的耐旱性及其相关的生理指标,以期获得具有一定应用价值的

耐旱羽衣甘蓝新种质,为筛选具有育种应用价值的材料奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

转基因植株受体材料为羽衣甘蓝名古屋(*Brassica oleracea* var. *acephala* f. *tricolor*),包括插入目的基因在不同位点的过表达株系 OE1~OE6 和野生材料(WT)。转化所用质粒为携带由 CaM35S 启动子控制 *AtCuZnSOD* (NCBI 登录号:NM_121815)和 *HPT* 基因的 pCAMBIA1301 载体(图 1)。

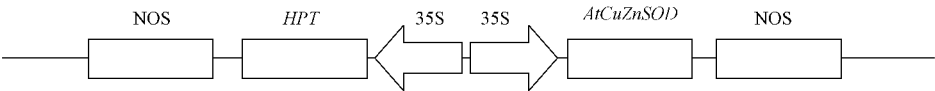


图 1 植物表达载体 pBIACAM1301-*AtCuZnSOD* 示意图
Fig. 1 Map of pBIACAM1301-*AtCuZnSOD* expression vector

1.2 试验方法

1.2.1 转基因及检测方法

转 *AtCuZnSOD* 基因植株检测采用 PCR 法; Southern blot 杂交方法是取 25 μg 阳性转化植株和野生型植株叶片总 DNA 经 *EcoRI* 完全消化后,采用 1%的琼脂糖凝胶电泳进行分离,探针以 35S 启动子基因与目的基因模板经 PCR 扩增的 1 360 的片段,采用随机引物法进行标记^[19]。转基因植株在盐胁迫下的表达量检测采用 qRT-PCR 法^[20]。相对定量公式: $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{试验}$

样品) - $\Delta Ct(\text{基准样品})$ 计算,其中: $\Delta Ct(\text{试验样品}) = Ct(\text{试验样品,目的基因}) - Ct(\text{试验样品,内参基因})$; $\Delta Ct(\text{基准样品}) = Ct(\text{基准样品,目的基因}) - Ct(\text{基准样品,内参基因})$; 相对表达量 = $2^{-\Delta\Delta t}$; 目的基因相对表达量 = 试验样品表达量 - WT 样品表达量。试验所用引物列于表 1。所有研究于 2016 年 8 月至 2018 年 7 月在黄淮学院园林中心实验室及温室大棚内进行。所有试验都包括至少 3 个生物重复,并用 Duncan-test 对数据进行差异分析。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequence

引物 Primer	正向 Forward(5'-3')	反向 Reverse(5'-3')
<i>AtCuZnSOD</i> 基因检测	P1: ATGGCTGCATCTCTACTGGA	P2: AACAGGATGTCAATATACAA
<i>AtCuZnSOD</i> southern blot 检测	P3: CGCACAAATCCCACTATCCTTC	P4: TGGCTCTGTCCGTTGATCTCA
<i>AtCuZnSOD</i> qRT-PCR	P5: GTCATGCTGGCGATTGGGT	P6: TGAGTGTGGCTCTGTCCGTT
β -actin	P7: GGAAGGACTTGTACGGTAACATTG	P8: GGACCTGCCTCATCATACTCA

1.2.2 胁迫处理

将转 *AtCuZnSOD* 基因羽衣甘蓝和野生(CK)植株置于室内培养,用含有 15% PEG-4000 MS 培养基进行缺水干旱处理。采用砂培方法(砂土质量比为 1:1),缺水 7 d 后复水 4 d,试验过程中采样并测定相关指标。

1.3 项目测定

参照文献[21]测定如下指标,转基因种子及对照萌发率、发芽势、主根长度、干质量/鲜质量、叶片丙二醛(MDA)含量、过氧化氢酶(CAT)活性和过氧化物酶(POD)活性等。

1.4 数据分析

采用 Excel 2013 及 SPSS 17.0 软件进行数据分析。

2 结果与分析

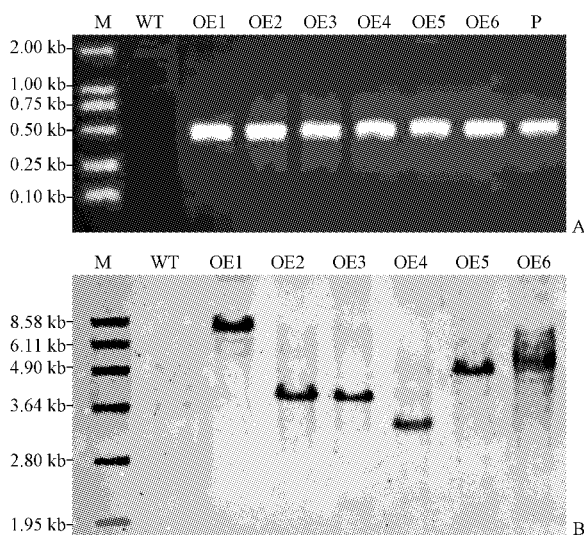
2.1 转 *AtCuZnSOD* 基因植株的获得

AtCuZnSOD 目的基因与载体 pBIA-CAM1301 经双酶切后连接重组, 获得 pBIA-CAM1301-*AtCuZnSOD* 基因过表达载体。经双酶切检验正确后, 将其导入农杆菌 LBA4404 菌株中, 利用农杆菌介导法将表达载体转入羽衣甘蓝中。在含有 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 潮霉素 MS 培养基中经过 2~3 周分化培养, 当有抗性芽再生时, 待苗长

至 0.5~1.0 cm 时转入生根培养基中生根, 共获得再生转基因植株 6 个株系。

2.2 转基因羽衣甘蓝的 PCR 与 Southern blot 检测

提取转基因和野生型羽衣甘蓝植株叶片 DNA, 用 PCR 方法扩增 *AtCuZnSOD* 基因, 经电泳检测, 结果如图 2-A 所示, 转基因植株在约 500 kb 处有目的条带, 且与阳性质粒 DNA PCR 结果一致, 但是在野生型植株的基因组 PCR 没有相应大小的条带。对 PCR 阳性的植株进行 Southern blot 分析表明, T1 代过表达植株均具有杂交带, 而野生型植株未出现杂交带(图 2-B)。显示的杂交信号表明 *AtCuZnSOD* 基因已整合到羽衣甘蓝基因组中。



注: A. PCR 检测; B. Southern blot 检测。M. 标准分子量; WT. 野生型; OE1~OE6. 转基因株系; P. 阳性对照。

Note: A. PCR analysis; B. Southern blot analysis. M. standard molecular weight; WT. wild type; OE1—OE6. transgenic lines; P. positive control.

图 2 *AtCuZnSOD* 基因转化羽衣甘蓝的 PCR 及 Southern blot 检测

Fig. 2 PCR and Southern blot analysis of *AtCuZnSOD* transgenic kale plants

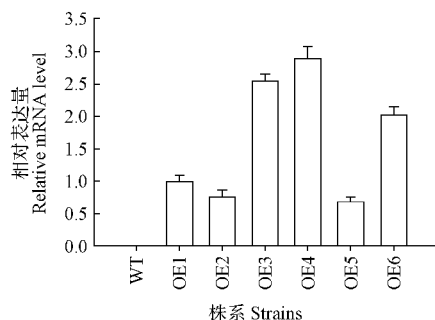
2.3 转基因羽衣甘蓝的 qRT-PCR 检测

待羽衣甘蓝 4 叶期时, 用 15% PEG-4000 对植物进行干旱胁迫处理, 在处理 24 h 后提取 RNA, 用 ABI7500 荧光定量 PCR 仪检测 *AtCuZnSOD* 基因的表达量(图 3)。结果表明转基因羽衣甘蓝 *AtCuZnSOD* mRNA 可以表达。但在这 6 个转基因株系中, OE4 株系在干旱胁迫下基因相对表达量最大。说明在同等干旱条件下,

OE4 植株将有可能产生更多的 CuZnSOD 酶。而 OE5 株系的 *AtCuZnSOD* 基因 mRNA 相对表达量最小, 这可能是由于目的基因插入到基因组中的位置不同而导置基因表达量不同。以下试验选择相对表达量较高的株系 OE3, OE4 和 OE6 作为研究对象。

2.4 种子萌发期转基因植株抗旱性

用 15% PEG-4000 处理, 转 *AtCuZnSOD* 基因羽



注: WT 为野生型株系; OE1~OE6 为转基因株系。

Note: WT, wild type; OE1—OE6, transgenic lines.

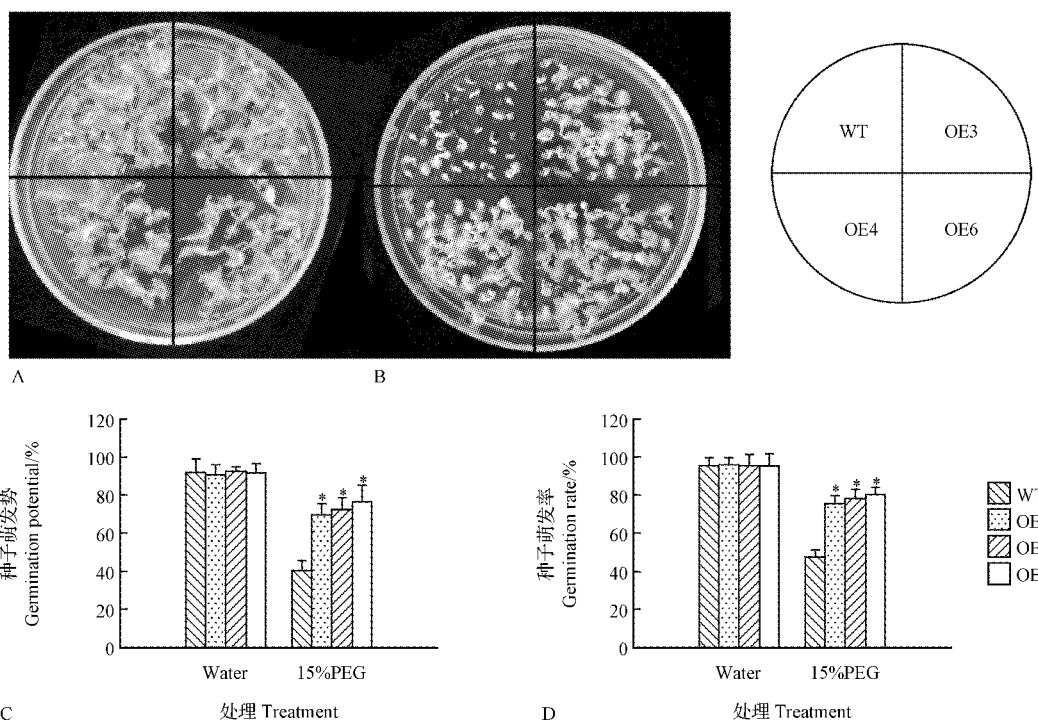
图 3 *AtCuZnSOD* 基因转化羽衣甘蓝的 RT-qPCR 检测

Fig. 3 qPCR identification of *AtCuZnSOD* transgenic kale plants

衣甘蓝株系的发芽势均大于对照。而且过表达株系发芽率也大于对照(图 4)。说明转基因羽衣甘蓝种子在干旱胁迫下活力较高,更适应干旱条件。

2.5 苗期转基因植株抗旱能力

4 叶期(2 片真叶、2 个子叶)羽衣甘蓝经 PEG-4000 处理 3 d 后,转基因羽衣甘蓝干质量/鲜质量比、丙二醛(MDA)明显低于野生型。转 *AtCuZnSOD* 基因的羽衣甘蓝根系相对野生型株系的主根长度显著增加。而 3 个转 *AtCuZnSOD* 羽衣甘蓝品系的叶绿素含量、CAT 活性和 POD 活性显著高于对照。在基质中培养,干旱 7 d 后,转基因植物成活率极显著高于 WT。这些研究结果表明外源 *AtCuZnSOD* 基因的导入羽衣甘蓝后提高了植株的耐旱性(图 5、6)。

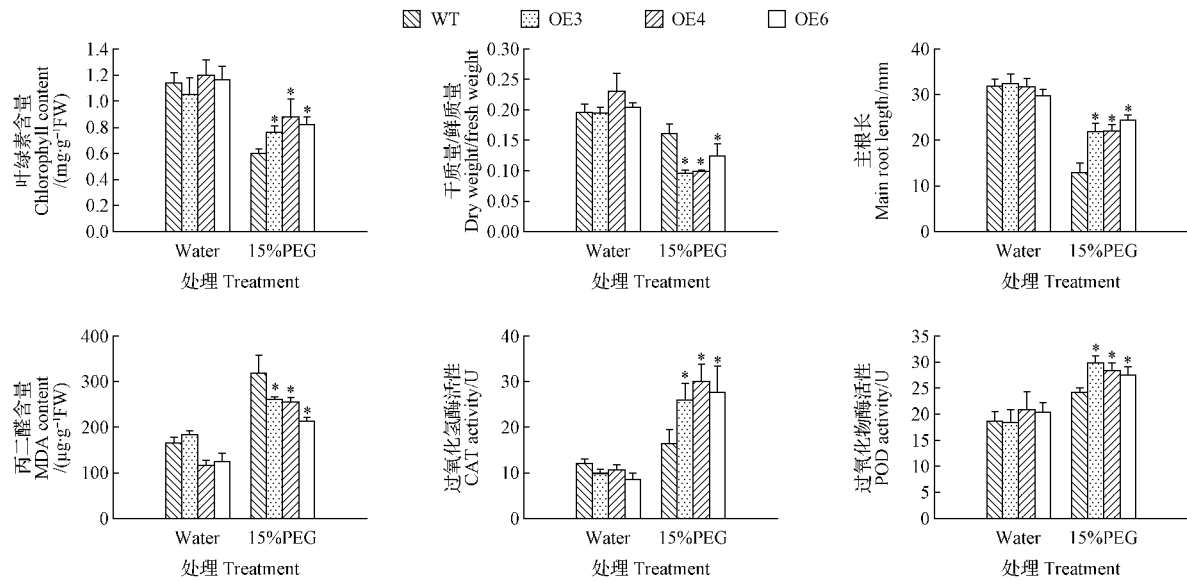


注:水处理(A)和 15% PEG-4000 处理(B)4 d 的转基因羽衣甘蓝长势。C. 水处理和 15% PEG-4000 处理 4 d 后转基因羽衣甘蓝发芽势。D. 水处理和 15% PEG-4000 处理 4 d 后转基因羽衣甘蓝萌发率。* 在 $P < 0.05$ 水平上差异显著,数据至少 3 个生物重复。

Note: Growth vigor of transgenic kale with water treatment (A) and 15% PEG-4000 treatment (B) for 4 days. C. Germination potential of transgenic kale after water treatment and 15% PEG-4000 treatment for 4 days. D. Germination rate of transgenic kale after water treatment and 15% PEG-4000 treatment for 4 days. * means the significant difference at the 0.05 probability level, error bars are based on three replicates.

图 4 转基因羽衣甘蓝与对照种子在干旱胁迫的萌发

Fig. 4 Germination status of seed of transgenic kale and control under drought stress



注: * 表示与对照显著差异 ($P < 0.05$)。

Note: * indicate significant difference between the transgenic lines compared with the wild type ($P < 0.05$).

图 5 干旱胁迫下转基因羽衣甘蓝的生理特征

Fig. 5 Physiological characteristics of transgenic plants under drought stress

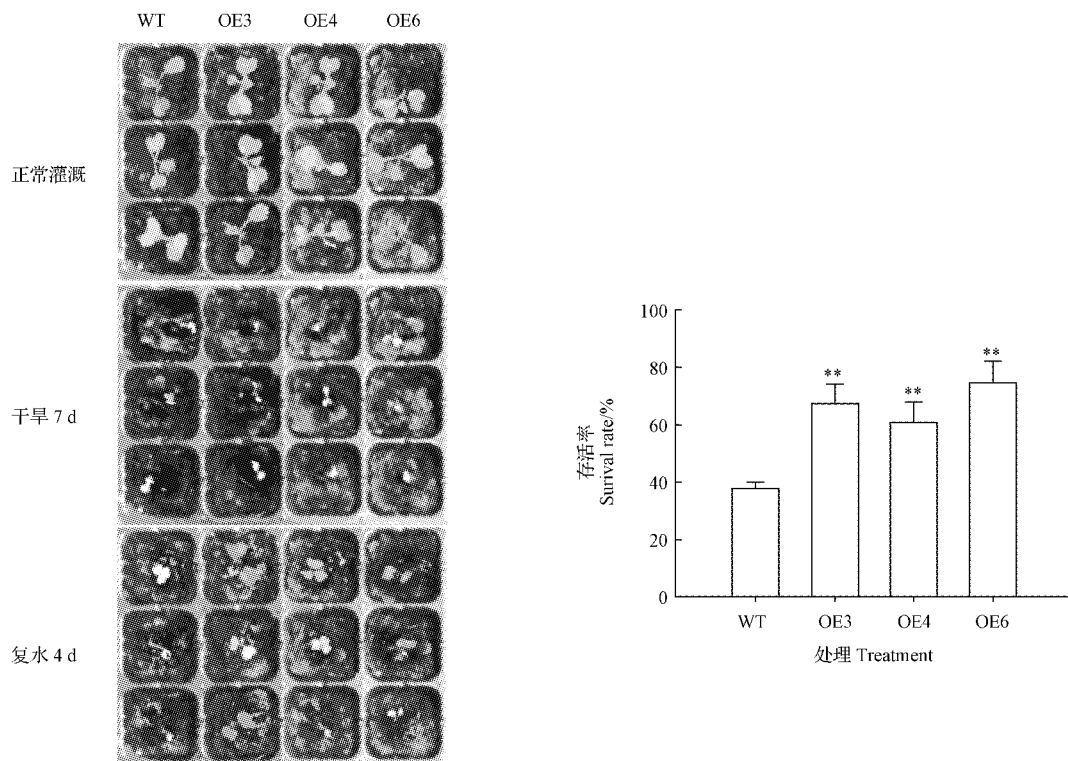


图 6 在干旱胁迫下转基因羽衣甘蓝及对照的存活率分析

Fig. 6 The survival rate of transgenic kale and control under drought stress

3 讨论

该研究中, *AtCuZnSOD* 基因经农杆菌介导转入羽衣甘蓝中, 经定量 PCR 检测, 都能在体内过表达。干旱是世界范围内日益严重的农业问题。干旱严重影响作物产量和品质^[1-2]。常规育种也可能增加羽衣甘蓝的耐旱性, 但费力费时, 而且由于遗传多样性限制了改进的潜力。分子生物学方法有助于提高经济作物的耐旱性。许多研究表明, 导入外源基因能增加植物的耐旱性, 例如, KUDO 等^[22]研究过量表达 *OSP11* 和 *DREB1A* 转基因的拟南芥植株, 其表现出较高的耐旱性。HUI 等^[23]把 *CuZnSOD* 和 *APX* 转入甘薯, 提高了转基因植物的耐盐性。该研究成功地在羽衣甘蓝中转入 *AtCuZnSOD* 基因。在干旱胁迫下, 转基因植株提高了耐旱性, 根系生长明显高于野生植株。

在干旱胁迫下, 种子萌发期的发芽率和发芽势是反映种子萌发能力的常规指标, 该试验中采用发芽势和发芽率对转基因植物与野生型种子进行评估。结果表明, 转基因植物种子的无论是发芽率还是发芽势均高于野生型。说明转基因羽衣甘蓝具有一定的耐旱性。

植物在干旱胁迫能产生活性氧(ROS), 危害植物生长发育^[24]。但植物体内有一些酶可将它们分解, 缓解它的破坏作用。如 POD 的作用主要是将过氧化氢水解, CAT 是将过氧化氢氧化为水和氧^[17]。该研究发现转基因羽衣甘蓝中 CAT 和 POD 活性均较高。表明转基因植株清除 ROS 的能力显著高于野生植株。转基因植物具有较强耐旱表型, 如在干旱胁迫下具有低的叶绿素损失、脂质过氧化。结果表明, 转基因植株中 CAT 和 POD 活性的升高降低了干旱胁迫引起的 ROS 毒性。在干旱胁迫下, 细胞内会产生较多的自由基如超氧自由基等, 它们能破坏细胞膜系统, 增大细胞膜的通透性, 使细胞膜失去保护功能^[25]。该研究表明, 转 *AtCuZnSOD* 基因羽衣甘蓝株系幼苗在干旱胁迫下 MDA 积累较少, 表明膜结构破坏小, 通透性改变较低, 受到的伤害较轻(图 5)。

综上所述, 过表达 *AtCuZnSOD* 基因显著提高了羽衣甘蓝的抗旱能力; *AtCuZnSOD* 基因作为遗传育种耐旱基因的靶基因是可行的。

参考文献

- [1] ZHU J K. Salt and drought stress signal transduction in plants[J]. Annual Review of Plant Biology, 2002, 53: 247.
- [2] FAROOQ M, WAHID A, KOBAYASHI N, et al. Plant drought stress: effects, mechanisms and management[J]. Agronomy For Sustainable Development, 2009, 29(1): 185-212.
- [3] DEIKMAN J, PETRACEK M, HEARD J E. Drought tolerance through biotechnology: improving translation from the laboratory to farmers' fields[J]. Curr Opin Biotechnol, 2012(23): 243-50.
- [4] 李大红, 刘宏伟, 秦兰娟, 等. 拟南芥 P5CS1 基因转化羽衣甘蓝增强耐盐性分析[J]. 南方农业学报, 2017, 48(5): 768-773.
- [5] WANG X, ZHANG H, GAO Y, et al. Characterization of Cu/Zn-SOD enzyme activities and gene expression in soybean under low nitrogen stress[J]. Journal of the Science of Food & Agriculture, 2016, 96(8): 2692.
- [6] MITTLER R, VANDERAUWERA S, GOLLERY M, et al. Reactive oxygen gene network of plants[J]. Trends in Plant Science, 2004, 9(10): 490-498.
- [7] HWANG C S, RHIE G E, OH J H, et al. Copper- and zinc-containing superoxide dismutase (Cu/ZnSOD) is required for the protection of *Candida albicans* against oxidative stresses and the expression of its full virulence[J]. Microbiology, 2002, 148(11): 3705-3713.
- [8] HERNÁNDEZ J A, ALMANSA M S. Short-term effects of salt stress on antioxidant systems and leaf water relations of pea leaves[J]. Physiologia Plantarum, 2002, 115(2): 251-257.
- [9] XU J, DUAN X, YANG J, et al. Coupled expression of Cu/Zn-superoxide dismutase and catalase in cassava improves tolerance against cold and drought stresses[J]. Plant Signaling & Behavior, 2013, 8(6): 24-25.
- [10] WHITE J A, SCANDALIOS J G. Isolation and characterization of a cDNA for mitochondrial manganese superoxide dismutase (SOD-3) of maize and its relation to other manganese superoxide dismutases[J]. BBA-Gene Structure and Expression, 1988, 951(1): 61-70.
- [11] 郭笑, 苑广信, 王曼力, 等. 番茄超氧化物歧化酶的生物信息学分析[J]. 北方园艺, 2016(21): 97-101.
- [12] SOMMER, CLAUS. Antioxidative responses of *Ocimum basilicum* to sodium chloride or sodium sulphate salinization[J]. Plant Physiology & Biochemistry, 2010, 48(9): 772-777.
- [13] DIONISIO-SESE M L, TOBITA S. Antioxidant responses of rice seedlings to salinity stress[J]. Plant Science, 1998, 135(1): 1-9.
- [14] GUAN Q, LIAO X, HE M, et al. Tolerance analysis of chloroplast OsCu/Zn-SOD overexpressing rice under NaCl and NaHCO₃ stress[J]. PloS One, 2017, 12(10): 1-17.
- [15] KWON S Y, JEONG Y J, LEE H S, et al. Enhanced toler-

ances of transgenic tobacco plants expressing both superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in chloroplasts against methyl viologen mediated oxidative stress[J]. Plant Cell Environ, 2002, 25(7): 873-882.

[16] TANG L, KWON S Y, KIM S H, et al. Enhanced tolerance of transgenic potato plants expressing both superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in chloroplasts against oxidative stress and high temperature[J]. Plant Cell Reports, 2006, 25(12): 1380-1386.

[17] SHAFI A, CHAUHAN R, GILL T, et al. Expression of SOD and APX genes positively regulates secondary cell wall biosynthesis and promotes plant growth and yield in arabidopsis under salt stress[J]. Plant Molecular Biology, 2015, 87(6): 615-631.

[18] SHIRIGA K, SHARMA R, KUMAR K, et al. Expression pattern of superoxide dismutase under drought stress in Maize [J]. International Journal of Innovative Research In Science, Engineering And Technology, 2014, 3(4): 11333-11337

[19] 刘立鸿, 许璐, 汪凯, 等. 地高辛标记探针 Southern 印迹杂交

技术要点及改进[J]. 生物技术通报, 2008(3): 57-59.

[20] 赵婉莹, 于太飞, 杨军峰, 等. 大豆 GmbZIP16 的抗旱功能验证及分析[J]. 中国农业科学, 2018, 51(15): 6-18.

[21] 张文玲. 农杆菌介导的抗寒基因转化羽衣甘蓝的初步研究[D]. 重庆: 西南大学, 2010.

[22] KUDO M, KIDOKORO S, YOSHIDA T, et al. Double overexpression of DREB and PIF transcription factors improves drought stress tolerance and cell elongation in transgenic plants [J]. Plant Biotechnology Journal, 2016, 15(4): 458-471.

[23] HUI Y, QIANG L, PARK S C, et al. Overexpression of CuZnSOD, and APX, enhance salt stress tolerance in sweet potato [J]. Plant Physiology & Biochemistry, 2016, 109(12): 20-27.

[24] TORRES M A. ROS in biotic interactions. Physiol Plant [J]. Physiologia Plantarum, 2009, 138(4): 414-429.

[25] GUTTIKONDA S K, VALLIYODAN B, NEELAKANDAN A K, et al. Overexpression of AtDREB1D, transcription factor improves drought tolerance in soybean [J]. Molecular Biology Reports, 2014, 41(12): 7995-8008.

Effects of Drought on Seed Germination and Seedling Growth of Transgenic *AtCuZnSOD* Kale

YANG Yong¹, HAI Jun², PANG Keqin¹, LI Hongyan³

(1. Garden Center of Huanghuai University, Huanghuai University, Zhumadian, Henan 463000; 2. Green Department of Zhumadian, Zhumadian, Henan 463000; 3. School of Biotechnology and Food Engineering, Huanghuai University, Zhumadian, Henan 463000)

Abstract: *Brassica oleracea* was used as test material, drought tolerance of transformed kale with *Arabidopsis thaliana* L. copper/zinc superoxide dismutase (*AtCuZnSOD*) gene was studied by Agrobacterium-mediated, PCR, Southern blot and qRT-PCR, in order to increase the germplasm resources of resistance breeding in Kale. The results showed that *AtCuZnSOD* gene was integrated into the genome of kale. The expression level of *AtCuZnSOD* in transgenic plants increased significantly. Under PEG-4000 stress, the seed germination potential and germination rate of transgenic *AtCuZnSOD* kale were higher than those of control. Under drought stress, MDA content of transgenic seedlings was significantly lower than that of wild plants, while POD and CAT activities were higher than those of wild plants. Meanwhile, the increase of average main root length, survival rate and chlorophyll content of transgenic plants were significantly higher than that of wild plants, while dry weight/fresh weight was significantly lower than that of wild plants. The results showed that the drought tolerance of transgenic kale plants with *AtCuZnSOD* gene was significantly improved.

Keywords: kale; *AtCuZnSOD* gene; transgenic plant; drought tolerance