

转拟南芥 *AtNHX5* 基因烟草的耐盐性研究

林小洁¹, 李洪清²

(1. 广东省阳江职业技术学院, 广东 阳江 529566; 2. 华南师范大学 生命科学院 广东省植物发育生物工程重点实验室, 广东 广州 510631)

摘要: 采用农杆菌介导的叶盘法将来源于拟南芥的 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因 *AtNHX5* 导入烟草, 经潮霉素筛选、PCR 和 RT-PCR 检测, 证明 *AtNHX5* 已导入烟草基因组并在转基因植株中表达。将转基因植株和非转基因(野生型)植株培养在含有 300 mM NaCl 的 1/2MS 培养基上, 发现转基因植株的生长明显优于野生型。将在含有 300 mM NaCl 的 1/2MS 培养基中生长 4 周后的幼苗转移到不含 NaCl 的 1/2MS 培养基后, 转基因植株快速恢复生长, 而野生型植株则生长停滞。结果表明, 超表达 *AtNHX5* 基因可以提高烟草的耐盐性。

关键词: 拟南芥 *AtNHX5*; 烟草; 耐盐性

中图分类号: Q 943.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2011)09-0123-04

盐胁迫由于其对植物生长和发育造成渗透胁迫和离子毒害, 成为影响植物生长发育和农业生产的重要因素之一。植物在进化过程中形成了一系列适应和耐受盐胁迫的机制^[1]: 一方面通过在细胞内合成和积累相溶性渗透物质进行渗透平衡的调节; 另一方面通过离子平衡机制调节胞内的离子平衡, 减轻细胞质的离子毒害。为避免细胞质中过量 Na^+ 对生理活动的干扰, 细胞主要通过 3 种机制减少 Na^+ 在胞质中的积累: (1) 限制 Na^+ 进入细胞; (2) 将胞质中的 Na^+ 排至胞外; (3) 将 Na^+ 移至细胞器(如液泡)。 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白是负责 Na^+ 和 H^+ 交换的一种跨膜运输蛋白, 广泛存在于细菌、酵母、藻类、动物和高等植物的膜系统上, 该蛋白在维持植物细胞质中 Na^+ 稳态平衡、 K^+/Na^+ 比值和 pH 稳定, 叶绿体发育, 叶片生长以及植物的耐盐性中起着重要的调节作用^[1]。

拟南芥基因组中编码拟南芥 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白的基因有 8 个成员 *AtNHX1*~*8*, *AtNHX1* 是其中第 1 个被克隆分离的基因, 并证明超表达该基因能够显著地提高植物的耐盐性, 是目前通过基因工程操作提高植物耐盐性的重要研究目标基因之一^[2]。*AtNHX1* 的表达活性受 NaCl、KCl、山梨醇或脱落酸(ABA)处理的上调, 盐处理上调 *AtNHX1* 的表达活性不是通过 SOS 途径而是通过 ABA 生物合成和 ABA 信号转导途径。而

AtNHX5 表达的上调仅对 NaCl 敏感, 对 LiCl 不敏感, 对 Na^+ 信号具有专一性。目前只知道 *AtNHX5* 的表达调控途径既不依赖于 SOS 途径也不依赖于 ABA 途径, 可能是受另一新的途径所调节(Munns 和 Tester 2008)。前期的工作证实, 超表达 *AtNHX5* (AF490589) 明显地提高了蓝猪耳的耐盐性^[3]。烟草品种 K326 是美国 1983 年开始推广的品种, 目前是我国云南省的主要栽培品种。在该试验中将 *AtNHX5* 导入烟草 K326, 提高了转基因烟草的耐盐性, 说明 *AtNHX5* 可应用于培育耐盐烟草新品种。

1 材料与方法

1.1 试验材料

植物转化受体烟草(*Nicotiana tabacum* L.) K326 种子和根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) 菌株 EHA105 为广东省植物发育生物工程重点实验室保存。*AtNHX5* 表达载体 pHQSN-F 为该实验室所构建^[3], 该质粒含有潮霉素磷酸转移酶筛选标记基因(*hpt*), *AtNHX5* 的启动子为烟草花叶病毒 CaMV35S 启动子和来源于蓖麻过氧化氢酶(castor bean catalase) 基因的一段内含子。将 pHQSN-F 导入 EHA105 中, -80°C 下保存。RNA 提取试剂盒购自 QIAGEN 公司, dDNA 合成试剂盒购自 TaKaRa 公司, dNTPs、Taq DNA 聚合酶购自北京鼎国生物公司, 引物合成委托北京赛百盛基因技术公司。

1.2 烟草的培养

用 70% 酒精浸泡烟草种子 30 s, 后用 5% 的次氯酸钠溶液(加 0.1% 吐温)消毒 15 min。无菌水冲洗 5~6 次后, 将种子接入不附加任何激素的 MS^[4] 培养基中, 附加琼脂 0.75%, pH 5.8。置于培养温度(25 ± 1) $^\circ\text{C}$, 光照强度 $35 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 每天光照 12 h 培养 28 d。

第一作者简介: 林小洁(1966-), 女, 本科, 高级讲师, 研究方向为植物基因工程和园艺植物组织培养, 现从事高职高专园林专业教学工作。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30170667)。

收稿日期: 2011-03-11

1.3 烟草转化

从-80℃低温冰箱取出保存的农杆菌 EHA105/pHQS-N-F, 在冰上溶化。取 2 μL 菌液接到含 50 mg/L 利福平和 50 mg/L kanamycin 的 5 mL 液体 YEP 培养基于(28±1)℃, 210 r/min 振荡培养 24 h。侵染外植体前, 农杆菌培养物经离心沉淀, 悬浮于 1/2 MS 液体培养基中(pH 5.2), OD₆₀₀ 值为 0.5。取无菌苗叶片切成约 0.5 cm×0.5 cm 的小块, 置农杆菌液中感染 10 min 后取出, 于灭菌滤纸上吸干, 接种到共培养基(MS+2 mg/L BA+0.5 mg/L NAA+20 mg/L 乙酰丁香酮, pH 5.5), 25℃黑暗下培养 3 d, 后用含有 500 mg/L 的头孢霉素无菌水洗涤外植体, 置灭菌滤纸上吸干, 将外植体接至抗性芽筛选培养基(MS+2 mg/L BA+0.5 mg/L NAA+25 mg/L hygromycin+500 mg/L 头孢霉素, pH 5.8), 照光(25±1)℃下培养, 21 d 后从外植体长出抗性芽, 将抗性芽转接到新鲜抗性芽筛选培养基, 切取高约 3.5 cm 抗性芽接到生根培养基(MS+0.1 mg/L NAA+25 mg/L hygromycin+250 mg/L 头孢霉素, pH 5.8)上生根, 得到抗性植株。

1.4 转基因植株的移栽

将生根的植株从瓶子中取出, 洗去根部的培养基, 用纸巾包裹, 置清水中培养 2 d 后, 将小苗移栽到经高压灭菌过的基质(蛭石:珍珠岩:海沙=2:1:1)中, 覆盖 1 层保鲜膜, 在保鲜膜上打上几个小孔, 置温度(25±1)℃, 光照强度为 15 μmol·m⁻²·s⁻¹(每天照光 12 h), 湿度为 90%的培养室中培养。10 d 后揭去保鲜膜, 继续在培养室中培养 10 d 后转移至温室中培养。

1.5 转基因植株的分子鉴定

从田间分别取转基因当代的转化株(T1、T4、T7、T8、T10 和 T11)和非转化株(WT)的新鲜叶片各 200 mg, 用 CTAB 法提取 DNA, 干燥后溶于 100 μL 无菌水中。提取总 RNA 时, 称取 100 mg 叶片, 按照 QIAGEN 公司 RNeasy Mini Kit 实验操作步骤进行 RNA 制备, 最终 RNA 溶于 50 μL DEPC 处理过的水中。反转录合成 cDNA 按照 TaKaRa 公司 M-MLV RTase cDNA Synthesis Kit 实验操作步骤进行。

分别取 T1 和 T7 株系的纯合系进行 RT-PCR 检测。RT-PCR 反应参照 TaKaRa 公司的试剂盒说明, 略加修改。RT 反应条件为: 65℃ 1 min, 50℃ 5 min 后, 15 min 内匀速升温到 65℃, 65℃保温 30 min, 98℃ 5 min, 4℃ 5 min。然后, 以反转录合成的 cDNA 为模板, 以 *Actin* 基因作为内参, 进行 RT-PCR 半定量分析。*Actin* 的引物为: 上游 *Actin F* (5'-TTC TGG TGA TGG TGT TAG C-3') 和下游 *Actin R* (5'-CCT ATC AGC AAT TCC AGG AAA C-3')。 *AtNHX5* 基因的引物为: 上游

AtNHX5F (5'-ATG ATT TCT CCG GTG GAG CAC GAC CC-3') 和下游 *AtNHX5R* (5'-CTA CTC CCC ATC TCC ATC TCC ATC TG-3')。反应体系成分为: 2 μL 的 10×PCR 缓冲液、0.5 μL 的 dNTP、上下游引物各 0.2、0.1 μL 的 *Taq* 酶(0.5 U/μL)、1 μL 的 cDNA、最后补去离子水至 20 μL。PCR 反应条件为: 94℃预变性 3 min, 94℃变性 30 s、60℃复性 30 s、72℃延伸 1 min, 30 个循环后于 72℃下延伸 10 min, 产物保持在 4℃下。取 10 μL 反应液于 1% 琼脂糖凝胶中电泳检测扩增的结果。

1.6 转基因植株的耐盐性分析

取 T3 代转基因纯系 T1 和 T7 及非转基因(WT)种子, 消毒后接种于 1/2 MS 培养基。将 10 d 苗龄的幼苗接种到 1/2 MS+300 mM NaCl (pH 5.8) 上, 每个培养皿接种 5 株, 设 3 个重复。光下培养 28 d 后, 观察幼苗生长情况并拍照, 然后将幼苗转移到不含 NaCl 的 1/2 MS 培养基中让幼苗恢复生长, 分别在恢复生长的第 6 天和第 12 天观察幼苗生长情况和拍照。

2 结果与分析

2.1 转 *AtNHX5* 基因植株的分子鉴定

AtNHX5 表达载体 pHQS-N-F 因含有潮霉素磷酸转移酶筛选标记基因(*hpt*), 可用潮霉素筛选转化的植物细胞。用含有 25 mg/L 的潮霉素筛选培养基对共培养后的 50 个外植体进行筛选, 36 个外植体分别长出抗性芽。每个外植体只取 1 个抗性芽, 转接到含有 25 mg/L 的潮霉素的生根培养基中生根。共获得 32 个生根的抗性植株。从 32 个生根的抗性植株中随机挑取 6 个株系(T1、T4、T7、T8、T10 和 T11)分别进行 *AtNHX5* 基因片段的 PCR 的鉴定。图 1A 结果表明非转化株 WT 中没有 *AtNHX5* 基因信号带, 而抗性株系 T1、T4、T7、T8、T10、T11 均有 1 554 bp 的目的条带(图 1A)。说明外源基因已导入了烟草基因组。

将第 1 代转基因种子接种到含有 50 mg/L 潮霉素的 1/2 MS 培养基中, 观察统计种子的萌发情况和萌发率, 发现 T1 和 T7 株系长出绿苗数与非抗性种子数的比分别为 108:33 和 116:37, 符合孟德尔 3:1 的分离比。分别挑选 T1 和 T7 株系中的各 15 个单株, 移至温室种植, 收获第 2 代转基因种子。分别对 T1 和 T7 的 15 个单株种子进行潮霉素抗性萌发试验。种子都能在含有潮霉素培养基萌发的单株则为转基因纯合系, T1 株系的 15 个单株中有 4 株为纯合系, T7 中的则有 3 株为纯合系。取转基因纯合系的叶片进行 RT-PCR 检测。RT-PCR 的分析结果表明, *AtNHX5* 基因在转基因株 T1 和 T7 中有转录(图 1B), 扩增片段大小为 1 554 bp, 与 *AtNHX5* 片段大小相符, 而 WT 则没有阳性条带, 证明外源基因 *AtNHX5* 基因在转基因株有表达。

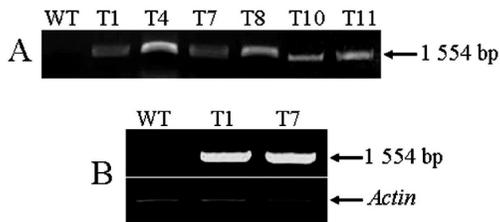


图1 转基因植株的PCR(A)和RT-PCR(B)鉴定

注: WT: 野生型; T1, T4, T7, T8, T10, T11: 转基因烟草

2.2 转 *AtNHX5* 基因株的耐盐性分析

分别对 T1 和 T7 株系的纯合系幼苗进行耐盐性分析。将幼苗接到含有 300 mM NaCl 培养基 28 d 后, 未转化株 WT 生长受到显著抑制: 根变褐, 生长停止, 子叶变黄(图 2, WT)。与 WT 相比, 转基因株 T1 和 T7 均能长出 1~2 条较长的新根, 子叶及叶片颜色鲜绿, 均能长出新的叶片(图 2, T1, T7)。随后将高盐条件下生长的幼苗转接到不含 NaCl 的 1/2 MS 培养基时, WT 生长仍处于停滞状态, 表现为叶片漂白, 根生长受阻, 到接种 12 d 时仍未见有生长的迹象(图 3, WT), 而转基因株则快速恢复生长: 所有转基因株均长出新叶, 原叶片长大, 叶片鲜绿, 根系生长快速(图 3, T1, T7)。说明超表达 *AtNHX5* 基因能提高转基因烟草的耐盐性。

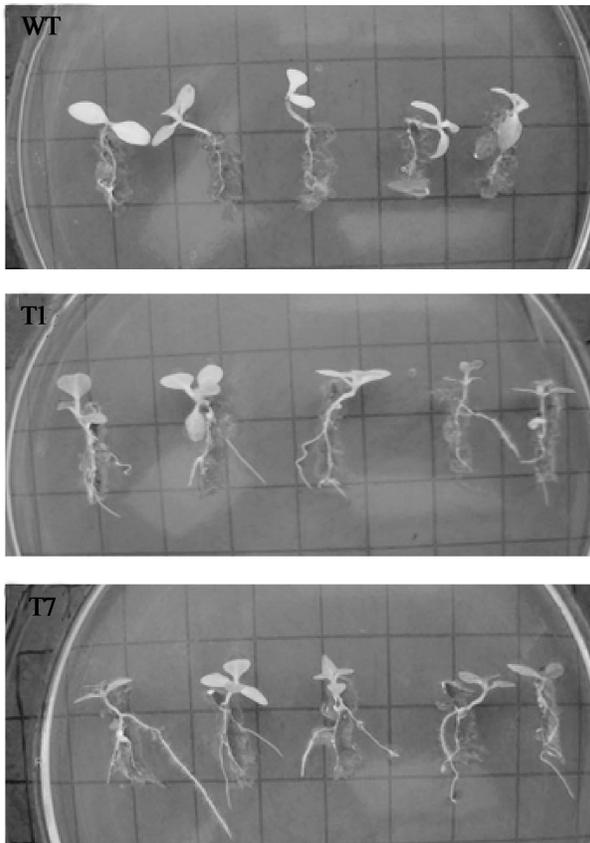


图2 高盐对非转基因(WT)和转基因(T1, T7)幼苗根和叶片生长的影响

注: 在幼苗于 1/2 MS + 300 mM NaCl (pH 5.8) 培养基中生长 28 d 时拍照

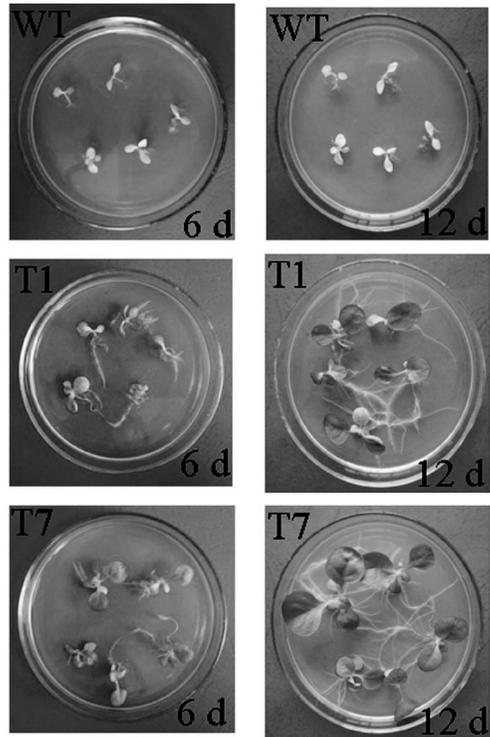


图3 非转基因(WT)和转基因(T1, T7)

幼苗在盐胁迫后恢复生长状况

注: 在幼苗于 1/2 MS (pH 5.8) 培养基中生长 6 d 和 12 d 时拍照。

3 讨论

植物基因工程技术为耐盐新品种的培育提供了重要的技术方法。自 1999 年超表达 *AtNHX1* 被首次^[2]证明能显著改良转基因植物的耐盐性以来, 超表达 *AtNHX1*^[5,6], *AtNHX3*^[7], *AtNHX5*^[3], *LeNHX2*^[8] 均被证明有提高多种转基因植物的耐盐力。这说明了 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白是植物耐盐性的重要调控蛋白, 操作编码 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因的表达活性可以实现植物耐盐新品种的育种。

植物 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白被分为二类: 类 I 和类 II。 *AtNHX1*~4 属于类 I, 位于液泡膜, *AtNHX5* 因与蕃茄 *LeNHX2* 的同源性很高, 该类蛋白对 K^+ 有着很高的选择性。由于 *LeNHX2* 属于类 II 存在于内体小泡 (Endosomal vesicles), 因此 *AtNHX5*~6 被推测应位于内体小泡^[9,10]。最初, *AtNHX5* 因与 *AtNHX1* 一样能遗传互补酵母突变体 *nhx1*, 恢复其耐盐性, *AtNHX5* 被认为与 *AtNHX1* 和 *AtNHX2* 一样是膜上 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白, 具有决定细胞耐盐的能力^[11-12]。与 *AtNHX1* 和 *AtNHX2* 不同, *AtNHX5* 基因的表达只受 Na^+ 专一性的调控。最近, 由于 *AtNHX5* 蛋白与 *LeNHX2* 极高的同源性, 而被推测是位于内体小泡的对 K^+ 有着专一选择性的离子逆向转运蛋白^[8,10]。实验室前期工作^[3]已证明, 该基因不仅能提高转基因植物蓝猪耳叶片富集

Na⁺ 的能力, 而且对盐处理降低叶片 K⁺ 含量有着明显的削弱作用, 该试验结果进一步证实 *AtNHX5* 也能应用于提高烟草的耐盐性, 推测 *AtNHX5* 对转基因植物耐盐性的改良作用可能与该基因有富集 Na⁺ 和 K⁺ 离子有关^[3]。该研究结果表明, *AtNHX5* 基因可用于培育理想耐盐新烟草品种。

参考文献

- [1] Munns R, Tester M. Mechanisms of salinity tolerance [J]. Annual Review Plant Biology, 2008, 59: 651-681.
- [2] Apse M P, Aharon G S, Snedden W S, et al. Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter in *Arabidopsis* [J]. Science, 1999, 285: 1256-1258.
- [3] Shi L Y, Li H Q, Pan X P, et al. Improvement of *Torenia fournieri* salinity tolerance by expression of *Arabidopsis AtNHX5* [J]. Functional Plant Biology, 2008, 35: 189-192.
- [4] Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures [J]. Physiology Plant, 1962, 15: 473-497.
- [5] Zhang H X, Blumwald E. Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit [J]. Nature Biotechnology, 2004, 19: 765-768.
- [6] Zhang H X, Hodson J, Williams J P, et al. Engineering salt tolerant brassica plants: characterization of yield and seed oil quality in transgenic plants with increased vacuolar sodium accumulation [J]. The Proceeding of

the National Academy of Sciences USA, 2004, 98: 12832-12836.

- [7] Liu H, Wang Q Q, Yu M M, et al. Transgenic salt-tolerant sugar beet (*Beta vulgaris* L.) constitutively expressing an *Arabidopsis thaliana* vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter gene *AtNHX3*, accumulates more soluble sugar but less salt in storage roots [J]. Plant Cell Environment, 2008, 31: 1325-1334.
- [8] Rodriguez Rosales M P, Jiang X, Golez F J, et al. Overexpression of the tomato K⁺/H⁺ antiporter *LeNHX2* confers salt tolerance by improving potassium compartmentalization [J]. New Phytologist, 2008, 179: 366-377.
- [9] Venema K, Belver A, Marin-Manzano M G, et al. A novel intracellular K⁺/H⁺ antiporter related to Na⁺/H⁺ antiporters is important for K⁺ ion homeostasis in plants [J]. Journal of Biological Chemistry, 2003, 278: 22453-22459.
- [10] Pardo J, Cubero B, Leidi E, et al. Alkali cation exchangers: role in cellular homeostasis and stress tolerance [J]. Journal of Experimental Botany, 2006, 57: 1181-1199.
- [11] Yokoi S, Quintero F J, Cubero B, et al. Differential expression and function of *Arabidopsis thaliana* NHX Na⁺/H⁺ antiporters in the salt stress response [J]. Plant Journal, 2002, 30: 529-539.
- [12] Aharon G S, Apse M P, Duan S L, et al. Characterization of a family of vacuolar Na⁺/H⁺ antiporters in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Soil, 2003, 253: 245-256.

(致谢: 感谢中国科学院华南植物园李美茹研究员对转基因植株耐盐性分析的指导和帮助。)

Overexpression of *AtNHX5* Improves Tolerance to Salt Stress in Tobacco

LIN Xiao-jie¹, LI Hong-qing²

(1. Yangjiang Vocational and Technical College, Yangjiang, Guangdong 529566; 2. Guangdong Provincial Key Lab of Biotechnology for Plant Development, College of Life Sciences, South China Normal University, Guangzhou, Guangdong 510631)

Abstract: Na⁺/H⁺ antiporters have been shown to sequester excess Na⁺ into the vacuole and therefore represent attractive targets for application in molecular plant breeding of salt tolerance. In this study, transgenic tobacco plants overexpressing *AtNHX5* showed higher salt tolerance than wild-type plants (WT) under high saline conditions. After salt stress recovery period, the growth of WT plants was obviously inhibited, while all the *AtNHX5* transgenic plants recovered growth quickly. Taken together, the results indicated the feasibility of improving tolerance to salt stress in tobacco via genetic engineering, by introducing *AtNHX5* into the genome of tobacco.

Key words: *Arabidopsis AtNHX5*; tobacco; salt tolerance