

doi: 103969/j.issn.0490-6756.2017.01.036

过量表达 *BnTR1* 油菜对多种逆境的抗性分析

陈彩丽, 曹昊昊, 樊莉娟, 朱旭辉, 刘志斌, 王健美

(四川大学生命科学学院生物资源与生态环境教育部重点实验室, 成都 610064)

摘要: 油菜 *BnTR1* 是一个定位于质膜上的 E3 连接酶, 前期的研究表明它赋予油菜、水稻和大肠杆菌对热胁迫的耐受性. 为了研究过量表达 *BnTR1* 油菜对多种逆境的综合抗逆特性, 本研究设计了多种胁迫条件, 观察并分析了这些油菜的综合抗逆表现. 结果表明与对照材料相比, 转基因油菜对双氧水胁迫、盐和甘露醇模拟干旱胁迫表现出较强的抗性, 并且在盐胁迫下, 转基因油菜的 SOD、POD、和 CAT 三种抗氧化酶活性高于对照材料. 这些结果证实过量表达 *BnTR1* 使得油菜对多种胁迫表现出了较强的抗性, 为深入研究 *BnTR1* 的功能奠定了基础, 为抗逆油菜新品种培育提供了原始材料.

关键词: 油菜; *BnTR1*; 过氧化氢胁迫; 盐胁迫; 干旱胁迫

中图分类号: Q37 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2017)01-0215-06

Analysis of tolerance to abiotic stresses in *Brassica napus* over-expressing *BnTR1*

CHEN Cai-Li, CAO Hao-Hao, FAN Li-Juan, ZHU Xu-Hui, LIU Zhi-Bin, WANG Jian-Mei

(Key Laboratory of Bio-resources and Eco-Environment of Ministry of Education,
College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract: *BnTR1* is an E3 ligase which localized in the plasma membrane, and previous studies indicated that it played a key role in heat stress response in *Brassica napus*, rice and *E. coli*. In order to investigate the comprehensive resistance characteristic of *B. napus* over-expressing *BnTR1* lines, a variety of stress conditions was designed to observe and analysis their phenotypes. Results showed that the transgenic plant has a better resistance to hydrogen peroxide, salt, and mannitol when compared with the control. In addition, the activity of superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD) and catalase (CAT) in transgenic plant was higher than the control under salt stress. These results confirmed that the over expression of *BnTR1* enhanced the tolerance of *Brassica napus* against a variety of stress, which laid a foundation for further research of the function of *BnTR1*, and also provided original materials for breeding new varieties.

Keywords: *Brassica napus*; *BnTR1*; Hydrogen peroxide stress; Salt stress; Drought stress

1 引言

BnTR1 是在甘蓝型油菜中发现的定位于细胞膜上的 E3 泛素连接酶, 其氨基酸序列中含有一个

锌指结构域, 是一个 C_4HC_3 型锌指蛋白, 在体外具有 E3 泛素化活性, 参与多种生物信号途径. 研究表明, *BnTR1* 在油菜、水稻、拟南芥、大肠杆菌及烟草中的过量表达能够提高植物对逆境的耐受性^[1].

收稿日期: 2015-12-23

基金项目: 国家自然科学基金(31271758)

作者简介: 陈彩丽(1988-), 女, 河南漯河人, 硕士, 研究方向为分子遗传学与基因工程. E-mail: 1152640724@qq.com.

通讯作者: 王健美. E-mail: wangjianmei@scu.edu.cn

过量表达 *BnTR1* 油菜及该转基因的拟南芥、水稻、大肠杆菌都表现出对高温的耐受性,使其在高温处理下仍然能生长良好^[2,3],而且转化了该基因的烟草对于甘露醇和 PEG 模拟的干旱胁迫和盐胁迫表现出较强的抗性^[4].

植物的生长和发育受到多种非生物胁迫因素的影响,如干旱、盐渍、低温、高温等,其中干旱胁迫和盐胁迫会引起陆生植物渗透压的变化,导致植物体内水分缺失,最终降低农作物的产量^[5].植物在长期的进化过程中,通过一系列生理生化机制逐步适应了不良环境^[6],包括形态结构和生理水平的变化^[7].

本文在前期研究的基础上,以过量表达 *BnTR1* 基因的油菜^[8]为实验材料,通过盐胁迫和甘露醇模拟的干旱胁迫研究对照材料和转基因株系的表型变化,并进行多项生理指标的测定,以探究 *BnTR1* 是否赋予了油菜对盐胁迫和干旱胁迫的耐受能力. DAB 染色方法定性分析在盐胁迫处理后不同株系的 H_2O_2 的含量.此外,体外用过量的过氧化氢处理下,观察上述材料的表型差异,并测定了叶绿素含量的变化.此研究结果为研究 *BnTR1* 的功能奠定了基础,也为培育抗逆油菜新品种提供新的亲本材料.

2 材料与方法

2.1 材料

植物材料:非转基因油菜(以下简称对照,用 control 表示)和过量表达 *BnTR1* 油菜(用 OE 表示)都是甘蓝型油菜,上述种子是本实验室长期保存和使用的材料.考马斯亮兰蛋白测定试剂盒,超氧化物歧化酶测定试剂盒,过氧化物酶测定试剂盒,过氧化氢酶测定试剂盒均购自南京建成生物工程研究所;其他化学试剂为国产分析纯.

2.2 方法

2.2.1 盐胁迫和甘露醇模拟干旱胁迫及生理指标的测定 将油菜种子常规灭菌后播种在 MS 培养基里,生长 96h,将生长一致的过表达株系和对照组油菜移栽到含有 200mM NaCl、300mM 甘露醇的培养基中培养 2w,观察表型变化,测量根长、鲜重、株高,重复三次.

2.2.2 盐胁迫下 H_2O_2 含量的检测及 H_2O_2 处理后的表型变化和叶绿素含量的测定 选取均匀对

照和过量表达 *BnTR1* 的油菜种子,播种在营养土中,在植物培养室里培养 7 周,培养条件:湿度 70%,温度 $22\pm 1^\circ C$,光周期是 16h 光照/8h 黑暗.分别取 5 盆油菜,用 170mM NaCl 溶液浇灌连续 1 周.分别剪取 2 组形态大小接近的叶片,洗净,浸泡在 8mL DAB 溶液中,将叶片完全浸没在溶液中,并将叶柄剪去以免气穴产生.黑暗环境中静置过夜,次日将叶片取出,用水冲洗,然后放进有棉球塞的试管中,用 95% 乙醇浸泡,将试管在沸水中水浴,直至叶绿素被完全脱去,然后将叶片转移入干净的 95% 乙醇中以备观察.将生长 7w 左右的油菜叶片剪下、洗净,分别取 2 组形态大小接近的叶片,完全浸没在清水和含有 0.3% H_2O_2 的水溶液中,在培养室中继续培养 48h.取出叶片,用清水洗净,观察并拍照,然后进行叶绿素含量的测定.

2.2.3 盐胁迫下超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)的活性测定 如上所述,将培养在组培室里的油菜,生长 7w 左右时,分别取 5 盆油菜,用 170mM NaCl 溶液浇灌连续 1w 后,称取 1g 叶片,进行超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)活性的测定,重复三次.

3 结果与分析

3.1 过量表达 *BnTR1* 油菜对盐和甘露醇模拟的干旱胁迫的影响

将对照和三种过量表达的 *BnTR1* 油菜播种在 MS 培养基上,生长 96h 后分别移栽到含有 200mM NaCl、300mM 甘露醇的 MS 培养基中,以生长在正常 MS 培养基上的油菜作为对照组.生长 2 周后,取出观察、拍照.结果发现在没有盐和甘露醇胁迫时,对照组和过量表达的 *BnTR1* 油菜表型上没有任何差异.而在胁迫条件下,所有材料的生长都受到了明显的抑制,根长变短,幼苗变矮(如图 1A).如图所示在盐胁迫或甘露醇胁迫下,三个过表达株系的根长、鲜重及株高都超过对照(如图 1B、C、D).其中,44-24 和 54-9 的抗性较强,根长、鲜重及株高均高于对照组和 3-32.这些研究结果证实 *BnTR1* 使油菜幼苗对盐和甘露醇胁迫产生了一定抗性,而这种抗性表现只是局限于幼苗时期,对其他生长时期是否有抗性还有待进一步研究.

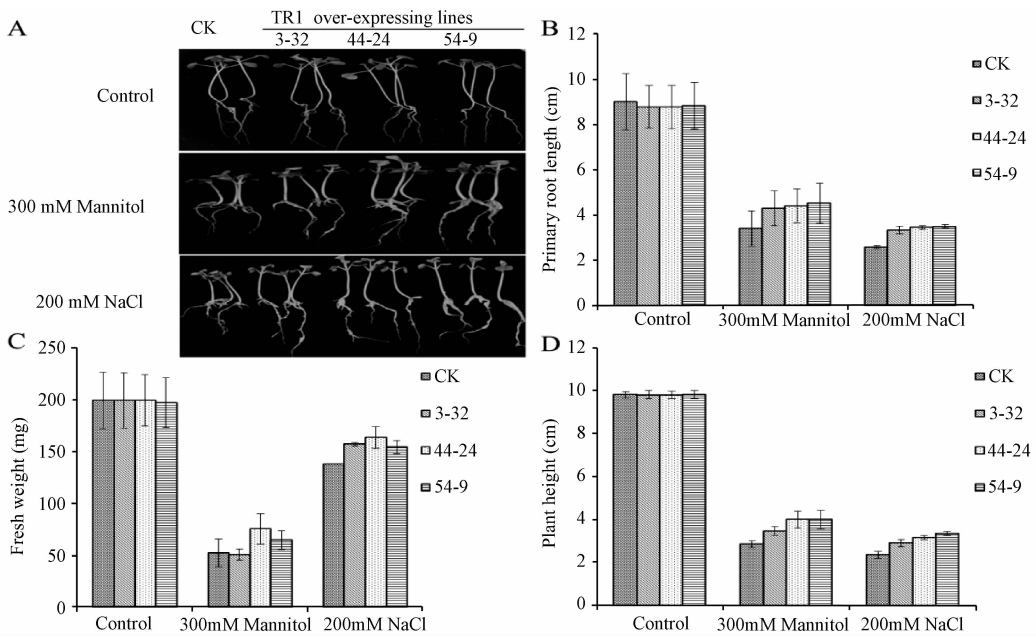


图 1 盐和甘露醇胁迫下不同油菜株系的表型变化

A. 盐和甘露醇胁迫下不同油菜株系的表型变化 B. 盐和甘露醇胁迫下不同油菜株系根长 C. 盐和甘露醇胁迫下不同油菜株系鲜重 D. 盐和甘露醇胁迫下不同油菜株系株高
CK: 对照油菜; 3-32, 44-24, 54-9: 过量表达 *BnTR1* 油菜

Fig. 1 The phenotype variation under the stress of salt or mannitol

3.2 盐胁迫下过量表达 *BnTR1* 的油菜中过氧化氢含量

分别剪取形态大小接近的对照和过量表达的 *BnTR1* 油菜叶片, 洗净, 浸泡在 8mL DAB 溶液中, 过夜孵育后进行脱色处理. DAB 染色结果显示, 盐胁迫处理后, 三个转基因油菜叶片颜色要浅一些, 而对照材料要深一些(如图 2 A), DAB 染色颜色越深, 植物体内过氧化物积累越多, 该结果说明过量的 *BnTR1* 增强了油菜体内清除盐胁迫产生的过多的过氧化物, 从而使转基因株系对盐胁迫具有更高的抗性.

将对照和三种过量表达 *BnTR1* 的油菜播种在常规条件下, 大约 7w 左右时, 采摘 2 组油菜叶片分别浸泡在清水和含有 0.3% H_2O_2 的水溶液中, 48h 后取出叶片, 用水洗净, 观察并测定其叶绿素的含量. 结果表明, 在清水浸泡组中, 对照材料和过量表达的 *BnTR1* 油菜的叶片形态、颜色等变化差异不大, 而在外源过量过氧化氢胁迫时, 对照油菜的叶片明显变黄变白, 大约叶片 90% 的区域都受到了氧化损伤, 显然叶片的叶绿素被严重破坏, 而 3 个过表达株系都表现出对过氧化氢胁迫的抗性, 只是程度不同(如图 2B). 在过氧化氢胁迫处理下, 所有供试材料的叶绿素含量都下降了, 过氧化氢胁迫下对照材料的叶绿素含量仅有清水对照组

的八分之一, 而过量表达 *BnTR1* 的油菜中叶绿素的含量要明显高于对照组, 至少还有清水组的一半以上, 其中 3-32 株系保留了 60% 的叶绿素(如图 2C). H_2O_2 在低浓度下是植物体内重要的信号分子, 当高浓度时, 会引起细胞的氧化损伤, 导致脂质过氧化^[9], 破坏叶绿体的结构, 最终叶绿素被破坏, 含量下降.

3.3 盐胁迫下 SOD、POD、CAT 的活性变化

在营养土中生长的对照和过量表达的 *BnTR1* 油菜播种在常规植物培养室里, 生长 7w 左右时, 分别取 5 盆油菜, 一组用 170mM NaCl 溶液浇灌, 一组以正常浇水, 1w 后, 测定超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)的活性. 结果发现, 在没有盐胁迫时, 对照组和过量表达 *BnTR1* 油菜的 SOD 活性相差不大, 但是经过盐胁迫处理后, 酶活均下降了, 过表达株系仍高于对照组, 其中对照组 SOD 活性下降了 28% (如图 3A). 而 SOD 在保护酶体系中处于核心地位, 可以催化两个超氧自由基发生歧化反应形成 O_2 和 H_2O_2 , DAB 染色结果显示, 过量表达株系对 H_2O_2 清除能力较对照组强, 因此过量表达的 *BnTR1* 油菜中的 SOD 活性也应该高于对照组. 经过盐胁迫处理后, 对照组和过表达株系, POD 活性、CAT 活性均发生了下降, 其中对照材料 POD 活性

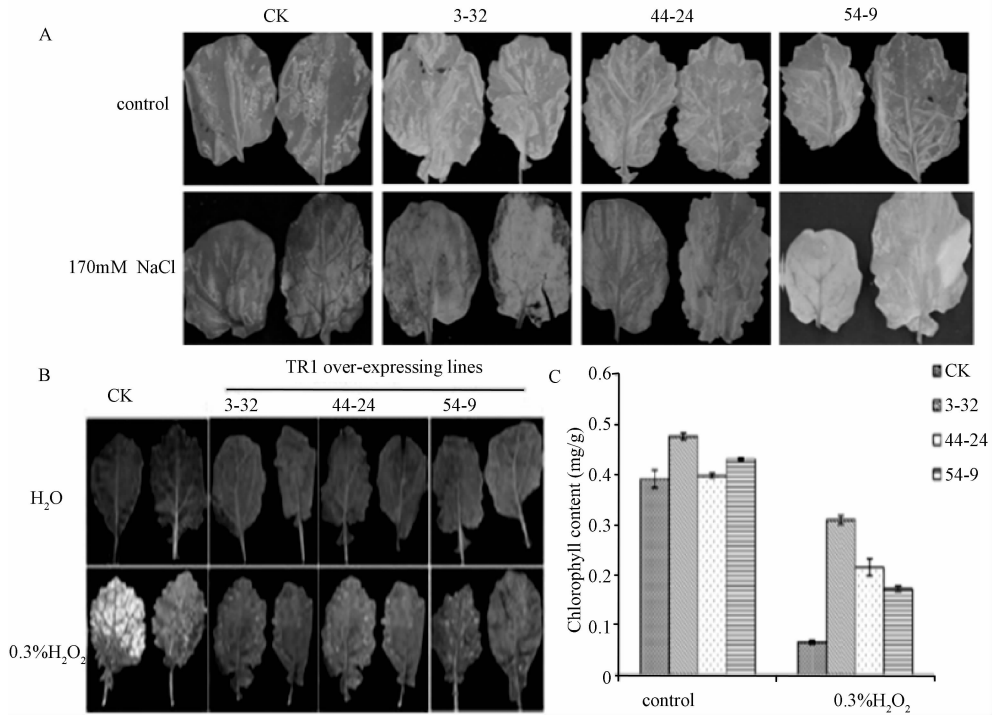


图 2 对照材料及过量表达 BnTR1 油菜盐胁迫下体内过氧化氢含量变化以及体外过氧化氢胁迫下的叶片变化和叶绿素含量变化

A. 盐胁迫下过量表达 BnTR1 油菜中过氧化氢含量少于对照组 B. 0.3% H₂O₂ 胁迫下油菜叶片的表型 C. 0.3% H₂O₂ 胁迫下油菜叶片的叶绿素含量的测定

CK: 对照油菜; 3-32, 44-24, 54-9: 过量表达 BnTR1 油菜

Fig. 2 The contents changes of H₂O₂ in control material and overexpression lines exposed to salt and the blade variation of *Brassica napus* and its chlorophyll content under the stress of 0.3% H₂O₂

下降了 49%, CAT 活性下降了 64% (如图 3B、C)。而 SOD 催化后产生的 H₂O₂ 可由 POD 和 CAT 清除。

超氧化物歧化酶、过氧化物酶、过氧化氢酶是植物体内的抗氧化剂^[10-12], 它们协同抵抗胁迫诱导的氧化伤害, 清除植物体内的活性氧, 使细胞内的活性氧维持在较低水平, 确保植物正常生长和代谢。由此得出 BnTR1 提高了转 BnTR1 油菜中抗氧化酶活性, 从而提高了油菜对盐胁迫的耐受性。

4 讨论

本研究以非转基因油菜和过表达 BnTR1 的油菜为实验材料, 对幼苗进行胁迫处理, 探索不同胁迫对油菜生长发育的影响以及对逆境的胁迫抗性表现, 为油菜对胁迫的耐受机制、育种材料培育提供依据和指导。

干旱和盐胁迫会抑制植物的地上部分和根系的生长, 主要表现在根长、鲜重、株高这些指标^[13], 它们是植物对干旱和盐胁迫反应的综合体现及对胁迫的综合适应, 也是植物耐盐和耐干旱的直接指标^[14]。结果表明在干旱和盐胁迫下, 对照材料和转

基因株系均受到了生长抑制, 而过表达 BnTR1 的油菜幼苗在根长、鲜重、株高指标上显著高于对照组, 降低干旱和盐胁迫对其的伤害。上述结果说明 BnTR1 在油菜中过量表达, 使得转基因油菜对盐和干旱胁迫产生了抗性, 推测 BnTR1 可能参与了植物应对逆境的某些生理进程。

而通过 DAB 处理后发现野生型株系的叶片较转基因株系的叶片更黄, 说明野生型叶片中积累的 H₂O₂ 含量多, 即过表达 BnTR1 油菜能够清除盐胁迫中产生的过多的过氧化物。在高等植物体内, 代谢产物是应对氧化胁迫的重要组分。而活性氧种类 (ROS, 如 O²⁻ 和 H₂O₂) 是应对逆境而产生的代谢产物; 少量的 ROS 可以作为信号分子传递给植物其他部位, 产生一系列代谢变化; 大量的 ROS 就会严重破坏植物细胞内的动态平衡和正常的生理代谢, 导致其体内的生物大分子如脂类、蛋白质和核酸受到氧化损伤^[15]。H₂O₂ 在低浓度下是植物体内重要的信号分子, 但是当浓度过高时会破坏叶绿体的结构。从表型图中 (2B) 可以看出经过过氧化氢处理后, 野生型叶片叫转基因株系出现了

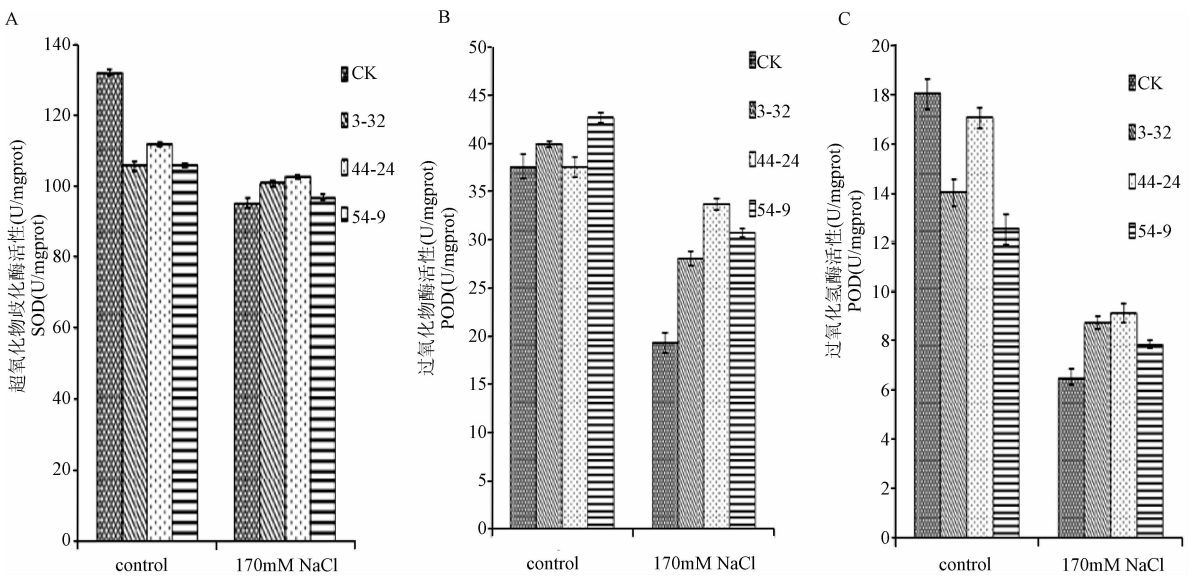


图 3 盐胁迫下油菜 SOD, POD, CAT 的酶活分析

A. 盐胁迫下油菜 SOD 的变化 B. 盐胁迫下油菜 POD 的变化 C. 盐胁迫下油菜 CAT 的变化
CK: 对照油菜; 3-32, 44-24, 54-9: 过量表达 *BnTR1* 油菜

Fig. 3 Enzyme capacities of SOD, POD and CAT in *Brassica napus* exposed to salt

更大的叶片变黄区域. 叶绿素能直接反应植物光合效率及同化能力的大小, 是光合作用的关键色素^[16], 叶绿素的破坏和降解直接造成光合作用能够效率的降低, 使植物长势变慢, 生长量减少^[17]. 这些结果充分显示 *BnTR1* 赋予油菜叶片对过氧化氢胁迫的抗性, 使得转基因油菜叶片中的叶绿体和叶绿素更加稳定, 从而受损伤的面积小.

盐胁迫能够增强活性氧的清除系统, 利用抗氧化酶体系(SOD、POD、和 CAT)能有效地清除活性氧自由基, 保护和稳定蛋白复合体和膜结构, 从而提高细胞耐脱水的能力, 抵抗活性氧的伤害^[18]. 其中 SOD 催化两个超氧自由基发生歧化反应形成 O_2 和 H_2O_2 , 产生的 H_2O_2 再由 POD 和 CAT 分解清除^[19]. 实验得出, 转基因株系中这些抗氧化酶活性要高于野生型株系, 有可能 *BnTR1* 直接或间接地调控了三种抗氧化酶合成相关基因的过量表达, 或是作为转录因子结合到三种抗氧化酶合成相关基因启动子上, 继而各基因的表达上调, 也有可能是 *BnTR1* 参与了盐胁迫耐受性网络的调控系统, 并且处于三种抗氧化酶的上游, 间接对三种抗氧化酶的活性调节起到正调控的作用, 最终导致三种酶活性高于野生型株系, 从而清除活性氧的能力增强^[20].

综上所述, *BnTR1* 在植物的双氧水胁迫、干旱胁迫和盐胁迫的过程中起到了重要作用, 但其具体机理现在还未清楚, *BnTR1* 所引起的这种抗逆表

型的分子机制还有待进一步研究, 本实验的研究为 *BnTR1* 提高油菜耐盐性、耐干旱性提供了科学依据, 为开发利用盐碱地提供抗逆油菜新材料打下基础.

参考文献:

- [1] Liu Z B, Wang J M, Yang Y, *et al.* A novel membrane-bound E3 ubiquitin ligase enhances the thermal resistance in plants [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2013, 1.
- [2] 王亭亭, 王中浩, 熊方建, 等. 轴胁迫对油菜的生长及抗氧化酶的影响[J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2014, 51(01): 171.
- [3] 陈凤莲, 刘志斌, 王健美, 等. 油菜 *BnRCH* 基因提高转基因拟南芥的耐盐性研究[J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2013, 50(03): 643.
- [4] 曹昊昊, 王中浩, 范智勇, 等. 转 *BnTR1* 基因的烟草对多种逆境胁迫的抗性研究[J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2016, 53(02): 453.
- [5] Jakab G, Ton J, Flors V, Zimmerli L, *et al.* Enhancing *Arabidopsis* salt and drought stress tolerance by chemical priming for its abscisic acid responses[J]. *Plant Physiol*, 2005, 139: 267.
- [6] Zhu J K. Salt and drought stress signal transduction in plants[J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2002, 53:247.
- [7] Catala R, Ouyang J, Abreu I A, *et al.* The Arabidopsis E3 SUMO Ligase SIZ1 Regulates Plant Growth and Drought Responses[J]. *The Plant Cell*,

- 2007, 19: 2952.
- [8] 曹昊昊. BnTR1 在油菜中抗非生物胁迫研究及 At-TR1 泛素化作用分析[J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2016, 53(2): 453.
- [9] Kavitha K, Venkataraman G, Parida A. An oxidative and salinity stress induced peroxisomal ascorbate peroxidase from *Avicennia marina*: molecular and functional characterization[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2008, 46(8-9): 794.
- [10] Zhuang W W, Li J, Cao M H. Effects of salt-drought intercross stress on physiological and biochemical characteristics of *Ammodendron argenteum* (Pall.) Kuntze seedlings[J]. *Journal of Wuhan Botanical Research*, 2010, 28(6): 730.
- [11] Lv T L, Sun M G, Song S W, *et al.* Study on photosynthesis characteristics of *Cercis chinensis* Bunge under drought and salt stress[J]. *Journal of Shandong Agricultural University: Natural Science*, 2010, 41(2): 191.
- [12] Zhao W Q, Zhuang L, Yuan F, *et al.* Physiological and ecological characteristic of *Haloxylon ammodendron* and *Tamarix ramosissima* in different habitats on the southern edge of Zhunger Basin[J]. *Journal of Shihezi University: Natural Science*, 2010, 28(3): 285.
- [13] Yang S H, Ji J, Wang W. Effects of salt stress on plants and the mechanism of salt tolerance [J]. *World Science Technology Research & Development*, 2006, 28(4): 70.
- [14] 许兴, 李树华, 惠红霞, 等. NaCl 胁迫对小麦幼苗生长、叶绿素含量及 Na^+ 、 K^+ 吸收的影响[J]. *西北植物学报*, 2002, 22(2): 278.
- [15] 代其林, 奉斌, 刘婷婷, 等. 甘蓝型油菜幼苗对 NaCl 胁迫的抗氧化应答[J]. *基因组学与应用生物学*, 2009, 28(4): 725.
- [16] 郇树乾, 刘国道, 张绪元, 等. NaCl 胁迫对刚果臂形草种子萌发及幼苗生理效应的研究[J]. *中国草地*, 2004, 26(6): 46.
- [17] 王光明, 涂俊芳, 李晶, 等. 镉处理对油菜生长和抗氧化酶系统的影响[J]. *应用生态学报*, 2006, 17(1): 102.
- [18] Fridovich I. The superoxide radical is an agent of oxygen toxicity: Superoxide dismutases provide an important defense[J]. *Science*, 1978, 201:875.
- [19] 范智勇, 王亭亭, 柴靓, 等. 盐胁迫和干旱胁迫对蓝花子种子萌发和幼苗生长的影响[J]. *北方园艺*, 2011, 2: 7.
- [20] 奉斌, 代其林, 刘婷婷, 等. 转 *IrrE* 基因甘蓝型油菜对 NaCl 胁迫的耐受性应答[J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2011, 48(3): 708.