

# 转 *mangrin* 基因水稻的耐盐性研究\*

张文惠<sup>1,2</sup>, 徐夙侠<sup>1</sup>, 黄青云<sup>1</sup>, 陈亮<sup>2</sup>

1. 福建省亚热带植物研究所, 厦门 361006; 2. 厦门大学生命科学学院, 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 厦门 361005

**摘要:** 以转 *mangrin* 基因水稻的阳性植株(11 #, 59 #, 86 #)和阴性植株为材料, 在 0, 100, 150, 200 mmol/L 的 NaCl 溶液中经盐胁迫 7 d 后, 测定叶片相对含水量、质膜透性、超氧化物歧化酶(SOD)活性和脯氨酸含量 4 项耐盐指标。结果表明: 盐胁迫下, 转基因植株的叶片相对含水量、脯氨酸含量、SOD 活性明显高于阴性植株, 叶片电导率则低于阴性植株。对转基因植株和阴性植株的耐盐性综合评定结果是 11 # > 59 # > 86 # > 阴性植株。

**关键词:** 水稻; *mangrin* 基因; 耐盐性; 转基因

**中图分类号:** S511.034 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-5684(2010)02-0119-04

## Research on Salt Tolerance of Rice Transformed by *mangrin* Gene

ZHANG Wen-hui<sup>1,2</sup>, XU Su-xia<sup>1</sup>, HUANG Qing-yun<sup>1</sup>, CHEN Liang<sup>2</sup>

1. Fujian Institute of Subtropical Botany, Xiamen 361006, China; 2. Life Science Department and Key Laboratory of Cell Biology and Tumor Cell Engineering of Ministry of Education, Xiamen University, Xiamen 361005, China

**Abstract:** Plants transformed by *mangrin* gene (11 #, 59 #, 86 #) and negatives were tested using several salt tolerance indices, including related water content, cell membrane permeability, SOD activity and proline content, which were conducted under the NaCl concentration of 0, 100, 150, 200 mmol/L after 7 days. The results indicated that the transgenic rice plants accumulated more RWC, proline content and SOD activity than ck under salt stress conditions, yet cell membrane permeability decreased less than ck. According to physiological target in synthetically evaluation, the result is 11 # > 59 # > 86 # > Negatives.

**Key words:** rice; *mangrin* gene; salt tolerance; transgenic

红树林植物是公认的耐盐、耐海水浸泡能力强的高等植物, 有些红树植物可在盐度高达 5% ~ 7% 的海水中生长<sup>[1]</sup>。Yamada A 等<sup>[2]</sup>从红树林海莲 [*Bruguiera sexangula* (Lour.) Poir] 中克隆出耐盐相关基因 *mangrin*, 将其导入大肠杆菌、酵母和烟草中, 转化子的耐盐性都得到了增强。厦门大学张文惠<sup>[3]</sup>等人将含耐盐基因 *mangrin* 的植物双元表达载体导入粳稻品种“日本晴”( *Oryza sativa* L. ssp. *japornica*) 中, 得到的转 *mangrin* 基因水稻具

有较高的耐盐性。本研究选用转 *mangrin* 基因水稻及其受体亲本为供试材料, 在不同盐浓度胁迫下对各供试材料幼苗进行生理指标测定, 旨在探讨转 *mangrin* 基因水稻耐盐性的生理基础, 为最终获得耐盐性状稳定的新品种提供理论依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 供试材料

以 Southern blot 和 PCR 检测过的 3 株阳性转

\* 基金项目: 福建省青年人才基金项目(2006F3022), 福建省自然科学基金项目(2007J0250)

作者简介: 张文惠, 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 植物抗逆性及分子育种研究。

收稿日期: 2009-02-09 修回日期: 2009-04-11

*mangrin* 基因水稻植株(11 # ,86 # ,57 # )和阴性对照水稻植株(ck)为供试材料。

上海雷诺新泾 DJS - 11A 电导仪,上海光谱 722E 型分光光度计,上海精密 UV - 7504PC 紫外可见分光光度计。

### 1.2 试验方法

将转基因阳性植株和阴性植株移栽到营养土中,使其恢复生长 1 个月。用 0, 100, 150, 200 mmol/L NaCl 溶液胁迫 7 d 后,取叶片测定生理生化指标。

### 1.3 测定方法

叶片相对含水量采用烘干法<sup>[4]</sup>测定;叶片质膜透性(相对电导率)用电导仪测定;叶片脯氨酸含量采用磺基水杨酸提取茚三酮显色法<sup>[5]</sup>测定;采用氮蓝四唑光还原法测定 SOD 活性,以抑制 50 % NBT 反应为 1 个酶活性单位<sup>[6]</sup>。

表 1 盐胁迫对转基因植物相对含水量的影响

Table 1. Effect of salt tolerance on RWC of transgenic plants

| 供试材料<br>Tested materials | c(NaCl) / (mmol L <sup>-1</sup> ) |                      |                     |                     |
|--------------------------|-----------------------------------|----------------------|---------------------|---------------------|
|                          | 0                                 | 100                  | 150                 | 200                 |
| ck                       | 98.47 <sup>aA</sup>               | 74.36 <sup>bB</sup>  | 63.28 <sup>cC</sup> | 40.33 <sup>dD</sup> |
| 11 #                     | 97.08 <sup>aA</sup>               | 90.12 <sup>bAB</sup> | 81.63 <sup>cC</sup> | 65.92 <sup>dD</sup> |
| 59 #                     | 96.25 <sup>aA</sup>               | 89.38 <sup>bAB</sup> | 78.29 <sup>cC</sup> | 63.44 <sup>dD</sup> |
| 86 #                     | 98.55 <sup>aA</sup>               | 85.76 <sup>bAB</sup> | 73.34 <sup>cC</sup> | 60.15 <sup>dD</sup> |

注:不同大小字母表示同一类型水稻间在 0.05 和 0.01 水平上差异显著,下同

Note: Different small and capital letters in the same column indicated significant difference in the same type of rice at the 0.05 and 0.01 levels, the same below

### 2.2 盐胁迫对叶片相对电导率的影响

细胞质膜是细胞与环境进行物质交换的主要通道,是细胞感受环境胁迫最敏感的部位,各种逆境的伤害往往先作用于质膜上,造成质膜差别透性的改变或丧失,使细胞内物质外渗,最后造成伤害。因此,细胞外渗液电导率的变化可以反映质膜受害程度及植株抗逆性的强弱,电导率越大,表明膜透性越大,即膜的受损程度越大,植株的抗逆性越弱。如表 2 所示,在盐胁迫下,对照植株和转

## 2 结果与分析

### 2.1 盐胁迫对水稻叶片含水量的影响

叶片相对含水量(RWC)是指示叶片保水力的一个常用指标。一般认为 RWC 值越大、下降速率越小,则品种耐盐性越强。如表 1 所示,在盐胁迫下,对照植株和转基因植株相对含水量均显著下降,当盐浓度为 100,150 mmol/L 时,转 *mangrin* 基因植株相对含水量分别下降了 7.17 %、15.91 %、7.14 %、18.67 % 和 12.98 %、25.58 %,对照植物的相对含水量分别下降了 24.48 %、35.74 %。而盐浓度为 200 mmol/L 时,转 *mangrin* 基因植株相对含水量下降了 32.09 %、34.08 %、38.96 %,远低于对照植株的 59.04 %。由此可知,转 *mangrin* 基因植株对盐胁迫的适应性增强,能较好地调节渗透势以抵抗胁迫,从而使植株维持较高的含水量。

基因植株相对电导率均呈显著增加,当盐浓度为 100,150 mmol/L 时,对照组植株相对电导率增加了 34.79 %、78.80 %,转基因植株分别增加了 20.50 %、63.18 %、14.86 %、54.56 %、19.45 %、56.64 %。当盐浓度为 200 mmol/L 时,对照组植株相对电导率增加了 124.29 %,高于转基因植株的 100.67 %、89.29 %、90.96 %。转基因植株透性增加幅度较阴性植株平缓,表明其细胞膜受到保护,受害程度轻,耐盐性较强。

表 2 盐胁迫对转基因植株膜透性的影响

Table 2. Effect of salt tolerance cell membrane permeability of transgenic plants

| 供试材料<br>Tested materials | c(NaCl) / (mmol L <sup>-1</sup> ) |                      |                      |                      |
|--------------------------|-----------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
|                          | 0                                 | 100                  | 150                  | 200                  |
| ck                       | 80.38 <sup>dD</sup>               | 108.35 <sup>cC</sup> | 143.72 <sup>bB</sup> | 180.29 <sup>aA</sup> |
| 11 #                     | 75.16 <sup>dD</sup>               | 90.57 <sup>cC</sup>  | 122.64 <sup>bB</sup> | 150.83 <sup>aA</sup> |
| 59 #                     | 78.54 <sup>dD</sup>               | 90.21 <sup>cC</sup>  | 121.39 <sup>bB</sup> | 148.67 <sup>aA</sup> |
| 86 #                     | 76.75 <sup>dD</sup>               | 91.68 <sup>cC</sup>  | 120.22 <sup>bB</sup> | 146.56 <sup>aA</sup> |

2.3 盐胁迫对转基因水稻叶片 SOD 活性的影响

超氧化歧化酶(SOD)是植物体内清除活性氧的关键酶之一,它可清除植物体内的超氧阴离子自由基,减缓自由基对植物细胞膜的伤害。如表3所示,在盐胁迫下,对照植株和转基因植株均呈显著下降。当盐浓度为 100,150 mmol/L 时,对照植株 SOD 活性下降了 28.28%,58.65%,转基因植株分别下降了 12.31%、37.29%、15.86%、

41.02%, 19.12%、43.16%。当盐浓度为 200 mmol/L 时,对照植株 SOD 活性已下降了 69.91%,转基因植株分别下降了 57.10%、56.95%、59.93%。转基因植株的 SOD 活性下降的较少,可以有效地清除细胞中由于胁迫产生的超氧自由基,很好地抵御盐胁迫对细胞膜的伤害,表现为耐盐性增强。

表3 盐胁迫对转基因植株 SOD 活性的影响

Table 3. Effect of salt tolerance on SOD activity of transgenic plants

| 供试材料<br>Tested materials | c(NaCl) / (mmol L <sup>-1</sup> ) |                     |                     |                     |
|--------------------------|-----------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
|                          | 0                                 | 100                 | 150                 | 200                 |
| ck                       | 28.25 <sup>aa</sup>               | 20.26 <sup>bb</sup> | 11.68 <sup>cc</sup> | 8.50 <sup>dd</sup>  |
| 11 #                     | 28.02 <sup>aa</sup>               | 24.57 <sup>bb</sup> | 17.57 <sup>cc</sup> | 12.02 <sup>dd</sup> |
| 59 #                     | 27.55 <sup>aa</sup>               | 23.18 <sup>bb</sup> | 16.25 <sup>cc</sup> | 11.86 <sup>dd</sup> |
| 86 #                     | 28.08 <sup>aa</sup>               | 22.71 <sup>bb</sup> | 15.96 <sup>cc</sup> | 11.25 <sup>dd</sup> |

2.4 盐胁迫对转基因水稻叶片脯氨酸含量的影响

脯氨酸是细胞内的一种渗透调节物质,当植物受到环境胁迫时可保持膨压。脯氨酸水溶性很大,有助于增加细胞持水力,对原生质起保护作用。如表4所示,当盐浓度为 100,150 mmol/L 时,转基因植株的脯氨酸含量增加了 40.02%、

76.25%, 38.09%、76.99%, 38.72%、72.08%; 对照植株的脯氨酸含量增加了 26.02%、57.11%。当盐浓度为 200 mmol/L 时,转基因植株脯氨酸含量分别增加了 108.92%、109.57%、103.03%,远高于对照植株的 91.84%。由此可知,盐胁迫下,脯氨酸在转基因植株叶片内的积累增多,对原生质起到保护作用。

表4 盐胁迫对转基因植株脯氨酸含量的影响

Table 4. Effect of salt tolerance on proline content of transgenic plants

| 供试材料<br>Tested materials | c(NaCl) / (mmol L <sup>-1</sup> ) |                      |                      |                      |
|--------------------------|-----------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
|                          | 0                                 | 100                  | 150                  | 200                  |
| ck                       | 158.65 <sup>dd</sup>              | 199.94 <sup>cc</sup> | 249.26 <sup>bb</sup> | 304.36 <sup>aa</sup> |
| 11 #                     | 160.82 <sup>dd</sup>              | 225.18 <sup>cc</sup> | 283.45 <sup>bb</sup> | 335.99 <sup>aa</sup> |
| 59 #                     | 161.55 <sup>dd</sup>              | 223.09 <sup>cc</sup> | 285.92 <sup>bb</sup> | 338.56 <sup>aa</sup> |
| 86 #                     | 162.76 <sup>dd</sup>              | 225.78 <sup>cc</sup> | 280.08 <sup>bb</sup> | 330.45 <sup>aa</sup> |

3 讨论

综合叶片相对含水量、质膜透性、SOD 活性和脯氨酸含量指标的测定结果,本试验中转基因植株和阴性植株的耐盐综合能力为 11 # > 59 # > 86 # > 阴性植株,随着盐胁迫浓度的增加,转基因植株与阴性植株间各指标变化幅度的差距明显加大,转基因植株的叶片相对含水量下降减缓、质膜伤害减轻、SOD 活性降低减缓、脯氨酸含量增加减慢,这都表明 *mangrin* 基因已经在

水稻转化植株体内表达,其耐盐性得到了提高。

近年来,水稻耐盐基因研究主要涉及渗透调节、离子摄入和区域化、大分子蛋白、基因表达以及保护酶等的相关基因。研究人员将  $\gamma$ -吡咯喹-5-羧酸合成酶(P5CS)基因<sup>[7]</sup>、甜菜碱醛脱氢酶(BADH)基因<sup>[8-9]</sup>、胆碱氧化酶基因(*codA*)<sup>[10]</sup>和 *mtlD/ gutD* 双价基因<sup>[11]</sup>等耐盐基因分别导入水稻中,获得了多种具有耐盐性的转基因水稻。Xu<sup>[12]</sup>、Qu<sup>[13]</sup>等将来源于大麦的 LEA 基因 *HAV1* 用基因枪法导入水稻悬浮细胞系,获得了大量的

转基因植株, *HAV1* 基因在水稻 Action21 启动子的驱动下在水稻根和叶片细胞中大量表达; 第二代转基因植株表现出明显的抵抗干旱和盐渍的能力, 并据此认为可以通过使转基因植株积累 LEA 来提高非盐生植物的抗盐性。LEA 蛋白是种子成熟过程中积累的亲水性球蛋白, 主要存在于细胞质中。在缺水情况下, 营养器官也可以积累 LEA 蛋白。LEA 蛋白主要在种子发育后期表达, 在幼苗中受 ABA、脱水、盐和高温诱导。

*mangrin* 基因全长 771 bp, 编码 1 个 256 个氨基酸残基组成的蛋白质, 这个蛋白质为丙二烯氧化物环氧化酶 (AOC) 的同源物。红树植物海莲中的 AOC 与番茄和拟南芥中的 AOC 具有较高的同源性, 但番茄和拟南芥的 AOC 却没有表现出耐盐特性。经过功能区分析, 发现海莲植物中的 AOC 蛋白有一个特殊的 70 个氨基酸序列 (16~86 位), 该功能区富含丝氨酸。在 LEA 蛋白中具有同样的富含丝氨酸区域, Dure<sup>[14]</sup> 认为这个丝氨酸区域在干旱胁迫下起到保护蛋白质和膜结构的作用。*mangrin* 可能有一个与 LEA 蛋白功能相似的区域, 它的作用与 LEA 蛋白相似, 在胁迫下束缚水分子, 保护酶蛋白, 稳定膜结构, 使细胞受到的损伤降至最低程度<sup>[15-17]</sup>。

高盐胁迫对植物生长发育的影响是非常复杂的, 通过基因工程手段, 采用重组 DNA 和转基因技术向栽培稻导入抗盐外源目的基因已发展成为改良水稻抗盐性的新途径。虽然转基因技术尚存在很多问题, 如遗传转化率低、目标基因沉默、基因漂移等, 随着研究人员对植物耐盐遗传机理更深入的研究和探讨, 转基因技术将会更广泛地应用于植物资源创新和育种中, 并最终培育出能应用于生产的耐盐作物品种。

#### 参考文献:

- [1] 林鹏. 中国红树林生态系 [M]. 北京: 科学出版社, 1997: 5-24, 133-147.
- [2] Yamada A, Saitoh T, Mimura T, et al. Expression of mangrove al-
- [3] 张文惠, 林涛, 张红心, 等. 红树耐盐相关基因转化水稻的研究 [J]. 西北植物学报, 2006, 26(6): 1105-1109.
- [4] 张志良, 瞿伟菁. 植物生理学实验指导 [M]. 3 版. 北京: 高等教育出版社, 2003.
- [5] 潘东明, 李合生. 植物生理生化实验原理和技术 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.
- [6] 白宝璋, 王景安, 孙玉霞, 等. 植物生理学测试技术 [M]. 北京: 中国科学出版社, 1993.
- [7] 苏金, Targolli J, 吴乃虎, 等. 在转基因植物中实现外源基因最佳表达的途径 [J]. 生物工程进展, 1999, 19(4): 3-6.
- [8] 郭岩, 张莉. 甜菜碱脱氢酶基因在水稻中的表达及转基因植株的耐盐性研究 [J]. 中国科学 (C 辑), 1997, 27(2): 151-155.
- [9] 卢德赵, 王慧中, 华志华, 等. 转甜菜碱脱氢酶基因水稻的获得及其耐盐性研究 [J]. 科技通报, 2003, 19(3): 179-182.
- [10] Mhanty A, Kathuria H, Ferjan A, et al. Transgenics of an elite indica rice variety Pusa Basmati 1 harbouring the *codA* gene are highly tolerant to salt stress [J]. Theor Appl Genet, 2002, 106(1): 51-57.
- [11] 王慧中, 黄大年, 鲁瑞芳, 等. 转 *mtD/ gutD* 双价基因水稻的耐盐性 [J]. 科学通报, 2000, 45(7): 724-728.
- [12] Xu D P, Duan X L, Wang B Y, et al. Plant Physiology, Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, *hav1*, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice [J]. Plant Physiology, 1996, 110(1): 249-257.
- [13] Qu R D, Beachy R N, Ho D T H, et al. Expression of a barley ABA-responsive protein gene in transgenic rice [J]. Chinese Rice Research Newsletter, 1996, 4(2): 1-2.
- [14] Dure III L, Crouch M, Harada J, et al. Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants [J]. Plant Mol Biol, 1989, 12(5): 475-486.
- [15] Dure III L. Structural motifs in LEA proteins in plant responses to cellular dehydration during environmental stress [J]. American Society of Plant Physiologists, 1993, 3(1): 91-103.
- [16] Swire-Clark G A, Marcotte W R. The wheat LEA protein Em functions as an osmoprotective molecule in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Plant Mol Biol, 1999, 39(1): 117-128.
- [17] Zhang L, Ohta A, Takagi M, et al. Expression of plant group 2 and group 3 lea genes in *Saccharomyces cerevisiae* revealed functional divergence among LEA proteins [J]. J Biochem (Tokyo), 2000, 127(4): 611-616.