

枣树 *ZjSOD1* 基因参与非生物胁迫响应的研究

聂园军¹, 郭慧娜³, 张春芬², 肖蓉², 邓舒², 李倩³, 曹秋芬^{3*}

(¹山西农业大学农业经济管理学院, 太原 030006; ²山西农业大学果树研究所, 山西太谷 030815; ³山西农业大学生命科学学院, 太原 030031)

摘要:【目的】克隆1个枣树超氧化物歧化酶基因 *ZjSOD1*, 并对其功能进行研究, 为在枣树抗逆基因工程改良中的利用奠定基础。【方法】采用PCR克隆 *ZjSOD1* cDNA 序列, 运用实时定量 RT-PCR 方法研究其在高盐和 PEG6000 胁迫下转录水平的变化。构建 *ZjSOD1* 过量表达载体转化拟南芥, 研究其在拟南芥中响应非生物胁迫应答的功能, 测定氧化酶活性及生理指标。【结果】*ZjSOD1* 基因 cDNA 序列开放阅读框全长为 699 bp, 编码 232 个氨基酸, 理论等电点为 8.59, 属于 Fe-SOD 家族成员。在转录水平上, *ZjSOD1* 明显受 NaCl 和 PEG6000 诱导。在拟南芥中过量表达 *ZjSOD1* 基因导致植株对干旱、高盐更加敏感, 但对 H₂O₂ 耐受性显著增强。在 NaCl、PEG6000 和 H₂O₂ 胁迫条件下, 过量表达 *ZjSOD1* 转基因植株中 SOD、CAT 和 POD 酶活性、脯氨酸和丙二醛含量、电解质渗透率均显著发生改变。实时定量 RT-PCR 结果显示参与活性氧(ROS)、高盐和干旱胁迫相关信号通路的基因在 *ZjSOD1* 转基因株系中表达量发生明显改变。【结论】*ZjSOD1* 在植物生长发育过程中参与氧化、干旱、高盐胁迫应答。

关键词: 枣树; *ZjSOD1*; 渗透/高盐/H₂O₂胁迫; 幼苗发育

中图分类号: S665.1

文献标志码: A

文章编号: 1009-9980(2020)09-1294-11

Studies on the role of *ZjSOD1* gene from *Ziziphus jujuba* in response to abiotic stresses

NIE Yuanjun¹, GUO Huina³, ZHANG Chunfen², XIAO Rong², DENG Shu², LI Qian³, CAO Qiufen^{3*}

(¹College of Agricultural Economics & Management, Shanxi Agricultural University, Taiyuan 030006, Shanxi, China; ²Institute of Pomology, Shanxi Agricultural University, Taigu 030815, Shanxi, China; ³College of Life Sciences, Shanxi Agricultural University, Taiyuan 030031, Shanxi, China)

Abstract: 【Objective】Superoxide dismutases (SODs) are involved in protecting plants against diverse biotic and abiotic stresses. In this study, a novel Fe-SOD gene, named *ZjSOD1*, was cloned from *Ziziphus jujuba* Mill. Hupingzao and its function was studied. The expression of *ZjSOD1* of jujube plantlets generated from tissue culture was studied under different abiotic stress treatments. 【Methods】The ORF sequences of the *ZjSOD1* cDNA was cloned by polymerase chain reaction (PCR). The expression of the *ZjSOD1* under salt, and drought stresses was analyzed by quantitative RT-PCR. To characterize the function of the *ZjSOD1* gene in plant development, coding sequence of *ZjSOD1* was inserted into the plant expression vectors PEZR(K)-LNY driven by CaMV 35S promoter and introduced into *Arabidopsis*. Subsequently, seeds of the wild type and homozygotes of T₃ generation of the *ZjSOD1* overexpression transgenic lines of *Arabidopsis* were sowed on MS agar media with or without NaCl, PEG6000 and H₂O₂, respectively. The seed germination rates, the cotyledon greening rate and the growth rates of the primary roots of the wild type and *ZjSOD1* lines were monitored under different abiotic stresses. The levels of proline, malondialdehyde (MDA), electrolyte leakage and the specific activities of various antioxidant enzymes were detected in the leaf tissues for evaluating the extent of cellular damage of

收稿日期: 2019-05-05 接受日期: 2020-05-29

基金项目: 国家自然科学基金(31372033); 国家基础研究计划项目(2012FY110100-5); 山西省科技成果转化引导专项(201904D131039); 山西省农业科学院攻关项目(YGG1432)

作者简介: 聂园军, 男, 副研究员, 硕士, 主要从事果树分子生物学研究。Tel: 18636905379, E-mail: nie379@126.com

*通信作者 Author for correspondence. Tel: 0351-7965586, E-mail: qiufengcao@163.com

both the *ZjSOD1* transgenic lines and the wild type during salt, PEG6000 and H_2O_2 treatments. In addition, we analyzed the expression levels of antioxidant enzymes (APX1, GPX3 and CAT1) in the ROS scavenging system, drought/high salinity-responsive genes (*RD29A* and *ERD15*) and *SOS2* (involved in SOS signaling pathway) were employed as markers for monitoring ROS signaling and stress-response pathways in *Arabidopsis* by quantitative RT-PCR. 【Results】The *ZjSOD1* contained a 699 bp of open reading frame (ORF) encoding a protein of 232 amino acids (including 22 acidic amino acids and 24 basic amino acids) with a calculated molecular mass of 25.597 1 ku and an isoelectric point of 8.59. *ZjSOD1* protein, which belongs to Fe-SOD family, and contained a C-terminal conservative SOD functional domain. The transcript levels of the *ZjSOD1* accumulated gradually in response to salt stress and reached the maximum expression with $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl for 24 h. Similarly the regulation of the *ZjSOD* at transcript level was also analyzed in response to osmotic stress with PEG6000 (simulating drought stress). In particular, the *ZjSOD1* expression level was increased by approximately 7-fold with 0.5 MPa PEG6000 treatment for 24 h. The overexpression of the *ZjSOD1* in *Arabidopsis* led to a drought- and salt-sensitive phenotype of the transgenic plants, resulting in an increase in plant tolerance to H_2O_2 stress. In the presence of NaCl or PEG6000, the rates of seed germination and cotyledon greening in the *ZjSOD1* overexpression transgenic plants were lower than those in the wild type, and the roots of the *ZjSOD1* overexpression transgenic plantlets were shorter than those of the wild type. In the presence of $150\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, the germination rate of the wild type reached to approximately 90%, but the *ZjSOD1* overexpression transgenic seeds reached to only about 60% 6 days after the treatments. Likewise, in the presence of 0.5 MPa PEG6000, about 85% of the wild type, whereas only 65% of the *ZjSOD1* overexpression transgenic seeds germinated 6 days after the treatments. However, In the presence of H_2O_2 , the rates of seed germination and cotyledon greening in the *ZjSOD1* overexpression transgenic plants were higher than those in the wild type, and the roots of the *ZjSOD* transgenic plantlets were longer than those of the wild type. The levels of SOD, CAT, POD activity, proline contents, MDA contents and electrolyte leakage in the *ZjSOD1* overexpression transgenic plantlets were remarkably altered under NaCl, PEG6000 or H_2O_2 stresses. Furthermore, the expression of the genes related to reactive oxygen species (ROS), salt and drought signaling pathway were altered in the *ZjSOD1* transgenic plants. 【Conclusion】These data suggest that the *ZjSOD1* was involved in plant response to oxidative, drought and salt stresses. The *ZjSOD1* may act as a positive regulator activating a subset of ROS-related genes in response to ROS signaling, but it may be as a negative regulator in response to salt/osmotic stress. Importantly, the over-expression of the *ZjSOD1* in crops may be useful for promoting the resistance to accumulation of ROS.

Key words: *Ziziphus jujuba*; *ZjSOD1*; Osmotic/high salinity/ H_2O_2 stress; Seedling development

干旱、高盐和低温作为最普遍的非生物胁迫因素,不仅限制植物的分布,而且严重影响作物的产量和品质^[1]。在逆境条件下,植物细胞膜的渗透性严重受损,离子失衡,导致细胞体内大量活性氧(如 H_2O_2 、 $OH\cdot$ 、 $O_2\cdot^-$ 、 O_2)积累,影响植物的正常生长和发育^[2]。先前研究表明,少量的活性氧(ROS)作为重要信号分子参与调控病菌防御、激素信号、胁迫应答等,在植物的生长发育过程中发挥重要作用^[3-4]。

枣树抗旱、耐盐碱,是研究植物抗逆机制的优良

材料。到目前为止,对枣树的研究主要集中在不同生理过程中的激素变化、组织培养、营养素及矿物质积累、化学活性成分分析等。超氧化物歧化酶(SODs, EC1.15.1.1)是一类广泛存在于植物细胞质、叶绿体、线粒体中的金属酶类,作为清除ROS信号的第一道防线,特异清除生物氧化中超氧阴离子自由基,将其发生歧化反应生成 O_2 和 H_2O_2 。根据酶活性位点金属辅因子的不同,SOD可以分为四类:Cu/Zn-SOD、Fe-SOD、Mn-SOD和Ni-SOD^[5]。先前已报

道在一些转基因植株中过量表达编码各种SOD同工酶的基因能够增强植株对非生物胁迫(高盐、冷害、干旱、高光)的耐受性。例如,在水稻叶绿体中异源表达豌豆*Mn-SOD*基因增强了植株对干旱胁迫的防御应答^[6]。在烟草中过量表达*Cu/Zn-SOD*基因增强了植株对氧化胁迫的耐受性^[7]。木薯细胞质中较高水平的*Cu/Zn-SOD*和*APX*表达增强了对氧化、冷、干旱胁迫的耐受性^[8]。在烟草中过量表达花生*Cu/Zn-SOD*可以缓解植株对高盐和干旱的伤害^[9]。由于高盐和干旱胁迫会导致ROS产生并累积,植物通过提高自身内SOD含量去缓解这些胁迫^[10-11]。因此在氧化胁迫条件下,SOD作为一种关键酶调控植物细胞体内ROS水平,维持正常的生理过程。

肖蓉等^[12]研究发现,枣树谷胱甘肽过氧化物酶基因*ZjGPX*能够被一定浓度的干旱(PEG)胁迫和盐胁迫诱导表达,在拟南芥中过量表达*ZjGPX*基因明显提高了植株的抗旱性和耐盐性。聂园军等^[13]研究发现,枣树2-半胱氨酸氧化还原酶基因*Zj2-CP*在转录水平能够被不同浓度的PEG和盐胁迫诱导表达,在拟南芥中过量表达*Zj2-CP*基因增加了植株对干旱和盐胁迫的敏感性。但是,与其他植物相比,枣树中有关分子水平上对非生物胁迫的抗氧化应答方面的研究还未见报道。笔者以壶瓶枣结果枝cDNA文库中获得的一个SOD同源基因序列为研究对象,对其进行生物信息学分析,并对其在干旱和盐胁迫下的枣组育苗叶片中的表达特性进行初步分析。另外成功构建该基因的植物表达载体,通过农杆菌介导浸花法转化野生拟南芥,初步分析该基因超表达拟南芥植株的抗旱性、耐盐性及抗氧化性,为进一步研究该基因的生物学功能、可能的活性调节方式及其在果树抗逆基因工程改良中的利用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料与处理

MS培养基上增殖培养课题组保存的‘辣椒枣’组育苗,置于30℃培养箱12h光照/12h黑暗培养30d,选取生长一致的幼苗分别转移至含有50、100、200、300 mmol·L⁻¹ NaCl和0.5、0.8、1.2 MPa PEG6000的MS液体培养基中,分别处理15 min、30 min、45 min、1 h、3 h、6 h、24 h和72 h后,收集幼苗的叶片置于-80℃保存,用于RNA的提取。

拟南芥(*Arabidopsis thaliana*,生态型 *Colum-*

bia)种子经75%酒精表面消毒1 min,10% NaClO处理3 min,无菌水冲洗3~4次后将其种植在MS培养基上,4℃处理2 d,然后移至植物生长培养箱中(16 h光照/8 h黑暗,22℃)待种子萌发。生长10 d后,将幼苗种植在土钵中,置于培养室(16 h光照/8 h黑暗,22~24℃)培养。留部分生长10 d的幼苗用于提取RNA。

1.2 实时定量PCR

用改良的CTAB法提取幼苗叶片RNA,随后用DNase消化除去基因组DNA^[14]。用PrimeScript® RT Master Mix将RNA反转录为cDNA。利用荧光实时定量PCR分析*ZjSOD1*基因在高盐和渗透胁迫条件下的表达量。枣树*ZjH3*基因(GenBank登录号:EU916201)作为内参。用于荧光定量PCR的基因特异性引物见表1。

表1 实验中所用引物序列

Table 1 Primer sequences used in the experiments

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence
<i>ZjH3</i> P1	5'-GAGGAAGCAACTGGCAACTAAGG-3'
<i>ZjH3</i> P2	5'-ACCAGCCTCTGGAATGGAAGTTTG-3'
<i>ZjSOD1</i> P1	5'-TTCAAGGTTCTGGATGGGTG-3'
<i>ZjSOD1</i> P2	5'-AAGTAGTATGCATGCTCCC-3'
<i>CAT1</i> P1	5'-AACTCTCTTTGACTGTGCGAACT-3'
<i>CAT1</i> P2	5'-TGTCTCTGACTATCAGCGTAGGAG-3'
<i>ATGPX3</i> P1	5'-ATGCCTAGATCAAGCAGCC-3'
<i>ATGPX3</i> P2	5'-TCAAGCAGATGCCAATAGC-3'
<i>APX1</i> P1	5'-ATGACGAAGA ACTACCCAAC-3'
<i>APX1</i> P2	5'-TTAAGCATCAGCAAACCCAAG-3'
<i>RD29A</i> P1	5'-TCAGCGAGGCTGGTGGATG-3'
<i>RD29A</i> P2	5'-ACAAAACACACATAAACATCCAAAAGT-3'
<i>AtERD15</i> P1	5'-TCAGCGAGGCTGGTGGATG-3'
<i>AtERD15</i> P2	5'-TGAGAATGGCGATGGTATCAGGA-3'
<i>AtSOS2</i> P1	5'-GGCTTGAAGAAAGTGAGTCTCG-3'
<i>AtSOS2</i> P2	5'-GCTACATAGTTCGGAGTTCACA-3'
<i>ACTIN2</i> P1	5'-GAAATCACAGCACTTGCACC-3'
<i>ACTIN2</i> P2	5'-AAGCCTTTGATCTTGAGAGC-3'

为了研究ROS清除系统中抗氧化酶类[*CAT1* (At1g20630)、*ATGPX3* (At2g43350)和*APX1* (At1g07890)]及参与干旱、高盐胁迫应答基因[*RD29A* (At5g52310)、*AtERD15* (At2g41430)和*AtSOS2* (At5g35410)]在转*ZjSOD1*基因拟南芥中的表达量,对生长10 d的幼苗分别用150 mmol·L⁻¹ NaCl、0.5 MPa PEG6000和5 mmol·L⁻¹ H₂O₂处理6 h后提取总RNA,经DNA消化后,逆转录为cDNA。通过实时定量PCR检测基因的转录水平,拟南芥*ACTIN2*基因作为内参。所用基因特异性引见表1。

荧光定量PCR反应体系为20 μL : cDNA 1 μL , Rox 0.4 μL , 上下游引物(5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)各0.4 μL , 含 $2\times$ SYBR Premix Ex *Taq* 10.0 μL , ddH₂O 17.8 μL 。在ABI 7500 system (Applied Biosystems, USA)按如下程序扩增:95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 31 s, 共40个循环。按照公式 $X=2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 进行目的基因的相对定量分析。

1.3 载体构建和拟南芥的转化

从‘壶瓶枣’(*Ziziphus jujuba* ‘Hupingzao’)结果枝cDNA文库中分离克隆超氧化物歧化酶基因,将其命名为*ZjSOD1*。随后将*ZjSOD1* cDNA开放阅读框经限制性内切酶*EcoR* I和*Sma* I修饰后连接于携带有黄色荧光蛋白基因*YFP*的植物表达载体PEZR(K)-LNY上,获得PEZR(K)-LNY-*ZjSOD1*质粒。经电转化农杆菌GV3101后,通过浸花法转化拟南芥^[5],待种子成熟后收获种子。将收获的种子在含有卡那霉素(Km)的MS培养基上筛选阳性转基因植株,加代至T₃代用于表型分析。

1.4 转基因拟南芥植株表型分析

将野生型和T₂代转基因株系种子分别种植在MS培养基、MS+150 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl、MS+0.5 MPa PEG6000和MS+5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ H₂O₂培养基上,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育2 d后,置于培养箱(22 $^{\circ}\text{C}$, 16 h光照/8 h黑暗)培养。其间定时统计种子萌发率和绿苗率,以胚根完全顶出种皮即为萌发,长出绿色子叶即为绿苗。计算公式如下:萌发率/%=已萌发种子数目/种子总数目 $\times 100$;绿苗率/%=长出绿色子叶数目/已萌发的种子数目 $\times 100$ 。

将野生型和T₂代转基因株系种子分别种植在MS培养基上萌发48 h后,选取萌发一致的幼苗转移至分别添加150 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl、0.5 MPa PEG6000和5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ H₂O₂的MS培养基中,置于培养箱中垂直培养。生长10 d后,记录幼苗生长状况,测定其主根根长。以上实验3次重复,每次3个独立重复。

1.5 总SOD、POD和CAT酶活性测定

收集胁迫处理后转基因植株叶片进行ROS酶类的提取^[16]与活性分析。SOD、POD和CAT酶活性测定方法参考文献^[16]。

1.6 丙二醛(MDA)和脯氨酸含量、电解质渗透率测定

MDA含量测定方法参考文献^[17],脯氨酸含量

的测定方法参考文献^[14],电解质渗透率测定方法参考文献^[18]。

2 结果与分析

2.1 *ZjSOD1* 基因的分离鉴定

从‘壶瓶枣’结果枝cDNA文库中约3 000个cDNA克隆中分离到1个枣树SOD基因的全序列,将其命名为*ZjSOD1*(Genbank登录号:KM603663),cDNA序列开放阅读框全长为699 bp,编码232个氨基酸,其中包含有22个酸性氨基酸,24个碱性氨基酸,蛋白质的相对分子质量为25.597 1 ku,理论等电点为8.59。*ZjSOD1*蛋白属于Fe-SOD家族成员,包含1个C端保守的SOD功能结构域(pfam domain 02777)(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)。

2.2 *ZjSOD1* 基因在转录水平上受高盐和PEG6000诱导

为了研究*ZjSOD1*基因的表达水平是否受非生物胁迫(高盐、渗透)调控,用不同浓度的NaCl和PEG6000分别处理野生型枣幼苗后,进行实时定量PCR分析。结果显示,经NaCl和PEG6000处理后,*ZjSOD1*表达量显著上调。在盐胁迫条件下,*ZjSOD1*转录水平逐渐增加,在100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl处理24 h条件下,表达量达到最高(图1-A)。在0.5 MPa PEG6000处理24 h条件下表达量增加7倍(图

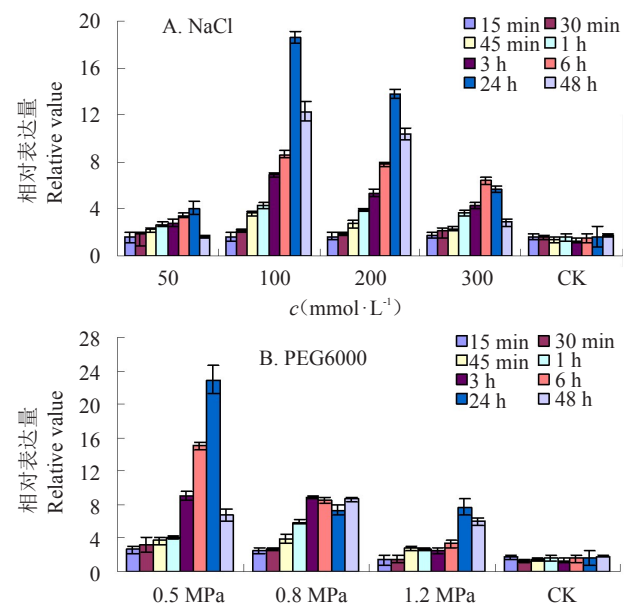


图1 NaCl和PEG6000处理对*ZjSOD1*基因表达量的影响

Fig. 1 Analysis of expression of *ZjSOD1* genes in jujube under NaCl and PEG6000 treatments, respectively

1-B)。以上结果表明, *ZjSOD1* 基因在转录水平受高盐和渗透胁迫诱导。

2.3 *ZjSOD1* 转基因株系对高盐和渗透胁迫更加敏感

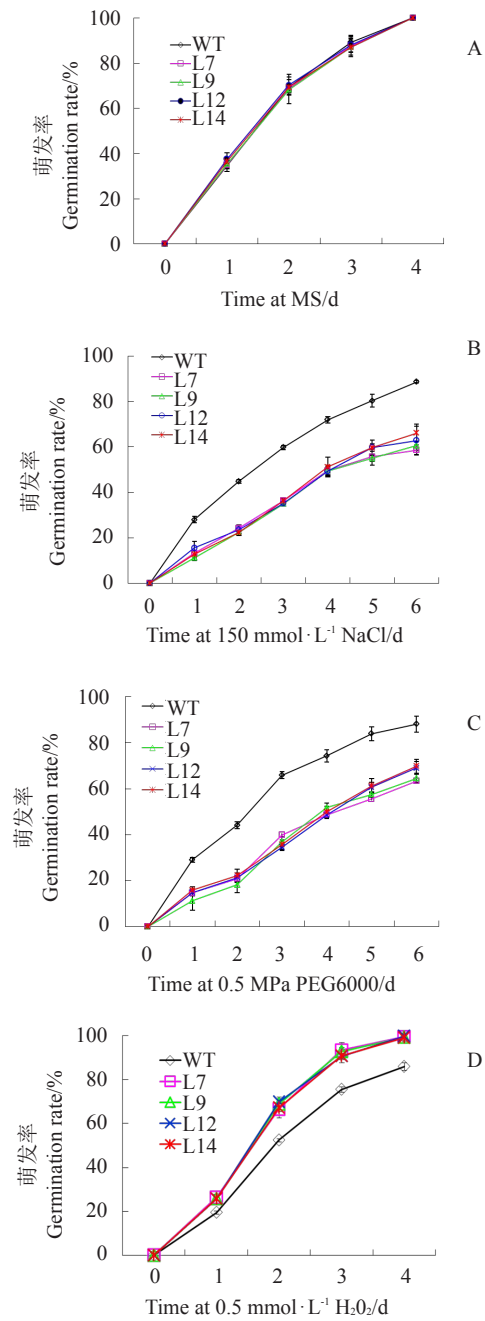
为了研究 *ZjSOD1* 基因在植物抗逆胁迫中的功能, 将 *ZjSOD1* 基因构建至由 35S 启动子驱动的 PE-ZR(K)-LNY 载体上转化拟南芥, 通过卡那霉素抗性筛选及 PCR 检测获得转基因阳性株系, 随后通过实时定量 PCR 筛选到 T2 代表表达量较高的株系 (L7、L9、L12 和 L14) 进行表型分析与抗性功能研究。

将 T2 代 *ZjSOD1* 转基因株系及野生型种子分别种植在 MS、MS+150 mmol·L⁻¹ NaCl、MS+0.5 MPa PEG6000 培养基上进行培养观察。结果显示, 在 MS 培养基中 *ZjSOD1* 转基因株系与野生型种子的萌发率无明显差异 (图 2-A)。在 150 mmol·L⁻¹ NaCl 或 0.5 MPa PEG6000 处理条件下, *ZjSOD1* 转基因拟南芥种子较野生型萌发迟缓, 萌发率显著低于野生型。NaCl 处理条件下生长 4 d 后, 野生型和转基因种子的萌发率分别为 70% 和 50% 左右。生长 6 d 后, 野生型种子的萌发率达到 90%, 而 *ZjSOD1* 转基因种子仅约 60% 萌发, 表现为对高盐敏感 (图 2-B)。在 PEG6000 处理条件下生长 3 d 后, 野生型种子和 *ZjSOD1* 转基因种子萌发率分别约为 65% 和 35%。生长 6 d 后, 约 85% 野生型种子萌发, 而转基因种子仅有 65% 萌发 (图 2-C)。

幼苗发育时期, 在 MS 培养基正常生长条件下, *ZjSOD1* 过量表达转基因株系与野生型幼苗的生长状况无明显差异 (图 3-A, 图 4-A, 图 4-E)。但是在高盐和 PEG 处理条件下, *ZjSOD1* 过量表达株系的生长明显受到抑制, 其绿苗率明显低于野生型, 主根显著短于野生型, 表现为对盐和 PEG 较野生型更加敏感 (图 3-B~C、E~F, 图 4-B~C、F~G)。综上, *ZjSOD1* 转基因株系对高盐和渗透胁迫更加敏感, 表明 *ZjSOD1* 基因在种子萌发及幼苗发育时期参与高盐和渗透胁迫应答, 可能起负调控作用。

2.4 *ZjSOD1* 转基因株系对 H₂O₂ 耐受性增强

将 T2 代 *ZjSOD1* 转基因株系及野生型种子分别种植在 MS 和 MS+5 mmol·L⁻¹ H₂O₂ 培养基上进行培养观察。在 5 mmol·L⁻¹ H₂O₂ 生长条件下, *ZjSOD1* 转基因种子萌发较早较快, 且萌发率显著高于野生型。生长 3 d 后, 转基因种子与野生型种子的萌发率分别约为 90% 和 75% (图 2-D)。



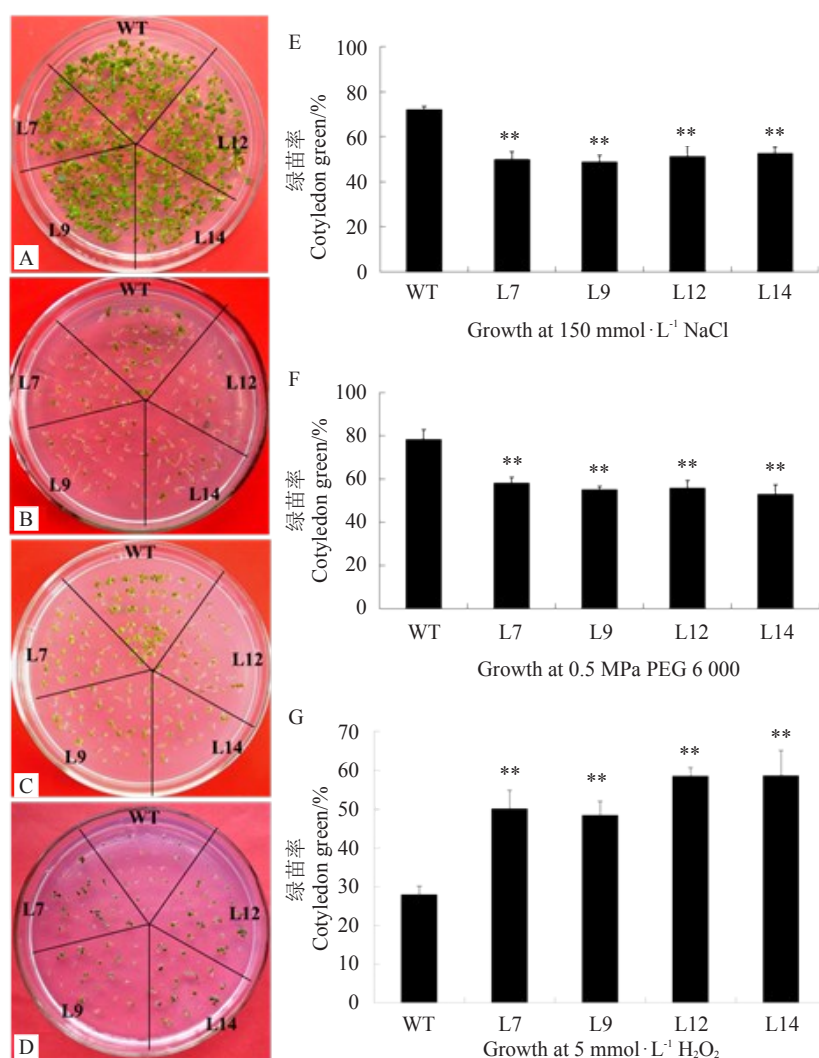
WT. 野生型; L7、L9、L12 和 L14. *ZjSOD1* 过量表达转基因株系 7、9、12 和 14。下同。

WT. Wild type; L7, L9, L12 and L14. *ZjSOD1*-overexpressing transgenic line 7, 9, 12 and 14. The same below.

图 2 *ZjSOD1* 过量表达转基因拟南芥在 NaCl、PEG6000 和 H₂O₂ 处理下种子萌发率分析

Fig. 2 Assay in seed germination of *ZjSOD1* overexpressing transgenic Arabidopsis under NaCl, PEG6000 and H₂O₂ treatments

在 H₂O₂ 处理条件下, *ZjSOD1* 过量表达株系的绿苗率明显高于野生型, 主根显著长于野生型 2 倍多, 表现为对 H₂O₂ 耐受性显著增强 (图 3-D、G, 图 4-D、H)。综上, *ZjSOD1* 基因在种子萌发及幼苗发育



野生型和转基因株系分别在 MS(A)、MS+150 mmol·L⁻¹ NaCl(B,E)、MS+0.5 MPa PEG6000(C,F)和 MS+5 mmol·L⁻¹ H₂O₂(D,G)培养基上培养 10 d 后的生长状况及绿苗率统计分析。*t*-test 检测显示,在转基因植株与野生型拟南芥之间存在极显著差异(***p* < 0.01)。

Growth status and statistical analysis of cotyledon expansion and greening of seedlings of wild type and transgenic seedlings grown on MS medium (A) and MS medium with 150 mmol·L⁻¹ NaCl (B, E), 0.5 MPa PEG6000 (C, F) and 5 mmol·L⁻¹ H₂O₂ (D, G) for 10 days, respectively. Independent *t* tests for equality of means demonstrated that there was very significant difference between wild type and transgenic plants (***p* < 0.01).

图3 *ZjSOD1* 过量表达转基因拟南芥在 NaCl、PEG6000 和 H₂O₂ 处理条件下绿苗率分析

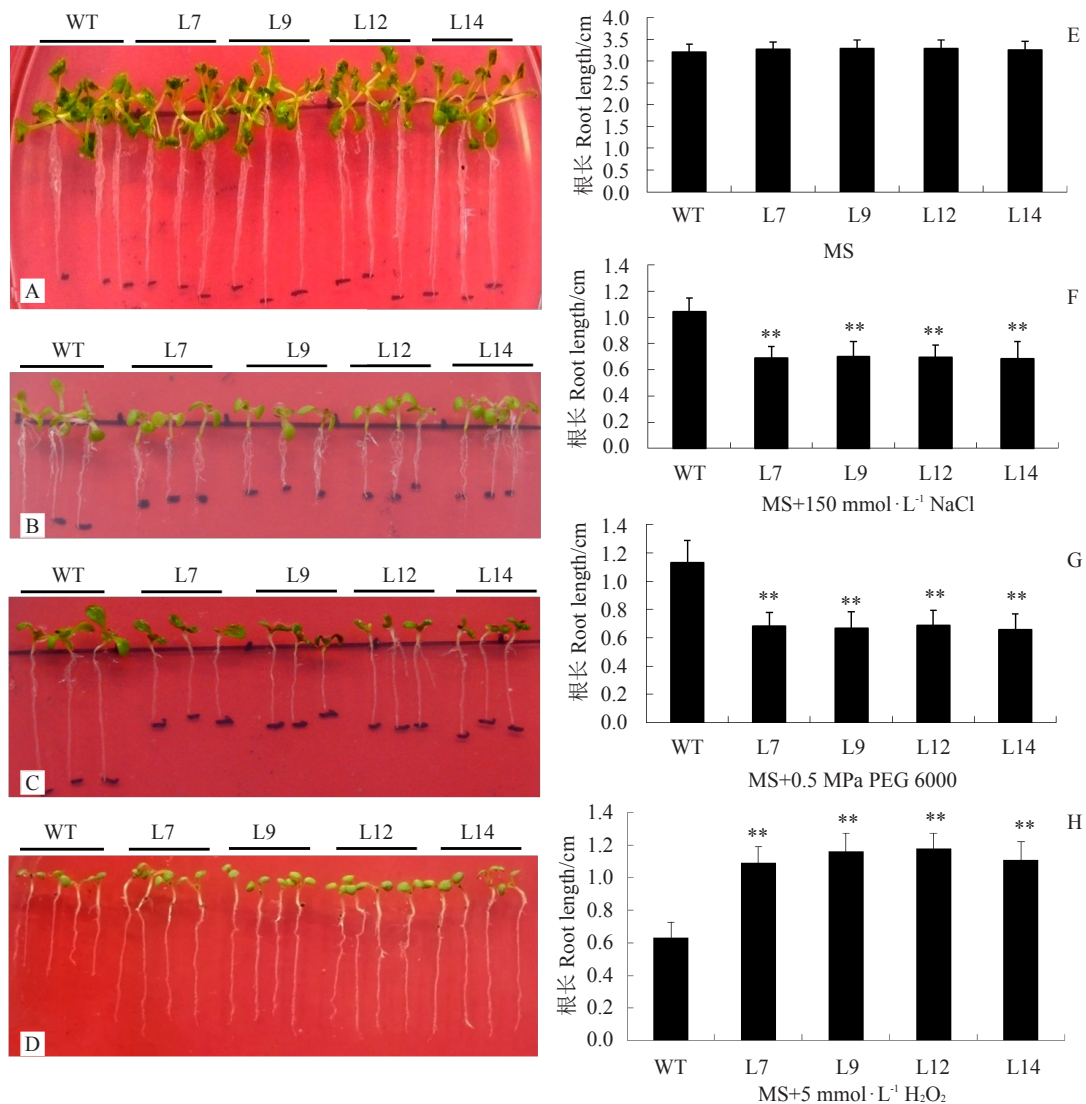
Fig. 3 Assay in cotyledon opening of *ZjSOD1* overexpressing transgenic seedlings under NaCl, PEG6000 and H₂O₂ treatments

时期参与 H₂O₂ 胁迫应答,可能起正调控作用。

2.5 *ZjSOD1* 转基因植株在非生物胁迫条件下生理指标及氧化酶活性发生改变

先前研究已报道在应对非生物胁迫时,植物体内的多种生理指标及氧化酶类会发生改变。因此对高盐、PEG6000 和 H₂O₂ 胁迫处理下的转基因株系和野生型植株叶片进行脯氨酸和 MDA 含量、电解质渗透率及 SOD、POD 和 CAT 活性测定。结果显示,在正常条件下,转基因植株和野生型植株的脯氨酸、MDA 含量和电解质渗透率及 POD 和 CAT 活性均无

显著差异(图 5),但是转基因株系中的 SOD 活性显著高于野生型。在高盐、PEG6000 和 H₂O₂ 胁迫处理下,*ZjSOD1* 转基因株系中的脯氨酸、MDA 含量均显著高于野生型。而在 NaCl 和 PEG6000 处理条件下,转基因株系中电解质渗透率显著增加且高于野生型,POD 和 CAT 活性明显低于野生型。在 H₂O₂ 处理条件下,转基因株系中的电解质渗透率明显低于野生型,但是 SOD、POD 和 CAT 活性均显著增加,明显高于野生型(图 5)。综上数据表明,*ZjSOD1* 在植物幼苗发育时期参与应答高盐、PEG6000 和 H₂O₂ 胁



野生型和 *ZjSOD1* 过量表达株系分别在 MS(A, E)、MS+150 mmol·L⁻¹ NaCl(B, F)、MS+0.5 MPa PEG6000(C, G)和 MS+5 mmol·L⁻¹ H₂O₂(D, H)培养基上生长 12 d 的幼苗生长状况和主根根长测量。*t*-test 检测显示,在转基因植株与野生型拟南芥之间存在极显著差异(** $p < 0.01$)。

Growth status and statistical analysis of cotyledon expansion and greening of seedlings of wild type and transgenic seedlings grown on MS medium (A, E) and MS medium with 150 mmol·L⁻¹ NaCl (B, F), 0.5 MPa PEG6000 (C, G) and 5 mmol·L⁻¹ H₂O₂ (D, H) for 10 days, respectively. Independent *t* tests for equality of means demonstrated that there was very significant difference between wild type and transgenic plants (** $p < 0.01$).

图4 *ZjSOD1* 转基因拟南芥在 NaCl、PEG6000 和 H₂O₂ 处理条件下的表型分析

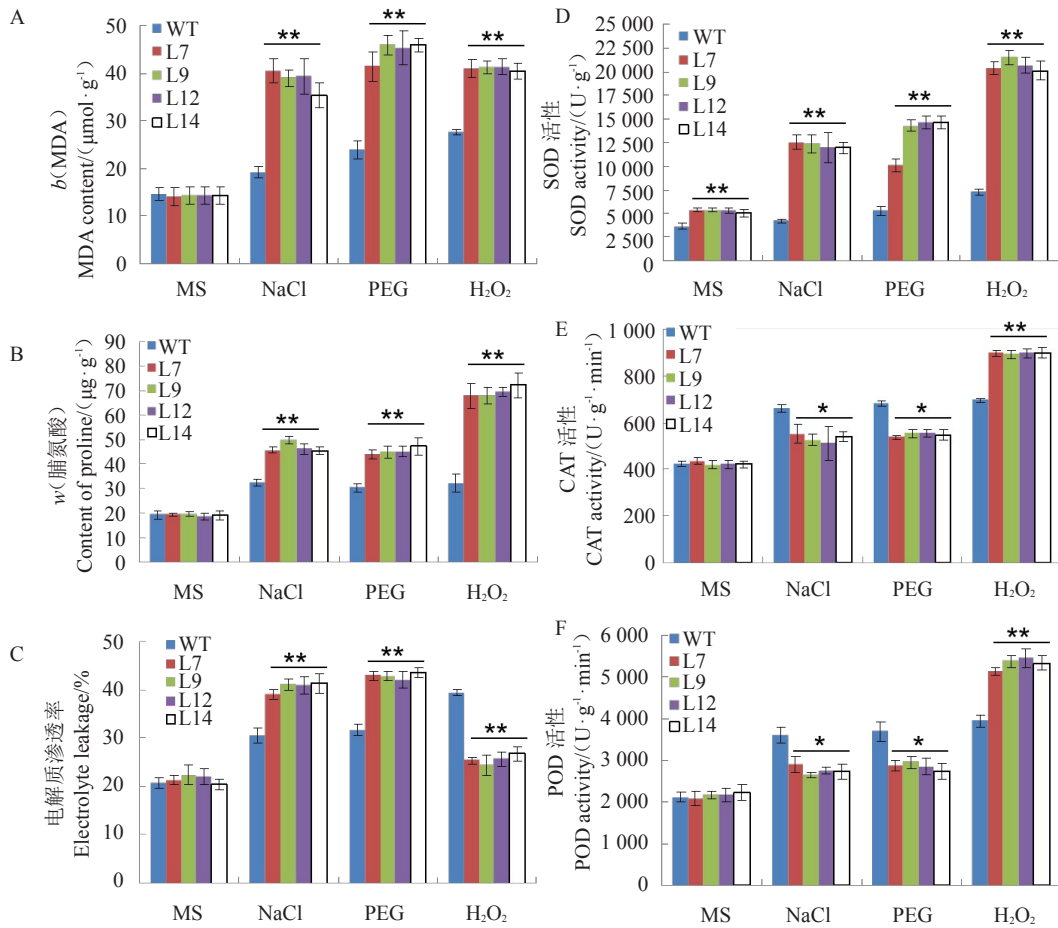
Fig. 4 Phenotypic analysis of Arabidopsis *ZjSOD1* lines under NaCl, PEG6000 and H₂O₂ treatments

迫,在转基因植株中 H₂O₂ 介导的氧化胁迫耐受性增强。

2.6 *ZjSOD1* 参与调控干旱、高盐胁迫应答及 ROS 信号通路相关基因的表达

为了研究 *ZjSOD1* 参与干旱、高盐胁迫应答及 ROS 信号通路的调控机制,选取参与 ROS 信号通路相关抗氧化酶基因(*CAT1*、*APX1* 和 *GPX3*)、盐信号通路(*SOS2*)及参与干旱胁迫应答基因(*RD29A* 和 *ERD15*)进行转录水平上的表达分析。结果显示,在正常生长条件下,所选6个基因在 *ZjSOD1* 转基因株

系与野生型中的表达量均无显著差异。但是在胁迫处理条件下,6个胁迫应答相关基因在转基因株系中表达量明显发生改变。主要表现为在 NaCl、PEG6000 和 H₂O₂ 处理条件下,*CAT1*、*APX1* 和 *GPX3* 在 *ZjSOD1* 转基因株系中的表达量均显著上调。*RD29A* 和 *ERD15* 在 NaCl 和 PEG6000 胁迫下的转基因株系中的表达量显著上调,而在 H₂O₂ 胁迫下的转基因株系中的表达量显著下调。*SOS2* 在 NaCl 和 PEG6000 胁迫下的转基因株系中的表达量显著下调(图6)。综上所述表明,*ZjSOD1* 基因参与植物应答



t-test 检测显示,在转基因植株与野生型拟南芥之间存在显著差异(* $p < 0.05$)和极显著差异(** $p < 0.01$)。

* and ** represent significant difference at $p < 0.05$, $p < 0.01$ between the transgenic lines and wild-type by *t* test.

图5 野生型和转基因株系在 NaCl、PEG6000 和 H₂O₂ 处理条件下生理指标的测定

Fig. 5 Comparison of physiological indices between wild type and transgenic plants under NaCl, PEG6000 and H₂O₂ treatments

非生物胁迫和 ROS 信号通路。

3 讨论

抗氧化酶是氧化胁迫防御机制中的关键成员,其中 SOD 酶类参与 ROS 的去氧化反应^[19]。先前已有报道 SOD 酶类活性与植物对不同非生物胁迫的耐受性呈正相关^[20],但是目前有关枣树 SOD 参与植物应答高盐、PEG 和 H₂O₂ 胁迫尚未见报道。

先前已报道在不同植物中过量表达 Cu/Zn-SOD 增强了植株对氧化胁迫的耐受性^[10-11]。本研究中,对种子萌发期及幼苗生长期的研究显示,在拟南芥中过量表达 *ZjSOD1* 使植株对 H₂O₂ 耐受性增强。在 H₂O₂ 胁迫条件下,与野生型相比, *ZjSOD1* 过表达株系中 SOD、POD 和 CAT 活性显著增加。该结果与先

前研究报道的 *SODs* 基因增强了植株对氧化胁迫的耐受性结果相一致^[10-11]。笔者推测过量表达 *ZjSOD1* 转基因植株中抗氧化酶活性增加,进而对 H₂O₂ 胁迫的耐受性增强, *ZjSOD1* 的过量表达有助于植株通过清除过量的 ROS 来维持细胞体内安全水平的 ROS。SOD、CAT、APX、MDHAR、DHAR 和 GR 作为抗氧化系统共同起作用,保护植物免受氧化损伤。大多数活性氧清除酶类在叶绿体中共表达^[21-22]。Xu 等^[8]发现同时表达细胞质中 SOD 和 APX 的转基因植株能够快速清除特定位置产生的超氧化物和 H₂O₂,同时阻止 OH·(毒性最大的 ROS)的形成,优先与靶标分子相互作用。本研究中,实时定量 PCR 结果显示,经 H₂O₂ 处理后, *APX1*、*GPX3* 和 *CAT1* 在 *ZjSOD1* 过量表达转基因株系中表达量显著上调,

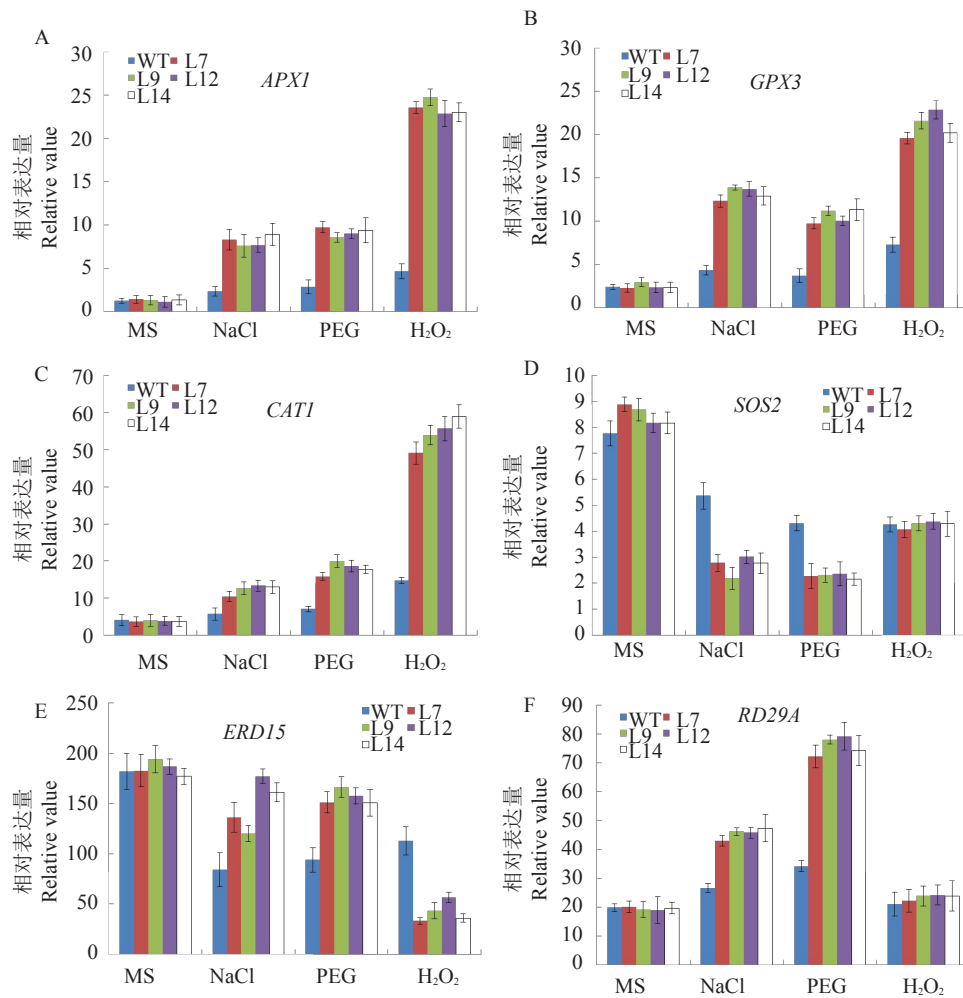


图 6 实时定量 RT-PCR 分析抗氧化高盐及干旱胁迫应答相关基因的表达

Fig. 6 Quantitative RT-PCR analysis of expression of antioxidative stress- and salt /drought-responsive genes in transgenic *Arabidopsis* plants with overexpressing *ZjSOD1*

表明 *ZjSOD1* 作为正调控子在拟南芥中调控 ROS 信号相关基因的表达。

实时定量 RT-PCR 分析显示经高盐、PEG 胁迫处理后 *ZjSOD1* 的表达量显著增加, 暗示其参与非生物(高盐和干旱)胁迫应答。这些结果与先前报道的 *SODs* 基因 (CuZnSOD、FeSOD、MnSOD) 在植物面临非生物胁迫时表达量增加结果是相一致的^[20-22]。但是先前已有报道显示在一些植物中过量表达编码 SOD 同工酶基因增强了植株对高盐和干旱的耐受性^[23-26]。而本研究显示 *ZjSOD1* 过量表达转基因植株表现出对高盐和 PEG 更加敏感。由于 SOD 蛋白中除其 SOD 功能结构域比较保守, 其他氨基酸序列相似性较低, 因此不同的 SODs 在植物生长发育过程中以及应对非生物胁迫中可能行使不同功能。

在 NaCl 和 PEG6000 胁迫处理下, *SOS2*、*RD29A*

和 *ERD15* 在转基因株系中的表达量显著发生改变。某些情况下, 胁迫应答相关基因的表达水平与植株对胁迫耐受的程度是相关联的^[27]。*SOS2* 作为信号转导分子在盐胁迫应答中起重要作用^[1]。本研究中, 在高盐处理和渗透胁迫条件下, *SOS2* 在 *ZjSOD1* 过量表达转基因株系中的转录水平均显著降低, 这有助于解释 *ZjSOD1* 过量表达转基因株系对高盐和渗透胁迫更加敏感的表现。在高盐和 PEG 胁迫处理下, *ZjSOD1* 过表达转基因株系中 SOD 活性显著高于野生型。综上结果暗示转基因株系中清除 $O_2^{\cdot-}$ 的活性明显增加, 另外转基因株系中 POD 和 CAT 活性也显著增加。众所周知, 在非生物胁迫环境下, 抗氧化酶活性会增加, 使植物免遭胁迫环境中产生 ROS 损害^[28-29]。因此 *ZjSOD1* 过表达转基因株系中 POD 和 CAT 活性的同时增加可能是由于胁迫

条件下抗氧化酶起作用清除 ROS 的结果。

植株在受到干旱和盐胁迫时体内会产生复杂的生理反应, *ZjSOD1* 作为一种清除 ROS 信号的第一道防线, 推测其直接作用于体内产生的 H_2O_2 , 从而间接参与到植株抗干旱和盐胁迫反应中。本文数据分析表明, *ZjSOD1* 是一个重要的抗氧化酶, 参与植物应对非生物胁迫信号通路。笔者推测 *ZjSOD1* 可能直接作为一个正调控因子激活下游一系列 ROS 相关基因的表达, 同时间接作为负调控子在盐和干旱胁迫应答行使重要功能, 在农作物中过量表达 *ZjSOD1* 有利于增强作物对 ROS 积累的耐受性。

4 结 论

克隆了 1 个枣树超氧化物歧化酶基因 *ZjSOD1*, 转录水平受 NaCl 和 PEG6000 诱导。在拟南芥中过量表达 *ZjSOD1* 基因导致植株对干旱、高盐更加敏感, 但对 H_2O_2 耐受性显著增强。氧化酶类活性、生理指标测定及转录调控分析表明, *ZjSOD1* 在植物生长发育过程中参与氧化、干旱、高盐胁迫应答。

参考文献 References:

- [1] XIONG L M, SCHUMAKER K S, ZHU J K. Cell signaling during cold, drought, and salt stress[J]. *Plant Cell*, 2002, 14: S165-S183.
- [2] JASPERS P, KANGASJARVI J. Reactive oxygen species in abiotic stress signaling[J]. *Physiologia Plantarum*, 2010, 138(4): 405-413.
- [3] TORRES M, DANGL J L, JONES J D. *Arabidopsis* gp91phox homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response[J]. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(1): 517-522.
- [4] FOREMAN J, DEMIDCHIK V, BOTHWELL J H, MYLONA P, MIEDEA H, TORRES M A. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth[J]. *Nature*, 2003, 422(6930): 442-446.
- [5] RAYCHAUDHURI S S, DENG X W. The role of superoxide dismutase in combating oxidative stress in higher plants[J]. *Botanical Review*, 2000, 66(1): 89-98.
- [6] WANG F Z, WANG Q B, KWON S Y, KWAK S S, SU W A. Enhanced drought tolerance of transgenic rice plants expressing a pea manganese superoxide dismutase[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2005, 162(4): 465-472.
- [7] GUPTA A S, HEINEN J L, HOLADAY A S, BURKE J J, ALLER R D. Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants that overexpress chloroplastic Cu/Zn superoxide dismutase[J]. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1993, 90(4): 1629-1633.
- [8] XU J, YANG J, DUAN X G, JIANG Y M, ZHANG P. Increased expression of native cytosolic Cu/Zn superoxide dismutase and ascorbate peroxidase improves tolerance to oxidative and chilling stresses in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) [J]. *BMC Plant Biology*, 2014, 14(1): 208.
- [9] NEGI N P, SHRIVASTAVA D C, SHARMA V, SARIN N B. Overexpression of CuZnSOD from *Arachis hypogaea* alleviates salinity and drought stress in tobacco[J]. *Plant Cell Reports*, 2015, 34(7): 1109-1126.
- [10] KAYA C, ASHRAF M, DIKILITAS M, TUNA A L. Alleviation of salt stress-induced adverse effects on maize plants by exogenous application of indoleacetic acid (IAA) and inorganic nutrients-A field trial[J]. *Australian Journal of Crop Science*, 2013, 7(2): 249-254.
- [11] SHIRIGA K, SHARMA R, KUMAR K, YADAV S K, HOSAIN F, THIRUNAVUKKARASU N. Expression pattern of superoxide dismutase under drought stress in maize[J]. *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering & Technology*, 2014, 3(4): 11333-11337.
- [12] 肖蓉, 罗慧珍, 邓舒, 张春芬, 张洁, 张小娟, 任莹, 孟玉平, 曹秋芬. 干旱和盐胁迫条件下枣树谷胱甘肽过氧化物酶基因(*ZjGPX*)的差异表达及功能分析[J]. *中国农业科学*, 2015, 48(14): 2806-2817.
- [13] XIAO Rong, LUO Huizhen, DENG Shu, ZHANG Chunfen, ZHANG Jie, ZHANG Xiaojuan, REN Ying, MENG Yuping, CAO Qiufen. Differential expression of glutathione peroxidase gene from jujube (*ZjGPX*) under drought and salt stresses and its transformation into *Arabidopsis*[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2015, 48(14): 2806-2817.
- [14] 聂园军, 李倩, 肖蓉, 郭慧娜, 张春芬, 邓舒, 侯丽媛, 董艳辉, 孟玉平, 曹秋芬. 枣树 2-半胱氨酸氧化还原酶基因 *Zj2-CP* 在干旱和盐胁迫下的功能分析[J]. *果树学报*, 2019, 36(6): 697-704.
- [15] NIE Yuanjun, LI Qian, XIAO Rong, GUO Huina, ZHANG Chunfen, DENG Shu, HOU Liyuan, DONG Yanhui, MENG Yuping, CAO Qiufen. Functional analysis of 2-Cys peroxidoredoxins gene (*Zj2-CP*) in jujube under drought and salt stresses[J]. *Journal of Fruit Science*, 2019, 36(6): 697-704.
- [16] QIN L X, LI Y, LI D D, XU W L, ZHENG Y, LI X B. *Arabidopsis* drought-induced protein Di19-3 participates in plant response to drought and high salinity stresses[J]. *Plant Molecular Biology*, 2014, 86(6): 609-625.
- [17] CLOUGH S J, BENT A F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium* mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Journal*, 1998, 16(6): 735-743.
- [18] CHEN Y, LIU Z H, FENG L, ZHENG Y, LI D D, LI X B. Genome-wide functional analysis of cotton (*Gossypium hirsutum*) in response to drought[J]. *PLoS One*, 2013, 8(11): e80879.
- [19] HEATH R H, PACKER L. Photoperoxidation in isolated chloro-

- plasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation [J]. Archives of Biochemistry & Biophysics, 1968, 125(1): 189-198.
- [18] BAJJI M, KINET J, LUTTS S. The use of the electrolyte leakage method for assessing cell membrane stability as a water stress tolerance test in durum wheat[J]. Plant Growth Regulation, 2002, 36(1): 61-70.
- [19] ALSCHER R G, ERTURK N, HEATH L S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants[J]. Journal of Experimental Botany, 2002, 53(372): 1331-1341.
- [20] UEDA Y, UEHARA N, SASAKI H, KOBAYASHI K, YAMAKAWA T. Impacts of acute ozone stress on superoxide dismutase (SOD) expression and reactive oxygen species (ROS) formation in rice leaves[J]. Plant Physiology & Biochemistry, 2013, 70(9): 396-402.
- [21] KWON S Y, JEONG Y J, LEE H S, KIM J S, CHO K Y, ALLEN R D, KWAK S S. Enhanced tolerance of transgenic tobacco plants expressing both superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in chloroplasts against methyl viologen mediated oxidative stress[J]. Plant Cell & Environment, 2002, 25(7): 873-882.
- [22] TANG L, KWON S Y, KIM S H, KIM J S, CHOI J S, CHO K Y, SUNG C K, KWAK S S, LEE H S. 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.
- [23] WANG Y C, QU G Z, LI H Y, WU Y J, WANG C, LIU G F. Enhanced salt tolerance of transgenic poplar plants expressing a manganese superoxide dismutase from *Tamarix androssowii*[J]. Molecular Biology Reports, 2010, 37(2): 1119-1124.
- [24] GOMEZ J M, JIMEANEZ A, OLMOS S F. Location and effects of long term NaCl stress on superoxide dismutase and ascorbate peroxidase isoenzyme of pea (*Pisum sativum* cv. Puget) chloroplasts[J]. Journal of Experimental Botany, 2004, 55(394): 119-130.
- [25] LIU Z B, ZHANG W J, GONG X D, ZHANG Q, ZHOU L R. A Cu/Zn super oxide dismutase from *Jatropha curcas* enhances salt tolerance of *Arabidopsis thaliana*[J]. Genetics and Molecular Research, 2015, 14(1): 2086-2098.
- [26] FAIZE M, BURGOS L, FAIZE L, PIQUERAS A, NICOLAS E, BARBA-ESPIN G, CLEMENTE-MORENO M J, ALCOBENDAS R, AATLIP T, HERNANDEZ J A. Involvement of cytosolic ascorbate peroxidase and Cu/Zn-superoxide dismutase for improved tolerance against drought stress[J]. Journal of Experimental Botany, 2011, 62(8): 2599-2613.
- [27] LIU Q, KASUGA M, SAKUMA Y, ABE H, MIURA S, YAMAGUCHI SHINOZZAKI K, SHINOZAKI K. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low temperature- responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*[J]. Plant Cell, 1998, 10(8): 1391-1406.
- [28] TAKEMURA T, HANAGATA N, SUGIHARA K, BABA S, KARUBE I, DUBINSKY Z. Physiological and biochemical responses to salt stress in the mangrove, *Bruguiera gymnorrhiza*[J]. Aquatic Botany, 2000, 68(1): 15-28.
- [29] GILL S S, TUTEJA N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants[J]. Plant Physiology & Biochemistry, 2010, 48(12): 909-930.