

# 超量共表达 *NsAKT1* 和 *AtDWF4* 烟草抗渗透胁迫能力研究

韦 春, 秦利军\*

(贵州大学生命科学学院, 山地植物资源保护与种质创新省部共建教育部重点实验室, 贵阳 550025)

**摘要:** 为了解钾和油菜素内酯 (BRs) 在调控植物抗逆境胁迫中的作用, 以超量表达  $K^+$  吸收基因 *NsAKT1* 及 BRs 合成基因 *AtDWF4* 的转基因烟草为材料, 分析 PEG 渗透胁迫对其形态及抗性指标等的影响。结果表明, PEG 胁迫 3 d 时, 转基因烟草 SOD 活性即达到极值且显著高于非转基因烟草 (Wt), 其中以共转 *AKT1/DWF4* 植株中 SOD 活性最高; 而 PEG 胁迫 1 d 时, 3 种转基因植株的 POD 活性均显著 ( $p < 0.05$ ) 高于 Wt 植株, 且共转 *AKT1/DWF4* 植株中 POD 活性分别是单转 *AKT1* 植株的 1.28 倍、单转 *DWF4* 植株的 1.40 倍和 Wt 植株的 1.90 倍; PEG 胁迫第 3 天时, 共转 *AKT1/DWF4* 植株中 CAT 活性增幅最大, 达 59.18%, 显著高于其他 2 种转基因烟草。同时,  $H_2O_2$  和 MDA 含量测定表明, PEG 处理后 Wt 中 MDA 和  $H_2O_2$  含量均在第 5 天时达极值, 分别为 58.52 nmol/g 和 38.21  $\mu\text{g/g}$ , 均显著高于转基因烟草。另外, 特征基因表达分析表明, *NsAKT1* 和 *AtDWF4* 可能协同调控共转 *AKT1/DWF4* 烟草对 PEG 渗透胁迫的抗性。本研究为进一步揭示 K 和 BRs 协同介导的烟草抗逆境胁迫应答机制以及创制优良的烟草新种质奠定理论依据。

**关键词:** 烟草; *AKT1*; *DWF4*; 抗旱性

## Study on Osmotic Stress Resistance of Tobacco by Overexpressing *NsAKT1* and *AtDWF4*

WEI Chun, QIN Lijun\*

(Key Laboratory of Plant Resources Conservation and Germplasm Innovation in Mountainous Region (Ministry of Education) and College of Life Sciences, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

**Abstract:** In order to study the role of potassium and BRs in regulating plant resistance to stresses, the transgenic tobaccos overexpressing the  $K^+$  absorption gene *NsAKT1* and the BRs synthetic gene *AtDWF4* were used to analyze the effects of PEG osmotic stress on morphology and resistance-related physicochemical indexes of transgenic tobaccos. The results showed that SOD activities of the transgenic tobacco plants reached the maximum values at 3 d after PEG treatment, which was significantly higher than that of non-transgenic tobacco (Wt). Among them, the highest SOD enzyme activity was in plants co-transformed with *AKT1/DWF4*. The POD enzyme activities of the three transgenic plants were significantly higher than that of Wt plants at 1 d after PEG stress ( $p < 0.05$ ), and the POD enzyme activities in the *AKT1/DWF4* co-transformed tobacco plants were 1.28 folds, 1.40 folds and 1.90 folds higher than that of trans-*AKT1* plants, trans-*DWF4* plants and Wt plants, respectively. Three days after PEG treatment, CAT enzyme activities in the *AKT1/DWF4* plants increased the most, up to 59.18%, which was significantly higher than the other two transgenic tobaccos. Meanwhile, the determination of  $H_2O_2$  and MDA contents showed that the maximum values of MDA and  $H_2O_2$  in Wt were 58.52 nmol/g and 38.21  $\mu\text{g/g}$ , respectively. Five days after PEG stress, these values were significantly higher than those in transgenic tobacco plants. Additionally, the expression analysis of characteristic genes indicated that *NsAKT1* and *AtDWF4* might synergistically regulate the resistance to PEG osmotic stress of the *AKT1/DWF4* tobacco lines. The results of this study provided a theoretical basis for further understanding of the mechanism of K and BRs synergistically mediated tobacco response to stresses and the creation of excellent new tobacco germplasm.

**Keywords:** *Nicotiana tabacum*; *AKT1*; *DWF4*; drought-resistance

钾不仅能维持植物细胞内稳态平衡和控制气孔开闭<sup>[1-2]</sup>, 还能改善烟草制品的安全性<sup>[3]</sup>。环境中  $K^+$  主要是通过质膜上的  $K^+$  通道 (potassium channel, PC) 进入植物体内<sup>[4-5]</sup>。PC 根据结构和功能不同,

又可分为 Shaker 家族通道、KCO 家族通道和其他通道<sup>[6]</sup>。钾转运蛋白 1 (Arabidopsis-like potassium transporter 1, AKT1) 是 Shaker 家族中的  $K^+$  钾离子通道, 能在低  $K^+$  环境 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 中促进植物

基金项目: 贵州省科技计划项目“烟草钾离子通道蛋白及 BR 对植株抗非生物胁迫研究” (黔科合 LH[2016]7449 号), 贵州大学人才培育项目“油菜素内酯介导的烟草抗 TMV 机理研究” (黔科合平台人才[2018]5781 号)

作者简介: 韦 春 (1995-), 在读硕士, 从事植物基因工程相关研究。E-mail: 1751608430@qq.com。\*通信作者, E-mail: leequine\_chin@126.com

收稿日期: 2020-06-02

修回日期: 2020-09-15

吸收  $K^{+}$ [7-9]。在水稻 (*Oryza sativa*) 中, *OsAKT1* 既能调节水稻在盐胁迫下对  $K^{+}$  的吸收[10], 又能提高水稻对干旱胁迫的抗性[11]。

近年来, 植物激素 (plant hormones) 介导的非生物胁迫抗性也被广泛报道[12-14]。其中, 油菜素内酯 (brassinosteroids, BRs) 作为一种重要的甾醇类激素, 参与了细胞分化、维管束发育及植物抗逆等过程[15-16]。芸苔素内酯 (brassinolide, BL) 作为 BRs 的活性形式, 其生物合成已被证明至少需要经由 3 条途径, 而 *DWF4* 是催化这 3 条途径的关键限速酶[17-18]。在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中, 该酶与拟南芥类固醇羟化酶 (Constitutive photomorphogenesis and dwarfism, CPD) 具有 43% 的同源性[19]。研究发现, 超量表达 *DWF4* 不仅能增加油菜 (*Brassica napus*) 种子产量和对小球腔菌 (*Leptosphaeria maculans*) 和菌核病 (*Sclerotinia sclerotiorum*) 的抗性[20], 还能有效改善拟南芥和番茄 (*Solanum lycopersicum*) 的营养生理状态[21-22]。

尽管 *OsAKT1* 和 *DWF4* 两者单独调控植物发育及抗性较多, 但鲜有对两者协同介导的非生物胁迫应答进行报道, 本试验立足于提高烟叶中钾含量和改善烟叶品质, 研究两者间协同促进转基因植株对渗透胁迫的抗性, 以期能为培育钾含量高、抗旱能力强的烟草新种质提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

普通烟草 (*Nicotiana tabacum*) 品种 K326, 植物表达载体 pRI 201-35SAkt1、pRI 201-rdDwf4 和 pRI 201-35SAkt1/rdDwf4 均由贵州大学农业生物工程研究院保存、构建并提供。植物激素及抗生素购于 Sigma-Aldrich 公司; 植物表达载体 pRI 201-AN

购于 Takara 公司; 普通质粒小提试剂盒及新型植物 DNA 提取试剂盒均购于 TIANGEN BIOTECH 公司; MultiScribe™ Reverse Transcriptase Kit 和 PowerSYBR® Green PCR Master Mix Kit 均购自 Applied Biosystems 公司。引物对 F-35SAkt/R-AktHsp 和 F-rdDwf/R-DwfHsp 及 Real-time PCR 分析相关引物均由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

### 1.2 方法

1.2.1 载体构建 以购自 Takara 公司的植物表达载体 pRI 201-AN (Code No. 3264) 为起始载体, 利用 *Nde* I 和 *Sal* I 对其进行双酶切, 同时以这 2 个酶双酶切人工合成的、两端含有 *Nde* I 和 *Sal* I 酶切位点的 *NsAKT1* 基因序列。分别胶回收上述两种酶切产物, 酶切产物依次经 T<sub>4</sub> DNA 连接酶连接和酶切验证后, 构建植物表达载体 pRI 201-35SAkt1 (图 1A)。利用 *Kpn* I 和 *Not* I 对植物表达载体 pRI 201-35SAkt1 进行双酶切; 利用 *Kpn* I 和 *Not* I 对植物表达载体 pRI 201-AN (Code No. 3264) 进行双酶切, 同时以这 2 个酶双酶切人工合成的、两端含有 *Kpn* I 和 *Not* I 酶切位点的 *AtDWF4* 基因表达元件。*AtDWF4* 基因表达元件由 *A. thaliana rd29A* 基因启动子、*A. thaliana DWF4* 基因及 *A. thaliana HSP* 基因终止序列 3 部分组成。分别胶回收上述两种酶切产物, 酶切产物依次经 T<sub>4</sub> DNA 连接酶连接和酶切验证后, 构建植物表达载体 pRI 201-rdDwf4 (图 1B)。以构建的 pRI 201-35SAkt1 为中间载体, 利用 *Kpn* I 和 *Not* I 将 *AtDWF4* 基因表达元件从植物表达载体 pRI 201-rdDwf4 切下并连接入 pRI 201-35SAkt1 中, 并最终构建构建植物表达载体 pRI 201-35SAkt1/rdDwf4 (图 1C)。

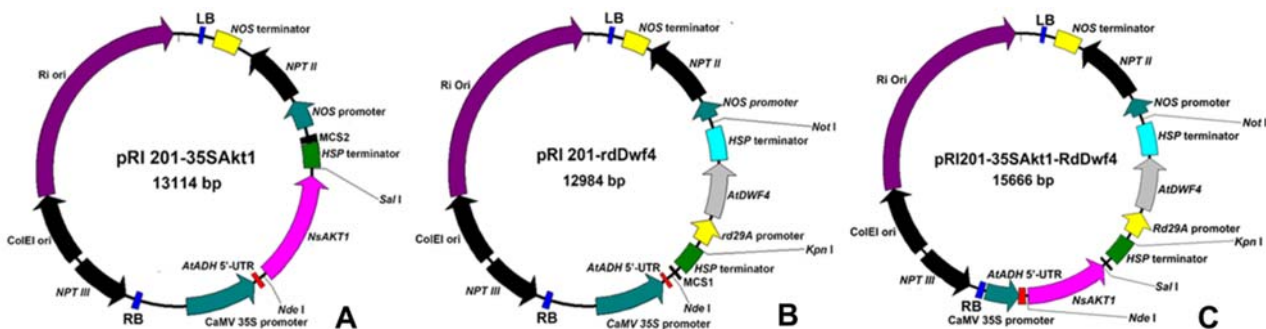


图 1 植物表达载体的构建

Fig. 1 Construction of plant expression vectors

1.2.2 烟草转化及转基因植株鉴定 参照农杆菌转化法<sup>[23]</sup>,以含 3 个质粒的工程农杆菌分别对栽培烟草 K326 进行遗传转化,按照谭颖等<sup>[24]</sup>的方法对侵染的叶块进行后续培养。提取抗性烟株总基因组并以其为模板,用特异性引物 F-201(5'-GACGGCCAGTGCCAAGCTTG-3')/R-Akt(5'-CCACACATAGAAACTCCTAAACTCC-3')和 F-Rd(5'-GGGCCAATAGACATGGACCGACTAC-3')/R-Dwf(5'-CCGAGTGTGTGGCGGTGTAC-3')对抗性植株进行 PCR 鉴定。F-201/R-Akt 引物扩增条件为:94 °C, 2 min; 94 °C, 30 s, 58 °C, 40 s, 72 °C, 1 min, 30 个循环; 72 °C, 5 min; 4 °C 维持。F-Rd/R-Dwf 引物扩增条件为:94 °C, 2 min; 94 °C, 20 s, 60 °C, 30 s, 72 °C, 1 min, 28 个循环; 72 °C, 5 min; 4 °C 维持。

1.2.3 转基因烟草 PEG 渗透胁迫处理 以稳定遗传的 T<sub>1</sub> 代转基因烟草和同批繁殖的非转基因烟草(K326)为材料,在 16 h 光照/28 °C 8 h 黑暗/23 °C 条件下萌发生长,待烟苗长至 6~8 叶期时,移栽至花盆(盆高 18 cm,直径 15 cm,每盆装培养基质 5 kg),置于温度为(25±2) °C,湿度 70%,光照为 1800 lx,光周期为 16 h 光照/8 h 黑暗的人工培养箱中恢复培养 5 d。参照张祎等<sup>[25]</sup>的方法以 20% PEG-6000 溶液处理 K326 及转基因烟苗,分别取 PEG-6000 处理前(0 d)及处理 1、3 和 5 d 的相同部位(自下向上第 4 叶)烟叶 1 g,液氮速冻后置于-80 °C 冰箱保存,用于测定烟叶中的抗氧化酶(antioxidant enzymes, AOE)活性;同时取

PEG-6000 胁迫处理前(0 d)及处理 6、12 和 24 h 的相同部位(自下向上第 5 叶)叶片 1 g,液氮速冻后置于-80 °C 冰箱保存,用于烟叶中 K<sup>+</sup>吸收及 BRs 合成相关基因表达分析。设 3 个生物学重复。

1.2.4 MDA 及 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量测定 以 PEG-6000 处理前(0 d)及处理 1、3 和 5 d 的叶片为材料,参照南京建成生物工程研究所丙二醛(MDA)测定试剂盒(TBA 法, A003-1-2)及 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 测定试剂盒(比色法, A064-1-1)方法制备待测样,分别于 532 和 405 nm 波长下测定吸光值,计算 MDA 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量。每组设 3 个生物学重复。

1.2.5 AOE 活性测定 参照南京建成生物工程研究所 POD(比色法, A084-3-1) SOD(WST-1 法, A001-3-2)和 CAT(可见光法, A007-1-1)酶活力测定试剂盒说明书操作制备待测样,待测样分别在 420、550 和 405 nm 波长下吸光值,计算 POD、SOD 和 CAT 酶活力。每组设 3 个生物学重复。

1.2.6 K<sup>+</sup>吸收及 BR 合成相关基因表达分析 分别取 PEG 胁迫处理前(0 h)和胁迫 6、12 和 24 h 的转基因与非转基因烟草相同部位叶片组织 0.1 g,按照 OMEGA Plant RNA Kit 试剂盒说明提取总 RNA,并按 Applied Biosystems 反转录操作将 RNA 反转录为 cDNA。使用美国 ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪检测转基因烟株叶片中 K<sup>+</sup>吸收相关基因,如 *HAK1*、*AKT1*、*NVP1* 和 *TORK1* 以及 BRs 合成相关基因(*DWF4*、*DET2*、*CPD* 和 *ROT3*)的相对表达量,以烟草 *β-Actin* 作为内参基因(表 1),每个样品设 3 个重复。

表 1 定量 PCR 引物序列  
Table 1 Primer sequences of quantitative PCR

基因 Genes	GenBank 登录号 Accession No.	引物序列(5'→3') Primer sequence(5'→3')
<i>β-Actin</i>	AB158612	GATCTTGCTGGTTCGTGATCT ACTTCCGGACATCTGAACCT
<i>HAK1</i>	DQ841950	ATCCACACCGAGCTTGTTCAGGA TGGGTCCAATTCTTCCACCAAGA
<i>TORK1</i>	AB196792	CACGCATACAGCAGCTTGCATCTT TCACCGTAAACCCACAGTTGCCATA
<i>NVP1</i>	X83730	GCTGGAGGAATAGCTGAGAT GTGATGGCAGAGAACCAGTA
<i>AKT1</i>	XM_009773746.1	GCCATCCGGTCAAGCATTTC GGATCAAGACCCCGCTTCAA
<i>DET2</i>	NM_001247111.2	CGGCAAACTACTACTTCCAGC GACCAGGTCATCAAAGCCCA
<i>CPD</i>	NM_120651.3	TTCTCAGCTGACCCGAAAC GAAAATCCATCATCCGCCGC
<i>ROT3</i>	NM_001342408.1	CGGAAAATCTCCCTTGGCCT GAGAACAAACCGAGCCTCAA
<i>DWF4</i>	AF044216.1	TCGACGGAGCAAATTCTCGA TTGGCTAGCTCTGAACACG

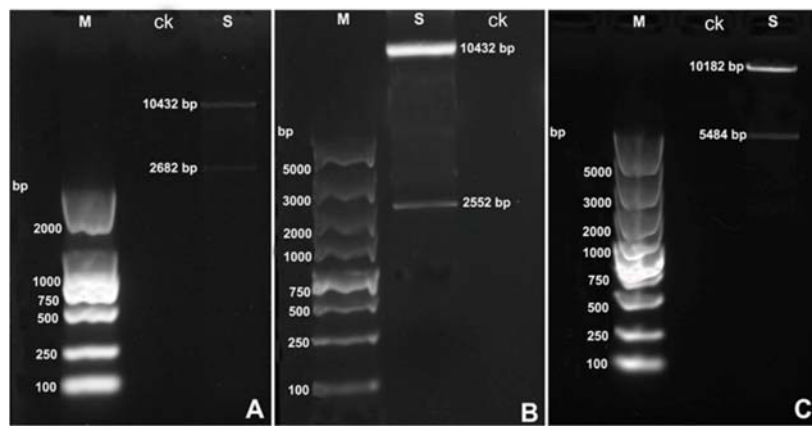
1.2.7 数据处理 采用 SPSS 18.0 软件进行数据处理, Duncan 法分析其差异显著性。

## 2 结果

### 2.1 植物表达载体的构建及酶切验证

构建了以 CaMV 35S 启动子驱动 *N. sylvestris* *AKT1* 表达 (*CaMV 35S::NsAKT1*) 的植物表达载体 pRI 201-35SAkt1, 以 *A. thaliana rd29A* 基因启动子启动 *A. thaliana DWF4* 基因 (*AtDWF4*) 表达 (*rd29A::AtDWF4*) 的植物表达载体 pRI

201-rdDwf4 和同时含有上述两个表达元件 (*CaMV::NsAKT1* 和 *rd29A::AtDWF4*) 的植物表达载体 pRI 201-35SAkt1/RdDwf4。pRI 201-35SAkt1 经 *Nde I/Sal I* 双酶切可产生 2682 bp 和 10 432 bp 两条带 (图 2A); pRI 201-rdDwf4 经 *Kpn I/Not I* 双酶切可产生 2552 bp 和 10 432 bp 两条带 (图 2B); pRI 201-35SAkt1-rdDwf4 经 *Nde I/Not I* 双酶切后可产生 5484 bp 和 10 182 bp 两条带 (图 2C)。说明目标片段已经整合到质粒载体中。



注: A, pRI 201-35SAkt1 双酶切; B, pRI 201-rdDwf4 双酶切; C, pRI 201-35SAkt1-rdDwf4 双酶切; M, DNA 分子量标准; ck, 对照; S, 样品。

Note: A, double digests of pRI 201-35SAkt1; B, double digests of pRI 201-rdDwf4; C, double digests of pRI 201-35SAkt1-rdDwf4; M, DNA marker; ck, control; S, sample.

图 2 植物表达载体酶切验证

Fig. 2 Enzyme validation of plant expression vectors

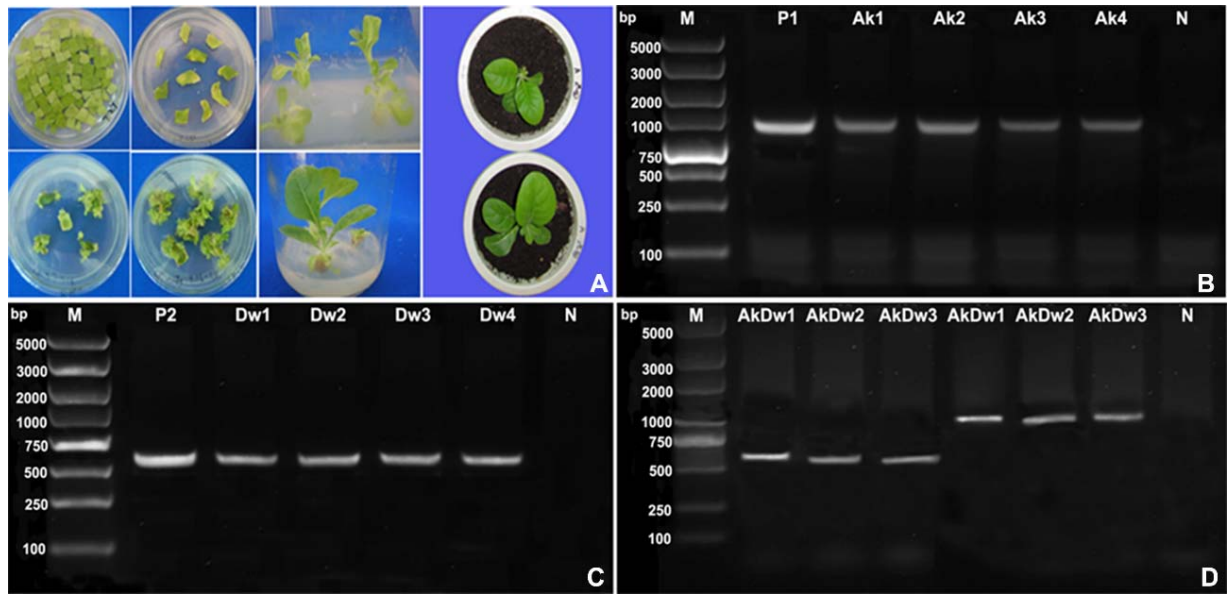
### 2.2 转基因烟株获得及 PCR 鉴定

分别以含有 pRI201-35SAkt1、pRI201-rdDwf4 以及 pRI201-35SAkt1-rdDwf4 质粒的工程农杆菌对 K326 叶片进行遗传转化, 经一系列培养后获得抗性植株 (图 3A)。剪取抗性烟株叶片 0.1 g 提取总 DNA, 以特异性引物 F-201/R-Akt 对转 pRI201-35SAkt1 载体的烟株进行鉴定, 可扩增产生 993 bp 大小的特异性条带 (图 3B); 以引物 F-Rd/R-Dwf 对转 pRI201-rdDwf4 载体的烟株进行鉴定, 可扩增产生 554 bp 大小的特异性条带 (图 3C); 而共转植株可同时扩增到 993 bp 和 554 bp 两条特异带 (图 3D)。最终, 鉴定到单转 *NsAKT1* 植株 56 株, 单转 *AtDWF4* 植株 42 株, 共转 *NsAKT1/AtDWF4* 植株 38 株。

### 2.3 PEG 胁迫对转基因烟草生长的影响

PEG 胁迫试验表明, 3~5 叶期转基因和非转基因 (Wt) 植株经 PEG 胁迫 3 d 后, 单转 *AtDWF4* 植株 (Dw) 和单转 *NsAKT1* 植株 (Ak) 均出现了不同程度的萎蔫, 而共转 *NsAKT1/AtDWF4* 的烟株 (Ak/Dw) 仅少数叶片出现萎蔫, Wt 叶片完全萎蔫、变黄 (图 4A); 6~8 叶期的转基因烟苗对 PEG 胁迫均表现出一定的抗性, 但在胁迫处理 10 d 时, 单转植株 (Ak 和 Dw) 的萎蔫程度显著高于 Ak/Dw 植株, 而 Wt 植株在处理 10 d 时叶片 (完全展叶和心叶) 完全萎蔫, 且下部叶片变为焦枯色 (图 4B), 说明无论是 3~5 叶期的小烟苗, 还是 6~8 叶期的大烟苗, Ak/Dw 植株都表现出较强的耐旱性。可见共转 *NsAKT1/AtDWF4* 植株耐旱性高于单转 *AtDWF4* 植株, 高于单转 *NsAKT1* 植株。



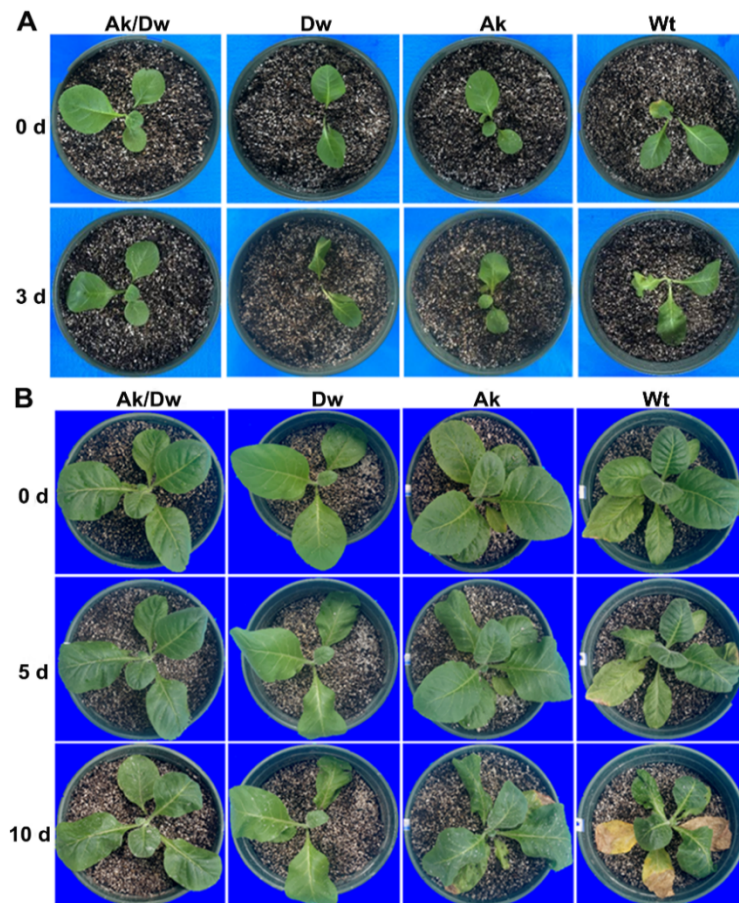


注：A，烟草遗传转化；B、C 和 D，不同转基因烟草 PCR 鉴定；M，DNA 分子量标准；P1~P2，阳性对照；N，阴性对照；Ak1~Ak4，*NsAKT1* 烟草株系；Dw1~Dw4，*AtDWF4* 烟草株系；AkDw1~AkDw3，*NsAKT1/AtDWF4* 烟草株系。

Note: A, tobacco genetic transformation; B, C and D, PCR identification of different transgenic tobacco; P1-P2, positive control; N, negative control; Ak1~Ak4, tobacco lines contained *NsAKT1*; Dw1~Dw4, tobacco lines contained *AtDWF4*; AkDw1~AkDw3, tobacco lines contained *NsAKT1* and *AtDWF4*.

图 3 烟草遗传转化及转基因植株鉴定

Fig. 3 Genetic transformation and identification of transgenic plants in tobacco



注：A，3~5 叶期烟苗；B，6~8 叶期烟苗。Ak，*NsAKT* 烟草；Dw，*AtDWF4* 烟草；Ak/Dw，*NsAKT/AtDWF4* 烟草；Wt，非转基因烟草；下同。

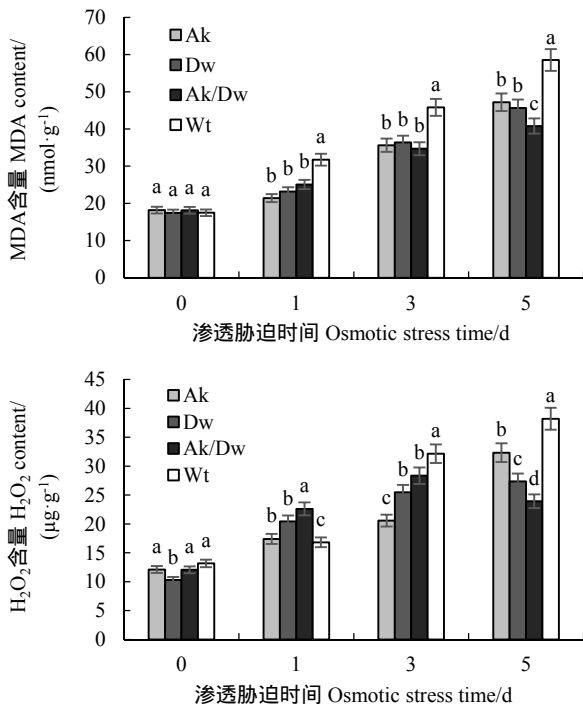
Note: A, tobacco seedlings at 3-5 leaf stage; B, tobacco seedlings at 6-8 leaf stage; Ak, *NsAKT*-contained tobaccos; Dw, *AtDWF4*-contained tobaccos; Ak/Dw, *NsAKT/AtDWF4*-contained tobaccos; Wt, non-transgenic tobaccos; the same below.

图 4 不同叶龄烟苗对 PEG 渗透胁迫的抗旱性比较

Fig. 4 Comparison of the resistance of tobacco seedlings of different leaf ages to drought stress

2.4 PEG 胁迫对不同烟株理化指标的影响

2.4.1 PEG 胁迫对 MDA 及 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量的影响 由图 5 可以看出,PEG 胁迫处理前,转基因和非转基因烟株 MDA 含量差异不显著。在胁迫 1~5 d 时,非转基因烟草 MDA 含量始终显著高于转基因烟草,说明 PEG 胁迫可引起非转基因烟株 MDA 的显著积累。在 PEG 处理第 5 天时,Ak/Dw 植株 MDA 含量显著低于 Ak 植株、Dw 植株和 Wt 植株,表明其在应答 PEG 渗透胁迫时,Ak/Dw 植株能更有效地降低脂膜氧化产物 MDA 的积累,进而保护植物细胞。在 PEG 胁迫处理前,Dw 植株 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量显著低于其他 3 种植株,但 PEG 渗透胁迫 1 d 时,Dw 烟草中的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 迅速积累且增幅仅次于 Ak/Dw 植株。在 PEG 渗透胁迫 1 d 时,转基因植株中 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量增幅均显著高于非转基因植株。胁迫处理 3 d 和 5 d,非转基因烟草中 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量始终显著 ( $p < 0.05$ ) 高于转基因植株。在 PEG 渗透胁迫 5 d 时,除 Ak/Dw 植株 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量降低外,Ak 和 Wt 植株 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量增幅均高于 Dw 植株。这一现象说明,不同转基因植株应答 PEG 渗透胁迫时引起植物体积 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的能



注:图中不同小写字母代表在  $p < 0.05$  条件下的差异显著性。下同。

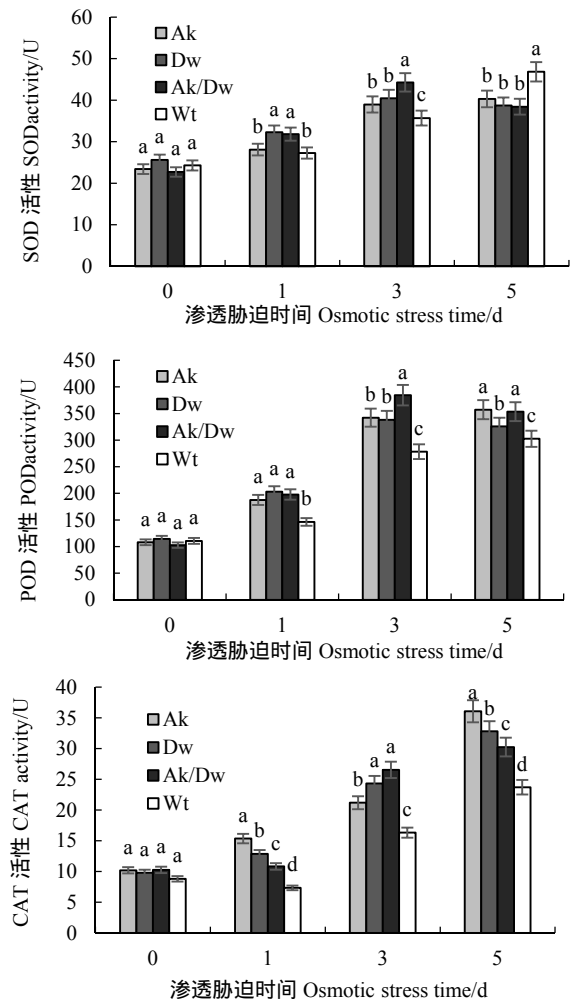
Note: Different lowercase letters in the figure indicate significant difference at  $p < 0.05$ . The same below.

图 5 PEG 胁迫时间对烟草叶片 MDA 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量变化的影响

Fig. 5 Effects of drought stress time on MDA and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> contents in different tobacco leaves

力不同,进而反映出植株所受 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化程度也各异。

2.4.2 PEG 胁迫对 AOEs 活性的影响 胁迫处理前,转基因与非转基因植株 AOEs 活性无显著差异(图 6)。在胁迫 3 d 时,转基因烟草的 SOD 活性均显著高于非转基因烟草,其中以共转 AKT1/DWF4 烟株的最高,达 44.28 U,其次是单转 DWF4 植株,为 40.45 U。同时,在 PEG 处理第 3 天时,单转 DWF4



注: SOD, 在黄嘌呤氧化酶耦联反应体系中抑制百分率为 50% 时,反应体系中的 SOD 酶活力定义为一个酶活力单位 (1 U); POD, 以每克组织在每毫升反应体系中每分钟 A<sub>470</sub> 变化 0.01 为一个酶活力单位 (1 U); CAT, 以每克组织每分钟催化 1nmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 降解定义为一个酶活力单位 (1 U)。

Note: SOD, when the inhibition rate of xanthine oxidase coupling reaction system is 50%, the SOD activity in the reaction system is defined as an enzyme activity unit (1 U); POD, the change of A<sub>470</sub> per minute per gram of tissue in the reaction system per milliliter was 0.01 as a unit of enzyme activity (1 U); CAT, 1 nmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> degradation per gram of tissue per minute was defined as an enzyme activity unit (1 U).

图 6 PEG 胁迫时间对烟草植株 AOEs 活性的影响

Fig. 6 Effects of drought stress time on AOEs activity of tobacco plants

和共转 *AKT1/DWF4* 烟株的 POD 活性达到极值, 分别为 338.16 和 384.37 U。4 种烟草株系 CAT 活性总体上表现为持续增加的变化趋势, 但增幅有一定差异。在 PEG 胁迫处理第 3 天时, 共转 *AKT1/DWF4* 植株 CAT 活性增幅最大, 较胁迫处理 1 d 时增加 59.18%, 其余 2 种转基因植株 CAT 活性增幅也较非转基因植株显著。以上结果表明, 转基因植株能有效并迅速地提高 AOE 的活性来消除由于 PEG 渗透胁迫引起的  $H_2O_2$ 、 $O_2^{\cdot -}$  等过氧化物的积累, 且不同转基因植株表现出调动 AOE 活性存在一定差异。

### 2.5 PEG 胁迫烟草植株 $K^+$ 吸收及 BRs 合成基因表的影响

**2.5.1  $K^+$  吸收相关基因表达** 由图 7 可见, 在 PEG 渗透胁迫 24 h 内, Ak、Dw 和 Ak/Dw 植株 *HAK1* 基因表达量不断增加, 但以 Dw 植株增幅最为显著。*AKT1* 基因在 Ak 和 Ak/Dw 植株中也呈逐步上升趋势, 且一直显著高于 Dw 和 Wt 植株, 这可能与 *AKT1* 在 Ak 和 Ak/Dw 植株中的超量表达有关。在 PEG 渗透胁迫 6 h 时, 转基因烟株中 *NVPI* 表达量显著高于 Wt 植株, 随着胁迫时间的增加, 仅 Ak/Dw 植株中的 *NVPI* 表达量始终显著高于 Wt 植株。*TROK1* 在转基因植株中表达变化与 *HAK1* 基本相似, 但表达量增幅有一定差异, 以 Ak 植株最高, Ak/Dw 其次, Dw 植株最低。进一步分析发现, PEG 渗透胁迫不仅诱导 Dw 植株 *HAK1* 基因的表达上调, 同时也引起 Ak 和 Ak/Dw 植株中 *AKT1* 的表达量增加, 而 *HAK1* 和 *AKT1* 在调控植物应答低钾等非生物胁迫抗性中具有重要作用; 另外, PEG 渗透胁迫还使 Ak 和 Ak/Dw 植株中 *TROK1* 基因显著上调表达, 推测转基因植株在应答 PEG 介导的渗透胁迫时, 一方面通过调节  $K^+$  富集相关基因的表达实现对  $K^+$  的吸收以提高  $K^+$  介导的抗旱应答胁迫能力; 另一方面, 为了维持植物内  $K^+$  含量稳定,  $K^+$  外排通道随即启动以平衡机体内的钾含量。

**2.5.2 BRs 合成相关基因表达** 由图 8 可以看出, PEG 渗透胁迫 24 h 内 *DWF4* 基因在 Dw 和 Ak/Dw 植株中的表达量始终显著高于 Ak 和 Wt 植株, 且在胁迫 12 h 时 Dw 植株中 *DWF4* 基因的表达量最高, 显著高于其他烟草植株。在 PEG 胁迫 6~12 h 内, Dw 和 Ak/Dw 植株中的 *DET2* 基因表达量均显著高

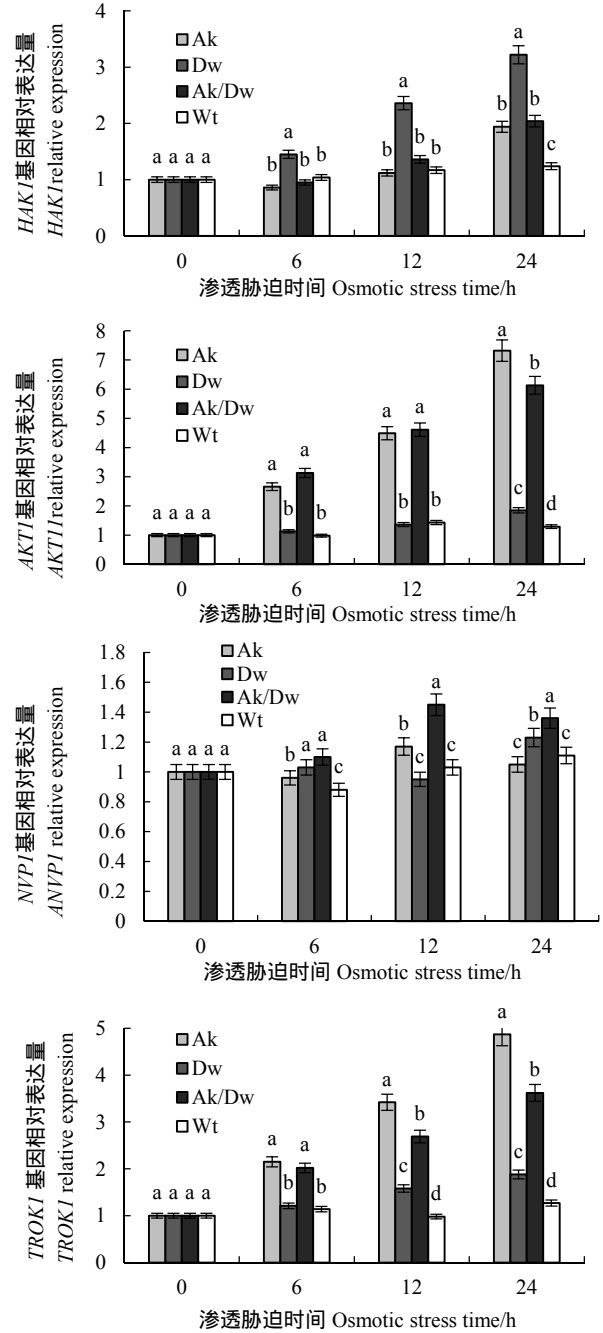


图 7 PEG 胁迫对不同烟草植株  $K^+$  吸收相关基因表达的影响  
Fig. 7 Effects of drought stress on  $K^+$  uptake related gene expression in different tobacco plants

于 Ak 和 Wt 植株, 且二者间也存在显著差异, 而在 PEG 胁迫 24 h 时 *DET2* 在 Ak/Dw 和 Dw 植株中的表达差异不显著。渗透胁迫后, *CPD* 在转基因烟草中表达趋势一致, 即随着胁迫时间增加, *CPD* 表达量逐渐增强, 但不同转基因植株中的增幅有一定差异, 始终在 Ak/Dw 植株中的表达量最高。除 Dw 植株外, 在 PEG 胁迫 6~12 h 内, *ROT3* 在 Ak、

Ak/Dw 和 Wt 植株中的表达量无显著差异,但在胁迫处理 24 h 时, Ak/Dw 中 *ROT3* 表达量迅速上调,显著高于 Dw、Ak 和 Wt 植株。*DWF4* 作为 BRs 生物合成中的关键限速基因,其表达量的高低直接影响下游基因的表达。本研究中 PEG 渗透胁迫引起了 Dw 和 Ak/Dw 植株中 *DWF4* 在 6 h 时即出现显著表

达,暗示这两类转基因植株可通过迅速调控 BRs 的合成以启动 BRs 介导的抗性信号通路的表达。同时,在胁迫处理后期(24 h) Ak/Dw 植株中 BRs 合成中下游基因 *DET2*、*CPD* 和 *ROT3* 的高表达也表明,在应答 PEG 渗透胁迫时 Ak/Dw 植株内积累更多的 BRs。

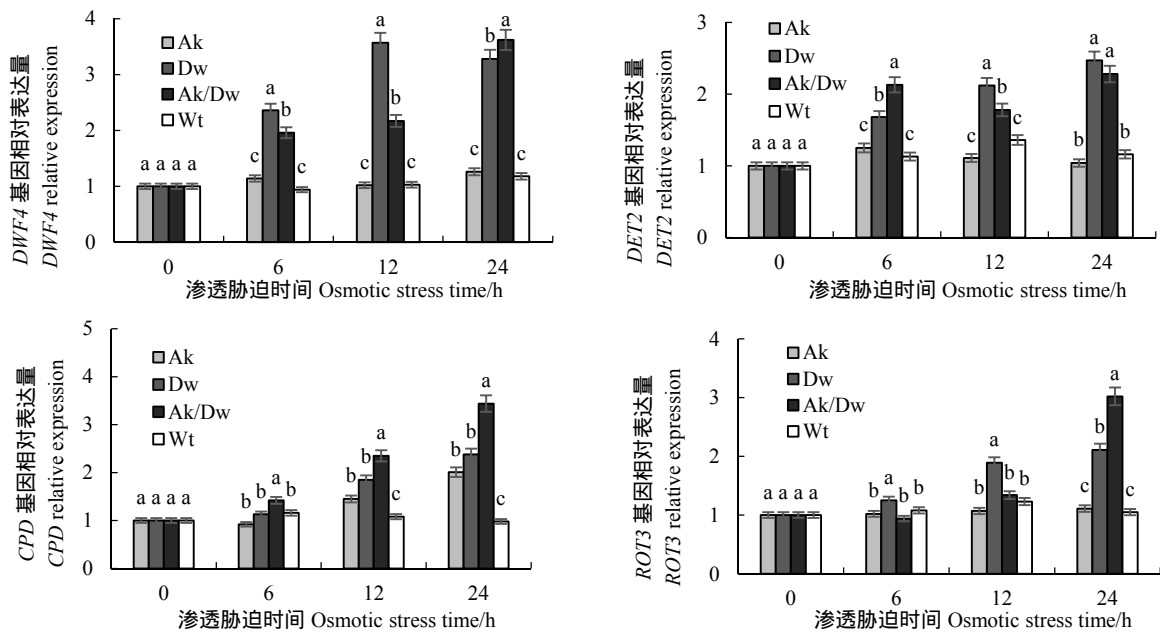


图 8 PEG 胁迫对不同烟草植株 BRs 合成相关基因表达的影响

Fig. 8 Effects of drought stress on the expression of genes related to BRs synthesis in different tobacco plants

### 3 讨论

在植物中, K 作为重要的渗透物质和电荷载体不仅参与了细胞生长、气孔开闭以及内稳态平衡等多种生命活动<sup>[26]</sup>,而且在多种生物胁迫( biotic stress )与非生物胁迫( abiotic stress )抗性中具有十分重要的作用<sup>[27-29]</sup>。植物从外界吸收  $K^+$  主要依赖于  $K^+$  通道蛋白和  $K^+$  转运体两类系统<sup>[30]</sup>, *AKT1* 是从 *A. thaliana* 突变体中鉴定到的一种耐低钾( 10  $\mu\text{mol/L}$  )及非生物胁迫的重要  $K^+$  通道蛋白<sup>[31-32]</sup>。此外, BRs 是从油菜( *Brassica napus* )花粉中分离的一种植物类固醇激素( steroid hormone )<sup>[33]</sup>, 在调节植物生长发育和逆境胁迫中也具有重要作用<sup>[34-37]</sup>。*DWF4* 可编码 *A. thaliana* 细胞色素 P450( cytochrome P450 ), 该蛋白是 BRs 生物合成中的关键限速酶, 介导 BRs 生物合成过程中的多个 22 $\alpha$ - 羟基化( 22 $\alpha$ -hydroxylation )步骤<sup>[38-39]</sup>。本文结果表明, 无论是 3~5 叶期的共转 *NsAKT1* 和 *AtDWF4* 的小烟

苗, 还是 6~8 叶期的大烟苗都表现出对 PEG 渗透胁迫一定的抗性, 说明 *NsAKT1* 和 *AtDWF4* 的共同导入能明显增强转基因烟草的耐旱能力。产生这一现象原因可能包括 2 个方面, 其一是 *NsAKT1* 的超量表达引起了 K 含量的迅速积累, 同时激活了由 K 介导的抗非生物胁迫应答<sup>[40]</sup>; 其二是 *AtDWF4* 的过表达也可能引起了转基因烟草中 BRs 含量增加, 故转基因植株在应答渗透胁迫时能迅速调动 BRs 介导的抗逆境通路基因的表达来提高作物的耐旱能力<sup>[41]</sup>。

PEG 渗透胁迫引起了各烟草植株中  $\text{H}_2\text{O}_2$  不同程度的积累, 但在胁迫处理 3 d 和 5 d 时, 非转基因烟草中  $\text{H}_2\text{O}_2$  含量始终显著(  $p < 0.05$  )高于转基因植株, 且在胁迫处理第 5 天时  $\text{H}_2\text{O}_2$  含量比共转 *NsAKT1* 和 *AtDWF4* 植株高 37.4%; 另外,  $\text{H}_2\text{O}_2$  的逐渐积累引起了植株细胞脂膜不断氧化产生 MDA, 但非转基因植株中 MDA 的积累量却显著(  $p < 0.05$  )



高于转基因植株。说明转基因植株能有效降低 PEG 渗透胁迫所引起的过氧化物 ( $H_2O_2$ ) 及其氧化产物 (MDA) 的积累, 从而减少植物细胞损害。YU 等<sup>[42]</sup>报道了转细菌冷休克蛋白 (bacterial cold shock protein) 基因 *SeCspA* 的小麦可通过降低 MDA 含量、失水率等指标提高抗旱能力; 张祎等<sup>[25]</sup>研究超量表达 *NtHAK1* 烟草时也发现其应答干旱胁迫时 MDA 含量显著低于非转基因植株。AOEs 活性测定结果表明, 在 PEG 胁迫前 3 d, 转基因烟草的 SOD、POD 和 CAT 活性始终高于非转基因植株, 但不同烟草株系抗氧化酶活性有一定差异。在 PEG 胁迫第 5 天时, 除 SOD 外, 转基因植株中其余两种酶活性仍显著 ( $p < 0.05$ ) 高于非转基因植株, 这与 GAO 等<sup>[43]</sup>的研究结果一致。说明转基因植株应答 PEG 渗透胁迫时, 能够迅速调动机体的抗氧化酶系统 (antioxidase system) 对过量积累的  $O_2^{\cdot-}$ 、 $H_2O_2$  等进行有效的清除。同时, 在转基因植株中较低的  $H_2O_2$  含量证明高 AOEs 活性实现了  $H_2O_2$  的还原, 从而起到保护植物的作用。

在 PEG 胁迫的单转 *NsAKT1* 和共转 *NsAKT1/AtDWF4* 植株中同时检测到了较高的 *AKT1* 和 *TORK1* 表达, 推测 *AKT1* 基因的高表达可能会引起植物中  $K^+$  的大量积累, 植物体通过调节 *TORK1* 的表达增强过剩  $K^+$  的外排, 以稳定细胞内正常的钾素平衡<sup>[44]</sup>, 这一结果与谭颖等<sup>[24]</sup>研究 *NtHAK1* 超量表达引起 *TORK1* 基因上调的结果类似。同时, PEG 渗透胁迫还引起了 BRs 合成相关基因 *DWF4*、*DET2*、*CPD* 和 *ROT3* 的差异表达。这些基因在单转 *AtDWF4* 烟草和共转 *NsAKT1* 和 *AtDWF4* 烟草中的高表达引起了 BRs 的迅速积累, 从而提高植物的抗旱性。这是由于 BRs 一方面可通过促进可溶性蛋白和渗透调节物的积累及水分和气体交换提高作物对干旱的耐受性<sup>[45-46]</sup>, 另一方面可以通过与其他植物激素 (如 ABA 和 ET) 或信号通路 (如 SA pathway) 互作来影响植物的抗旱性<sup>[47]</sup>。与单转 *NsAKT1* 和 *AtDWF4* 烟草相比, PEG 渗透胁迫引起了共转 *NsAKT1* 和 *AtDWF4* 烟草中 4 个 BRs 合成关键基因 *DWF4*、*DET2*、*ROT3* 和 *CPD* 显著上调, 表明共转烟草应答渗透胁迫时引起了 BRs 积累。

## 4 结 论

超量共表达 *N. sylvestris AKT1* 和 *A. thaliana DWF4* 能显著增强转基因植株对 PEG 渗透胁迫的抗性, 共转 *NsAKT1/AtDWF4* 烟草比单转 *NsAKT1*、单转 *AtDWF4* 以及非转基因植株 (Wt) 表现出高 AOEs (SOD、POD 和 CAT) 酶活性以及 MDA 和  $H_2O_2$  含量的降低, 且可通过协同调控  $K^+$  吸收及 BRs 合成相关基因的表达实现转基因植株对渗透胁迫的应答。本研究可为培育富钾、耐旱烟草新种质提供理想的亲本材料。

## 参考文献

- [1] MARON L. Phospholipids: novel players in the complex regulation of potassium channels in plants[J]. The Plant Journal, 2020, 102(4): 647-648.
- [2] WHITE, PHILIP J, KARLEY, ALISON J. Potassium[J]. Plant Cell Monographs, 2010, 17:199-224.
- [3] YAMAMOTO T, UMEMURA S, KANEKO H. Effect of exogenous potassium on the reduction in tar, nicotine and carbon monoxide deliveries in the mainstream smoke of cigarettes[J]. Beiträge zur Tabakforschung International/Contributions to Tobacco Research, 2013, 14(6): 379-385.
- [4] 曲平治, 刘贯山, 刘好宝, 等. 烟草钾离子通道研究展[J]. 中国烟草科学, 2009, 30(2): 74-80.
- [5] QU Z P, LIU G S, LIU H B, et al. Research advances in tobacco potassium ion channel[J]. Chinese Tobacco Science, 2009, 30(2): 74-80.
- [6] SZCZERBA M W, BRITTO D T, KRONZUCKER H J.  $K^+$  transport in plants: physiology and molecular biology[J]. Journal of Plant Physiology, 2009, 166(5): 447-466.
- [7] VÉRY A A, SENTENAC H. Molecular mechanisms and regulation of  $K^+$  transport in higher plants[J]. Annual Review of Plant Biology, 2003, 54(1): 575-603.
- [8] SANCHEZ-BARRENA M J, CHAVES-SANJUAN A, RADDATZ N, et al. Recognition and activation of the plant *AKT1* potassium channel by the kinase CIPK23[J]. Plant physiology, 2020, 182(4): 19.01084.
- [9] GAMBALE F, UOZUMI N. Properties of shaker-type potassium channels in higher plants[J]. The Journal of Membrane Biology, 2006, 210(1): 1-19.
- [10] LI J, WU W, WANG Y. Potassium channel *AKT1* is involved in the auxin-mediated root growth inhibition in *Arabidopsis* response to low  $K^+$  stress[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2017, 59(12): 895-909.
- [11] FUCHS I, STOLZLE S, IVASHIKINA N, et al. Rice  $K^+$  uptake channel OsAKT1 is sensitive to salt stress[J]. Planta, 2004, 221(2): 212-221.
- [12] AHMAD I, MIAN A, MAATHUIS F J. Overexpression of the rice *AKT1* potassium channel affects potassium nutrition and rice drought tolerance[J]. Journal of Experimental Botany, 2016, 67(9): 2689-2698.
- [13] PELEG Z, BLUMWALD E. Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2011, 14(3): 290-295.
- [14] KUMAR P P. Regulation of biotic and abiotic stress responses by plant hormones[J]. Plant Cell Reports, 2013, 32(7): 943.
- [15] VERMA V, RAVINDRAN P, KUMAR P P. Plant hormone-mediated regulation of stress responses[J]. BMC Plant Biology, 2016, 16(1): 86-96.

- [15] LIAQAT S, UMAR S, SAFFEULLAH P, et al. Protective effect of 24-Epibrassinolide on barley plants growing under combined stress of salinity and potassium deficiency[J]. Journal of Plant Growth Regulation, 2020: 1-16.
- [16] NOLAN T, VUKASINOVIC N, LIU D, et al. Brassinosteroids: multidimensional regulators of plant growth, development, and stress responses[J]. The Plant Cell, 2020, 32(2): 295-318.
- [17] SAKAGUCHI J, MATSUSHITA T, WATANABE Y. DWARF4 accumulation in root tips is enhanced via blue light perception by cryptochromes[J]. Plant, Cell&Environment, 2019, 42(5): 1615-1629.
- [18] ZHAO B L, LI J. Regulation of brassinosteroid biosynthesis and inactivation[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2012, 54(10): 746-759.
- [19] SI J, SUN Y, WANG L, et al. Functional analyses of *Populus euphratica* brassinosteroid biosynthesis enzyme genes *DWF4* (*PeDWF4*) and *CPD* (*PeCPD*) in the regulation of growth and development of *Arabidopsis thaliana*[J]. Journal of Biosciences, 2016, 41(4):727-742.
- [20] SAHNI S, PRASAD B D, LIU Q, et al. Overexpression of the brassinosteroid biosynthetic gene *DWF4* in *Brassica napus* simultaneously increases seed yield and stress tolerance[J]. Scientific Reports, 2016, 6(1): 28298.
- [21] REN C, HAN C, PENG W, et al. A leaky mutation in *DWARF4* reveals an antagonistic role of brassinosteroid in the inhibition of root growth by jasmonate in *Arabidopsis*[J]. Plant physiology, 2009, 151(3): 1412-1420.
- [22] LI X J, CHEN X J, GUO X, et al. *DWARF* overexpression induces alteration in phytohormone homeostasis, development, architecture and carotenoid accumulation in tomato[J]. Plant Biotechnology Journal, 2016, 14(3): 1021-1033.
- [23] HUDZIECZEKA V, CEGANA R, CERMAK T, et al. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of a dioecious plant model *Silene latifolia*[J]. New Biotechnology, 2019, 48: 20-28.
- [24] 谭颖, 秦利军, 赵丹, 等. 共转化法获得 *HAK1* 基因高表达烟草提高植株钾吸收能力[J]. 植物生理学报, 2013, 49(7) : 689-699.
- TAN Y, QIN L J, ZHAO D, et al. The overexpression of *HAK1* gene improved the absorbing ability for potassium in transgenic tobacco by co-transformation method[J]. Plant Physiology Journal, 2013, 49(7): 689-699.
- [25] 张祎, 秦利军, 赵丹, 等. 超量表达 *NtHAK1* 基因提高烟草干旱胁迫能力[J]. 植物生理学报, 2017, 53(8) : 1444-1452.
- ZHANG Y, QIN L J, ZHAO D, et al. Improvement of drought-stress in *NtHAK1*-overexpressing *Nicotiana tabacum*[J]. Plant Physiology Journal, 2017, 53(8): 1444-1452.
- [26] 郭兆奎, 杨谦, 姚泉洪, 等. 转拟南芥 *AtNHX1* 基因促进烟草对钾吸收的研究[J]. 高技术通讯, 2007(17) : 1174-1179.
- GUO Z K, YANG Q, YAO H Q, et al. Transgenic tobacco of *Arabidopsis thaliana AtNHX1* promotes plant potassium uptake[J]. Chinese High Technology Letters, 2007(17): 1174-1179.
- [27] WANG M, ZHENG Q, SHEN Q, et al. The critical role of potassium in plant stress response[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2013, 14: 7370-7390.
- [28] SONG W, LIU S, MENG L, et al. Potassium deficiency inhibits lateral root development in tobacco seedlings by changing auxin distribution[J]. Plant and Soil, 2015, 396(1): 163-173.
- [29] SHABALA S, CUIN T A. Potassium transport and plant salt tolerance[J]. Physiologia Plantarum, 2008, 133(4): 651-669.
- [30] 库文珍, 赵运林, 董萌. 植物 Shaker K<sup>+</sup>通道的研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2012, 32(10) : 112-118.
- KU W Z, ZHAO Y L, DONG M. Advances on shaker-type K<sup>+</sup> channels in plants[J]. China Biotechnology, 2012, 32(10): 112-118.
- [31] HIRSCH R E, LEWIS B D, SPALDING E P, et al. A role for the AKT1 potassium channel in plant nutrition[J]. Science, 1998, 280(5365): 918-921.
- [32] PILOT G, GAYMARD F, MOULINE K, et al. Regulated expression of *Arabidopsis* Shaker K<sup>+</sup> channel genes involved in K<sup>+</sup> uptake and distribution in the plant[J]. Plant Molecular Biology, 2003, 51: 773-787.
- [33] GROVE M D, SPENCER G F, ROHWEDDER W K, et al. Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen[J]. Nature, 1979, 281(5728): 216-217
- [34] CLOUSE S D, SASSE J. Brassinosteroids: essential regulators of plant growth and development[J]. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1998, 49: 427-451
- [35] TANVEER M, SHAHZAD B, SHARMA A. 24-Epibrassinolide; an active brassinolide and its role in salt stress tolerance in plants: a review[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2018, 130: 69-79.
- [36] DENG X, ZHU T, ZHANG D, et al. The alternative respiratory pathway is involved in brassinosteroid-induced environmental stress tolerance in *Nicotiana benthamiana*[J]. Journal of Experimental Botany, 66(20): 6219-6232.
- [37] FARIDUDDIN Q, YUSUF M, AHMAD I, et al. Brassinosteroids and their role in response of plants to abiotic stresses[J]. Biologia Plantarum, 2014, 58(1): 9-17.
- [38] CHO E, DILKES B P, FUJIOKA S. The *DWF4* gene of *Arabidopsis* encodes a cytochrome P450 that mediates multiple 22 $\alpha$ -hydroxylation steps in brassinosteroid biosynthesis[J]. The Plant Cell, 1998, 10(2): 231-243
- [39] KVASNICA M, OKLESTKOVA J, BAZGIER V, et al. Biological activities of new monohydroxylated brassinosteroid analogues with a carboxylic group in the side chain[J]. Steroids, 2014, 85: 58-64.
- [40] HASANUZZAMAN M, BORHANUDDIN BHUYAN M H M, NAHAR K, et al. Potassium: a vital regulator of plant responses and tolerance to abiotic stresses[J]. Agronomy, 2018, 8: 31-60.
- [41] NOLAN T, CHEN J, YIN Y. Cross-talk of Brassinosteroid signaling in controlling growth and stress responses[J]. Biochemical Journal, 2017, 474(16): 2641-2661.
- [42] YU T F, XU Z S, GUO J K, et al. Improved drought tolerance in wheat plants overexpressing a synthetic bacterial cold shock protein gene *SeCspA*[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 1-14.
- [43] GAO S, WANG Y, YU S, et al. Effects of drought stress on growth, physiology and secondary metabolites of two *Adonis* species in Northeast China[J]. Scientia Horticulturae, 2020, 259(3): 259-269.
- [44] IVASHIKINA N, BECKER D, ACHE P, et al. K<sup>+</sup> channel profile and electrical properties of *Arabidopsis* root hairs[J]. FEBS Letters, 2001, 508(3): 463-469.
- [45] TALAAT N B, ABDALLAH A M. Effect of 28-homobrassinolide and 24-epibrassinolide on the growth, productivity and nutritional value of two faba bean (*Vicia faba L.*) cultivars[J]. Archives of Agronomy and Soil Science, 2010, 56(6): 649-669.
- [46] FAROOQ M, WAHID A, BASRA S M A, et al. Improving water relations and gas exchange with brassinosteroids in rice under drought stress[J]. Journal of Agronomy and Crop Science, 2009, 195(4): 262-269.
- [47] DIVI U K, RAHMAN T, KRISHNA P. Brassinosteroid-mediated stress tolerance in *Arabidopsis* shows interactions with abscisic acid, ethylene and salicylic acid pathways[J]. BMC Plant Biology, 2010, 10: 151-156.