过量表达 pAPX 基因提高水稻对镉胁迫的耐性*

段苏然[1,2]　施卫明[2†]　王俊儒[1]
(1 西北农林科技大学生命科学学院,陕西杨凌　712100)
(2 土壤与农业可持续发展国家重点实验室(中国科学院南京土壤研究所),南京　210008)

摘　要　研究了编码大麦 pAPX 的基因 *HvAPX1* 导入水稻并过量表达后,转 pAPX 水稻在镉胁迫下的生长状况、生理指标及镉含量。结果发现,由于 pAPX 基因的过量表达,转基因植株的根系伸长量、生物量、叶绿素含量以及 APX 活性都明显高于野生型植株。与野生型植株相比,转基因水稻对镉胁迫具有明显的耐性。伴随对镉胁迫耐性的提高,转 pAPX 水稻对镉的累积量也同时提高。

关键词　镉胁迫;抗坏血酸过氧化物酶;环境胁迫;基因过量表达;转基因水稻
中图分类号　S154.4　　**文献标识码**　A

在重金属镉胁迫下,植物体产生大量的活性氧自由基,导致细胞膜脂过氧化,生理代谢紊乱,而植物体内的抗氧化酶能在一定程度上清除活性氧自由基,降低细胞的受伤害程度[1]。因此,导入外源基因提高植物清除超氧自由基的能力,有助于提高植物对镉的耐性。Schützendübel 的研究证明镉可通过 H_2O_2 积累影响细胞内的氧化还原调控,从而诱发植物产生防御或导致细胞死亡[2]。APX(抗坏血酸过氧化物酶)是活性氧清除系统中的一种重要酶,它以抗坏血酸为底物,催化过氧化氢还原为水。已知 APX 分布在植物细胞内的不同细胞器中,如细胞质 APX(cAPX)、叶绿体中的基质 APX (sAPX)和类囊体 APX(tAPX),微体(包括乙醛酸循环体和过氧化物体) APX(pAPX),线粒体 APX(mAPX)[3]。pAPX 是定位于过氧化物体膜上的 APX,作为过氧化物体上的跨膜蛋白,pAPX 的 N 端活性区域位于细胞质一侧,因此,pAPX 既可清除由过氧化物体外渗到细胞质的 H_2O_2,又可清除细胞质中产生的 H_2O_2[4]。已有研究证实在不同化学或环境压力下,pAPX 基因的表达水平会升高[5,6]。*HvAPX1* 是编码大麦 pAPX 的基因,施卫明等将大麦 pAPX 导入拟南芥,发现 pAPX 的过量表达可提高拟南芥的耐高温能力[5]。因此,本研究将 *HvAPX1* 基因导入水稻,获得相应的转基因植株,以探讨超氧自由基与植物镉胁迫耐性的关系。

1　材料与方法

1.1　材料

构建受玉米 Ubiquitin 启动子控制的表达质粒,通过农杆菌介导方法,将大麦 *HvAPX1* 基因导入水稻(*Oryza Sativa*),获得两个遗传独立的转基因水稻株系 APX3、APX7。分子鉴定结果表明,APX3 和 APX7 株系都是 *HvAPX1* 高表达量的转基因株系,但是 APX7 株系的 *HvAPX1* 表达量要高于 APX3 株系。非转基因受体水稻粳稻品种为月光(*Oryza sativa* cv. Tsuchihikari)。

1.2　试验处理

实验在人工光照培养室内进行。光照培养室内条件设定为:温度 25 ±2 ℃,相对湿度 75 %,光照 300 μmol $m^{-2}s^{-2}$,昼夜循环光照 14 h + 黑暗 10 h。选取饱满的水稻种子用 1 %的次氯酸消毒 20 min,去离子水清洗干净后于 30 ℃催芽 3 d。种子萌发后,播种于覆盖纱网的塑料盒中培养,幼苗生长到两叶半时(14 d 左右),选取长势一致的幼苗将其移入容器体积为 5 L 的塑料盒中,每盒 12 穴,每穴 5 株。用木村 B 营养液[7]培养,每天调 pH 值至 5.5,营养液每 3 d更换 1 次。试验设对照和 Cd 20 μmolL^{-1}(使用分析纯的 $CdSO_4 \cdot 8H_2O$,),处理时间为 6 d。

* 国家自然科学基金项目(40271063)资助
† 通讯作者,E-mail: wmshi@issas.ac.cn
作者简介:段苏然(1980～),女,山东济宁人,西北农林科技大学 2002 级植物学专业硕士研究生
收稿日期:2005-04-21;收到修改稿日期:2005-08-30

1.3 试验方法

1.3.1 植物 DNA、RNA 提取及 RT-PCR(逆转录—PCR)反应 植物 DNA、总 RNA 均提取自水稻叶片,方法参考《分子生物学实验指导》[8]。取四叶期的水稻叶片,超纯水清洗后用液氮迅速冷冻,分别提取 DNA 和 RNA。RT-PCR 反应使用 Qiagen 公司(www.giagen.com)试剂盒。PCR 鉴定所用引物是长度均为 22 个碱基的寡核苷酸。PCR 扩增的 DNA 片段长度为 769 bp。

1.3.2 生物量测定 以 5 株的平均值作为每株生物量。

1.3.3 叶绿素含量测定 采用乙醇提取法,参考《植物生理生化实验原理和技术》[9]。0.5 g 水稻叶片用 95 %乙醇研磨过滤,定容至 10 ml,测定 OD665、OD649。计算得出叶绿素含量。

1.3.4 APX 活性测定 叶片(鲜重)0.3 g,加入 4 ml 酶提取液(50 mmol L^{-1} PBS, pH7.8, 1 mmol L^{-1} 抗坏血酸, 0.25 mmol L^{-1} EDTA)冰浴研磨,冷冻离心 12 000 g,20 min,上清液作酶活性分析用。APX 活性的测定参照 Nakano 和 Asada 的方法[10]。

1.3.5 镉含量的测定 用湿消煮(HNO_3-$HClO_4$)的方法,样品消煮完全后,定容,在 220FS 200Z 型原子吸收仪上测定镉含量。

1.4 数据统计分析

采用 SPSS11.5 软件进行实验数据的统计分析

2 结果与分析

2.1 转 HvAPX1 基因水稻植株的确认及其 HvAPX1 转录水平的验证

HvAPX1 基因的 cDNA 长度为 1 089 bp,通过农杆菌介导方法导入水稻得到转基因植株,通过加代获得纯合系的转基因株系 APX3 和 APX7。本试验材料采用纯合系的转基因种子(T3 代),用 PCR 技术鉴定了转基因植物为导入 *HvAPX1* 基因的水稻,结果(图 1)表明,转基因植株的基因组 DNA 含有 *HvAPX1* 基因片段,而非转基因水稻植株没有该基因片段;此外,还验证了导入的 *HvAPX1* 基因在水稻植株中正常高量表达(图 2)。通过从水稻植株 RNA 反转录获得的 cDNA,再进行 PCR 扩增,结果表明,转基因植株来源的 RNA 中都含有长度为 769bp 片段的电泳条带,而非转基因植株来源的则没有。从看家基因(House-keeping gene)Actin 的结果来看,所有水稻材料都含有 Actin 片段,说明 PCR 反应是正常进行的。这些结果证明,*HvAPX1* 基因成功地导入到了水稻植株,并获得正常的转录表达。

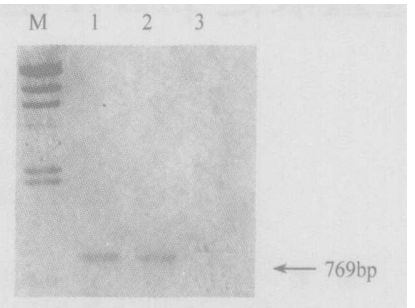


图 1 水稻植株基因组 DNA 的 *HvAPX1* 基因片段鉴定(M. 标准 DNA 分子;1. APX3 株系;2. APX7 株系;3. 非转基因植物)

Fig. 1 Identification of *HvAPX1* in transgenic plants of T3 generation (M. DNA marker; Lane 1. APX3 plant; Lane 2. APX7 plant; Lane 3. wild type plant)

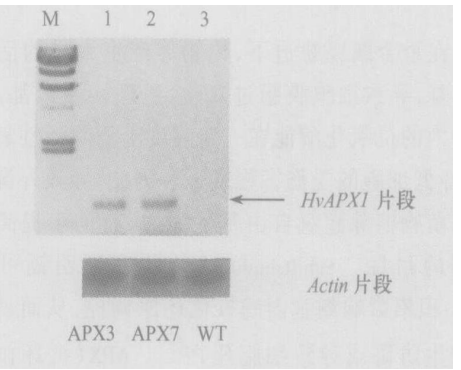


图 2 *HvAPX1* 基因在转基因水稻中过量表达的 RT-PCR 验证(M. 标准 DNA 分子;1. APX3 株系;2. APX7 株系;3. 非转基因植物)

Fig. 2 Confirmation of transgene *HvAPX1* transcript level in the transgenic plants (M. DNA marker; Lane 1. APX3 plant; Lane 2. APX7 plant; Lane 3. wild type plant)

2.2 生理指标分析

由于 *HvAPX1* 基因的过量表达,Cd 20 μmol L^{-1} 处理 6 d 后野生型水稻 APX 活性为 32.18 units g^{-1}FW,转 pAPX 基因株系 APX3 的 APX 活性为 38.35 units g^{-1}FW,转基因株系 APX7 的 APX 活性为 40.28 units g^{-1}FW,分别占各自对照的 96 %,115 %和 114 %。转 pAPX 基因株系水稻的 APX 活性高出野生型水稻近 20 %(图 3)。对植株叶片中 APX 活性动态分析表明,过量表达 pAPX 的转基因水稻在镉胁迫下,植株叶片内的 APX 活性始终保持较高水平,而野生型水稻植株叶片内的 APX 活性在胁迫初期略微上升后呈现下降趋势(图 4)。

2.3 镉胁迫下植物生长和叶绿素含量的变化

镉毒害症状最先表现在植株根部,随后是地上部分。镉处理的植株,水稻根系生长明显受抑制,根

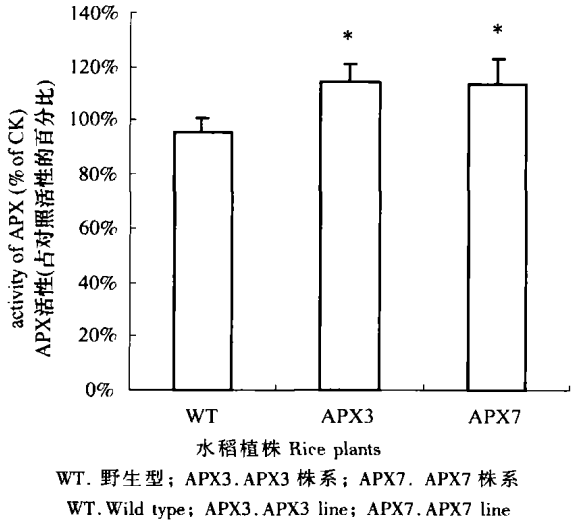


图 3　Cd 20 μmol L^{-1}处理 6 d 后转基因及野生型水稻 APX 活性比较(*表示差异达到统计水平($p < 0.05$))

Fig. 3　Significant difference between *HvAPX1*-transgenic plants and wild type after Cd-treated in APX activities (*indicates the significance level ($p < 0.05$))

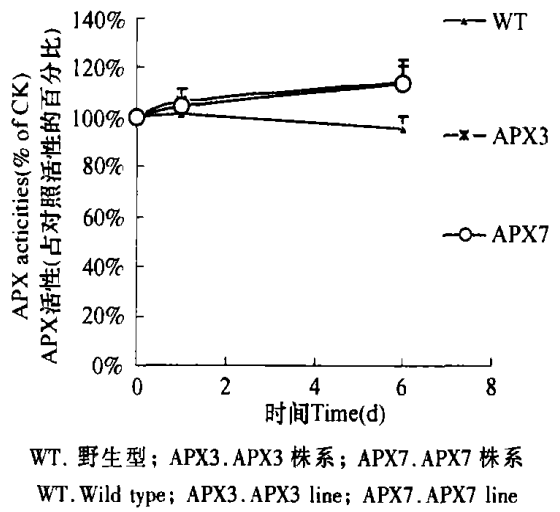


图 4　Cd 20 μmol L^{-1}胁迫下转基因及野生型水稻 APX 活性动态变化

Fig. 4　Variation of APX activities in WT and pAPX-overexpressed plants under stress of Cd

系发黄变硬,侧根数比对照明显减少(图 5)。与对照相比,Cd 20 μmol L^{-1}处理 6 d 后,WT、APX3、APX7 主根净增长量分别下降 79 %、70 %和 68 %。虽然植株根系的生长都受到了显著的抑制,但是转基因株系的根系生长受镉的抑制明显低于镉对野生型植株的抑制,表现出一定的耐性。在正常营养条件下转基因植物和非转基因植物之间根系生长差异不明显。

地上部分镉毒害症状主要表现为叶片失绿,植株矮化。经镉处理 6 d 之后,水稻叶片呈淡绿色,比对照略浅,株高明显低于对照,水稻生长均明显比对照瘦弱。Cd 20 μmol L^{-1}处理 6 d 后,WT、APX3、APX7 的生物量分别为 0.25 g 株$^{-1}$、0.28 g 株$^{-1}$和 0.28 g 株$^{-1}$,依次下降为各自对照的 66 %、77 %、78 %。如表 1 所示,转基因植株和野生型间在生物量上存在显著差异($p < 0.05$)。

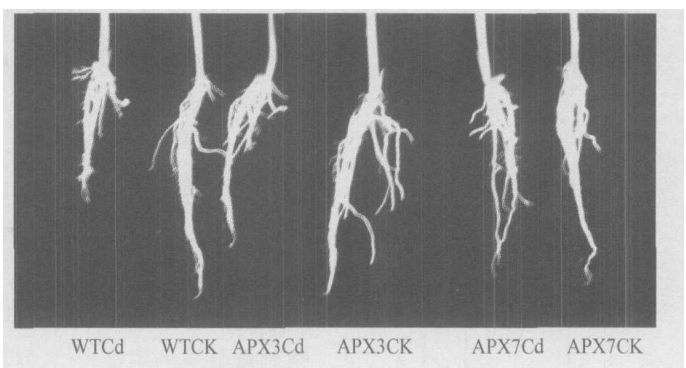


图 5　镉胁迫下水稻植株根系生长图(WTCd. 野生 Cd 处理;WTCK. 野生型对照;APX3Cd. APX3 株系 Cd 处理;APX3CK. APX3 株系对照;APX7Cd. APX7 株系 Cd 处理;APX7CK. APX7 株系对照)

Fig. 5　Root growth of rice plants under Cd stress(WTCd. Wild type with Cd; WTCK. Wild type under normal conditions; APX3Cd. APX3 line with Cd treatment; APX3CK. APX3 line under normal conditions; APX7Cd. APX7 line with Cd treatment; APX7CK. APX7 line under normal conditions)

表 1　Cd 对水稻总生物量的影响

Table 1　Effect of Cd treatment on total fresh weight of WT and pAPX plants

株系 Line	对照 (g) Control	Cd 处理 (g) Cd-treatment	抑制率 % Inhibition rates
WT	0.375 ±0.036	0.248 ±0.008	34 ±2
APX3	0.359 ±0.038	0.277 ±0.005 *	23 ±2
APX7	0.356 ±0.030	0.276 ±0.011 *	22 ±3

Cd 20 μmol L^{-1}处理 6 d 后,各株系叶片均失绿,但转基因水稻的叶片失绿程度不如野生型明显。植株叶片叶绿素含量的测定结果(图 6)进一步证明转基因水稻叶绿素的含量确实高于野生型水稻,尤其是株系 APX7 的叶绿素含量高出野生型水稻 10 %以上,差异达到显著水平($p < 0.05$)。

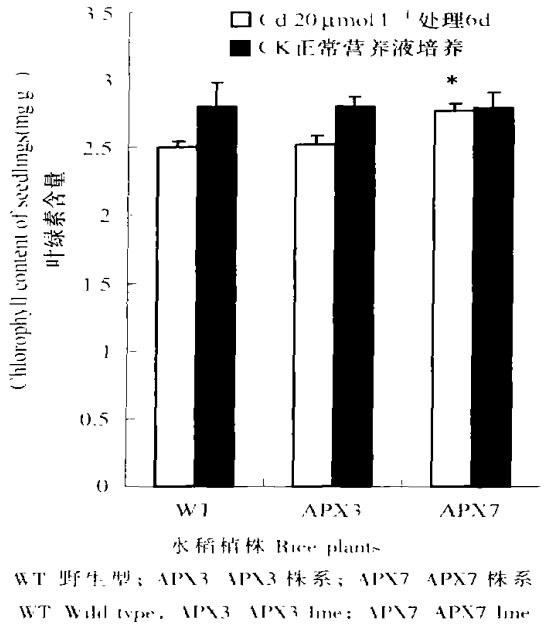


图 6 Cd 20 μmol L⁻¹处理 6 d 后转基因及野生型水稻叶绿素含量

Fig. 6 Chlorophyll content of the rice seedlings after Cd treatment

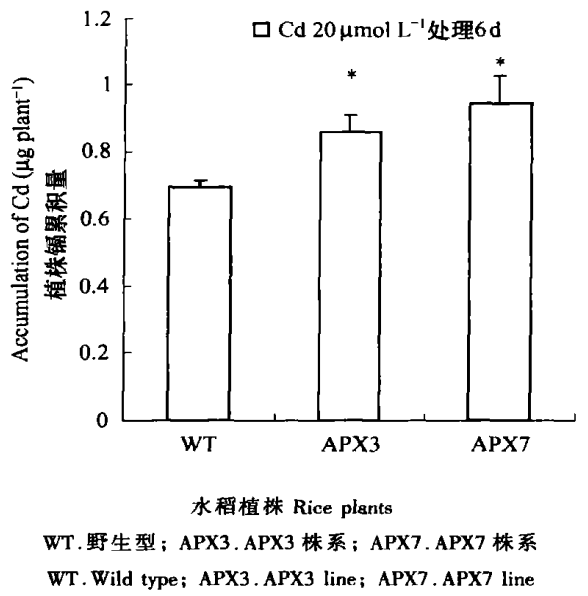


图 8 Cd 20 μmol L⁻¹胁迫下转基因及野生型水稻植株镉累积量

Fig. 8 Total Cd accumulation of WT and transgenic rice growing in nutrient solution supplemented with 20 μmol L⁻¹ Cd

2.4 转基因植物和非转基因植物之间的植株镉含量比较

Cd 20 μmol L⁻¹处理 6 d 后转基因及野生型水稻无论是在根部还是在地上部分,单位干重内的镉含量并没有差异(图 7)。但是,由于转基因植株生物量明显高于非转基因植株,导致转 pAPX 基因水稻在镉胁迫下能够累积更多的镉(图 8)。

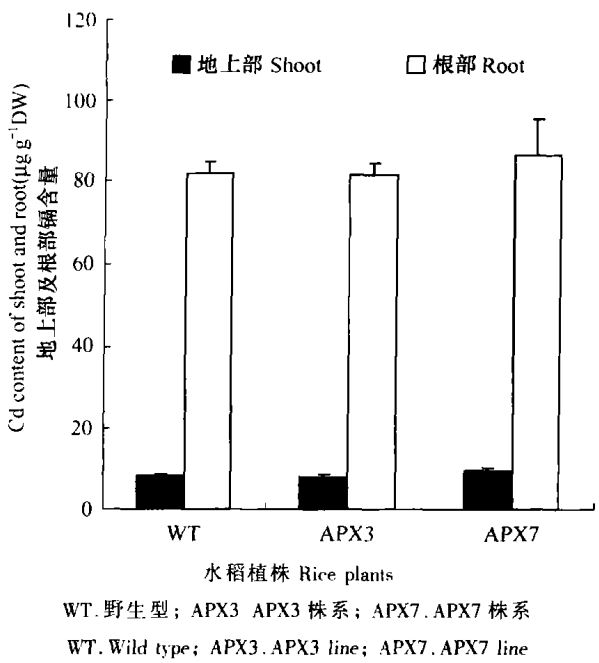


图 7 转基因及野生型水稻根部及地上部镉含量

Fig. 7 Cadmium content in shoots and roots of wild type and transgenic rice

3 讨 论

Cd 是对动植物具有极高毒性的环境污染物,Cd 在植物中的累积引起光合作用下降,水分和营养吸收的减少,产生黄化,生长受抑,根尖颜色变褐等症状,最终植物死亡。Cd 如何在细胞水平上使植物受到伤害以及植物如何耐受 Cd 污染等问题已经引起了广泛关注。

在镉等重金属胁迫下,植物产生一系列生理生化反应来适应胁迫环境。主要的适应响应机制有植物螯合多肽的诱导表达和超氧自由基清除系统的活化。以往的研究表明,导入螯合多肽基因来增强螯合多肽的表达可以提高植物解毒能力,从而提高植物对重金属的耐性[11]。但是,有关提高超氧自由基系统活性能否提高植物对重金属耐性则迄今缺乏直接的实验证据。作为信号传导物质,在逆境条件下 H_2O_2 可以通过诱导植物抗氧化酶系统而使植物抵御活性氧胁迫[12],但当植株内 H_2O_2 含量过高时,H_2O_2 本身亦会对植物造成伤害。众所周知,在干旱,空气污染,强光,寒冷,重金属毒害,紫外光照射等环境胁迫下,H_2O_2 含量都会增加[13]。大量实验已证明镉胁迫下植物体内会积累过量 H_2O_2[14]。作为清除 H_2O_2 的主要酶类,APX 活性的高低与 H_2O_2

的累积有直接关系,而 H_2O_2 的累积与植株受镉毒害程度密切相关,由此作者认为 APX 活性的高低影响着植株对镉胁迫的耐性。但是,在植株体内,存在不同亚细胞类型的 APX。在环境胁迫下究竟哪种或哪些 APX 酶活性升高与植物对环境胁迫的耐性有直接关系,哪些只是间接关系仍然不清楚。研究结果证明,叶绿体 APX(tAPX)和微体 APX(pAPX)的过量表达可提高拟南芥植物抗氧化的能力[15,16]。本试验结果表明,由于 *HvAPX1* 过量表达提高了 APX 酶活性,转 pAPX 基因水稻植株清除 H_2O_2 的能力增强,从而可以有效地清除镉胁迫诱导产生的植株体内过量 H_2O_2 积累,避免后者对植物细胞的伤害。与野生型植株相比,转 pAPX 基因植株对镉胁迫具有明显的耐性,本研究结果证明了导入 pAPX 基因可提高植物清除活性氧的能力,有助于提高植物对镉的耐性。而且,转 pAPX 基因水稻在镉胁迫下由于生物量明显升高,能够累积更多的镉。这对于重金属污染土壤的植物修复也可望有积极意义。

参 考 文 献

[1] Schützendübel A, Schwanz P, Teichmann T, *et al*. Cadimium-induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in Scots pine roots. Plant Physiology, 2001, 127: 887～898

[2] Schützendübel A, Nikolova P, Rudolf C, *et al*. Cadmium and H_2O_2-induced oxidative stress in *Populus*. *canescens* roots. Plant Physiol. Biochem., 2002, 40:577～584

[3] Yoshimura K, Yabuta Y, Ishikawa T, *et al*. Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses. Plant Physiology, 2000, 123:223～233

[4] Lisenbee C S, Heinze M, Richard N. Peroxisomal ascorbate peroxidase resides within a subdomain of rough endoplasmic reticulum in wild-type arabidopsis cells. Plant Physiology, 2003, 132:870～882

[5] Shi W M, Muramoto Y, Ueda A, *et al*. Cloning of peroxisomal ascorbate peroxidase gene from barley and enhanced thermotolerance by overexpressing in Arabidopsis thaliana. Gene, 2001, 273:23～27

[6] Zhang H, Wang J, Nickel U, *et al*. Cloning and expression of an Arabidopsis gene encoding a putative peroxisomal ascorbate peroxidase. Plant Mol. Biol., 1997, 34:967～971

[7] 毛达如主编. 植物营养研究方法. 北京:中国农业大学出版社, 1994. 14～15. Mao D R. ed. Methods for Plant Nutrition Research (In Chinese). Beijing: China Agricultural University Press, 1994. 14～15

[8] 魏群主编. 分子生物学实验指导. 北京:施普林格出版社, 1999. 71～73. Wei Q. ed. Experiments in Molecular Biology (In Chinese). Beijing: Springer Publisher, 1999. 71～73

[9] 李合生主编. 植物生理生化实验原理和技术. 北京:高等教育出版社, 2000. 134～137. Li H S. ed. Principle and Technology of Plant Physiology and Biochemistry (In Chinese). Beijing: Higher Education Press, 2000. 134～137

[10] Nakano Y, Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant Cell Physiol., 1981, 22 (5):867～880

[11] 沈振国,刘友良. 重金属超量积累植物研究进展. 植物生理学通讯, 1998, 34 (2): 133～139. Shen Z G, Liu Y L. Research progress in heavy metal hyperaccumulators (In Chinese). Plant Physiology Communications, 1998, 34(2):133～139

[12] Gechev T, Gadjev I, Breusegem F. Hydrogen peroxide protects tobacco from oxidative stress by inducing a set of antioxidant enzymes. Cell. Mol. Life Sci., 2002, 59:708～714

[13] Storozhenko S, Pauw P, Montagu M, *et al*. The heat-shock element is a functional component of the arabidopsis APX1 gene promoter. Plant Physiol., 1998, 118:1 005～1 014

[14] Schützendübel A, P. Schwanz P, Teichmann T. Cadmium-induced changes in antioxidative systems, H_2O_2 content and differentiation in pine (*Pinus sylvestris*) roots. Plant Physiol., 2001, 127:887～898

[15] Murgia I, Tarantino D, Vannini C, *et al*. *Arabidopsis thaliana* plants overexpressing thylakoidal ascorbate peroxidase show increased resistance to Paraquate-induced photooxidative stress and to nitric oxide-induced cell death. The Plant Journal, 2004, 38:940～953

[16] Wang J, Zhang H, Allen RD, *et al*. Overexpression of an arabidopsis peroxisomal ascorbate peroxidase gene in tobacco increases protection against oxidative stress. Plant Cell Physiol., 1999, 40(7):725～732

OVEREXPRESSING PEROXISOMAL ASCORBATE PEROXIDASE GENE IN RICE ENHANCED TOLERANCE TO CADMIUM STRESS

Duan Suran[1,2] Shi Weiming[2†] Wang Junru[1]

(1 College of Life Sciences, Northwest Agriculture & Forestory University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

(2 State Key Lab of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China)

Abstract Differences were studied between wild type and transgenic rice overexpressing barley peroxisomal type ascorbate peroxidase (*HvAPX1*) under excessive cadmium condition in growth, physiological characters and accumulation of cadmium. The results indicate that with increasing *HvAPX1* transcript in transgenic rice, elongation rate of the main root, total biomass, chlorophyll content and activity of the APX (ascorbate peroxidase) all got obviously higher than that of the wild type of rice, respectively. The transgenic plants were significantly more tolerant to cadmium stress as compared with the wide-type plants and accumulate more cadmium.

Keywords Cadmium stress; Ascorbate peroxidase; Environmental stress; Gene over expression; Transgenic rice