

## 过表达*ZmSKIP*基因提高烟草抗低温胁迫的能力

叶晓霞<sup>1</sup>, 燕芳<sup>2</sup>, 龙海桂<sup>1</sup>, 王小敏<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>玉林师范学院生命科学与技术学院, 广西玉林537000; <sup>2</sup>重庆大学生命科学学院, 重庆400044

**摘要:** 以野生型和过表达*ZmSKIP*基因烟草为试材, 研究了低温胁迫下过表达*ZmSKIP*对烟草抗氧化能力的影响。测定了不同低温处理时间下过表达*ZmSKIP*转基因烟草T<sub>3</sub>代植株和野生型植株抗氧化酶如超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)活性和丙二醛(MDA)含量以及相对电导率, 结果表明, 低温下, 相对于野生型植株, 转基因烟草具有较高的抗氧化酶活性和较低的相对电导率和MDA含量, 说明过表达*ZmSKIP*提高了转基因植株的耐低温胁迫能力。

**关键词:** *ZmSKIP*; 低温胁迫; 抗氧化酶; 电导率

## Overexpression of *ZmSKIP* Enhanced Tolerance to Chilling Stress in Tobacco (*Nicotiana tabacum*)

YE Xiao-Xia<sup>1</sup>, YAN Fang<sup>2</sup>, LONG Hai-Gui<sup>1</sup>, WANG Xiao-Min<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>College of Life Science and Technology, Yulin Normal University, Yulin, Guangxi 537000, China; <sup>2</sup>College of Life Sciences, Chongqing University, Chongqing 400044, China

**Abstract:** The wild type (WT) and transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum*) lines with overexpression of *ZmSKIP* were used to investigate the antioxidant ability under chilling stress. The activities of antioxidant enzymes including superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD) and catalase (CAT), malondialdehyde (MDA) content and relative electrical conductivity of T<sub>3</sub> transgenic tobacco plants overexpressing *ZmSKIP* and WT tobacco plants were examined under chilling stress. Compared to WT plants, transgenic tobacco plants overexpressing *ZmSKIP* displayed higher antioxidant enzyme activity, lower MDA content and relative electrical conductivity under chilling stress. These results indicated that overexpression of *ZmSKIP* improved the plant antioxidant ability and the chilling tolerance.

**Key words:** *ZmSKIP*; chilling stress; antioxidant enzyme; electrical conductivity

低温胁迫是植物栽培中常常遇到的一种灾害, 它不仅影响植物的生长发育, 限制作物的产量, 甚至影响植物在地球上的分布(江福英等2002)。在我国北方大部分地区和南方的早春、晚秋季节, 农作物生产频繁地遭受低温冷害, 导致农作物的产量和品质的下降。利用现代作物分子育种技术培育耐低温作物品种首先依赖于对植物适应低温胁迫的分子调控机理和抗逆基因的发掘。*SKIP* (ski-interacting protein)基因最早以癌症基因*v-Ski*为诱饵通过酵母双杂交分离出来(Dahl等1998)。所有的*SKIP*同源蛋白都具有一个绝对保守的SNW/*SKIP*结构域的S-N-W-K-N氨基酸序列, 该序列很可能对于维持*SKIP*基因作为共剪切因子的转录和剪切功能是必需的(Folk等2004)。*SKIP*作为剪切因子参与了pre-mRNA的剪切、转录延伸及成熟mRNA运输等整个过程(Hou等2009), 在ABA信号途径中参与了植物响应非生物胁迫过程(Lim

等2010)。我们已克隆了玉米中*SKIP*同源基因*ZmSKIP*, 发现过表达*ZmSKIP*基因能够提高转基因烟草的抗旱、抗盐能力(Wang等2013)。然而, 目前尚未见到有关*SKIP*基因提高抗寒能力的报道。本文对转*SKIP*基因植株进行低温胁迫处理, 研究过表达*ZmSKIP*烟草在低温胁迫下抗氧化酶活性的变化以及细胞膜的稳定性。

### 材料与方法

#### 1 植物材料的培养与低温处理

烟草(*Nicotiana tabacum* L. cv. 'Wisconsin 38')由实验室保存, 过表达*ZmSKIP*转基因烟草T<sub>3</sub>代植

收稿 2014-02-10 修定 2014-05-04

资助 国家自然科学基金(31360485)、广西自然科学基金(2012GXNSFBA053076)和玉林师范学院博士启动基金(G20130013)。

\* 通讯作者(E-mail: wxmin99@163.com; Tel: 0775-2679937)。

株由前期实验获得(Wang等2013)。所有植株种植于普通温室,生长条件为:温度(25±2)℃,光周期16 h光/8 h暗,光照强度250 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>,湿度80%。

将野生型和转基因烟草种子灭菌后分别接种在MS和含卡那霉素100 mg·L<sup>-1</sup>的MS培养基上,培养20 d后,将植株移栽到装有土壤的塑料袋中培养20 d,挑选生长一致的植株,分成2组,分别置人工气候箱25和4℃培养,在处理0、24、48、72 h时取样。

## 2 方法

### 2.1 酶液的提取

酶液提取参照丁海东等(2011)的方法,精确称取2 g植物叶片,置于预冷的研钵中,加入4% PVPP和1.8 mL的抽提缓冲液[含50 mmol·L<sup>-1</sup>磷酸缓冲液(pH 7.6)、0.1 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA、0.5% (W/V) Triton X-100],冰上研磨成匀浆,全部转入5 mL干净的离心管中,于4℃、13 000×g离心10 min,将上清液转移至干净的2 mL离心管,保存于冰上备用。

### 2.2 抗氧化酶活性的测定

超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性测定参照Beyer和Fridovich (1987)的方法,用氮蓝四唑(NBT)显色反应后计算其活性,以抑制NBT光还原50%作为1个酶活性单位[U·mg<sup>-1</sup> (FW)];过氧化氢酶(catalase, CAT)活性测定参照Corbisier等(1987)和Chen等(2012)方法,采用紫外分光光度法,以25℃下100 s内在反应体系中分解50%的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的酶量为1个酶单位[U·mg<sup>-1</sup> (FW)];过氧化物酶(peroxidase, POD)活性测定参照Polle等(1994)的方法,采用愈创木酚显色反应,以每分钟OD<sub>470</sub>变化0.01为1个酶活性单位[U·mg<sup>-1</sup> (FW)]。

### 2.3 丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量测定

MDA含量测定参照Hara等(2003)和Lokhande等(2011)方法,采用硫代巴比妥酸(TBA)显色反应,在紫外分光光度计于波长532和600 nm下测定。

### 2.4 相对电导率测定

相对电导率参照王玉等(2014)的方法,准确称取2 g烟草叶片,切成均匀大小,放在盛有20 mL双蒸水的烧杯中,在真空干燥器中抽气浸泡0.5 h以抽去植物叶片中的气泡,迅速用滤纸吸干表面水分,放入装有30 mL双蒸水的大试管中,振荡30 min,用电导仪测定溶液的电导率(L<sub>1</sub>);再将试管放在沸水中,加热煮沸,彻底破坏材料的膜结构后冷却10~15 min至室温,再测定溶液中的电导率(L<sub>2</sub>)。按以下公式计算细胞膜渗透率:  $Le=(L_1-空白)/(L_2-空白) \times 100\%$ 。

## 3 数据统计

所有实验均有3个平行设计,运用DPS 7.05数据分析统计软件和Excel对试验数据进行处理。

## 实验结果

### 1 转ZmSKIP基因提高了烟草植株耐低温胁迫的能力

从图1可以看出,在25℃生长条件下,野生型和转基因烟草植株生长并没有太大的差异;在低温中处理72 h后,两者都受到了不同的伤害,但转基因烟草植株叶片萎蔫程度要小于野生型,说明在烟草中过表达ZmSKIP能提高植株对低温胁迫的抗性。

### 2 过表达ZmSKIP基因提高了烟草植株叶中抗氧化酶活性

由图2-A可知,转基因烟草植株叶片中CAT活



图1 常温和低温条件下野生型及转基因植株的表型

Fig. 1 Phenotypes of WT and transgenic tobacco plants at room temperature (25 °C) or low temperature (4 °C)

性显著高于野生型植株, 而两者的SOD和POD活性差异不明显。低温处理对野生型的CAT活性影响不明显, 但显著提高了转基因植株的CAT活性。低温处理48 h内, 低温可诱导提高野生型的SOD和POD活性, 随着处理时间的延长, 酶活性水平有回落, 转基因植株叶片中的SOD和POD活性水平显著高于野生型。说明过表达*ZmSKIP*基因提高了转基因烟草在低温胁迫下的抗氧化酶活性。

### 3 转*ZmSKIP*基因提高了烟草植株叶片在低温下细胞膜结构的稳定性

从图3-A可以看出, 随着低温处理时间的延

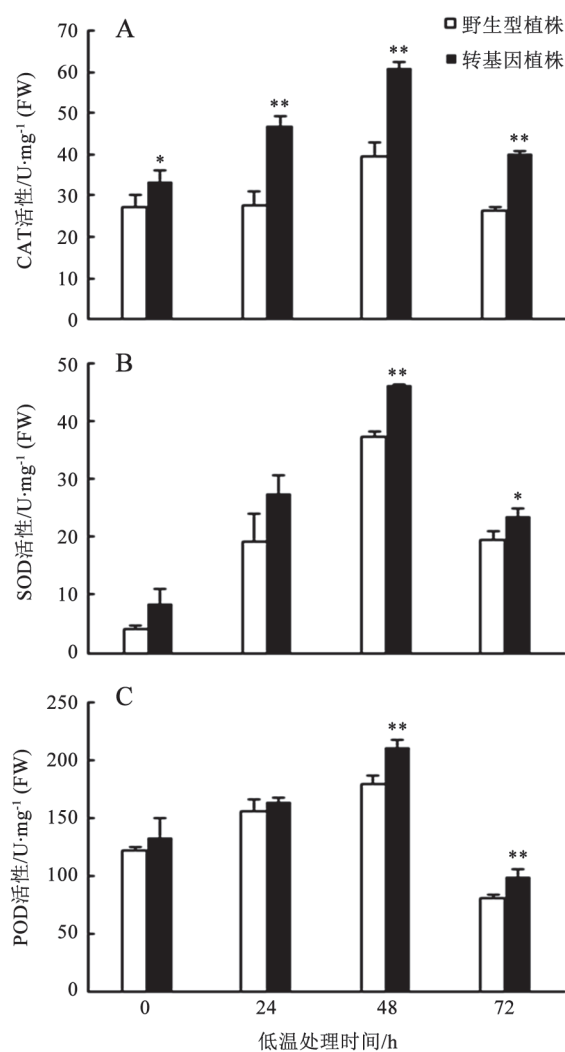


图2 低温处理对野生型和转基因植株叶中抗氧化酶活性的影响

Fig.2 Effects of chilling treatment on activities of antioxidant enzymes in leaves of WT and transgenic plants  
\*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ .

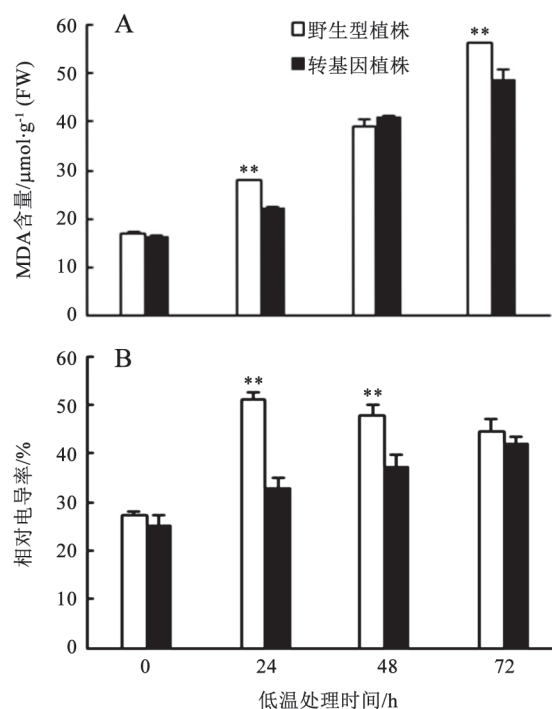


图3 低温对野生型和转基因植株MDA含量和相对电导率的影响

Fig.3 Effects of chilling treatment on MDA content and relative electrical conductivity in WT and transgenic plants  
\*\*:  $P < 0.01$ .

长, 叶片MDA含量也随着升高, 在处理24和72 h时, 野生型植株的MDA含量显著高于转基因植株, 尽管在处理48 h时转基因烟草的MDA含量与野生型植株的MDA含量差别不明显, 但从图3-B可以看出, 在低温处理后, 叶片相对电导率都有明显上升, 在处理24和48 h, 野生型植株相对电导率显著高于转基因植株。这表明在低温胁迫下, 过表达*ZmSKIP*烟草提高了细胞膜的稳定性和抗氧化能力。

## 讨论

*SKIP*在植物生长发育和抵抗非生物胁迫伤害中起着很重要的调节作用: Hou等(2009)最早报道在水稻中过表达*OsSKIPa*能提高转基因植株的耐干旱和高盐胁迫能力; Lim等(2010)也报道在拟南芥中过表达*AtSKIP*明显地提高了转基因植株的耐旱和高盐的能力; 2013年, 我们从玉米中分离得到*ZmSKIP*, 并证明该基因具有提高转基因烟草的耐旱和高盐的能力(Wang等2013)。在本文中, 我们进一步证明*ZmSKIP*具有提高转基因烟草的耐低温能力。

植物在正常的代谢过程中,当叶绿体、线粒体和质膜上的电子传递至分子氧时会产生活跃的活性氧(reactive oxygen species, ROS),如: 氢氧根负离子(OH<sup>-</sup>)、自由羟基(·OH)、过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)、超氧化物阴离子自由基(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)、单线态氧(<sup>1</sup>O<sub>2</sub>)等(Apel和Hirt 2004; Gill和Tuteja 2010)。植物细胞内活性氧存在双重功能,活性氧能作为信号分子对很多生理过程诸如细胞生长、周期性调控、程序性死亡以及非生物胁迫做出应答,同时体内活性氧的增加能导致细胞的毒害(Mittler 2002)。植物体内有着一个活性氧调节的基因网络,活性氧的产生与活性氧清除体系是一种动态平衡的状态,产生的活性氧能及时被植物体内抗氧化酶去除,这些抗氧化酶主要有SOD、CAT、POD、抗坏血酸过氧化物酶(APX)、谷胱甘肽还原酶(GR)、脱氢抗坏血酸还原酶(DHAR)和谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)等(Mittler 2002)。因此,活性氧清除系统为维持细胞内一个较低水平的平衡提供了保证。在非生物胁迫条件下,植物的抗氧化酶活性越高,清除活性氧的能力越强,植物抵抗非生物胁迫的能力就越强(Choi等2004; Mittler 2002),通过基因工程操作的研究也表明过表达抗氧化酶基因有明显提高转基因植株耐非生物胁迫的能力(丁海东等2011; 王玉等2014)。Hou等(2009)发现,过表达*Os-SKIPa*提高转基因植株的耐干旱和高盐胁迫能力可能是通过提高转基因植株在胁迫下的SOD活性和抗性转录因子(如CBF2、PP2C和RD22)的表达水平。我们之前的研究也表明,*ZmSKIP*提高转基因烟草的耐旱和耐高盐的能力与该基因有提高转基因植株在胁迫下叶片的CAT和SOD活性以及上调*CAT*、*APX*和*PR5*基因的表达有关。在本研究中,我们发现转*ZmSKIP*显著地提高了低温胁迫下转基因植株叶片抗氧化酶CAT、SOD和POD的活性,进而减轻低温胁迫处理引发的膜脂过氧化的损伤程度,增加细胞膜结构的稳定。

### 参考文献

- 丁海东, 刘慧, 陈一, 王丹, 梁建生(2011). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>和MAPK介导油菜素内酯诱导番茄抗氧化防护酶SOD和CAT的信号途径. 植物生理学报, 47 (10): 1010~1016
- 江福英, 李延, 翁伯琦(2002). 植物低温胁迫及其抗性生理. 福建农业学报, 17 (3): 190~195
- 王玉, 孔凡英, 尹波, 董新纯, 孟庆伟(2014). 过表达单脱氢抗坏血酸还原酶基因提高番茄抗UV-B胁迫能力. 植物生理学报, 50 (1): 95~104
- Apel K, Hirt H (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol*, 55: 373~399
- Beyer WF, Fridovich I (1987). Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Anal Biochem*, 161 (2): 559~566
- Chen S, Chai M, Jia Y, Gao Z, Zhang L, Gu M, Lin W, Wang L (2012). *In vitro* selection of glyphosate-tolerant variants from long-term callus cultures of *Zoysia matrella* [L.] Merr. *Plant Cell Tiss Org*, 111 (2): 199~207
- Choi DG, Yoo NH, Yu CY, de Los Reyes B, Yun SJ (2004). The activities of antioxidant enzymes in response to oxidative stresses and hormones in paraquat-tolerant *Rehmannia glutinosa* plants. *J Biochem Mol Biol*, 37 (5): 618~624
- Corbisier P, Houbion A, Remacle J (1987). A new technique for highly sensitive detection of superoxide dismutase activity by chemiluminescence. *Anal Biochem*, 164 (1): 240~247
- Dahl R, Wani B, Hayman MJ (1998). The Ski oncoprotein interacts with Skip, the human homolog of *Drosophila* Bx42. *Oncogene*, 16 (12): 1579~1586
- Folk P, Puta F, Skruzny M (2004). Transcriptional coregulator SNW/SKIP: the concealed tie of dissimilar pathways. *Cell Mol Life Sci*, 61 (6): 629~640
- Gill SS, Tuteja N (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Bioch*, 48 (12): 909~930
- Hara M, Terashima S, Fukaya T, Kuboi T (2003). Enhancement of cold tolerance and inhibition of lipid peroxidation by citrus dehydrin in transgenic tobacco. *Planta*, 217 (2): 290~298
- Hou X, Xie K, Yao J, Qi Z, Xiong L (2009). A homolog of human ski-interacting protein in rice positively regulates cell viability and stress tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106 (15): 6410~6415
- Lim GH, Zhang X, Chung MS, Lee DJ, Woo YM, Cheong HS, Kim CS (2010). A putative novel transcription factor, AtSKIP, is involved in abscisic acid signalling and confers salt and osmotic tolerance in *Arabidopsis*. *New Phytol*, 185 (1): 103~113
- Lokhande V, Nikam T, Patade V, Ahire M, Suprasanna P (2011). Effects of optimal and supra-optimal salinity stress on antioxidative defence, osmolytes and *in vitro* growth responses in *Sesuvium portulacastrum* L. *Plant Cell Tiss Org*, 104 (1): 41~49
- Mittler R (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci*, 7 (9): 405~410
- Polle A, Otter T, Seifert F (1994). Apoplastic peroxidases and lignification in needles of Norway spruce (*Picea abies* L.). *Plant Physiol*, 106 (1): 53~60
- Wang X, Li Z, Yan F, Khalil R, Ren Z, Yang C, Yang Y, Deng W (2013). *ZmSKIP*, a homologue of SKIP in maize, is involved in response to abiotic stress in tobacco. *Plant Cell Tiss Org*, 112 (2): 203~216