

羊草*LcPIP*基因遗传转化露地菊及其抗盐性鉴定

张冰冰¹, 孙天旭¹, 赵月明², 张旻^{1*}

¹东北林业大学生命科学学院, 哈尔滨150040

²长白山自然保护管理中心, 吉林安图133613

摘要: PIP是重要的水孔蛋白之一, 与植物的抗逆性有关。本文用叶盘法将羊草*LcPIP*遗传转化露地菊火焰, 通过常规PCR和GUS染色方法鉴定转基因株系, Real-time PCR检测盐胁迫下转基因和野生植株中*CmPIP1*和*CmPIP2*的相对表达量, 并测定SOD、POD活性和MDA含量。结果显示, 在转*LcPIP*基因的露地菊植株叶片中, *CmPIP1*和*CmPIP2*基因表达量均上升, 是野生型植株的2倍; 根部的*CmPIP1*与*CmPIP2*基因的表达量均上升, *CmPIP1*上升程度高于*CmPIP2*。在200 mmol·L⁻¹ NaCl的胁迫下, 野生型植株中*CmPIP1*基因表达量明显下降, 而转基因植株中*CmPIP1*基因表达量在12~48 h出现明显的上升; 在盐胁迫12 h后, 转基因植株中*CmPIP2*基因表达量上升程度明显高于野生型植株。盐胁迫12 h后, 转基因植株的SOD活性提高更为明显。在盐胁迫前期(0~24 h)转基因植株MDA含量增加幅度低于野生型植株; 在盐胁迫后期(48~72 h)转基因露地菊POD活性出现明显上升, 而野生型露地菊呈下降趋势。

关键词: *LcPIP*; 露地菊; 转基因; 抗盐性; 生理指标

露地菊具有植株低矮、覆盖力强、管理粗放、使用范围广、观赏价值高等特点, 被广泛应用于我国北方地区绿化(王江2010)。而我国是干旱和半干旱面积很大的国家, 水资源较为匮乏(胡兴旺等2015), 同时土壤盐渍化也日趋加重(梁超等2006), 每年都会造成不可估量的损失, 制约着作物产量、植物生长状况和花卉观赏品质。土壤盐分是限制农作物产量的重要因素。通常盐胁迫会限制植物的正常生长, 主要由于盐胁迫会产生渗透胁迫、离子胁迫和离子毒性, 使得植物膜通透性改变, 进而影响植物生理代谢, 限制植物正常生长。近期研究发现NAC、AP2/EREBP、bZIP、MYB、MYC、Cys2/His2锌指家族等转录因子及PIP在植物响应及抵抗非生物胁迫过程中发挥重要作用(Agarwal等2006; Chinnusamy等2006; Umezawa等2006; He等2012; Liu等2011)。Horie等(2011)用200 mmol·L⁻¹的NaCl处理大麦4 h后, *HvPIP1;2*、*HvPIP1;3*、*HvPIP1;4*、*HvPIP2;1*、*HvPIP2;2*和*HvPIP2;3*的表达量明显下降, 导水率也有显著下降, 因此PIP基因是植物耐受盐胁迫所必需的。水孔蛋白(aquaporin, AQP)根据其序列的相似性, 可将其分为5个亚型: PIPs、TIPs、NIPs、SIPs和XIPs(Chaumont等2001; Johanson等2001; Danielson和Johanson 2008; Park等2010)。

PIPs包括PIP1和PIP2两个亚型, 由于其氨基酸序列的特异性导致其结构存在差异, 因此在植物

体内也表现出不同的功能。从菠菜中得到的*SoPIP1*在爪蟾卵母细胞中表现出低的水运输活力, PIP2的同源蛋白质却表现出很强的质膜渗透性(Törnroth-Horsefield等2006)。这种结果几乎在所有植物的水孔蛋白中得到证实, 在拟南芥中也不例外。拟南芥PIP1亚型没有表现或表现出很低的水渗透性, 然而与PIP2相关的蛋白却是高效的水通道蛋白(孙天旭等2014)。研究发现, 在卵母细胞中如果玉米*ZmPIP1;2*与*ZmPIP2s*相互作用后会表现出相应的水通道功能, 当*ZmPIP1;2*与功能性水通道蛋白*ZmPIP2s*在爪蟾卵母细胞中协同表达会增强膜对水的通透性(Chau- mon等2005; Fetter等2004)。此外, PIP1家族成员可以运输其他分子, 包括甘油、硼酸、尿素和CO₂(Alexandersson等2005)。例如, 烟草中PIP1家族成员*NtAQPI*不仅能介导甘油的运输, 也能促进CO₂的扩散。在比较*NtAQPI*与*AQPI*调节气体运输能力的实验中发现, 在红细胞和植物的叶片细胞中, 二者均在质膜上表达, 而且具有很高的CO₂的运输能力(Uehlein等2003; Biela等1999)。研究表明PIP1s对薄壁组织细胞中CO₂传导和光合作用调节机制的进化起到一定作用。通过反义抑制和过表达*AQPI*能够影响CO₂的传导、光合作用

收稿 2017-06-07 修定 2018-03-13

资助 “十二五”农村领域国家科技计划课题项目(2013AA102706)。

* 通讯作者(summerzhang@126.com)。

和植物生长(Uehlein等2008; Flexas等2006; Gomes等2009)。AtPIP2;1能够运输H₂O₂, H₂O₂作为一种活性氧自由基(ROS), 不仅与氧化应激反应, 也与植物受伤反应或病原体攻击相关(Dynowski等2008)。此外, 还发现PIP2s的过表达能够促进棉花纤维细胞的伸长(Li等2013)。前人对菠菜(Törnroth-Horsefield等2006)、玉米(Chaumon等2005; Fetter等2004)和烟草(Uehlein等2003; Biela等1999)中的PIP进行了研究, 然而并没有PIP基因遗传转化花卉植株的相关报道。

本研究从与盐碱相关羊草差减文库中筛选出LcPIP基因, 以东北林业大学培育的露地菊火焰为试验材料, 利用构建的双元表达载体遗传转化羊草LcPIP基因, 并对转基因植株进行抗盐性验证。研究该基因在露地菊抗逆过程中的作用, 对于研究露地菊抗逆性有重要意义, 同时为今后在分子生物学水平上改良和培育高抗性的露地菊新品种奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

露地菊(*Chrysanthemum morifolium* Ramat.)品系火焰(黑登记2009047)来自东北林业大学花卉工程研究所。

1.2 pCAMBIA1301-PMI-LcPIP农杆菌遗传转化露地菊

利用已经构建好的pCAMBIA1301-PMI-LcPIP双元表达载体(图1)进行露地菊遗传转化。甘露糖异构酶基因PMI为抗性筛选基因。

将露地菊无菌苗幼嫩叶片切成1 cm×1 cm小块, 接种到预培养基(MS+0.5 mg·L⁻¹ 6-BA+1.5 mg·L⁻¹ NAA+30 g·L⁻¹蔗糖)上预培养1 d; 用摇过夜的菌液(LB液体+50 mg·L⁻¹ Kana+50 mg·L⁻¹ Rif+500 mg·L⁻¹乙酰丁香酮)侵染预培养的叶片10 min, 轻轻摇动菌液, 使每一块外植体都能与菌液充分

接触。用灭菌滤纸吸去叶片表面附着的多余菌液, 待叶片表面无明显水分后, 将其接入共培养基(1/2MS+0.5 mg·L⁻¹ 6-BA+1.5 mg·L⁻¹ NAA+30 g·L⁻¹蔗糖)上暗培养2 d。将共培养的叶片转入到前期筛选培养基(MS+0.5 mg·L⁻¹ 6-BA+1.5 mg·L⁻¹ NAA+22 g·L⁻¹蔗糖+8 g·L⁻¹甘露糖)中, 采用选择压递增的方式进行筛选, 当外植体叶片上可以看到微小的愈伤组织后, 将其转入后期筛选培养基(MS+0.5 mg·L⁻¹ 6-BA+1.5 mg·L⁻¹ NAA+20 g·L⁻¹蔗糖+10 g·L⁻¹甘露糖)中进行进一步的筛选, 每15 d换一次培养基。当分化的芽长到1~2 cm时, 将其转入生根培养基(1/2MS+30 g·L⁻¹蔗糖)中, 促进生根, 每15~20 d换一次培养基。

1.3 露地菊转基因植株的PCR检测

采用CTAB法提取抗性植株叶片DNA。以获得的露地菊抗性植株总DNA为模板, 质粒为阳性对照, 以野生型露地菊为阴性对照, 以PMI基因PCR检测。PMI引物: 上游5'-CCGCTCGAGATG-CAAAACTCATTA-3'; 下游5'-CCGCTC-GAGTTACAGCTTGTTGTAACACG-3'。反应体系(20 μL): Ex-Taq 10 μL、DNA 1 μL、引物(20 μmol·L⁻¹)各0.4 μL、ddH₂O 8.2 μL。反应程序: 95°C 5 min; 95°C 2 min, 53°C 30 s, 72°C 90 s, 35个循环; 72°C 7 min。0.8%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物。

1.4 露地菊转基因植株的GUS染色检测

取转基因露地菊的幼嫩叶片, 浸泡到染液[100 mmol·L⁻¹ 磷酸钠缓冲液(pH 7.0)、10 mmol·L⁻¹ Na₂EDTA、1 mmol·L⁻¹ K₃[Fe(CN)₆]、1 mmol·L⁻¹ K₄[Fe(CN)₆]、0.5% (V/V) Triton X-100、20% (V/V) 甲醇]中, 用真空抽滤器对其进行抽真空, 反复几次后, 将其放入37°C温箱中保温20~22 h。将叶片转入75%的乙醇中进行脱色2~3 d, 期间不断换新的75%的乙醇, 至阴性对照材料呈现出黄白色。在肉眼或显微镜下进行观察, 白色背景上的蓝色小斑点就是GUS表达位点。

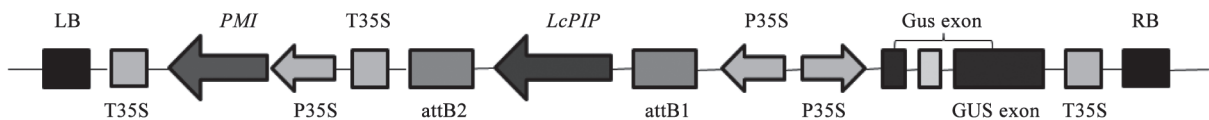


图1 pCAMBIA1301-PMI-LcPIP双元表达载体图

Fig.1 Expression vector map of pCAMBIA1301-PMI-LcPIP

1.5 实时定量PCR检测

用TRIzol试剂盒(Invitrogen)提取转基因和野生植株RNA叶片和根系。将所提取的植株RNA稀释为 $1 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 并以此为模板, 按照反转录[PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time), TAKARA BIO INC, China]试剂盒说明书方法进行反转录反应。将反转录产物cDNA稀释20倍作为反应模板, 进行Real-Time PCR。试验PCR仪器采用Applied Biosystems公司的7500型实时荧光定量PCR仪器。以菊花*UBI*基因作为内参。反应体系($20 \mu\text{L}$): Power SYBR Green PCR Master Mix $10 \mu\text{L}$ 、Primer-F/R (表1) ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)各 $0.8 \mu\text{L}$; cDNA $8.4 \mu\text{L}$ 。反应条件: (1) 95°C 10 min ; (2) 95°C 15 s ; (3) 60°C 1 min ; (4) 95°C 15 s ; (5) 60°C 1 min ; (6) 95°C 15 s ; (7) 60°C 15 s (步骤2~3为40个循环, 步骤4~7是溶解曲线)。 *CmPIP1*基因实时定量PCR的反应长度是130 bp, *CmPIP2*基因实时定量PCR的反应长度是97 bp。

1.6 盐胁迫下转基因露地菊*CmPIP1*和*CmPIP2*基因表达分析

在含有 $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl的Hoagland营养液中培养转基因和野生植株, 分别选取在培养0、6、12、24和48 h的自生长点向下第2片叶子作为材料, 提取RNA (TRIzol, Invitrogen)并以此为模板反转录后, 进行Real-Time PCR。

1.7 盐胁迫下转基因露地菊生理指标测定

用Hoagland营养液预培养转基因和野生植株14 d后, 在Hoagland营养液中加入 $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, 分别在0、6、12、24、48和72 h取自生长点向下第2片叶子作为材料。用超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒、丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒和过氧化物酶(peroxidase, POD)试剂盒(苏州科铭生物技术有限公司)测定转基因植株和野生型植株的SOD、MDA和POD的活性。每个处理3个生物学重复。

1.8 数据统计

使用Excel进行数据处理及作图。

2 实验结果

2.1 露地菊植株遗传转化各阶段生长状况

pCAMBIA1301-*PMI-LcPIP*表达质粒遗传转

表1 Real-time PCR反应相关引物序列

Table 1 Primer sequens of Real-time PCR

引物	序列
<i>CmPIP1</i> -RT-F	5'-TGTCCTATTTGGCTCCTCTCCCC-3'
<i>CmPIP1</i> -RT-R	5'-GTCCTTGTTGTAGATGATCGCGGCT-3'
<i>CmPIP2</i> -RT-F	5'-GGCACTTTCGTCCTTGTTTAC-3'
<i>CmPIP2</i> -RT-R	5'-CGATAGGAAGAGGTGCCAAA-3'
<i>q UBI</i> -F	5'-AGCTGAGCAGACTCCCGATG-3'
<i>q UBI</i> -R	5'-AGGCGAATCATCAGTACCAAGT-3'

化露地菊火焰, 植株叶片各阶段生长状态如图2所示, 以*PMI*为筛选标记, 经后期筛选后得到抗性植株。

2.2 转基因植株PCR检测

取转入pCAMBIA1301-*PMI-LcPIP*载体的转基因植株叶片, 提取植物总DNA作为PCR模板进行PCR检测, 选取载体上*PMI*基因作为检测目标基因。PCR结果(图3)显示, 获得约1 200bp的目的条带, 与已知条带大小相符, 初步证明转化pCAMBIA1301-*PMI-LcPIP*表达质粒的露地菊转基因成功。

2.3 转基因植株GUS染色检测

转入的pCAMBIA1301-*PMI-LcPIP*表达质粒上包含有*GUS*基因, 因此转基因植株经过*GUS*染色后会呈现蓝色。取之前经过PCR鉴定的转基因植株进行*GUS*染色, 染色结果如图4所示。叶片边缘出现蓝色, 表明转基因植株中载体上的*GUS*基因已经表达, 进一步证明了获得的转基因植株的真实性。我们对获得的转基因植株进行扩繁, 用来进行下一步试验。

2.4 转羊草*LcPIP*基因的露地菊中*CmPIP1*和*CmPIP2*基因表达的变化

结果(图5)表明: 在转基因植株叶片中, *CmPIP1*和*CmPIP2*表达量均上升, 分别是野生型的3.1倍和2.8倍。在转基因植株根部, *CmPIP1*与*CmPIP2*表达量均上升, *CmPIP1*上升程度高于*CmPIP2*。

2.5 盐胁迫下转基因露地菊*CmPIP1*和*CmPIP2*基因表达分析

过表达*LcPIP*基因可以增强植株的耐盐性(图6~8)。 $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl处理下, 转基因植株的生长状态比野生型植株好(图6)。在盐胁迫0~12 h, 野生型露地菊的*CmPIP1*基因表达量明显下降, 随着

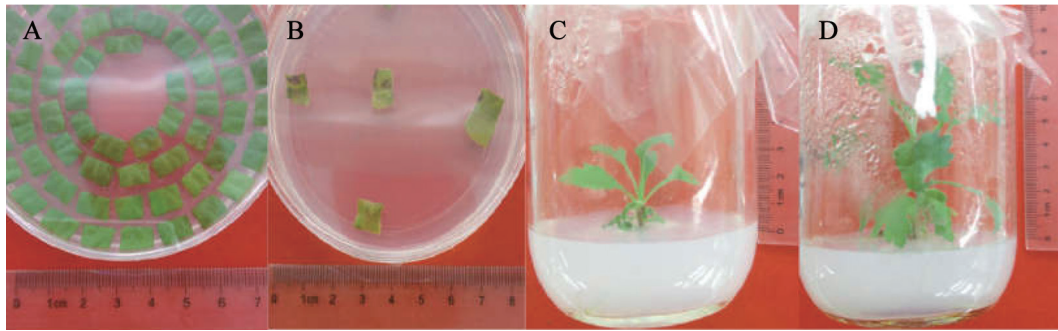


图2 露地菊遗传转化各阶段生长状况

Fig.2 The growth status of transgenic chrysanthemum at different stages

A: 预培养叶片; B: 共培养叶片; C: 前期筛选植株; D: 后期筛选植株。

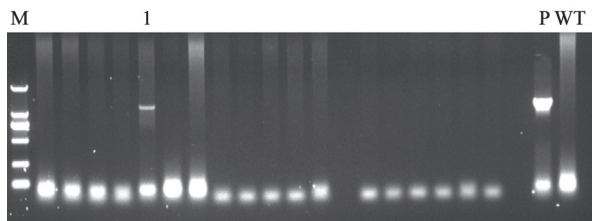


图3 露地菊PMI抗性苗的PCR分析

Fig.3 PCR analysis of PMI in transgenic chrysanthemum

M: 2000 bp Marker; P: 阳性对照; WT: 阴性对照; 1: 转基因植株。

胁迫时间的延长其表达量出现一定程度的回升; 而转基因露地菊的*CmPIP1*基因整体呈上升趋势, 在胁迫24 h时达到峰值(图7)。在盐胁迫下, 野生型露地菊叶片中*CmPIP2*基因表达水平先上升后下降再上升, 胁迫48 h达到最高值; 在转基因露地菊中, 胁迫前12 h, *CmPIP2*基因表达量出现明显下降, 之后*CmPIP2*基因表达量出现了明显的上升(图8)。

2.6 盐胁迫下转基因露地菊的SOD活性、MDA含量和POD活性的变化

图9-A显示, 野生型露地菊SOD活性在整个盐

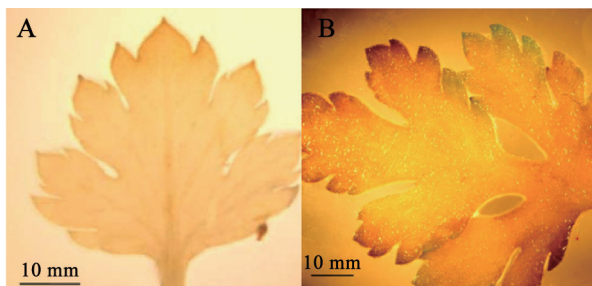


图4 转基因露地菊GUS染色结果

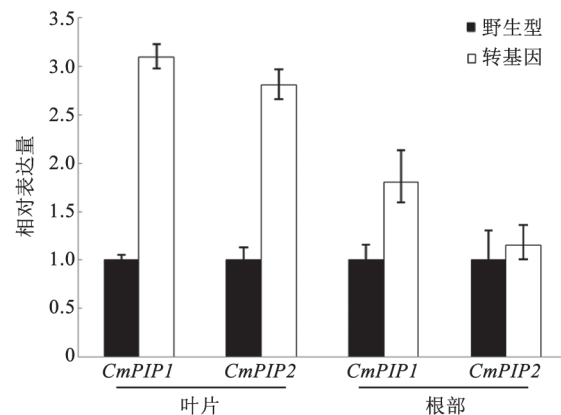
Fig.4 GUS dyeing of transgenic chrysanthemum

A: 野生型露地菊; B: 转基因露地菊。

胁迫阶段呈现递增趋势, 且增长趋势较明显; 转基因露地菊SOD活性在整体上也表现出增长趋势, 但胁迫6 h的SOD活性出现较大程度下降, 随后出现较高增长, 与野生型相比, 盐胁迫12 h以上的转基因植株SOD活性提高更为明显。

图9-B显示, 盐胁迫条件下, 野生型和转基因露地菊MDA含量先呈现上升趋势, 后下降。胁迫24 h, 野生型和转基因露地菊MDA含量分别增加43.07%和32.88%, 由此可见, 盐胁迫下转基因露地菊MDA含量的增加幅度小于野生型露地菊, 说明盐胁迫下转基因露地菊的膜脂过氧化水平较低, 质膜稳定性优于野生型露地菊, 具有更强的耐盐性。

图9-C显示, 在盐胁迫前期(0~24 h), 野生型露地菊POD活性高于转基因露地菊, 但在胁迫后期(48~72 h)转基因露地菊POD活性出现明显上升而野生型露地菊呈下降趋势。

图5 *CmPIP1*和*CmPIP2*在野生型和转基因露地菊中的表达Fig.5 Expression of *CmPIP1* and *CmPIP2* in WT

and transgenic chrysanthemum

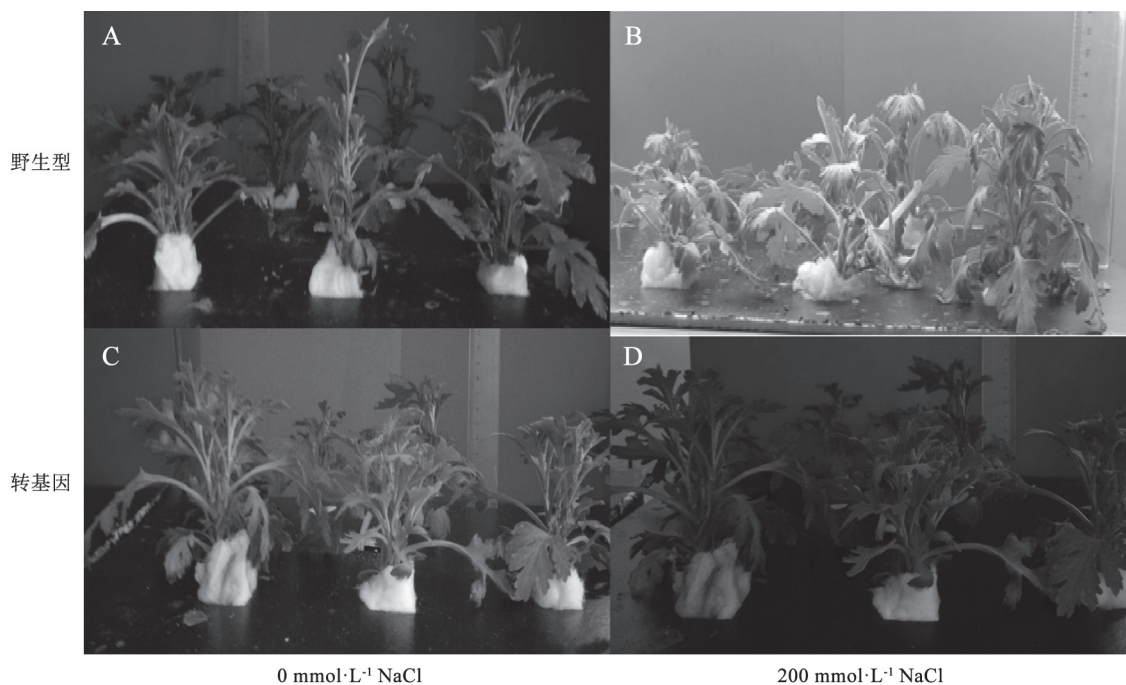
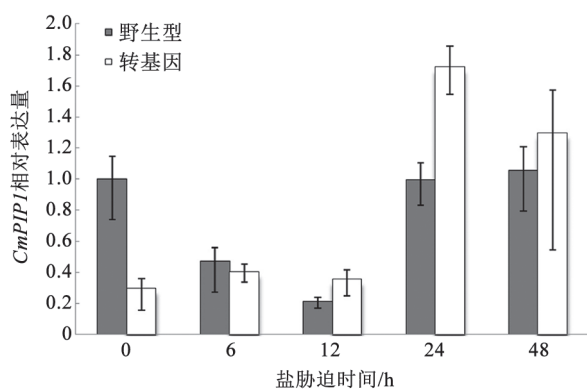
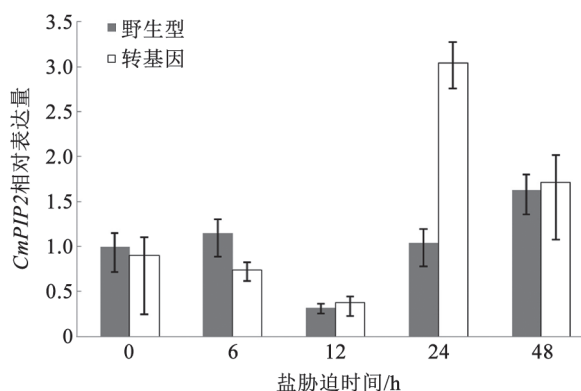


图6 盐胁迫下露地菊的生长情况

Fig.6 The growth of chrysanthemum under salt stress

A、C: 0 mmol·L⁻¹ NaCl处理48 h的野生型和转基因露地菊; B、D: 200 mmol·L⁻¹ NaCl处理48 h的野生型和转基因露地菊。

图7 盐胁迫下转基因和野生型植株中*CmPIP1*的表达Fig.7 Expression of *CmPIP1* in WT plants and transgenic plants under salt stress图8 盐胁迫下转基因和野生型植株中*CmPIP2*的表达Fig.8 Expression of *CmPIP2* in WT plants and transgenic plants under salt stress

3 讨论

3.1 羊草*LcPIP*基因遗传转化露地菊及转基因植株鉴定

在面临全球环境变化, 土壤资源减少, 盐碱化严重, 转基因研究是当前解决这些问题最有效的手段。但转基因过程中使用的抗性标记基因一直是转基因作物对人类最大的威胁。在本试验中, 我们改造了传统的植物抗性筛选基因, 重新改造

加入*PMI*基因, 该基因是在大肠杆菌中发现的能够分解植物所不能利用的甘露糖为可利用的碳源, 因此可以试验甘露糖替代抗生素筛选, 从而避免了抗生素筛选对环境所带来的威胁。

我们采用了pCAMBIA1301-*PMI-LcPIP*二元表达载体进行露地菊遗传转化。羊草水孔蛋白基因(*LcPIP*)是羊草分子标记筛选出来的盐胁迫基因。经过对3 280片露地菊叶片进行培养获得的65株抗

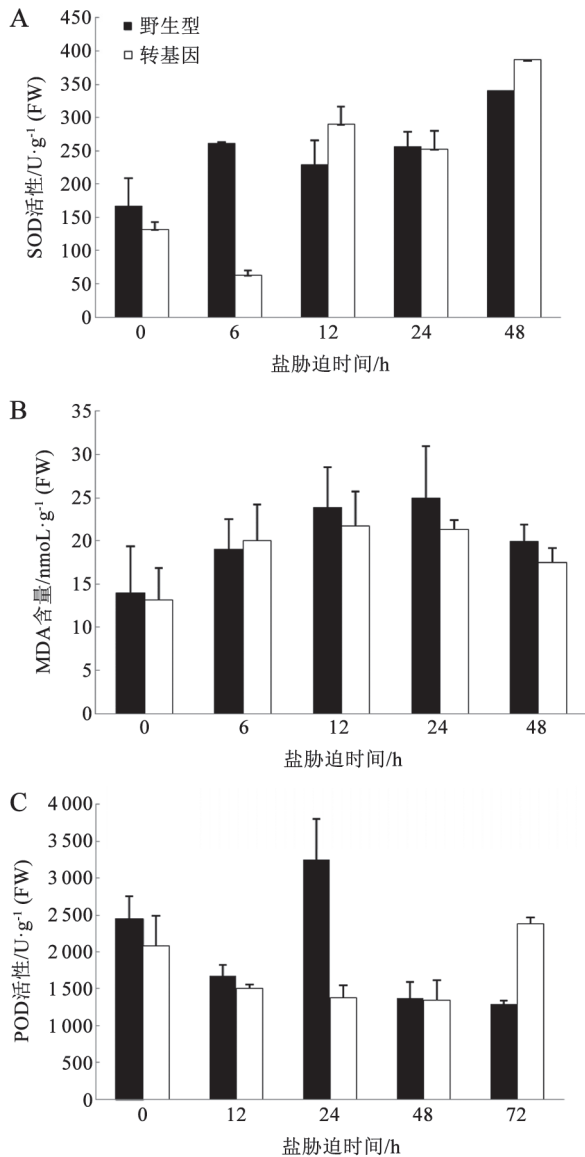


图9 盐胁迫下露地菊SOD活性、MDA含量和POD活性的变化

Fig.9 Changes in SOD activity, MDA contents and POD activity of chrysanthemum under salt stress

性植株的分子生物学鉴定, 转化率为0.3%。本试验中, 采取传统的组织培养方法进行转基因研究, 该方法耗时长, 转化率低, 假阳性高。随着生物技术的不断发展, 各类转基因新技术逐渐涌现, 并且转化率更高, 成功率更高, 在今后的研究中可以不断尝试新技术。

3.2 转基因露地菊*CmPIP1*和*CmPIP2*基因表达分析

我们用羊草*LcPIP*基因对露地菊进行了遗传转化, 以期获得抗逆性更强的露地菊植株。通

过对野生型及转基因露地菊进行盐处理, Real-time PCR试验分析野生型与转基因露地菊中*CmPIP*基因表达情况, 从基因水平研究转基因露地菊植株的抗盐胁迫能力。结果表明, *CmPIP1*在野生型与转基因植株中表现出相同的表达模式, 但胁迫12 h以上, 转基因植株中*CmPIP1*基因上调表达程度高于野生型植株, 表明转基因植株中*CmPIP1*基因响应盐胁迫能力更强; 而转基因植株中*CmPIP2*基因响应盐胁迫能力更强。因此我们认为在盐胁迫条件下, 转基因植株比野生型植株调控基因表达能力更强。

由于转入了外源的*LcPIP*基因, 为了验证外源基因的转入是否会影响内源基因的表达, 我们进行了Real-time PCR试验来验证转基因植株与野生型植株的相对表达。结果发现, 转入外源基因的转基因植株中*CmPIP*基因的表达量明显上升。对于造成这一现象的原因还需要进一步的研究。

3.3 盐胁迫下转基因露地菊生理指标测定

植物在盐胁迫条件下会迅速积累活性氧自由基(ROS), 包括 H_2O_2 和 O_2^- 。过多的氧自由基会造成植物氧化损伤, 影响细胞内蛋白质的合成及细胞膜的稳定性, 导致细胞及组织损伤, 严重时会造成植物死亡(Zang等2015)。因此植物消除ROS的能力是抗盐胁迫所必需的。SOD泛存在于植物细胞内, 催化超氧化物阴离子发生歧化反应, 生成 H_2O_2 和 O_2 , 在生物抗氧化系统中起重要作用(童富淡等1997)。POD可催化过氧化氢氧化酚类和胺类化合物, 具有消除过氧化氢的作用(鲁福成等2001)。MDA是氧自由基作用于质膜发生过氧化物的中间产物, 可与细胞膜上蛋白质和酶等结合, 使蛋白失活, 破坏生物膜的结构与功能(刘延吉等2008), MDA含量与质膜氧化程度呈正相关。

本实验结果显示, SOD活性在盐胁迫处理下均有提高, 表明无论是野生型还是转基因植株在胁迫条件下均作出反应抵抗盐胁迫带来的氧自由基, 并且转基因植株SOD活性提高程度高于野生型植株。由此证明转基因露地菊在盐胁迫条件下具有更强的消除氧自由基的能力。过氧化物酶POD活性在野生型与转基因植株中呈现不同变化趋势。在转基因露地菊中, 盐胁迫条件下POD酶活性稳定, 并且在盐胁迫后期POD酶活性出现明显上升; 而野生型植株在胁迫前期POD活性高于

转基因露地菊, 但胁迫24 h后POD酶活性明显下降, 并在72 h低于转基因植株。表明长期盐胁迫下转基因植株相比野生型植株能够更有效清除过氧化氢。MDA代表植株在盐胁迫条件下质膜的氧化程度, 胁迫前期(0~24 h)野生型植株和转基因植株MDA含量呈现上升趋势, 且转基因植株的增幅低于野生型植株, 说明盐胁迫下转基因露地菊的膜脂过氧化水平较低, 质膜稳定性优于野生型露地菊, 具有更好的完整性。胁迫48 h野生型植株和转基因植株均下降的原因可能是随着盐胁迫时间的延长, 植物体内MDA合成的代谢水平降低或循环途径发生逆转。综合SOD、POD活性以及MDA含量来看, 转基因植株相比野生型植株能更好耐受盐胁迫。

本试验利用农杆菌侵染愈伤组织, 进行组织培养获得外植体的方法, 采用PMI梯度筛选的方式获得了露地菊转基因植株。通过实时荧光定量PCR技术表明在盐胁迫条件下, 转基因露地菊中*CmPIP*基因响应盐胁迫时表达调控能力好于野生型植株, 一定程度上说明转基因露地菊具有更强耐盐胁迫能力。通过对SOD、MDA、POD含量生理指标的测定, 证明获得的转基因露地菊具有更强的盐胁迫耐受能力。

参考文献(References)

- Agarwal PK, Agarwal P, Reddy MK, et al (2006). Roles of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Plant Cell Rep*, 25: 1263–1274
- Alexandersson E, Fraysse L, Sjøvall-Larsen S, et al (2005). Whole gene family expression and drought stress regulation of aquaporins. *Plant Mol Biol*, 59: 469–484
- Biela A, Grote K, Otto B, et al (1999). The *Nicotiana tabacum* plasma membrane aquaporin NtAQP1 is mercury-insensitive and permeable for glycerol. *Plant J*, 18: 565–570
- Chaumont F, Barrieu F, Wojcik E, et al (2001). Aquaporins constitute a large and highly divergent protein family in maize. *Plant Physiol*, 125 (3): 1206–1215
- Chaumon F, Moshelion M, Daniels MJ (2005). Regulation of plant aquaporin activity. *Biol Cell*, 97 (10): 749–764
- Chinnusamy V, Zhu J, Zhu JK (2006). Gene regulation during cold acclimation in plants. *Physiol Plantarum*, 126: 52–61
- Danielson JÅ, Johanson U (2008). Unexpected complexity of the aquaporin gene family in the moss *Physcomitrella patens*. *BMC Plant Biol*, 8 (1): 45
- Dynowski M, Schaaf G, Loque D, et al (2008). Plant plasma membrane water channels conduct the signalling molecule H₂O₂. *Biochem J*, 414: 53–61
- Fetter K, Van Wilder V, Moshelion M, et al (2004). Interactions between plasma membrane aquaporins modulate their water channel activity. *Plant Cell*, 16 (1): 215–228
- Flexas J, Ribas-Carbo M, Hanson DT, et al (2006). Tobacco aquaporin NtAQP1 is involved in mesophyll conductance to CO₂ *in vivo*. *Plant J*, 48: 427–439
- Gomes D, Agasse A, Thiébaud P, et al (2009). Aquaporins are multifunctional water and solute transporters highly divergent in living organisms. *BBA-Biomembranes*, 1788 (6): 1213–1228
- He Y, Li W, Lv J, et al (2012). Ectopic expression of a wheat MYB transcription factor gene, *TaMYB73*, improves salinity stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot*, 63: 1511–1522
- Horie T, Kaneko T, Sugimoto G, et al (2011). Mechanisms of water transport mediated by PIP aquaporins and their regulation via phosphorylation events under salinity stress in barley roots. *Plant Cell Physiol*, 52 (4): 663–675
- Hu XW, Jin HX, Zhu DH. (2015). Research progress of drought and salt resistant mechanism of plant. *Chin Agric Sci Bull*, 31 (24): 137–142 (in Chinese with English abstract) [胡兴旺, 金杭霞, 朱丹华(2015). 植物抗旱耐盐机理的研究进展. *中国农学通讯*, 31 (24): 137–142]
- Johanson U, Karlsson M, Johansson I, et al (2001). The complete set of genes encoding major intrinsic proteins in arabidopsis provides a framework for a new nomenclature for major intrinsic proteins in plants. *Plant Physiol*, 126: 1358–1369
- Li DD, Ruan XM, Zhang J, et al (2013). Cotton plasma membrane intrinsic protein 2s (PIP2s) selectively interact to regulate their water channel activities and are required for fibre development. *New Phytol*, 199 (3): 695–707
- Liang C, Wang C, Yang XF, et al (2006). Salt-tolerant physiological characters of wheat variety Dekang 961. *Acta Bot Bor-Occid Sin*, 26 (10): 2075–2082 (in Chinese with English abstract) [梁超, 王超, 杨秀凤等(2006). ‘德抗961’小麦耐盐生理特性研究. *西北植物学报*, 26 (10): 2075–2082]
- Liu QL, Xu KD, Zhao LJ, et al (2011). Overexpression of a novel chrysanthemum *NAC* transcription factor gene enhances salt tolerance in tobacco. *Biotechnol Lett*, 33: 2073–2082
- Liu YJ, Zhang SS, Tian XY, et al (2008). Effects of salt stress on protective enzyme system MDA content and membrane permeability of NHC foliar. *Grassland Turf*, 127 (2): 30–34 (in Chinese with English abstract) [刘延吉, 张珊珊, 田晓艳等(2008). 盐胁迫对NHC牧草叶片保护酶系

- 统、MDA含量及膜透性的影响. 草原与草坪, 127 (2): 30–34]
- Lu FC, Wang MQ, Wei XS, et al (2001). Variability of several physiological indexes of vegetables in adversity. *J Tianjin Agric Sci*, 7 (2): 6–10 (in Chinese with English abstract) [鲁福成, 王明启, 魏雪生等(2001). 逆境条件下几种蔬菜作物生理指标的变化. 天津农业科学: 7 (2): 6–10]
- Park W, Scheffler BE, Bauer PJ, et al (2010). Identification of the family of aquaporin genes and their expression in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *BMC Plant Biol*, 10 (1): 142
- Sun TX, Li YH, Zhang Y (2014). Advance in a role of pip aquaporins under adversity condition. *Plant Physiol J*, 50 (06): 749–757 (in Chinese with English abstract) [孙天旭, 李玉花, 张旻(2014). 逆境条件下水孔蛋白PIPs作用的研究进展. 植物生理学报, 50 (6): 749–757]
- Tong FD, Hu JS, Chen JH, et al (1997). Effect of the different methods of rice nursery on activity of superoxide dismutase, ion leakage of rice leaves and root growing power. *J Zhejiang Univ (Agric & Life Sci)*, 23 (6): 682–686. (in Chinese with English abstract) [童富淡, 胡家恕, 陈进红等(1997). 不同育秧方式对早稻叶片SOD活性, 电解质渗透率和发根力的影响. 浙江农业大学学报, 23 (6): 682–686]
- Törnroth-Horsefield S, Wang Y, Hedfalk K, et al (2006). Structural mechanism of plant aquaporin gating. *Nature*, 439 (7077): 688–694
- Uehlein N, Lovisolo C, Siefritz F, et al (2003). The tobacco aquaporin NtAQP1 is a membrane CO₂ pore with physiological functions. *Nature*, 425 (6959): 734–737
- Uehlein N, Otto B, Hanson DT, et al (2008). Function of *Nicotiana tabacum* aquaporins as chloroplast gas pores challenges the concept of membrane CO₂ permeability. *Plant Cell*, 20 (3): 648–657
- Umezawa T, Fujita M, Fujita Y, et al (2006). Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring genes to unlock the future. *Curr Opin Bio Tech*, 17: 113–122
- Wang J (2010). The use of the *PMI*/mannose selection system to recover transgenic *Chrysanthemum morifolium* with *PtDHAR* gene (dissertation). Harbin: Northeast Forestry University, 1–42 (in Chinese with English abstract) [王江 (2010). 以*PMI*基因为选择标记露地菊转*PtDHAR*基因体系的鉴定. 哈尔滨: 东北林业大学, 1–42]
- Zang DD, Wang C, Ji XY, et al (2015). *Tamarix hispida* zinc finger protein ThZFP1 participates in salt and osmotic stress tolerance by increasing proline content and SOD and POD activities. *Plant Sci*, 235: 111–121

Genetic transformation of *LcPIP* gene in *Chrysanthemum morifolium* and identification of its salt resistance

ZHANG Bing-Bing¹, SUN Tian-Xu¹, ZHAO Yue-Ming², ZHANG Yang^{1,*}

¹College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

²Changbai Mountain Nature Conservation Management Center, Antu, Jinlin 133613, China,

Abstract: PIP is one of the important aquaporins, and play a crucial role in plant stress tolerance. We transferred *LcPIP* into *Chrysanthemum morifolium* huoyan by using the leaf disc method, and identified transformed plants by the PCR and GUS staining methods. The relative expression of *CmPIP1* and *CmPIP2* in transgenic and WT plants under salt stress were determined by real-time PCR, and the activities of SOD, POD and MDA content were also determined. The results showed that the expression of *CmPIP1* and *CmPIP2* increased in the leaves of transgenic plant, which were two times higher than those of WT plants. The expression of *CmPIP1* and *CmPIP2* also increased in the roots of transgenic plant, and the rise of *CmPIP1* was higher than that of *CmPIP2*. Under the stress condition of 200 mmol·L⁻¹ NaCl, the expression of *CmPIP1* decreased obviously in WT plants, while which in the transgenic plants increased significantly at 12–48 h stress. After 12 h salt stress, the increase of *CmPIP2* gene expression in transgenic plants was significantly higher than that of WT plants, and the activity of SOD increased significantly. In the early stage of salt stress (0–24 h), the MDA content of transgenic plants increased less than that of WT plants. The POD activity of transgenic plant increased significantly in the late stage of salt stress (48–72 h), while that of WT plant showed a decreasing trend.

Key words: *LcPIP*; *Chrysanthemum morifolium*; transgenic; salt resistance; physiological index

Received 2017-06-07 Accepted 2018-03-13

This work was supported by National Science and Technology Plan Project of Rural Area in 12 th Five-Year (2013AA102706).

*Corresponding author (summerzhang@126.com).