

## 转TPSP融合基因小麦的耐旱相关特性

李金花<sup>1,\*</sup>, 孙敏善<sup>1,\*</sup>, 张春艳<sup>1</sup>, 张宁<sup>1</sup>, 孟凡荣<sup>2</sup>, 任江萍<sup>1</sup>, 牛洪斌<sup>1</sup>, 王翔<sup>1</sup>, 尹钧<sup>1</sup>, 李永春<sup>1,\*\*</sup>

河南农业大学, <sup>1</sup>国家小麦工程技术研究中心, <sup>2</sup>生命科学学院, 郑州450002

**摘要:** 在获得转TPSP基因小麦纯合株系的基础上, 对3个转基因株系的耐旱相关生理特性进行了分析。脯氨酸含量测定显示, 干旱胁迫过程中小麦叶片中脯氨酸含量逐渐增加, 且3个转基因株系叶片中脯氨酸的积累速度和积累量均显著高于非转基因对照; 叶绿素荧光参数测定显示, 3个转基因株系的 $F_v/F_m$ 值在胁迫过程中均略高于非转基因对照, 转基因株系4-4-4的 $F_v/F_0$ 值显著高于非转基因对照, 表明转基因株系在水分胁迫条件下光合系统II (PSII)的光合效率有所增强; 转基因小麦耐旱性鉴定显示: 模拟干旱胁迫100 h时对照小麦叶片几乎全部萎蔫, 而3个转基因株系均表现出较强的耐旱性; 复水24 h后转基因株系4-9-1、4-4-4和30-1-2的叶片黄化率分别为25.2%、23.3%和27.6%, 显著低于非转基因对照(48.8%)。上述研究结果表明转TPSP基因小麦具有较强的耐旱能力, 为转基因材料进一步应用于小麦抗旱育种提供了依据。

**关键词:** 小麦; TPSP融合基因; 耐旱性

## The Drought Tolerance Related Characteristics of Transgenic Wheat with the TPSP Fusion Gene

LI Jin-Hua<sup>1,\*</sup>, SUN Min-Shan<sup>1,\*</sup>, ZHANG Chun-Yan<sup>1</sup>, ZHANG Ning<sup>1</sup>, MENG Fan-Rong<sup>2</sup>, REN Jiang-Ping<sup>1</sup>, NIU Hong-Bin<sup>1</sup>, WANG Xiang<sup>1</sup>, YIN Jun<sup>1</sup>, LI Yong-Chun<sup>1,\*\*</sup>

<sup>1</sup>National Engineering Research Center for Wheat, <sup>2</sup>College of Life Sciences, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China

**Abstract:** Based on the transgenic homozygous lines of wheat with the TPSP fusion gene, the drought tolerance related characteristics of 3 transgenic lines were analyzed. Comparative analysis on proline content in wheat leaves showed a gradually increasing pattern during the drought stress, and the accumulating speed and volume of proline in 3 transgenic lines were significantly higher than that in no-transgenic control. The detection of chlorophyll fluorescence parameters showed that the  $F_v/F_m$  values of 3 transgenic lines were slightly higher than that of no-transgenic control under the drought stress, while the  $F_v/F_0$  values of transgenic line 4-4-4 were significantly higher than that of control, which indicated that the photosynthetic efficiency of photosystem II in transgenic lines were enhanced under drought stress. The drought tolerance assay using an artificial water-stress system indicated that almost all of no-transgenic leaves were severely withered at the time point of 100 h after stress treatment, while the transgenic lines presented stronger drought tolerance. The percentage of yellow leaves were calculated at the time point of 24 h after rewatering and the results showed that the yellow leaf ratios of transgenic line 4-9-1, 4-4-4 and 30-1-2 were 25.2%, 23.3% and 27.6%, which were significantly lower than the ratio (48.8%) of no-transgenic control. All these results indicated that the drought tolerance of transgenic wheat with TPSP gene was greatly enhanced and this provide an important basis for the further application of these transgenic materials in drought resistant breeding of wheat.

**Key words:** wheat; TPSP fusion gene; drought tolerance

干旱是限制小麦持续高产、稳产的重要逆境因子, 设法提高小麦耐旱能力是当前小麦育种研究的重要方向之一。近年来, 随着植物生物技术的迅速发展, 转基因育种正在成为作物常规育种的有效补充。研究发现, 一些植物, 如沙漠中生长的复活草[*Selaginella lepidophylla* (Hook. and Grev.) Spring]具有的超强耐旱能力与其体内高浓

度的海藻糖(trehalose)积累密切相关(Goddijn和van

收稿 2011-10-30 修定 2011-11-23

资助 国家转基因生物新品种培育科技重大专项(2009ZX08002-011B)。

\* 共同第一作者。

\*\* 通讯作者(E-mail: yongchunli71@yahoo.com.cn; Tel: 0371-63558215)。

Dun 1999; Zentella等1999)。进一步分析表明,海藻糖是一种非还原性二糖,在胁迫条件下可有效维持生物膜及细胞内活性物质的稳定性,从而提高生物体对逆境胁迫的耐受能力(Iturriaga等2009; Chary等2008)。因此,通过转基因技术提高作物中海藻糖的合成能力是获得耐旱作物新材料的重要策略之一(Karim等2007; Garg等2002)。已有研究报道,海藻糖合成相关基因 $TPS$ 或 $TPP$ 在水稻(Garg等2002)、小麦(杜丽璞等2007)和烟草(Almeida等2005)等植物中过表达后均可不同程度地提高转基因植株的耐旱性。为了进一步获得耐旱性强的转基因小麦材料,我们在前期研究中构建了海藻糖-6-磷酸合成酶( $TPS$ )基因 $otsA$ 和海藻糖-6-磷酸磷酸酯酶( $TPP$ )基因 $otsB$ 的融合基因 $TPSP$ 及其干旱诱导型表达载体,并获得了转基因小麦新材料(李永春等2009)。在此基础上,本研究对转基因小麦的耐旱相关生理指标进行了分析和鉴定,为转基因小麦新材料在抗旱育种中的应用奠定基础。

## 材料与方 法

供试材料为3个转 $TPSP$ 基因小麦(*Triticum aestivum* L.)纯合株系4-4-1、4-9-1和30-1-2,以‘豫麦18’(Y18)作为对照。室内培养条件为:挑选发育良好的种子60粒,在培养箱中(温度为26 °C,相对湿度为70%~78%,光照条件为160  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , 14 h)水培至两叶一心期,用于各项室内鉴定分析。模拟干旱胁迫方法为:在两叶一心期用20%聚乙二醇(PEG6000)代替水继续在培养箱中培养,在干旱胁迫的不同时间点观察各材料的生长状态,并进行脯氨酸含量和光合特性分析。脯氨酸含量的测定采用茚三酮法(邹琦2000),叶绿素荧光参数的测定使用OS5-FL型调制式叶绿素荧光分析仪(美国OPTI-SCIENCES公司)进行。剪取胁迫前和胁迫100 h后的小麦茎叶组织,用液氮研磨后采用Megazyme海藻糖检测试剂盒(K-TREH)测定海藻糖的含量,具体操作和计算方法参照试剂盒的说明书进行。上述所测定实验均设3次生物学重复。采用CTAB法提取小麦叶片的基因组DNA用于转基因材料的PCR鉴定分析,转基因特异性引物为:TPSP-8(5'-GTGGGGAAGTAATCCTTGTGC-3')和TPSP-9(5'-ACGCGGGTCAGGTTAGAAA-3'),预期扩增产

物为734 bp; PCR反应体系为20  $\mu\text{L}$ , PCR扩增程序为:94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 56.5 °C 30 s, 72 °C 30 s, 35个循环; 72 °C 7 min。

## 结果与讨论

### 1 转基因小麦中海藻糖的诱导性积累

所有转基因株系均经过PCR鉴定后才用于后续的耐旱特性分析。PCR检测显示,转基因株系基因组中均可以扩增到和预期的目标片段大小(734 bp)一致的条带,而非转基因对照中未检测到目标条带(图1-A)。对转基因株系中海藻糖含量的测定表明,在水分胁迫100 h后转基因小麦中海藻糖的含量显著高于非转基因对照,在水分胁迫条件下转基因株系中海藻糖的含量为胁迫前的3~8倍,其中株系4-4-4在胁迫条件下海藻糖的含量达486.8  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  (FW) (图1-B)。可见,转基因小麦中海藻糖的含量受水分胁迫诱导而大幅度提高,这与目的基因 $TPSP$ 受干旱诱导性启动子的驱动有关(李永春等2009)。

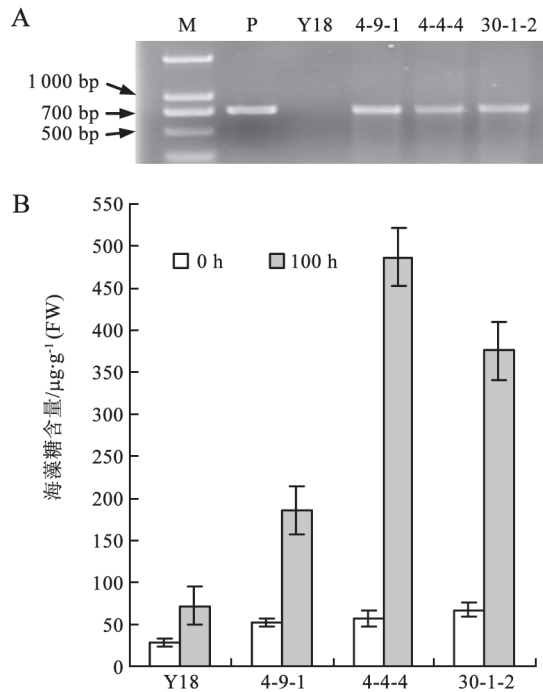


图1 转基因小麦中目的基因的鉴定及海藻糖检测  
Fig.1 Identification of transgene and detection of trehalose in transgenic wheat

A: 转基因小麦PCR鉴定; B: 转基因小麦海藻糖含量测定。M: 1 kb plus DNA ladder; P: 质粒DNA阳性对照; Y18: 非转基因对照‘豫麦18’; 4-9-1、4-4-4和30-1-2分别为3个转基因株系。

## 2 转基因小麦叶片中脯氨酸的积累动态

在利用20% PEG6000溶液处理的模拟干旱条件下, 对转基因株系幼苗叶片中脯氨酸含量的测定表明(图2): 在胁迫前, 转基因株系和非转基因对照叶片中脯氨酸的含量没有显著差异; 随着胁迫时间的延长, 转基因株系和对照叶片中脯氨酸的含量均呈现出逐渐增加的趋势, 但3个转基因株系叶片中的脯氨酸积累速度和积累量均显著高于非转基因对照; 转基因株系4-4-4叶片中脯氨酸的积累最快, 在胁迫6 h时叶片中脯氨酸的含量已经达到 $101.6 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  (FW), 而非转基因对照在胁迫12 h时才达到这一水平; 在胁迫12 h以后, 转基因株系30-1-2叶片中脯氨酸的含量最高, 在胁迫后48 h时达到 $400.9 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  (FW)。大量研究表明, 许多植物在干旱、盐渍等胁迫条件下叶片中会有大量的脯氨酸积累, 而且脯氨酸的积累能力与植物的抗旱性呈正相关, 因此脯氨酸含量已成为评价植物抗旱能力的重要指标之一(陈吉宝等2010)。本研究发现, 在没有胁迫时3个转基因株系叶片中的脯氨酸含量与对照差异不大, 但在干旱胁迫条件下转基因株系的脯氨酸积累速度和积累量均显著高于对照, 表明转基因株系中脯氨酸的干旱诱导性积累能力显著提高, 这可能与转基因株系中TPSP基因受干旱诱导性启动子驱动有关(李永春等2009)。

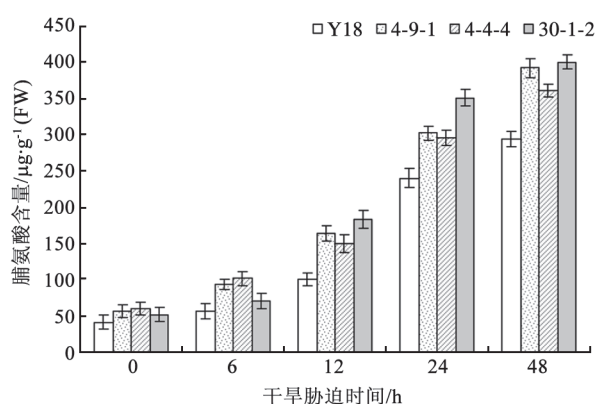


图2 转基因小麦的脯氨酸积累动态

Fig.2 The accumulation patterns of proline in transgenic wheat lines

## 3 转基因小麦的叶绿素荧光参数变化

叶绿素荧光参数是评价干旱胁迫对植物光合作用影响的有效方法(张仁和等2011), 对转基因株

系叶绿素荧光参数的测定显示(图3): 随着胁迫时间的延长, 可变荧光值( $F_v$ )与最大荧光值( $F_m$ )之比( $F_v/F_m$ )逐渐降低, 而且3个转基因株系的 $F_v/F_m$ 值在水分胁迫后的各个时间点均略高于非转基因对照(图3-A); 可变荧光值( $F_v$ )与固定荧光值( $F_o$ )之比( $F_v/F_o$ )也表现出类似的动态, 其中转基因株系4-4-4在胁迫过程中的各个时间点 $F_v/F_o$ 值均显著高于非转基因对照(图3-B), 说明转基因株系在胁迫条件下的光系统II (PSII)光化学效率有所增强, 这可能与转基因株系中海藻糖的干旱诱导性积累有关, 这与Garg等(2002)在水稻中的相关研究结果一致。

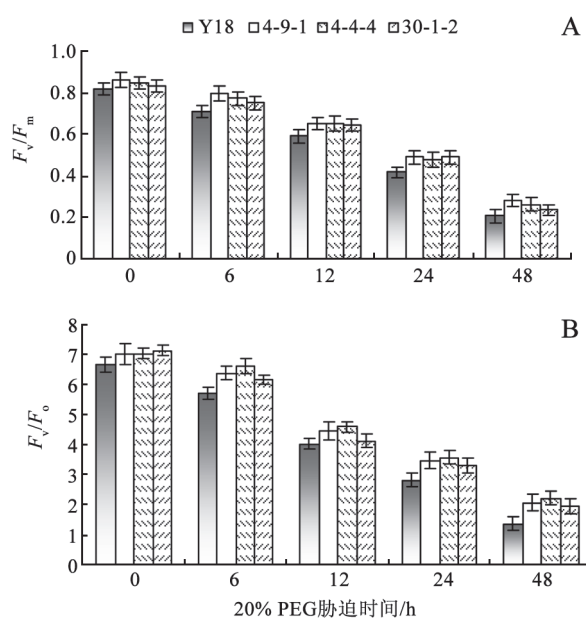


图3 干旱胁迫过程中转基因小麦的叶绿素荧光参数变化  
Fig.3 Changes of chlorophyll fluorescence parameters in transgenic wheat under water-stress

## 4 转基因小麦幼苗的耐旱性

在模拟干旱条件下进行的耐旱性鉴定显示, 3个转基因株系具有较强的耐旱能力(图4)。在胁迫前, 转基因株系和非转基因对照的生长状态基本一致(图4-A); 胁迫12 h时, 小麦幼苗出现部分叶片萎蔫下垂和少数叶尖变黄现象, 但转基因株系和对照植株差异不明显; 胁迫24 h时, 大部分叶片出现萎蔫下垂, 48 h时转基因株系的萎蔫程度明显要低于非转基因对照; 胁迫100 h时, 非转基因对照叶片几乎全部萎蔫, 且失绿严重, 而转基因株系则表现出不同程度的耐旱性(图4-B); 之后进行复水实

验,复水6 h时转基因株系已基本恢复正常生长,而非转基因对照植株仍表现出干旱胁迫症状;复水24 h时,转基因株系和对照均已恢复正常生长,但叶片黄化率仍存在显著差异,非转基因对照的黄化率平均为48.8%,而转基因株系4-9-1、4-4-4和30-1-2的叶片黄化率分别为25.2%、23.3%和27.6%,显著低于非转基因对照。

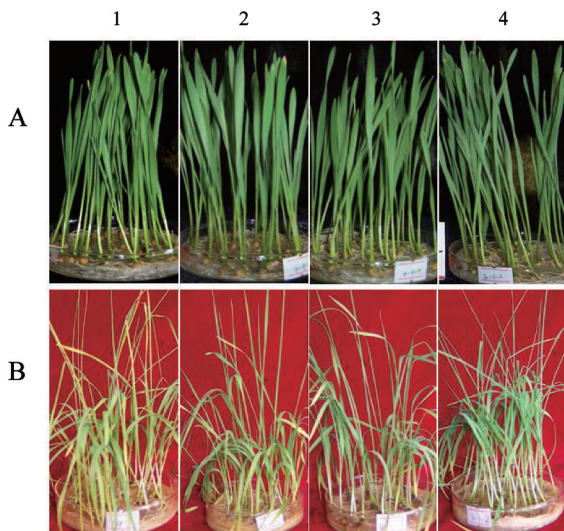


图4 转基因株系耐旱性鉴定

Fig.4 Drought tolerant assay of transgenic lines

A: 胁迫前植株; B: 胁迫100 h的植株; 1-4: 分别为非转基因对照、转基因株系4-9-1、4-4-4和30-1-2。

海藻糖作为一种重要的渗透条件物质,在干旱、高温、冷冻等非生物胁迫条件下具有保护植物细胞膜结构及维持细胞内蛋白质活性的作用,通过基因工程的方法提高植物体内海藻糖的积累能力已成为植物抗旱研究的重要方向(Iordachescu和Imai 2008)。然而,海藻糖合成相关基因的组成型表达会造成转基因植株矮化等不良性状,这可能与转基因植株中海藻糖的过量积累有关(Karim等2007)。另外,将海藻糖合成相关的单个基因导入植物后,转基因植株的抗旱能力也显得非常有限(Iordachescu和Imai 2008)。因此,本课题组在前期的研究中,克隆构建了海藻糖合成酶(TPS)和海藻糖磷酸酯酶(TPP)的融合基因 $TPSP$ ,并利用干旱诱导性启动子驱动目的基因,以防止因转基因植株中海藻糖的过渡积累而导致的不良性状(李永春等2009)。本研究发现,转 $TPSP$ 基因小麦纯合株系的耐旱相关生理指标均优于对照,表现出较强的

抗旱能力。在自然干旱条件下,转基因株系在田间的生长发育正常,且表现出很强的耐旱性,转基因株系的千粒重明显高于非转基因对照(未发表数据),这与Suarez等(2008)在大豆中的研究结果一致。可见,转 $TPSP$ 基因小麦具有较强的耐旱性和良好的综合性状,这为转基因材料作为亲本资源在小麦抗旱育种中的应用奠定了基础。

## 参考文献

- 陈吉宝, 赵丽英, 毛新国, 王述民, 景蕊莲(2010). 转 $PvP5CSI$ 基因拟南芥植株对干旱和盐胁迫的反应. 作物学报, 36: 147~153
- 杜丽璞, 徐惠君, 叶兴国, 林忠平(2007). 小麦转 $TPS$ 基因植株的获得及其初步功能鉴定. 麦类作物学报, 27(3): 369~373
- 李永春, 王潇, 陈焕丽, 陈雷, 孟凡荣, 尹钧(2009). 转 $TPSP$ 融合基因小麦植株的获得及抗旱性初步鉴定. 麦类作物学报, 29: 195~198
- 张仁和, 薛吉全, 浦军, 赵兵, 张兴华, 郑友军, 卜令铨(2011). 干旱胁迫对玉米苗期生长和光合特性的影响. 作物学报, 37: 521~528
- 邹琦(2000). 植物生理学实验指导. 北京: 中国农业出版社, 161~162
- Almeida AM, Villalobos E, Araujo S, Leyman B, Van Dijck P, Alfaro-Cardoso L, Fevreiro P, Torné JM, Santos DM (2005). Transformation of tobacco with an *Arabidopsis thaliana* gene involved in trehalose biosynthesis increases tolerance to several abiotic stresses. Euphytica, 146: 165~176
- Chary SN, Hicks GR, Choi YG, Carter D, Raikhel NV (2008). Trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase regulates cell shape and plant architecture in *Arabidopsis*. Plant Physiol, 146: 97~107
- Garg AK, Kim JK, Owens TG, Ranwala AP, Choi YD, Kochian LV, Wu RJ (2002). Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. Proc Natl Acad Sci USA, 99: 15898~15903
- Goddijn OJ, van Dun K (1999). Trehalose metabolism in plants. Trends Plant Sci, 4: 315~319
- Iordachescu M, Imai R (2008). Trehalose biosynthesis in response to abiotic stresses. J Integr Plant Biol, 50: 1223~1229
- Iturriaga G, Suarez R, Nova-Franco B (2009). Trehalose metabolism: from osmoprotection to signaling. Int J Mol Sci, 10: 3793~3810
- Karim S, Aronsson H, Ericson H, Pirhonen M, Leyman B, Welin B, Mantyla E, Palva ET, Van Dijck P, Holmstrom KO (2007). Improved drought tolerance without undesired side effects in transgenic plants producing trehalose. Plant Mol Biol, 64: 371~386
- Suarez R, Wong A, Ramirez M, Barraza A, Orozco Mdel C, Cevallos MA, Lara M, Hernandez G, Iturriaga G (2008). Improvement of drought tolerance and grain yield in common bean by overexpressing trehalose-6-phosphate synthase in rhizobia. Mol Plant Microbe Interact, 21: 958~966
- Zentella R, Mascorro-Gallardo JO, Van Dijck P, Folch-Mallol J, Bonini B, Van Vaec C, Gaxiola R, Covarrubias AA, Nieto-Sotelo J, Thevelein JM, Iturriaga G (1999). A *Selaginella lepidophylla* trehalose-6-phosphate synthase complements growth and stress-tolerance defects in a yeast *tps1* mutant. Plant Physiol, 119: 1473~1482