

## 过表达*Mdip1*基因提高番茄抗低温诱导的氧化胁迫能力

晋文娟<sup>1</sup>, 张少杰<sup>1</sup>, 陈双臣<sup>1\*</sup>, 林晓民<sup>1</sup>, 贺超兴<sup>2</sup>

<sup>1</sup>河南科技大学林学院, 河南洛阳471003; <sup>2</sup>中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京100081

**摘要:** 采用农杆菌介导法获得了类萌发素蛋白(germin-like protein, *Mdip1*)超表达的转基因番茄植株, PCR和Southern杂交检测表明, 外源基因分别以1~3个拷贝整合到番茄基因组中。Real-time PCR检测表明, 在转基因个体中目的基因已经在受体基因组上完成整合, 且不同株系间的表达有所差异。分析了低温下转*Mdip1*基因株系和野生型植株中AsA、GSH含量及H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>累计的差异。与未转基因植株相比, *Mdip1*超表达植株在低温胁迫下根干重、冠干重和叶绿素含量显著高于对照, 并显著提高了氧化还原信号AsA、GSH含量和AsA/DHA、GSH/GSSG以及GalLDH活性, 降低了低温胁迫下叶片H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、MDA的积累, 降低程度与表达量相关。亚细胞定位表明, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的增加主要分布在质外体。表明*Mdip1*基因通过调控氧化还原信号在番茄抗氧化胁迫响应中起重要作用。

**关键词:** 番茄; 氧化还原信号; 类萌发素蛋白; 活性氧; 低温胁迫

## Overexpression of *Mdip1* Gene Enhanced Tolerance of Transgenic Tomato to Chilling Mediated Oxidative Stress

JIN Wen-Juan<sup>1</sup>, ZHANG Shao-Jie<sup>1</sup>, CHEN Shuang-Chen<sup>1\*</sup>, LIN Xiao-Min<sup>1</sup>, HE Chao-Xing<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Forestry, Henan University of Science & Technology, Luoyang, Henan 471003, China; <sup>2</sup>Institute of Vegetables and Flowers, CAAS, Beijing 100081, China

**Abstract:** The germin-like protein gene *Mdip1* was introduced into tomato line Ailsa Craig via *Agrobacterium*-mediated method. Transgenic lines were confirmed for integration into the tomato genome using PCR, Southern blot hybridization. One to three copies of the transgene were integrated into the tomato nuclear genome. Transcription of *Mdip1* in various transgenic lines was determined using real-time PCR. Performance test of resistance analyses to chilling stress with T<sub>1</sub> generation transgenic tomato lines showed that the transgenic lines exhibited lighter symptoms of chilling injury and kept higher values of biomass accumulation and chlorophyll content than those of non-transformed plants. The resistance levels were related to expression levels of the transgene compared with wild-type plants, and the contents of AsA and AsA/DHA in both normal and low-temperature conditions were increased, while the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and MDA content were decreased in the transgenic plants. Meantime, the contents of GSH and GSH/GSSG and GalLDH activity were also increased in the overexpression plants. Based on these results, it can be concluded that *Mdip1* may play a pivotal role in increasing tomato tolerance against chilling stress by increasing redox level and lowering H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and lipid peroxidation accumulation.

**Key words:** tomato; redox signal; germin-like protein; reactive oxygen species; chilling stress

低温冷害是北方地区冬季日光温室番茄生产的主要限制因子。在研究植物对低温等环境胁迫的响应时发现了大量的胁迫响应基因, 其中类萌发素蛋白(germin-like protein, GLPs)在植物对生物和非生物胁迫的应答中起着重要的作用。GLPs是一类与小麦萌发素(germin)序列相似性较高的、位于胞外基质的可溶性糖蛋白, 绝大多数为稳定的低聚物(Patnaik和Khurana 2001; Guevara-Olvera等2012)。类萌发素蛋白几乎存在于所有的被子植物(包括禾本科植物)、裸子植物和苔藓中(Patnaik和Khurana 2001)。

GLPs是一种在陆生植物中普遍存在、表达量很高的基因家族, 推测其功能多种多样, 可能与植物的抗病反应(Manosalva等2009)、果实发育(El-Sharkawy等2010)、抗盐反应(Hurkman等1994)、抑制根的发育(Ham等2012)等诸多生长发育过程有关。Park等(2004)将辣椒*CaGLP1*基因瞬时过量

收稿 2013-01-17 修定 2013-04-09

资助 国家科技支撑计划(2011BAD12B03)、国家自然科学基金(31101536)、山东省科技攻关计划(2012GNC011111)和河南省青年骨干教师计划(2011GGJS-075)。

\* 通讯作者(E-mail: lamont@126.com; Tel: 0379-64282345)。

表达,表明*CaGLP1*过表达可能提高了烟草花叶病毒的抗性。在拟南芥中过量表达大麦*HvGER*基因(Zimmermann等2006)或葡萄*VvGLP3*基因(Godfrey等2007)都可以显著提高转基因植株对白粉病的抗性。Knecht等(2010)在拟南芥中过量表达糖用甜菜*BvGLP-1*基因可以使拟南芥提高对轮枝菌(*Verticillium longisporum*)和立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)的抗性,而对幼苗中内生真菌印度梨形孢没有影响。Rietz等(2012)对油菜菌核病菌敏感型和部分抗性甘蓝型油菜品种接种菌核病菌,发现不同的类萌发素基因表达量不同,其中*BnGLP3*和*BnGLP12*诱导了活性氧的爆发,在抵御油菜菌核病菌中起重要作用。Ham等(2012)在拟南芥中过量表达胞间连丝间同源基因*PDGLP1*和*PDGLP2*,发现类萌发素基因可以通过控制韧皮部介导的物质分配抑制初生根的生长和发育。

研究表明, GLPs主要以酶(如OXO/SOD/AGP-Pase等)、受体(如ABP19/20激素受体、Rhadhesins受体)和结构蛋白的形式参与多种生理生化过程(Patnaik和Khurana 2001)。但目前对GLPs的功能研究主要集中在麦类作物、水稻和拟南芥上,且已有研究大多以蛋白鉴定分析、酶的活性鉴定为主(Chen等2011),对其在非生物胁迫逆境下的生理机理知之甚少。本研究采用农杆菌介导法将类萌发素蛋白基因*Mdip1*导入番茄,探讨了*Mdip1*过量表达对番茄抵御低温能力的影响,丰富了番茄抗低温育种的基因资源。

## 材料与方法

### 1 试验材料

番茄受体材料为野生型Ailsa Craig (*Lycopersicon esculentum* L.),由美国加州大学番茄遗传中心惠赠。番茄*Mdip1*基因和*Mdip1*表达载体pBI121-*Mdip1*由本实验室克隆构建(图1)。*Mdip1*基因序列在GenBank的注册号为AB012138.1。总RNA微提试剂盒购自AxyGEN生物科技公司, RNA纯化试剂盒购自Qiagen公司, 反转录试剂盒购自Fermentas公司, iQ多色实时定量PCR检测系统及iQ SYBR Green超混合液购自伯乐公司, 引物由上海生工合成。

### 2 转基因番茄的遗传转化

参照Fillati (1987)农杆菌介导的番茄遗传转化

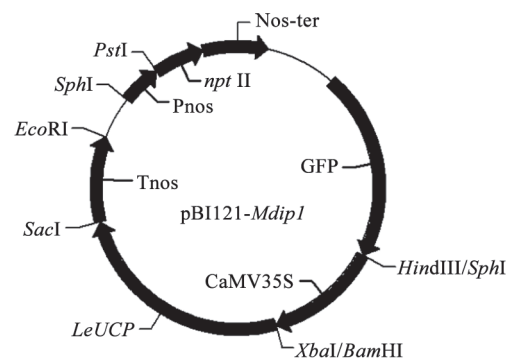


图1 表达载体pBI121-*Mdip1*的T-DNA区结构图

Fig.1 Schematic diagram of the T-DNA region of vector pBI121-*Mdip1*

Tnos: Nopaline合成酶终止子; Pnos: Nopaline合成酶基因启动子; CaMV35S: Cauliflower mosaic virus 35S启动子。

方法,用叶盘法将把质粒pBI121-*Mdip1*导入Ailsa Craig。将无菌番茄子叶切去叶尖和基端,切成0.5 cm<sup>2</sup>的小块,正面朝下置于M<sub>1</sub>培养基上(MS+2 mg·L<sup>-1</sup> ZT+0.2 mg·L<sup>-1</sup> IAA+50 μmol·L<sup>-1</sup> AS+15 g·L<sup>-1</sup>蔗糖+0.5%琼脂), 28 °C暗培养2 d。之后将预培养的外植体浸入用MS液体培养基稀释的根癌农杆菌悬浮液中10 min,用无菌滤纸吸去外植体表面多余菌液,在M<sub>1</sub>上共培养2 d。转移至筛选培养基M<sub>2</sub>上(MS+2 mg·L<sup>-1</sup> ZT+0.2 mg·L<sup>-1</sup> IAA+100 mg·mL<sup>-1</sup>卡那霉素+500 mg·mL<sup>-1</sup>羧苄青霉素+20 g·L<sup>-1</sup>蔗糖+0.5%琼脂)筛选分化芽。转化的抗性芽长至1.5~2.0 cm时,将芽切下放入M<sub>3</sub>培养基(MS+2.0 mg·L<sup>-1</sup> IAA+100 mg·mL<sup>-1</sup>卡那霉素+150 mg·mL<sup>-1</sup>羧苄青霉素+20 g·L<sup>-1</sup>蔗糖+0.5%琼脂)中诱导生根。将生根的T<sub>0</sub>代小植株直接移入装有草炭和蛭石的营养钵中,遮荫保湿炼苗3~5 d,在温室自然光照下生长。

### 3 转基因番茄的PCR、Southern和Real-time检测

转基因植株3~4片真叶时,用CTAB法提取基因组DNA,以pBI121-*Mdip1*载体的质粒为阳性对照,以非转基因植株为阴性对照进行PCR检测。PCR上游引物35S: 5'-GACGCACAATCCCAC-TATCC-3';下游引物*Mdip1*13: 5'-GCTGATCTCACC-TCAACTT-3'。PCR反应体系为25 μL,包括2 μL质粒DNA, 2.5 μL 2 mmol·L<sup>-1</sup> PCR buffer, 1.8 mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 2 mmol·L<sup>-1</sup> dNTPs混合物,引物各2 μL, 0.1 μL Taq聚合酶,加灭菌水补齐到终体积。PCR反应条件如下: 94 °C变性5 min; 然后进行如下循

环: 95 °C 预变性 2.5 min; 94 °C 变性 1 min, 56 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1.5 min, 共 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。扩增片段在 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

用限制性内切酶 *Hind*III 完全酶切 20 μg 总 DNA, 经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分离, 用毛细管转移法将胶中的 DNA 片段转移至尼龙膜 (HyBond N<sup>+</sup>) (Amersham Pharmacia) 上, 80 °C 烘干。预杂交、杂交均用 7% SDS 磷酸缓冲液。所用探针为 *NPTII* 基因扩增产物, 用 <sup>32</sup>P-dCTP 标记探针, 37 °C 保温 1 h, 热变性后加入杂交液, 55 °C 杂交 16 h。杂交膜用洗膜液 I (1×SSC, 0.1% SDS), 室温洗膜 2 次, 每次 10 min, 洗膜液 II (0.5×SSC, 0.1% SDS), 60 °C 洗膜 2 次, 每次 10 min。

取 0.2 g T<sub>1</sub> 代转基因植株根尖样品提取 RNA 和基因表达分析。总 RNA 用总 RNA 微提试剂盒提取, 以 RNA 纯化试剂盒进行纯化。用反转录试剂盒合成 cDNA 的第一条链, 作为 RT-PCR 的模板。实时定量 PCR 在 iQ 多色实时定量 PCR 检测系统中进行。25 μL 反应体系中包含: iQ SYBR Green 超混合液 12.5 μL、cDNA 1 μL、上下游引物各 0.2 μmol·L<sup>-1</sup>。PCR 反应程序: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 10 s, 58 °C 退火 45 s, 40 个循环。引物序列为: *Mdip1* 上游引物 5'-CCACGGAGATGATTTACG-TTT-3' 和下游引物 5'-TTGAACCCAGCAATAA-CAGC-3'; *actin*: 5'-TGGTCGGAATGGGACA-GAAG-3' 和 5'-CTCAGTCAGGAGAACAGGGT-3'。荧光数据在每个循环的退火末期采集。番茄中 *actin* 基因的荧光值作为计算的內标, 相对基因表达水平的计算参照 Livak 和 Schmittgen (2001) 的 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup> 法, 重复 3 次。

#### 4 转基因番茄苗期的低温处理

将转基因番茄 T<sub>1</sub> 代种子与对照非转基因番茄 (WT) 种子播种在消毒的土壤中, 当幼苗长至 5~6 片真叶时, 移入光照强度 300 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>、光照时间 14 h·d<sup>-1</sup> 的人工气候箱中于 25 °C/15 °C 预处理 1 d 后, 在 10 °C/8 °C 下进行低温胁迫 (LT), 以 25 °C/15 °C 为对照 (control)。于处理 5 d 分别选取相同节位的功能叶片, 每个处理 3 次重复, 液氮冷冻, -80 °C 低温冰箱保存。

### 5 测定项目与测定方法

#### 5.1 生物量和叶绿素含量的测定

分析耐冷性时, 取 25 °C/15 °C 条件下培育的五叶

期番茄, 在温度 10 °C/8 °C、光照强度 300 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> 和光照 14 h·d<sup>-1</sup> 的条件下进行低温处理。低温处理 21 d 后, 再移入 25 °C/15 °C 下恢复培养 7 d, 测定生物量积累、叶绿素含量变化。

#### 5.2 AsA、GSH、MDA 含量测定

AsA 和 DHA 含量的测定依据 Law 等 (1983) 的方法加以改进。取 0.3 g 样品, 加 5 mL 5% 三氯乙酸 (TCA) 提取, 12 000×g 离心 15 min。取 0.2 mL 上清液及用二硫苏糖醇 (DTT) 处理 10 min 的混合液, 分别加 0.2 mL 水和 0.5 mL PBS, 然后依次加入 0.4 mL 10% TCA, 0.4 mL 44% 正磷酸, 0.4 mL 连吡啶 (70% 乙醇溶液配制), 0.2 mL 3% FeCl<sub>3</sub> 显色。放入 40 °C 水浴锅中反应 40 min, 离心去除杂质, 525 nm 处比色。测定 DHA 时, 吸取一定量提取液加至 2.0 mL 100 mmol·L<sup>-1</sup> 磷酸钾缓冲液 (pH 6.8) 中, 加入 2 mmol·L<sup>-1</sup> DTT 后记录 265 nm 下的吸光值变化。

谷胱甘肽含量依据 Rao 和 Ormrod (1995) 的方法进行测定。取 0.3 g 鲜样, 加适量 5% TCA 提取, 20 000×g 离心 15 min。取上清液用于 GSH 的测定。取 0.4 mL 上清液, 然后加入 0.6 mL 磷酸缓冲液稀释, 然后加入 40 μL 的 2-乙烯基吡啶, 在 25 °C 下反应 1 h, 用于测定 GSSG。MDA 含量测定参照赵世杰等 (1994) 的方法。

#### 5.3 叶片 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量测定

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的检测参照 Willekens 等 (1997) 进行。取 0.3 g 叶片冰浴研磨均匀, 加入 3 mL 1.0 mol·L<sup>-1</sup> HClO<sub>4</sub>, 4 °C 6 000×g 离心 5 min。取 2.5 mL 上清液逐滴加入 4 mol·L<sup>-1</sup> KOH, 直到 pH 达 6~7 为止。加入 0.05 g 活性炭吸附色素, 剧烈涡旋 20 s 后, 4 °C 12 000×g 离心 5 min。取 2 mL 上清液过膜, 加入 4 μL 辣根过氧化物酶 (POD)、1 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 样品和 994 mL 反应缓冲液测定吸收峰 412 nm。

#### 5.4 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组织化学染色和亚细胞分析

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的组织化学染色参考 Thordal-Christensen (1997) 的方法。取不同处理的叶圆片 (直径 1.5 cm) 用蒸馏水洗净后将其置于 10 mL 离心管中, 加入适量 DAB 反应液 (50 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 3.8)。28 °C 避光保存 8 h 后吸去各管染液, 加入 80% 乙醇并沸水浴直至叶片完全脱绿后拍照 (Leica DM4000; Leica, Wetzlar, Germany)。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的亚细胞定位参照 Bestwick 等 (1997) 的方法, 在 JEM-1200 EX 型透射电镜 (Japan, JEOL company) 下观察、照相。

### 5.5 半乳糖内酯脱氢酶(GalLDH)活性测定

GalLDH活性测定参照Tabata等(2001)进行。取2 g叶片, 4 °C下在5 mL 100 mmol·L<sup>-1</sup>磷酸钾缓冲液(pH 7.4)中研磨成匀浆, 双层纱布过滤后在300×g下离心, 取上清于10 000×g离心收集沉淀, 轻悬浮于0.5 mL 100mmol·L<sup>-1</sup>磷酸钾缓冲液(pH 7.4)中作为酶液。2.4 mL反应体积中含有2 mL 1.05 mg·mL<sup>-1</sup>的Cyt c, 200 μL 56 mmol·L<sup>-1</sup>的L-半乳糖内酯和200 μL酶液。测定前将反应混合液于25 °C预温育1 min, 反应从加入L-半乳糖内酯后开始计时。1个酶活力单位定义为每分钟氧化1 nmol L-半乳糖内酯所需的酶液量, 摩尔系数值为17.3 mmol<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>。

### 6 数据处理

应用DPS v 7.05软件进行数据分析, 采用Duncan氏法进行差异显著性检验。

## 实验结果

### 1 外源基因整合及表达检测结果

#### 1.1 目的基因PCR检测

对得到的抗性植株进行PCR检测, 电泳检测结果如图2。结果表明: 转基因植株均扩出与阳性对照同样大小的980 bp的目的片段, 而未转化植株的基因组DNA未扩增出任何条带。

#### 1.2 转基因植株的Southern杂交和表达分析结果

提取T<sub>0</sub>代植株PCR检测呈阳性的5个株系的DNA, 利用NPTII基因的PCR扩增片段作探针, 与酶切后的转基因番茄基因组DNA杂交分析, 结果显

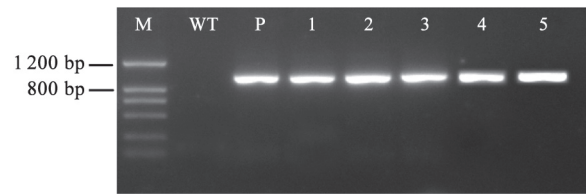


图2 T<sub>0</sub>代转基因番茄植株DNA的PCR结果

Fig.2 Detection of *Mdipl* gene in T<sub>0</sub> transgenic tomato by PCR

M: DNA分子量标记; Lane 2: 非转基因对照(WT); Lane 3: 质粒DNA阳性对照; Lanes 4~7: 不同转基因株系。

示外源基因以单拷贝或低拷贝的形式整合入番茄基因组中, 而未转化植株无杂交带, 表明外源基因已整合到所转化的番茄基因组中(图3-A)。为了确证外源基因在番茄基因组中的表达, 提取PCR阳性T<sub>1</sub>代植株的RNA, 进行转基因表达水平检测, 表明*Mdipl*基因在转基因植株中都有不同程度的表达, 表达水平在各株系间有所差异(图3-B)。

### 2 低温胁迫下转基因番茄生物量积累和叶绿素含量的变化

转基因与未转基因番茄在10 °C/8 °C低温处理期间, 两者外观上的差别不明显。处理21 d后, 番茄移入25 °C/15 °C下恢复时, 未转基因植株呈现严重的冷害症状, 叶片逐渐萎蔫; 而转基因植株在恢复期间仅出现轻微的冷害症状。低温胁迫后转基因植株根干重、冠干重和叶绿素含量均显著高于对照植株, 呈现较强的耐冷能力(表1)。

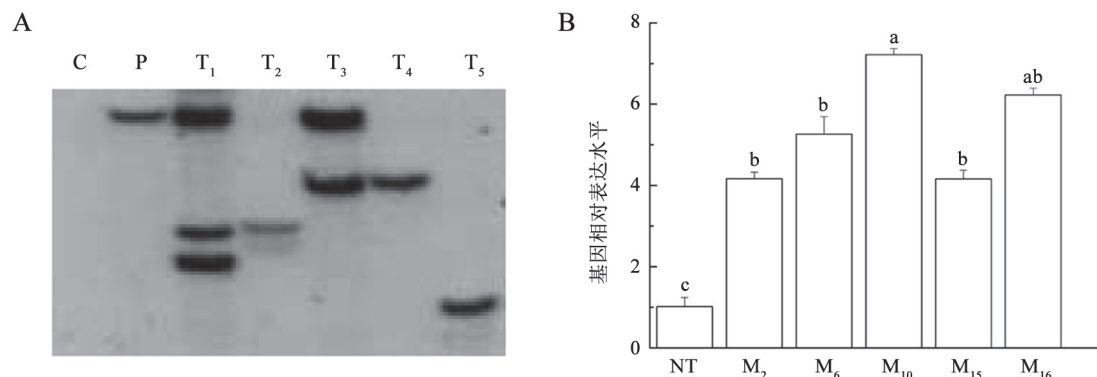


图3 转基因番茄植株Southern杂交(A)和基因表达分析(B)

Fig.3 Southern blot and real-time analysis of PCR-positive transformed plants with *Mdipl*

Lane C: 非转基因对照(WT); Lane P: 质粒DNA阳性对照; Lanes T<sub>1</sub>~T<sub>5</sub>: 不同T<sub>0</sub>代转基因株系; M<sub>2</sub>~M<sub>16</sub>: 不同T<sub>1</sub>代转基因株系; NT: 非转基因株系, 不同小写字母表示不同株系测定值间具有显著性差异( $P < 0.05$ )。图4~6和表1同此。

表1 *Mdip1*过量表达对低温胁迫下番茄生物量积累和叶绿素含量的影响

Table 1 Analysis of biomass accumulation and chlorophyll content of T<sub>1</sub> transformed plants

株系	根干重/g		冠干重/g		总干重增量/g	叶绿素含量/mg·g <sup>-1</sup>	
	胁迫前	胁迫后	胁迫前	胁迫后		胁迫前	胁迫后
WT	0.134 <sup>a</sup>	0.145 <sup>b</sup>	0.61 <sup>a</sup>	0.70 <sup>b</sup>	0.101 <sup>b</sup>	11.84 <sup>a</sup>	7.88 <sup>b</sup>
M <sub>2</sub>	0.136 <sup>a</sup>	0.165 <sup>a</sup>	0.63 <sup>a</sup>	0.80 <sup>a</sup>	0.199 <sup>a</sup>	11.87 <sup>a</sup>	12.71 <sup>a</sup>
M <sub>10</sub>	0.138 <sup>a</sup>	0.176 <sup>a</sup>	0.65 <sup>a</sup>	0.85 <sup>a</sup>	0.238 <sup>a</sup>	12.88 <sup>a</sup>	11.44 <sup>a</sup>

### 3 低温胁迫下转基因番茄叶片中AsA、GSH和MDA含量的变化

由图4可知, 转*Mdip1*基因植株AsA、AsA+DHA的含量、AsA/DHA的比值均有所增加, 但对GSH、GSH+GSSG含量则无明显影响。低温胁迫下, 转基因植株与对照抗坏血酸含量均明显增加,

转基因植株中AsA含量、AsA/DHA显著高于对照, 且与*Mdip1*的表达量正相关, 其中M<sub>10</sub>的AsA含量、AsA/DHA比未转化植株分别高出58.13%、135.63%。同样, 低温下转基因植株中GSH、GSH+GSSG含量和GSH/GSSG较对照也明显增加, GSH含量、GSH/GSSG分别较未转基因对照提高33.33%和

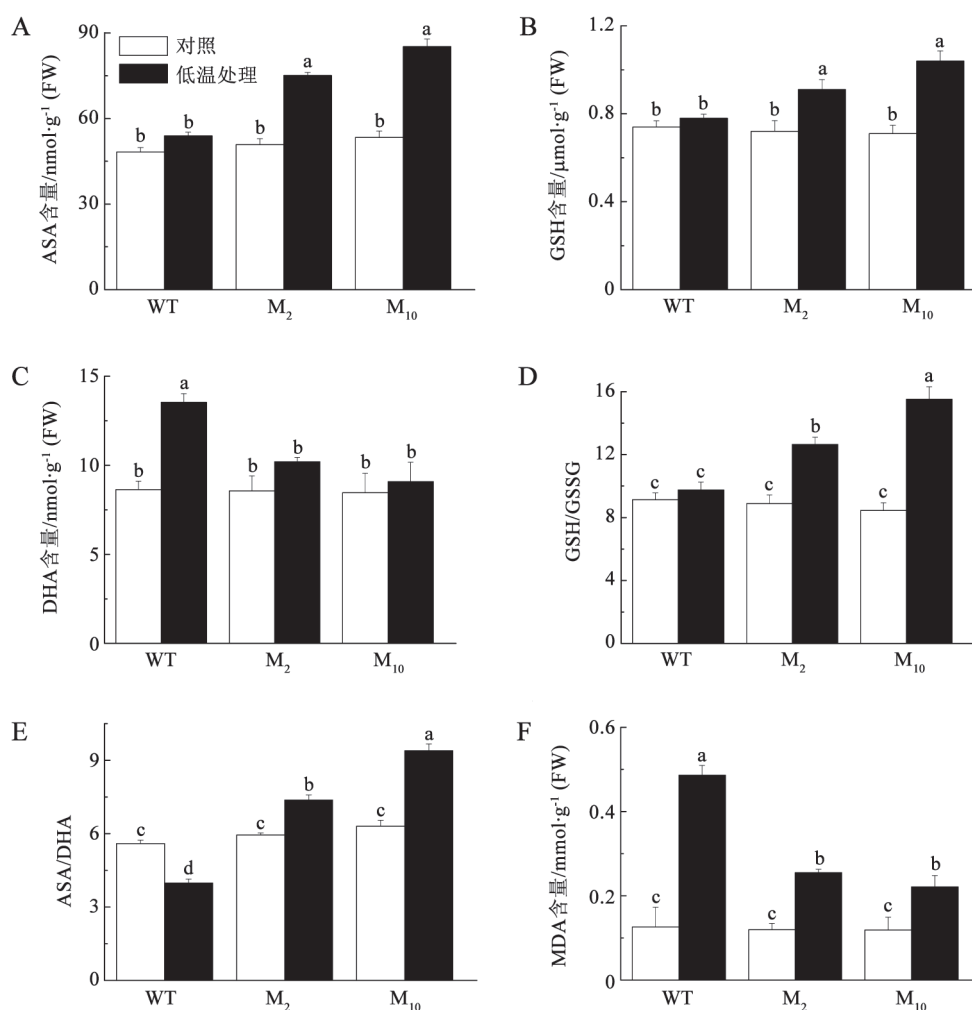


图4 *Mdip1*过量表达对低温胁迫下番茄叶片中AsA、GSH和MDA含量的影响  
Fig.4 Analysis of AsA, GSH and MDA content in the leaves of T<sub>1</sub> transformed plants

59.20%。同时,低温处理植株后显著增加了转基因植株与对照叶片的MDA含量,但转基因植株中MDA含量显著低于对照,其中M<sub>10</sub>较对照降低54.52%。

#### 4 低温胁迫下转基因番茄叶片中H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>积累的变化

如图5-A所示,在正常生长条件下,转基因植株与对照H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>含量无显著差异。在低温胁迫下,未转化叶片H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>含量显著提高。而不同转化株系间H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>含量与外源基因的表达相关,过量表达植

株M<sub>2</sub>、M<sub>6</sub>、M<sub>10</sub>叶片中H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>含量较未转化植株分别降低了43.8%、49.9%和58.1%。利用DAB组织化学染色法得到了相同的结果(图5-B),转基因植株H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>积累较对照相比明显降低。进一步用CeCl<sub>3</sub>染色法对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的亚细胞定位表明(图5-B),H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的增加主要分布在叶肉细胞细胞壁的背影和质外体,而在叶绿体、线粒体、细胞核及液泡等组织内基本没有或有少量的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>产生。

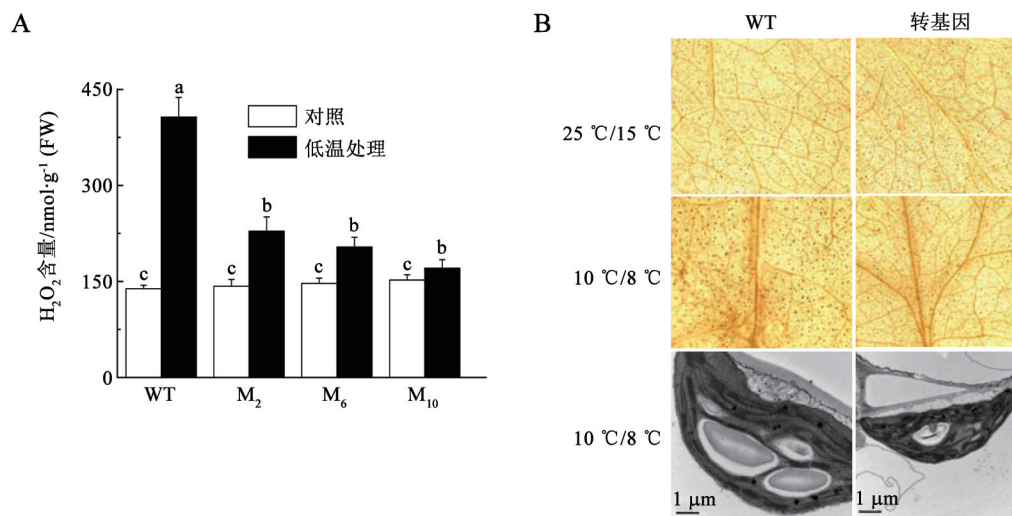


图5 *Mdip1*过量表达对低温胁迫下番茄叶片中H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>含量的影响  
Fig.5 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content and accumulation analysis of T<sub>1</sub> transformed plants

#### 5 低温胁迫下转基因番茄叶片中GaILDH活性的变化

高等植物主要通过L-半乳糖途径合成AsA (Wheeler等1998), L-半乳糖内酯脱氢酶(GaILDH)直接氧化L-半乳糖内酯生成AsA。由图6可知,不同转*Mdip1*基因植株中GaILDH活性均有所增加,但差异不显著。低温胁迫下,转基因植株GaILDH活性显著高于对照,且与*Mdip1*的表达量正相关,其中M<sub>10</sub>的GaILDH活性比未转化植株高出59.85%。

### 讨 论

近年来的研究发现GLPs在调节植物防御反应方面具有重要作用。通过瞬时超表达和基因沉默手段证明, GLPs家族作为复杂的数量性状位点,对植物病原真菌、细菌、病毒起到广谱抗性作用 (Manosalva等2009; Guevara-Olvera等2012)。在本研究中,利用农杆菌介导转化番茄叶盘得到了

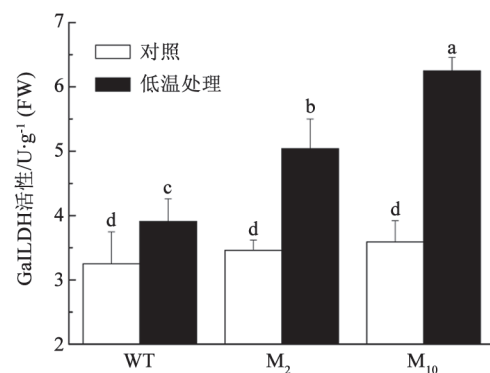


图6 *Mdip1*过量表达对低温胁迫下番茄叶片中GaILDH活性的影响  
Fig.6 GaILDH activity analysis of T<sub>1</sub> transformed plants

*Mdip1*过量表达的植株。转基因T<sub>1</sub>株系在低温胁迫下,抗性均比对照有明显提高,所得到的稳定表达的T<sub>1</sub>株系对于番茄耐低温育种有着实际的应用价值。

氧化还原反应是生物体生长发育过程中能量转化分配的基本代谢过程, 有关氧化还原信号在植物生长发育、生理代谢、基因表达和抗逆中的作用日益受到人们的广泛关注(Jiang等2012; Dietz 2008)。抗坏血酸和谷胱甘肽是具有氧化还原活性的分子, 通常植物体以氧化还原状态的改变来响应生物或非生物胁迫。在遭遇逆境胁迫时, 植株可通过调节以GSH-AsA为核心的活性氧清除系统, 减轻伤害(Noctor 2006; Dietz 2008)。氧化还原状态(AsA/DHA比率)、AsA的含量及其合成与代谢相关酶类活性的变化涉及植物对一系列逆境胁迫的响应。在番茄根中, Shalata等(2001)发现, 盐胁迫使盐敏感品种的AsA含量降低, DHA的含量明显升高, AsA/DHA比率降低; 然而盐耐受品种与之刚好相反, 表明番茄较高的抗盐性, 至少部分地来自于AsA含量、AsA/DHA比率和某些相关酶活性的提高。Burkey等(2003)发现, 在臭氧胁迫条件下, 食莢菜豆叶中总AsA的含量耐受品种比敏感品种高, 且能维持相对较高的AsA库; 此外, 质外体总AsA含量耐受品种远远高于敏感品种, 其AsA/(AsA+DHA)比率也相对较高, 表明植物臭氧忍耐力与质外体AsA的含量和氧化还原状态密切相关。本研究中, 在低温胁迫下, 转基因植株与野生型植株相比, *Mdip1*过量表达植株AsA含量、AsA/DHA均高于野生型植株, 且膜脂过氧化产物MDA含量和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>累计均显著低于野生型植株。同时, 转基因植株GSH含量无显著变化, 但低温下GSH含量则明显高于对照。进一步通过亚细胞检测表明, 未转化植株H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>在质外体中大量累积。Aria和Ramin(2009)和李超汉等(2009)研究表明, 施用外源AsA可降低逆境下植株中MDA的积累。本研究中转基因植株中MDA含量的降低可能与*Mdip1*基因的超量表达增加内源AsA含量有密切关系。同时, 未转化植株中AsA合成下降, 导致质外体AsA氧化还原状态过氧化, 而AsA是质外体唯一的redox缓冲体系, 并且质外体的抗氧化能力很弱(Pignocchi等2003), 从而使H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>过度累积, 因此, *Mdip1*可能通过H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>信号途径调节植物的防卫反应。

我们发现, 与对照相比, 低温下转化植株叶片中维持了较高GalLDH活性(图6), 从而叶片能持续合成AsA, 这可能是逆境下转基因植株积累AsA的主要原因, 表明低温下AsA的合成至少部分受

GalLDH活性的调节。An等(2004)研究表明, 刺梨不同器官中AsA的积累量与*GalLDH*基因表达水平具高度的协同性, 即在AsA积累量更高的器官中*GalLDH*基因的表达也更强, 这与本研究结果是一致的。以上结果说明, 表明番茄*Mdip1*基因通过调控redox信号而对植物抗氧化胁迫起到了积极作用。

对T<sub>1</sub>代H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>和MDA含量检测结果表明, 各转基因株系间抗冷性有所差异。已有研究表明抗性的强弱与基因表达水平间存在相关性(Duan等2012; Yarra等2012)。但也有研究表明抗性的强弱与基因表达水平间的相关性存在争议(Park等2005)。本研究对T<sub>1</sub>代植株转基因表达和抗冷性分析表明, *Mdip1*基因的表达水平较高的株系M<sub>6</sub>、M<sub>10</sub>抗性较强, 而基因表达较弱的M<sub>2</sub>膜脂过氧化产物MDA和活性氧累计较多, 表明各株系的抗性与外源基因的表达量相关。进一步分析表明, 外源基因的表达水平与外源基因的插入拷贝数无直接关系, 这与前人结果相一致(Moravčiková等2004)。

## 参考文献

- 李超汉, 张琳, 史庆华, 李青竹, 郭晓青, 李霞, 于贤昌(2011). *GM-Pase*超表达对番茄植株抗坏血酸含量及耐冷性相关生理指标的影响. 园艺学报, 38: 692~700
- 赵世杰, 许长成, 邹琦(1994). 植物组织中丙二醛测定方法的改进. 植物生理学通讯, 30: 207~210
- An HM, Chen LG, Fan WG (2004). cDNA fragment cloning of L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase and its expression in different organs of *R. roxburghii* Tratt. Agr Sci China, 3: 807~811
- Aria D, Ramin SJ (2009). Impact of exogenous ascorbic acid on antioxidant activity and some physiological traits of common bean subjected to salinity stress. Not Bot Horti Agrobi, 37: 165~172
- Bestwick CS, Brown IR, Bennett MHR, Mansfield JW (1997). Localization of hydrogen peroxide accumulation during the hypersensitive reaction of lettuce cells to *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. Plant Cell, 9: 209~221
- Burkey KO, Eason G, Fiscus EL (2003). Factors that affect leaf extracellular ascorbic acid content and redox status. Physiol Plant, 117: 51~55
- Chen XP, Wang ML, Holbrook C, Culbreath A, Liang XQ, Breneman T, Guo BZ (2011). Identification and characterization of a multigene family encoding germin-like proteins in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.). Plant Mol Biol Rep, 29: 389~403
- Dietz KJ (2008). Redox signal integration: from stimulus to networks and genes. Physiol Plantarum, 133: 459~468
- Duan M, Feng HL, Wang LY, Li D, Meng QW (2012). Overexpression of thylakoidal ascorbate peroxidase shows enhanced resistance to chilling stress in tomato. J Plant Physiol, 169: 867~877

- El-Sharkawy I, Mila I, Bouzayen M, Jayasankar S (2010). Regulation of two germin-like protein genes during plum fruit development. *J Exp Bot*, 61: 1761~1770
- Fillati JJ, Kiser J, Rose R, Luca C (1987). Efficient transfer of a glyphosate tolerance gene into tomato using a binary *Aprobacterium tumefaciens* vector. *Biotechnology*, 5: 726~730
- Godfrey D, Able AJ, Dry IB (2007). Induction of a grapevine germin-like protein (*VvGLP3*) gene is closely linked to the site of Erysiphe necator infection: A possible role in defense? *Mol Plant Microbe In*, 20: 1112~1125
- Guevara-Olvera L, Ruiz-Nito ML, Rangel-Cano RM, Torres-Pacheco I, Rivera-Bustamante RF, Muñoz-Sánchez CI, González-Chavira MM, Cruz-Hernandez A, Guevara-González RG (2012). Expression of a germin-like protein gene (*CchGLP*) from a geminivirus-resistant pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) enhances tolerance to geminivirus infection in transgenic tobacco. *Physiol Mol Plant Pathol*, 78: 45~50
- Ham BK, Li G, Kang BH, Zeng F, Lucas WJ (2012). Overexpression of *Arabidopsis* plasmodesmata germin-like proteins disrupts root growth and development. *Plant Cell*, 24: 3630~3648
- Hurkman WJ, Lane BG, Tanaka CK (1994). Nucleotide sequence of a transcript encoding a germin-like protein that is present in salt-stressed barley (*Hordeum vulgare* L.) roots. *Plant Physiol*, 104: 803~804
- Jiang YP, Cheng F, Zhou YH, Xia XJ, Mao WH, Shi K, Chen Z, Yu JQ (2012). Cellular glutathione redox homeostasis plays an important role in the brassinosteroid-induced increase in CO<sub>2</sub> assimilation in *Cucumis sativus*. *New Phytol*, 194: 932~943
- Knecht K, Seyffarth M, Desel C, Thureau T, Sherameti I, Lou BG, Oelmüller R, Cai DG (2010). Expression of *BvGLP-1* encoding a germin-like protein from sugar beet in *Arabidopsis thaliana* leads to resistance against phytopathogenic fungi. *Mol Plant Microbe In*, 23: 446~457
- Law MY, Charles SA, Halliwell B (1983). Glutathione and ascorbic acid in spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplasts—the effect of hydrogen-peroxide and of Paraquat. *Biochem J*, 210: 899~903
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔCT</sup> method. *Methods*, 25: 402~408
- Manosalva PM, Davidson RM, Liu B, Zhu XY, Hulbert SH, Leung H, Leach JE (2009). A germin-like protein gene family functions as a complex quantitative trait locus conferring broad-spectrum disease resistance in rice. *Plant Physiol*, 149: 286~296
- Moravčíková J, Matušíková I, Libantová J, Bauer M, Mlynářová L (2004). Expression of a cucumber class III chitinase and *Nicotiana glaucum* class I glucanase genes in transgenic potato plants. *Plant Cell Tiss Org*, 79: 161~168
- Noctor G (2006). Metabolic signalling in defence and stress: the central roles of soluble redox couples. *Plant Cell Environ*, 29: 409~425
- Park CJ, An JM, Shin YC, Kim KJ, Lee BJ, Paek KH (2004). Molecular characterization of pepper germin-like protein as the novel PR-16 family of pathogenesis-related proteins isolated during the resistance response to viral and bacterial infection. *Planta*, 219: 797~806
- Park SM, Lee JS, Jegal S, Jeon BY, Jung M, Park YS, Han SL, Shin YS, Her NH, Lee JH, et al (2005). Transgenic watermelon rootstock resistant to CGMMV (cucumber green mottle mosaic virus) infection. *Plant Cell Rep*, 24: 350~356
- Patnaik D, Khurana P (2001). Germins and germin like proteins: an overview. *Indian J Exp Biol*, 39: 191~200
- Pignocchi C, Fletcher JE, Barnes J, Barnes JD, Foyer CH (2003). The function of ascorbate oxidase (AO) in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Plant Physiol*, 132: 1631~1641
- Rao MV, Ormrod DP (1995). Impact of UVB and O<sub>3</sub> on the oxygen-free radical scavenging system in *Arabidopsis thaliana* genotypes differing in flavonoid biosynthesis. *Photochem Photobiol Sci*, 62: 719~726
- Rietz S, Bernsdorff FE, Cai D (2012). Members of the germin-like protein family in *Brassica napus* are candidates for the initiation of an oxidative burst that impedes pathogenesis of *Sclerotinia sclerotiorum*. *J Exp Bot*, 63: 5507~5519
- Shalata A, Mitova V, Volokita M, Guy M, Tal M (2001). Response of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii* to salt-dependent oxidative stress: The root anti-oxidative system. *Physiol Plant*, 112: 487~494
- Tabata K, Oba K, Suzuki K, Esaka M (2001). Generation and properties of ascorbic acid-deficient transgenic tobacco cells expressing antisense RNA for L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase. *Plant J*, 27: 139~148
- Thordal-Christensen H, Zhang Z, Wei Y, Collinge DB (1997). Subcellular localization of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in plants: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *Plant J*, 11: 1187~1194
- Wheeler GL, Jones MA, Smirnoff N (1998). The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature*, 393: 365~369
- Willekens H, Chamnongpol S, Davey M, Schraudner M, Langebartels C, Van Montagu M, Inzé D, Van Camp W (1997). Catalase is a sink for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and is indispensable for stress defence in C<sub>3</sub> plants. *EMBO J*, 16: 4806~4816
- Yarra R, He SJ, Abbagani S, Ma B, Bulle M, Zhang WK (2012). Overexpression of a wheat Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene (*TaNHX2*) enhances tolerance to salt stress in transgenic tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.). *Plant Cell Tiss Org*, 111: 49~57
- Zimmermann G, Baumlein H, Mock H, Himmelbach A, Schweizer P (2006). The multigene family encoding germin-like proteins of barley. Regulation and function in basal host resistance. *Plant Physiol*, 142: 181~192