

转玉米*ZmSDD1*基因烟草降低气孔密度提高抗旱性

刘延波^{1,2}, 项阳^{1,3}, 秦利军^{1,2}, 赵德刚^{1,2,3,*}

贵州大学¹农业生物工程研究院, 山地植物资源保护与种质创新省部共建教育部重点实验室, ²绿色农药与农业生物工程国家重点实验室培育基地, ³生命科学学院基因工程实验室, 贵阳550025

摘要: 为了培育抗旱的烟草新品种并研究玉米*SDD1*基因(*ZmSDD1*)的功能, 从玉米中同源克隆到*ZmSDD1*, 构建了含有玉米*Ubiquitin*启动子驱动的*ZmSDD1*基因的植物表达载体pGM626-Ubi-*ZmSDD1*-ABt, 并利用叶盘转化法遗传转化烟草, 筛选获得转基因植株。经反复干旱处理发现, 转*Ubiquitin::ZmSDD1*基因烟草存活率比野生型高80%, 转基因植株中PRO含量以及POD和SOD活性均显著高于野生型烟草植株, MDA含量则低于野生型植株。转*ZmSDD1*基因烟草植株和野生型植株的气孔导度、细胞间二氧化碳浓度和蒸腾速率在干旱后都有所下降, 但转基因植株的净光合速率极显著高于野生型。转*Ubiquitin::ZmSDD1*烟草植株叶片表面气孔数较野生型相比减少50%。Real-time PCR结果显示转基因烟草和野生型相比负调控气孔密度的*ZmSDD1*基因和*MAPK3*基因表达量均极显著上调, 正调控气孔密度的*FAMA*基因极显著下调。结果说明, 转*ZmSDD1*植株比野生型植株抗旱的原因是由于*ZmSDD1*基因负调控了气孔发育相关基因的表达从而使气孔密度降低, 减少蒸腾作用, 减少水分散失从而提高抗旱性。

关键词: 烟草; 气孔密度; *ZmSDD1*; 抗旱

Improvement of Drought Tolerance in Transgenic Tobacco Expressed Maize *ZmSDD1* by Reducing Stomatal Density

LIU Yan-Bo^{1,2}, XIANG Yang^{1,3}, QIN Li-Jun^{1,2}, ZHAO De-Gang^{1,2,3,*}

¹Key Laboratory of Plant Resources Conservation and Germplasm Innovation in Mountainous Region (Ministry of Education), Institute of Agro-Bioengineering, ²State Key Laboratory Breeding Base of Green Pesticide and Agricultural Bioengineering, ³Genetic Engineering Laboratory in College of Life Sciences, Guizhou University, Guiyang 550025, China

Abstract: In this study, a *ZmSDD1* gene derived from *Zea mays* was cloned by homology-based cloning method. The plant expression vector, named by pGM626-Ubi-*ZmSDD1*-ABt, contained *Z. mays Ubiquitin* promoter-driven *ZmSDD1* was constructed for studying the function of the gene. The transformation method mediated by *Agrobacterium* was executed to genetically transform the tobacco leaf disks. In addition to, the results from the repeated drought experiments indicated that the survival rate was about 80% higher in transgenic tobacco plants than wild-type plants. By the enzyme activity of SOD and POD and the content of PRO and MDA determined after drought, we concluded that the transgenic plants could bear the drought stress by increasing SOD and POD enzyme activity and PRO content. The stomatal conductance, intercellular CO₂ concentration and transpiration rate were decreased in transgenic and wild-type plants, but net photosynthetic rate was significantly higher in transgenic plants than wild-type ones. Results from microscopic observation found that the stomatal number in transgenic tobacco plants decreased 50% compared with the wild-type ones. Meanwhile, the relative expression of the genes in stoma development-related were analyzed and the results showed that the relative expression of two genes, *MAPK3* and *ZmSDD1* which was negative correlation with stomatal development, were up-regulated obviously, while the *FAMA* gene of positive correlation with the development reported was significantly down-regulated simultaneously. To sum up, the *ZmSDD1* transgenic tobacco plants could resist drought stress by decreasing the stomatal density of leaf surface and transpiration.

Key words: tobacco; stomatal density; *ZmSDD1*; drought tolerance

收稿 2014-10-13 修定 2014-11-20

资助 国家转基因生物新品种培育科技重大专项子课题(2014ZX0801008B-002)、国家转基因生物新品种培育科技重大专项子课题(2014ZX08010-003)和贵州省科技厅转基因专项(黔科合2004NZ004)。

* 通讯作者(E-mail: dgzhao@gzu.edu.cn; Tel: 0851-3863615)。

我国烟草总产量居世界首位,在国民经济中占有重要地位。由于水分的限制,我国每年有大量地区的烟叶产量、质量受到影响。干旱是影响烟草正常生长发育、烟叶品质和产量的一个重要影响因子(Holmström等1996)。在干旱胁迫下,烟叶的产量下降,中上等烟比例减少,烟叶内还原糖含量下降,烟碱和总氮含量升高,烟叶内在化学成分比例失调(于建军和汪旭富1993)。此外,在干旱胁迫下,烟叶中主要香气物质含量减少且香气物质变差,甚至使烟叶失去其利用价值(韩锦峰等1994),可见水分已成为烟叶生产的主要限制因子,提高水分利用率成为最迫切的需求(王军等2004)。

植物约90%水是通过气孔蒸腾作用散失的,研究气孔具有重要的意义(Schroeder等2001)。气孔密度和分布(stomatal density and distribution)相关基因*SDD1*首先在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中被发现,它编码丝氨酸蛋白酶,是气孔发育相关的重要元件之一(Berger和Altmann 2000)。*SDD1*属枯草杆菌蛋白酶(subtilase)家族,其编码基因是拟南芥subtilases家族56个成员中唯一有表型改变的功能基因(Rautengarten等2005)。在拟南芥突变体*stomatal density and distribution1-1 (sdd1-1)*中由于缺乏*SDD1*蛋白,因此建立起来的气孔模式是断裂的,导致气孔密度增加2~4倍(Schlüter等2003);相反在野生型拟南芥中过表达*SDD1*基因导致的表型和*sdd1-1*突变体完全相反,减少了2~4倍的气孔密度(von Groll等2002)。在中国传统中草药菘蓝(*Isatis indigotica*)中分离的菘蓝*SDD1 (IsSDD1)*和拟南芥*SDD1 (AtSDD1)*有高度同源性,*IsSDD1*不仅参与应激敏感通路,还可能和多倍体进化有关(Xiao等2010)。在拟南芥上*gtl1 (GT-2 LIKE 1)*突变体通过减少日间的蒸腾作用且生物量没有减少的情况下,提高了水分利用率,增强了抗旱性。蒸腾减少的原因是*GTL1*基因负调控*AtSDD1*,在*gtl1*突变体中*AtSDD1*基因大量表达从而导致减少25%的气孔密度(Yoo等2010)。

传统育种技术在选育抗旱烟草品种应用中发挥了积极的作用,但其周期较长,耗时费力(Zhou等2014)。近年来,利用转基因技术将抗旱相关基因转入烟草,增强烟草的抗旱能力有着广阔的应用前景,也是未来烟草抗旱育种的一个发展趋势(Basu等2010; 赵文军等2012)。通过构建含有

*ZmSDD1*的载体,将其遗传转化烟草,研究*ZmSDD1*基因的功能及抗旱特性,从而提高烟草产量和水分利用效率,进而培育抗旱新品种,也为其他农作物的抗旱分子育种和品种改良奠定了分子基础。

材料与方法

1 材料

普通烟草(*Nicotiana tabacum* L. cv. 'Xanthi')种子由本研究院保存并提供;新型植物DNA提取试剂盒购自TIANGEN BIOTECH公司;限制性内切酶*SpeI*酶、Premix Taqver 2.0 plus dye和DNA 2000 Marker Ladder均购于TaKaRa宝生物工程(大连)有限公司;MultiScribe™ Reverse Transcriptase Kit和Power SYBR® Green PCR Master Mix购于Applied Biosystems Inc;Plasmid Mini Kit I及Plant RNA Kit购于OMEGA Bio-Tek Inc;DNA回收试剂盒、Kanamycin、Rifampicin、Glufosinate、Bialaphos、BASTA、Timentin均购自Sigma公司;*ZmSDD1*检测引物和其他Real-time PCR相关引物均由Invitrogen公司合成;Southern blotting检测试剂盒(DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II)购自Roche公司;过氧化物酶(POD)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)和脯氨酸(PRO)测试试剂盒均购于南京建成生物工程研究所。

2 方法

2.1 载体构建

用*SpeI*酶分别酶切Ubiquitin-*ZmSDD1*-3'UTR和质粒pGM626-ABt(9018),然后用T₄ DNA连接酶连接,即获得表达载体pGEM626-Ubi-*ZmSDD1*-ABt(图1)。该载体含有玉米Ubiquitin启动子驱动*ZmSDD1*基因表达的元件,Actin启动子驱动的*Bt*基因和Ubiquitin启动子驱动*Bar::GUS*融合基因作为筛选标记基因和报告基因。

2.2 烟草遗传转化

利用冻融转化法将载体pGEM626-Ubi-*ZmSDD1*-ABt分别转入农杆菌EHA105,以叶盘转化法(Horsch等1985)对烟草叶片受体进行遗传转化。取新鲜烟草叶片经灭菌消毒处理后,切成0.5 cm×0.5 cm小叶块,置于携带有植物表达载体的农杆菌菌液(OD₆₀₀=0.5~0.6)中进行侵染。10 min后用无菌滤纸吸去多余的菌液,将烟草叶块接种于共

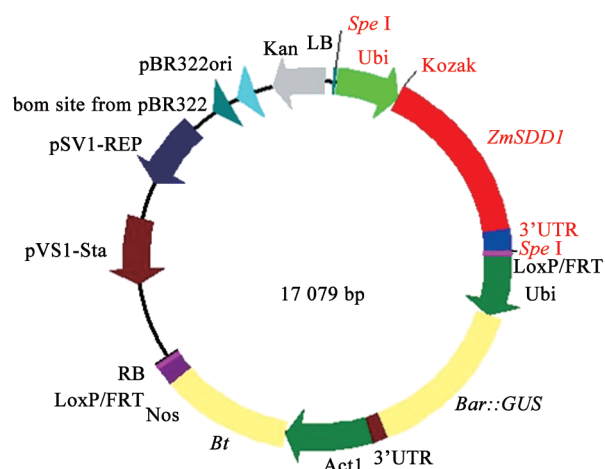


图1 植物表达载体pGEM626-Ubi-ZmSDD1-ABt
Fig.1 The plant expression vector pGEM626-Ubi-ZmSDD1-ABt

培养基MS₁ (MS+0.1 mg·L⁻¹ NAA+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA) 上, 28 °C 黑暗培养2 d。共培养后的叶块转移至脱菌筛选培养基MS₂ (MS+0.1 mg·L⁻¹ NAA 1.0 mg·L⁻¹+6-BA+1.0 mg·L⁻¹ PPT+150 mg·L⁻¹ Timentin)上, 温度25 °C、光照时间16 h·d⁻¹培养2周, 以诱导抗性芽分化。待抗性芽长至1 cm左右后, 切下并转接到生根培养基MS₃ (1/2MS+0.1 mg·L⁻¹ IAA+1.0 mg·L⁻¹ PPT+100 mg·L⁻¹ Timentin)上诱导抗性芽生根。抗性苗长至3~5 cm时, 移栽于含培养基质(园土:Hawita泥炭土:珍珠岩=3:1:1)的花盆中生长, 每盆施3 g 复合肥(N:P₂O₅:K₂O=15:10:10)。

2.3 抗性烟草植株鉴定

筛选的抗性烟草植株生长至3~5叶期时, 剪取少量叶片进行GUS组织化学染色(Jefferson等1987), 在体视显微镜下观察染色结果。按TIAN-GEN BIOTECH公司的新型植物总DNA提取试剂盒步骤分别提取GUS阳性烟草植株和野生型植株的基因组DNA, 用于转基因植株PCR鉴定。设计ZmSDD1基因特异引物(5'-TGGTGTACAATAAG-GGCATCCGTG-3', 5'-AGATGTAAACTCTGAC-CGCCGCT-3', 产物504 bp, 退火温度52.3 °C)和Bt引物(5'-TGCCCTTACAACCGCTATTC-3', 5'-GCAAATTTGAGGAGGTTCCA-3', 产物773 bp, 退火温度60 °C)对植株进行检测。按照以下程序进行扩增: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 52.3 °C (60 °C) 30 s, 72 °C 45 s, 35个循环; 72 °C延伸7 min; 4 °C保温。反应完毕, 取5 μL扩增产物在含Gelred的1%琼

脂糖凝胶中电泳, 紫外灯下检测结果。提取叶片总DNA, 用EcoRI和HindIII对基因组DNA进行完全酶切, 按试剂盒说明书步骤进行Southern杂交。

2.4 转基因烟草抗旱性鉴定

用反复干旱法测定转基因烟草的抗旱性(Cai等2014)。分别选取正常生长的5~8叶期的转基因烟草和野生型烟草各20株移栽到含有营养土的花盆中, 温室内正常生长条件下(光照时间16 h·d⁻¹, 温度29 °C)培育2周。然后停止浇水2周后复水1次, 共进行3次45 d。观察植株的抗旱表现并统计转基因和野生型植株的存活率并拍照, 叶片萎蔫、枯竭死亡的则被认定为死亡植株。取5~8叶期的转基因烟草和野生型烟草叶片(1 g)放在吸水纸上, 每隔1 h测定其鲜重(FW), 共测定24 h, 计算离体叶片失水率(Yan等2014)。

2.5 转基因烟草抗旱生理生化指标测定

分别参照MDA、PRO、SOD和POD试剂盒说明书测定转基因和野生型烟草倒4叶的MDA和PRO含量、SOD和POD活性, 每个样品重复3次。

2.6 转基因烟草抗旱的光合指标测定

分别选取转基因和野生型烟草倒4叶, 利用LI-6400便携式光合作用测定系统, 在上午9:00~12:00以LI-6400-02B红蓝光光源测定, 选择晴天连续测定2 d, 重复测定3次。通过开放式气路, 设定温度为25 °C, CO₂浓度为400 μmol·mol⁻¹, 空气相对湿度为50%~70%, 设定光强梯度为2 000、1 500、1 000、500、200、100、50、20、0 μmol·m⁻²·s⁻¹。测定叶片在每一光强下的净光合速率(P_n)、气孔导度(G_s)、胞间CO₂浓度(C_i)和蒸腾速率(T_r) (Purohit等2002)。

2.7 显微镜观察转基因烟草植株

分别取6~8叶期转基因和野生型烟草同样大小的叶片2份, 一份用镊子将其叶片表皮撕开, 保证其连续性, 放在载玻片上, 盖上盖玻片用光学显微镜选取样本叶片5个不同部位观察气孔数目, 另一份用戊二醛固定然后用扫描电镜观察。气孔密度观察参照de Carvalho等(2005)方法, 以气孔数目个·mm⁻²表示气孔密度, 每组重复3次。

2.8 转基因烟草植株的气孔发育关键酶基因Real-time PCR分析

根据NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)数据库中报道的ZmSDD1、烟草MAPK3和FAMA基因

序列,设计各基因引物,以烟草 β -actin基因作为内参(表1)。

分别选取转基因烟草与野生型烟草从底端向上数的第4片叶0.2 g,按OMEGA公司植物总RNA提取试剂盒步骤提取烟草植株总RNA并反转录为cDNA,利用SYBR Green I实时定量PCR染料法分别对选取的转基因株系与野生型植株的气孔发育相关基因的表达量进行分析比较。参照ABI公司提供的仪器使用说明,每个样品设置3个平行重复。

2.9 统计分析

数据分析采用Microsoft Excel 2003软件,分别计算均值及标准误差,并绘制图表。采用SPSS 13.0统计软件进行 t 检验。图中标注的“*”和“**”分别表示所测定项目在转基因与野生型烟草之间差异显著($P<0.05$)和极显著($P<0.01$)。

实验结果

1 农杆菌介导烟草遗传转化与转基因植株获得

以烟草叶片为外植体,通过农杆菌介导的共转化法将含有pGEM626-Ubi-ZmSDD1-ABt的农杆菌菌液对烟草进行转化,共培养2 d后转入脱菌筛选培养基上培养2~3周,烟草叶缘出现绿色的愈伤组织后,再经继代培养诱导产生抗性芽,将1 cm左右的抗性芽切下于生根培养基上诱导生根,待再生苗长至3~5 cm后炼苗并移栽至营养土中培养,共获得50株抗性植株(图2)。

在植株3~5叶期选取抗性植株和野生型植株的叶片进行GUS组织化学染色,结果说明GUS基因在抗性植株中表达,而野生型植株中未检测到

GUS活性(图3-A)。分别提取野生型和5个独立抗性株系的DNA,以ZmSDD1基因引物和Bt基因引物进行PCR扩增,在5个转化株系中都分别扩增出预期504 bp的ZmSDD1(图3-B)和773 bp的Bt基因(图3-C)目的条带,在野生型烟草植株中未扩增出目的条带,说明已经获得转ZmSDD1基因烟草。通过统计共获得31株转基因烟草植株。对其中部分植株进行ZmSDD1基因的Southern blotting分析,证明所构建的连锁遗传的外源基因已成功整合到烟草基因组中,不同植株的外源基因拷贝数不同,3个株系分别检测到了1~3条杂交带(图3-D)。

2 转ZmSDD1基因烟草植株抗旱性增强

选择转基因和野生型烟草各20株,经3次反复干旱45 d后,统计植株存活率的结果表明,转基因烟草存活18株,死亡2株,平均存活率为90%,野生型存活2株,死亡18株,存活率为10%,转ZmSDD1基因烟草比野生型烟草存活率高80%(图4-B)。干旱30 d后,转基因烟草叶片的枯萎程度要弱于野生型(图4-A)。通过测定离体叶片失水率发现转基因烟草叶片的失水率比野生型显著减少(图4-C)。以上数据表明转ZmSDD1基因烟草在干旱后和野生型相比显著提高了抗旱能力。

3 干旱对转ZmSDD1基因烟草理化指标和光合指标的影响

通过测定发现,干旱30 d后转ZmSDD1基因烟草植株的POD(图5-A)和SOD活性(图5-B)以及PRO含量(图5-D)均显著高于野生型植株,而MDA含量显著低于野生型植株(图5-C)。提示转ZmSDD1基因烟草能显著提高植株在干旱胁迫下的抗氧化能力。

表1 气孔发育相关基因Real-time PCR引物序列

Table 1 Primers of Real-time PCR for stomatal development-related genes

基因名称	GenBank登录号	引物序列(5'→3')
ZmSDD1	NM_001137303.1	TGTGCTCCTCCTTCTCTTCTTCATCG TTCAGGTAGACAATGTAGGTAGCCGC
烟草MAPK3	JX076821.1	GCCTCGTATGTGCTGCTATAA TGTTCCATGTGCCGAAGTAG
烟草FAMA	XM_004240165.1	TGAGGAAGTTGAGAGCCAAAG CAGGCATGAGAGACCTCAATAC
烟草 β -actin	AB158612	GATCTTGCTGGTCGTGATCT ACTTCCGGACATCTGAACCT

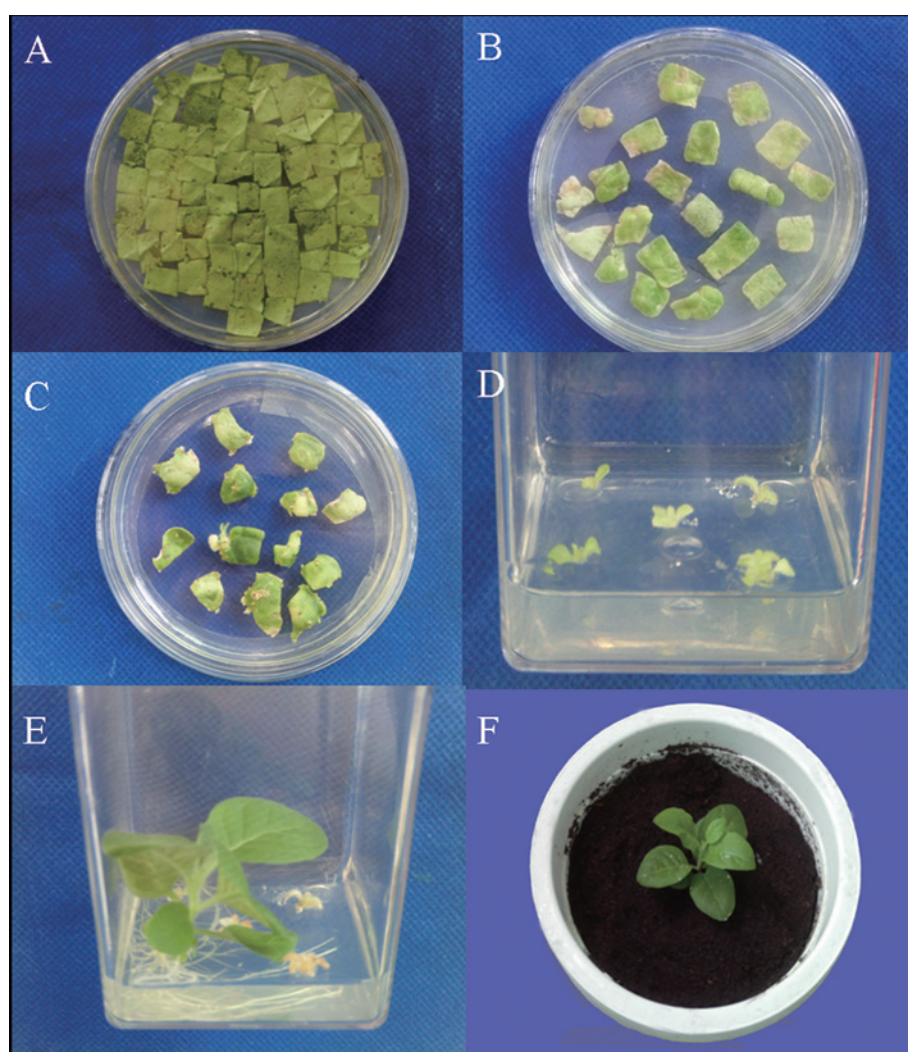


图2 烟草的遗传转化

Fig.2 Process of tobacco genetic transformation

A: 共培养; B: 筛选培养; C: 抗性愈伤组织分化; D: 抗性芽分化; E: 抗性苗形成; F: 抗性苗移栽。

光合生理指标测定结果表明, 转*ZmSDD1*基因烟草植株和野生型植株的气孔导度(图5-F)、胞间二氧化碳浓度(图5-G)和蒸腾速率(图5-H)在干旱后都显著下降。其中野生型气孔导度为 $0.0501 \text{ mol (H}_2\text{O)} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 转基因为 $0.0349 \text{ mol (H}_2\text{O)} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 。野生型蒸腾速率为 $1.762 \text{ mmol (H}_2\text{O)} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 转基因为 $0.796 \text{ mmol (H}_2\text{O)} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 。但转基因烟草净光合速率为 $7.67 \text{ } \mu\text{mol (CO}_2\text{)} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 野生型仅为 $4.39 \text{ } \mu\text{mol (CO}_2\text{)} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (图5-E)。

4 转*ZmSDD1*基因烟草植株气孔减少且影响气孔发育相关基因的表达

通过光学显微镜观察, 叶片放大100倍的视野

内野生型烟草有42个气孔(图6-A), 而转基因烟草植株中仅有21个(图6-B)。放大200倍观察野生型气孔为13个(图6-C), 转基因为6个(图6-D)。扫描电镜观察显示, 野生型烟草的气孔为3个(图6-E), 而转基因烟草的气孔为1个(图6-F)。经过统计转基因和野生型烟草相比气孔密度下降约50% (图6-G)。

研究发现转基因烟草的*ZmSDD1*基因表达量比野生型烟草上调了4.8倍(图6-H), 气孔发育信号通路的基因*MAPK3*表达量升高了2.1倍(图6-I)。*FAMA*基因表达量则下调了0.5倍(图6-J)。说明转基因烟草和野生型烟草相比气孔密度下降的原因

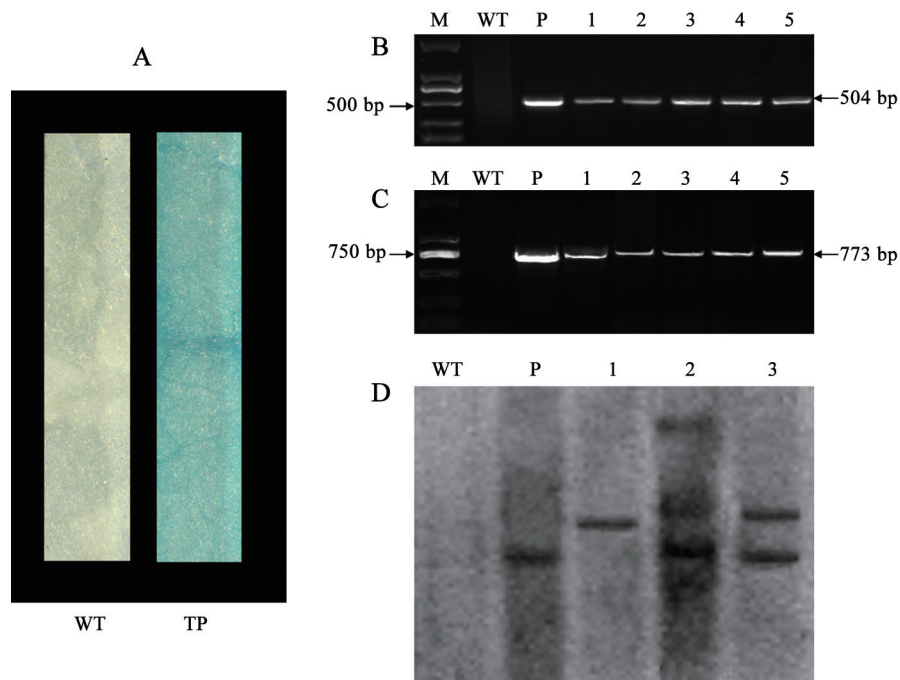


图3 抗性植株的GUS染色、PCR鉴定及转基因植株Southern blotting分析

Fig.3 GUS staining and PCR identification of herbicide-resistance plants and Southern blotting of transgenic plants

A: GUS染色鉴定抗性植株; B: *ZmSDD1*基因的PCR鉴定(M为分子量标准, P为阳性对照, 1~5分别代表不同的株系); C: *Bt*基因的PCR鉴定(M为分子量标准, P为阳性对照, 1~5分别代表不同的株系); D: *ZmSDD1*基因的Southern杂交鉴定(P为阳性对照, 1~3分别代表不同的株系)。WT: 野生型植株(wild type); TP: 转基因植株(transgenic plant)。

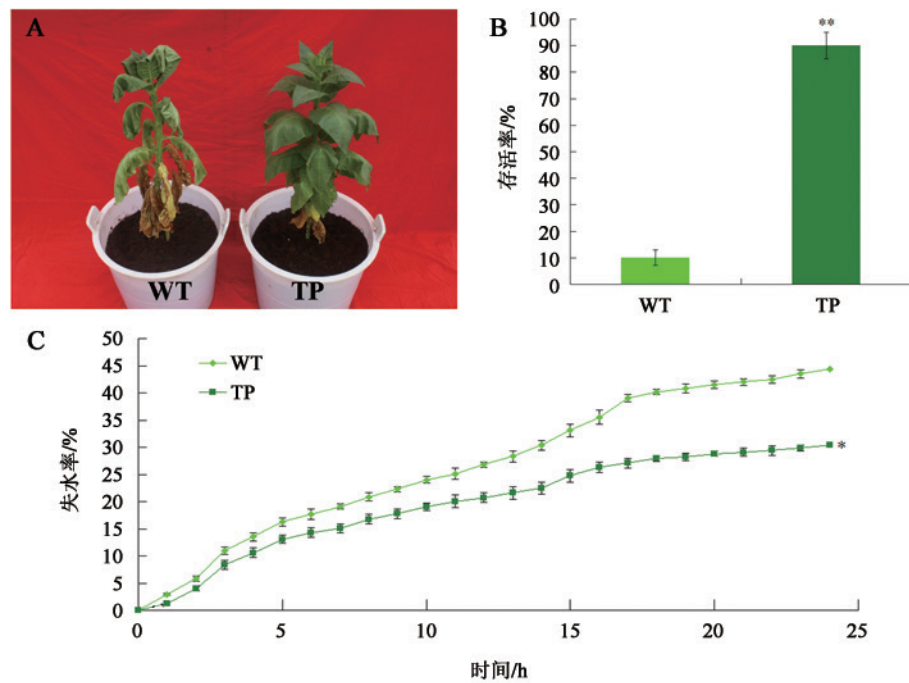
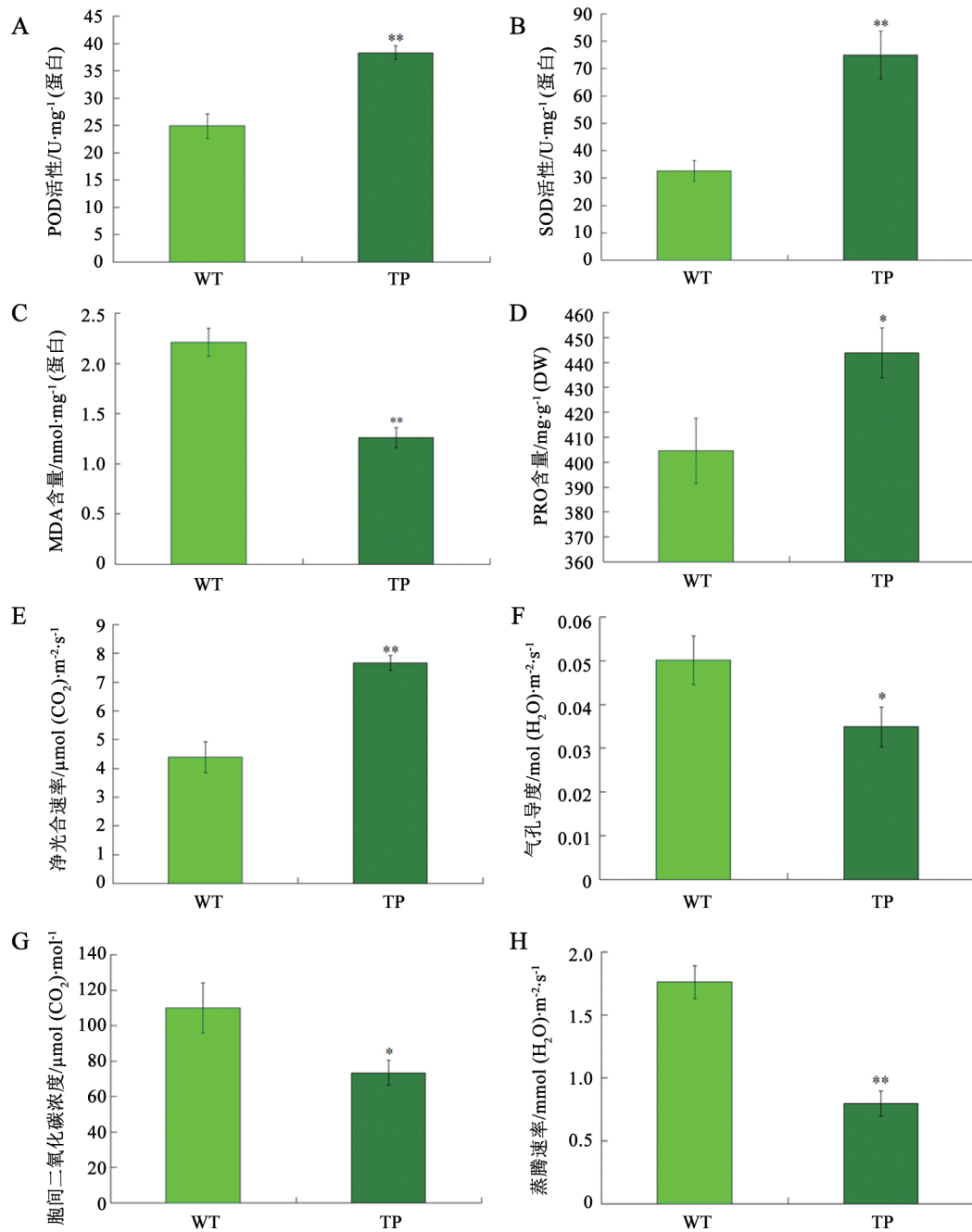


图4 转*ZmSDD1*基因烟草植株的抗旱性分析

Fig.4 Analysis of drought-resistance of *ZmSDD1* transgenic tobacco plants

A: 转基因烟草和野生型烟草干旱处理后植株对比; B: 转基因烟草和野生型烟草存活率对比; C: 转基因烟草和野生型烟草离体叶片失水率对比。

图5 转*ZmSDD1*基因烟草的抗旱生理生化特征和光合生理特征变化Fig.5 The changes of physiological indexes and photosynthetic characteristics of *ZmSDD1* transgenic tobacco plants

可能是*ZmSDD1*基因调控了气孔发育相关基因的表达。

讨 论

干旱条件下植物体内自由基产生和清除的平衡被打破,植物体内会大量积累自由基,导致膜脂

过氧化,造成酶的失活、蛋白质分解及细胞组分的损伤,影响植物的正常生长发育(陈善福和舒庆尧1999)。植物体内的SOD和POD对自由基的清除起重要作用,植物抗旱性越强SOD和POD活性上升幅度越大,活性下降越多其抗旱性也越差(周瑞莲和王刚1997; 祁云枝和杜勇军1997)。因此SOD

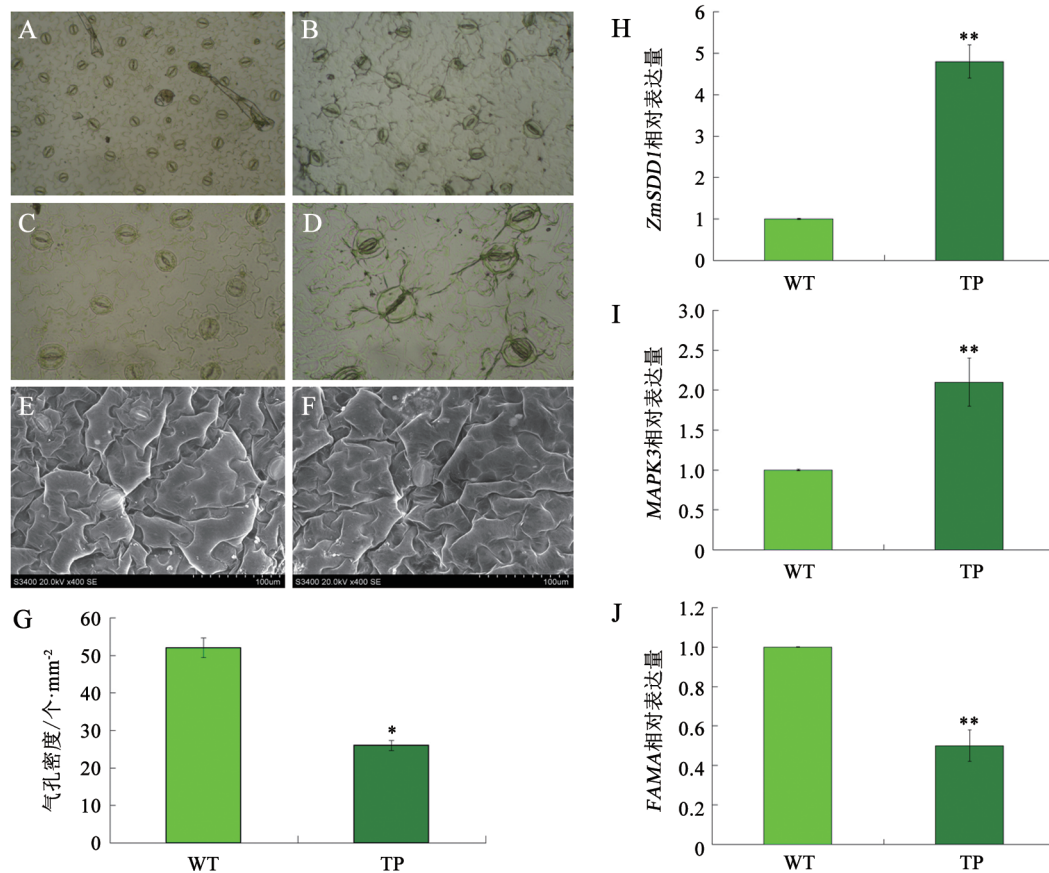


图6 转*ZmSDD1*基因烟草植株气孔观察和相关基因表达量变化

Fig.6 The observation of stomatal number and change of related gene expression of *ZmSDD1* transgenic tobacco plants

A、B: 野生型烟草(A)和转基因烟草(B)在光镜100倍视野下观察结果; C、D: 野生型烟草(C)和转基因烟草(D)在光镜200倍视野下观察结果; E、F: 野生型烟草(E)和转基因烟草(F)在电镜下观察结果; G: 转基因烟草和野生型烟草气孔密度统计; H: *ZmSDD1*基因相对表达量; I: *MAPK3*基因相对表达量; J: *FAMA*基因相对表达量。

和POD可以反映植物抗旱胁迫的能力(陈善福和舒庆尧1999)。本研究发现抗旱性较强的转*ZmSDD1*烟草POD和SOD活性均高于野生型植株(图5-A、B), 这与前人研究结果一致(王建华等1989; 袁有波等2009)。MDA是膜质过氧化累积产物, 可以破坏核酸结构、使蛋白质失活, 所以MDA含量是检测膜脂过氧化程度的一个公认的指标(王爱国等1986)。抗旱性强的品种, 其MDA含量增加相对较慢, 增幅较小, 而抗旱性弱的增加幅度较大。本研究发现转*ZmSDD1*烟草MDA含量增幅显著低于野生型植株(图5-C), 与文建成等(1998)和覃鹏等(2005)研究结果一致。脯氨酸是有效的有机渗透调节物质。能够增加植物忍耐干旱胁迫和延缓缺水胁迫的加剧。在干旱条件下, 脯氨酸积累的减少可以减少失水, 因此可以作为植物抗旱的生理

指标应用于鉴别植物品种的抗旱性(汤章城1984; Liu和Zhu 1997)。即干旱下抗旱品种比不抗旱品种积累更多的脯氨酸, 本研究中转*ZmSDD1*烟草PRO含量高于野生型植株(图5-D), 这与彭志红等(2002)和Du等(2014)的研究结果一致。转*ZmSDD1*烟草增强了细胞保护酶的活性并增加了脯氨酸的含量, 从而对细胞膜及原生质体产生保护作用, 增强膜的稳定性, 降低了膜脂过氧化产物MDA的含量, 减轻膜脂过氧化程度, 减缓了干旱胁迫下细胞膜的损伤, 提高烟草抵抗干旱胁迫的能力。

本研究中发现转*ZmSDD1*烟草比野生型烟草气孔密度下降了约50% (图6-A~G)。相似的结果在过表达*AtSDD1*基因的拟南芥中也被发现(von Groll等2002)。Yoo等(2010)在负调控*AtSDD1*基因的*gtll* (GT2LIKE1)拟南芥突变体中发现*AtSDD1*基

因可减少气孔数量。在拟南芥中, *AtSDD1*、*MAPK3/6* (*MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE 3/6*)等都负调控气孔的发育, 而3个结构相似的bHLH转录因子SPCH、MUTE和FAMA促进气孔发育, 分别调控着气孔发育的“三步转录级联反应”(three-step transcriptional cascade), 其中FAMA控制保卫细胞母细胞GMC向保卫细胞的转变(Pillitteri等2007; Lampard等2008; Wang等2007)。我们通过实验发现转*ZmSDD1*基因的烟草气孔发育相关基因*MAPK3*显著升高(图6-I), *FAMA*显著下降(图6-J), 暗示转*ZmSDD1*基因烟草引起气孔密度下降的原因是调控了气孔发育相关基因的表达, 也进一步提示烟草和拟南芥可能具有相同的气孔发育相关信号通路。

干旱胁迫下烟草植株吸水减少, 光合速率下降, 造成植株生长减缓, 干物质积累减少。本文获得的转*ZmSDD1*基因烟草在干旱情况下通过降低气孔密度(图6-G)、降低气孔导度(图5-F)、减少蒸腾作用(图5-H)从而减少水分的散失。同时还发现转*ZmSDD1*基因烟草和野生型相比在干旱后具有较高的净光合速率(图5-E)。这与Yoo等(2010)研究结果一致。说明*ZmSDD1*基因表达不仅可以提高植株抵御干旱胁迫的能力。还能保持较高的光合速率。综上所述, *ZmSDD1*基因具有较强的抗旱功能, 本研究为促进烟草产业发展、增强烟草适应干旱环境的能力提供了一条有效的研究途径。为下一步*ZmSDD1*基因转化其他农作物并获得抗旱新种质提供基础, 将会在农业生产中有非常广泛的应用价值。

参考文献

- 陈善福, 舒庆尧(1999). 植物耐干旱胁迫的生物学机理及其基因工程研究进展. 植物学通报, 16 (5): 555~560
- 韩锦峰, 汪耀富, 杨素勤(1994). 干旱胁迫对烤烟化学成分和香气物质含量的影响. 中国烟草, (1): 35~38
- 彭志红, 彭克勤, 胡家金, 萧浪涛(2002). 渗透胁迫下植物脯氨酸积累的研究进展. 中国农学通报, 18 (4): 80~83
- 祁云枝, 杜勇军(1997). 干旱胁迫下黄瓜及蚕豆叶片膜透性改变及其机理的初步研究. 陕西农业科学, (4): 6~7
- 覃鹏, 刘叶菊, 刘飞虎(2005). 干旱胁迫对烟草叶片丙二醛含量和细胞膜透性的影响. 亚热带植物科学, 33 (4): 8~10
- 汤章城(1984). 逆境条件下植物脯氨酸的累积及其可能的意义. 植物生理学通讯, (1): 15~21
- 王爱国, 邵从本, 罗广华(1986). 丙二醛作为植物脂质过氧化指标的探讨. 植物生理学通讯, (2): 35~37

- 王建华, 刘鸿先, 徐同(1989). 超氧化物歧化酶(SOD)在植物逆境和衰老生理中的作用. 植物生理学通讯, (1): 1~7
- 王军, 王益奎, 李鸿莉, 韦建玉(2004). 水分胁迫对烟草生长发育的影响研究进展. 广西农业科学, 35 (6): 440~442
- 文建成, 陈学宽, 符菊芬, 范源洪, 高玉蓉, 夏红明(1998). 质膜透性与丙二醛(MDA)含量的变化评价甘蔗品种抗旱性初探. 甘蔗, 5 (3): 1~5
- 于建军, 汪旭富(1993). 干旱胁迫对烤烟干物质积累和产量品质的影响. 烟草科技, (6): 30~33
- 袁有波, 李继新, 丁福章, 苏贤坤(2009). 不同干旱胁迫对烟草叶片保护酶活性的影响. 中国烟草科学, 30 (5): 10~13
- 赵文军, 杨继周, 胡保文, 常剑(2012). 抗旱相关基因在烟草中的应用研究进展. 生物技术进展, 2 (4): 240~248
- 周瑞莲, 王刚(1997). 水分胁迫下豌豆保护酶活力变化及脯氨酸积累在其抗旱中的作用. 草业学报, 6 (4): 39~43
- Basu SK, Dutta M, Goyal A, Bhowmik PK, Kumar J, Nandy S, Scagliusi SM, Prasad R (2010). Is genetically modified crop the answer for the next green revolution? GM Crops, 1 (2): 68~79
- Berger D, Altmann T (2000). A subtilisin-like serine protease involved in the regulation of stomatal density and distribution in *Arabidopsis thaliana*. Genes Dev, 14 (9): 1119~1131
- Cai R, Zhao Y, Wang Y, Lin Y, Peng X, Li Q, Chang Y, Jiang H, Xiang Y, Cheng B (2014). Overexpression of a maize *WRKY58* gene enhances drought and salt tolerance in transgenic rice. Plant Cell Tiss Org Cult, 119: 565~577
- de Carvalho JFRP, de Carvalho CR, Otoni WC (2005). *In vitro* induction of polyploidy in annatto (*Bixa orellana*). Plant Cell Tiss Org Cult, 80 (1): 69~75
- Du F, Shi H, Zhang X, Xu X (2014). Responses of reactive oxygen scavenging enzymes, proline and malondialdehyde to water deficits among six secondary successional seral species in Loess Plateau. PLoS One, 9 (6): e98872
- Holmström KO, Mäntylä E, Welin B, Mandal A, Palva ET, Tunnela OE, Londeborough J (1996). Drought tolerance in tobacco. Nature, 379: 683~684
- Horsch RB, Fry JE, Hoffmann NL, Eichholtz D, Rogers SG, Fraley RT (1985). A simple and general method for transferring genes into plants. Science, 227: 1229~1231
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987). GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. EMBO J, 6 (13): 3901~3907
- Lampard GR, Macalister CA, Bergmann DC (2008). *Arabidopsis* stomatal initiation is controlled by MAPK-mediated regulation of the bHLH SPEECHLESS. Science, 322 (5904): 1113~1116
- Liu J, Zhu JK (1997). Proline accumulation and salt-stress-induced gene expression in a salt-hypersensitive mutant of *Arabidopsis*. Plant Physiol, 114 (2): 591~596
- Pillitteri LJ, Sloan DB, Bogenschutz NL, Torii KU (2007). Termination of asymmetric cell division and differentiation of stomata. Nature, 445 (7127): 501~505
- Purohit VK, Tamta S, Chandra S, Vyas P, Palni LMS, Nandi SK (2002). *In vitro* multiplication of *Quercus leucotrichophora* and *Q. glauca*: Important Himalayan oaks. Plant Cell Tiss Org Cult, 69 (2): 121~133

- Rautengarten C, Steinhauser D, Büssis D, Stintzi A, Schaller A, Kopka J, Altmann T (2005). Inferring hypotheses on functional relationships of genes: analysis of the *Arabidopsis thaliana* subtilase gene family. *PLoS Comput Biol*, 1 (4): e40
- Schlüter U, Muschak M, Berger D, Altmann T (2003). Photosynthetic performance of an *Arabidopsis* mutant with elevated stomatal density (*sdd1-1*) under different light regimes. *J Exp Bot*, 54: 867~874
- Schroeder JI, Allen GJ, Hugouvieux V, Kwak JM, Waner D (2001). Guard cell signal transduction. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 52 (1): 627~658
- von Groll U, Berger D, Altmann T (2002). The subtilisin-like serine protease SDD1 mediates cell-to-cell signaling during *Arabidopsis* stomatal development. *Plant Cell*, 14 (7): 1527~1539
- Wang H, Ngwenyama N, Liu Y, Walker JC, Zhang S (2007). Stomatal development and patterning are regulated by environmentally responsive mitogen-activated protein kinases in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 19 (1): 63~73
- Xiao Y, Yu X, Chen J, Di P, Chen W, Zhang L (2010). *IsSDD1*, a gene responsive to autopolyploidy and environmental factors in *Isatis indigotica*. *Mol Biol Rep*, 37 (2): 987~994
- Yan Q, Hou H, Singer SD, Yan X, Guo R, Wang X (2014). The grape *VvMBF1* gene improves drought stress tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 118: 571~582
- Yoo CY, Pence HE, Jin JB, Miura K, Gosney MJ, Hasegawa PM, Mickelbart MV (2010). The *Arabidopsis* GTL1 transcription factor regulates water use efficiency and drought tolerance by modulating stomatal density via transrepression of *SDD1*. *Plant Cell*, 22 (12): 4128~4141
- Zhou L, He H, Liu R, Han Q, Liu B, Shou H (2014). Overexpression of *GmAKT2* potassium channel enhances resistance to soybean mosaic virus. *BMC Plant Biol*, 14 (1): 154