

干旱胁迫对转*CpHRD*基因烟草的影响

陈琴*, 李星星, 童婷, 谢文华, 阎晓菲, 郝欢欢

新疆农业大学科学技术学院, 乌鲁木齐830052

摘要: *HRD*基因是AP2/EREBP转录因子家族的一员, 过表达*HRD*基因可以提高水稻的水分利用效率。本文采用同源序列克隆的方法从线果芥中克隆了*CpHRD*基因, 并转化野生型烟草, 测定了干旱胁迫下转*CpHRD*基因烟草的丙二醛、游离脯氨酸、可溶性淀粉、可溶性糖的含量以及过氧化氢酶和超氧化物歧化酶活性6项生理指标; 观察了转基因烟草的形态和气孔的变化。结果显示, 除MDA含量外, 转*CpHRD*基因烟草的其余5项指标均显著高于野生型烟草, 而转基因烟草的叶表面气孔数和气孔开度均低于野生型, 说明*CpHRD*基因参与了植物逆境应答过程, 并可以显著提高转基因烟草的抗旱能力。

关键词: 干旱胁迫; 转基因烟草; *HRD*基因; 生理指标

Influence of Drought Stress on Transgenic *CpHRD* Gene in Tobacco

CHEN Qin*, LI Xing-Xing, TONG Ting, XIE Wen-Hua, YAN Xiao-Fei, HAO Huan-Huan

College of Science and Technology, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China

Abstract: *HRD* is a member of the AP2/EREBP transcription factor family. Overexpression of *HRD* in rice improved its water use efficiency (WUE). A *CpHRD* gene derived from *Conringia planisiliqua* was cloned by homology-based cloning method and transformed the tobacco (*Nicotiana tabacum*) leaf. The six physiological and biochemical indicators (the contents of MDA, PRO, H₂O₂, soluble starch, soluble sugar, and the activities of CAT, SOD) were measured in transgenic *CpHRD* tobacco under drought stress. And the changes of morphology and porosity of transgenic tobacco were observed. The results indicated that expect the MDA contents, the other five indicators in transgenic tobaccos were significantly higher than those in the wild type tobacco. The stomata number and stomata aperture of transgenic tobacco leaves were lower than those of the wild type. These results also indicated *CpHRD* gene involved in abiotic stress responses and strengthen the drought resistance of transgenic tobaccos.

Key words: drought stress; transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum*); *HRD* genes; physiological index

干旱是世界上最严重的灾害之一, 据统计全世界因水分胁迫所致的作物减产, 超过了其他因素造成减产的总和(朱旗和徐吉臣2010)。植物在漫长的进化过程中, 面对干旱、盐渍、高温以及冷冻害等非生物胁迫的恶劣环境, 其体内形成了各种对水分亏缺反应-伤害-修复-适应-补偿的调节机制(党云萍等2012)。有研究表明, 可以通过植物表观形态、生理生化指标变化及复水后的补偿能力等来直观的反应植物的抗旱性。在干旱条件下, 植物叶片气孔关闭、气孔密度减少、萎蔫、解剖结构也会发生相应的变化(刘红茹等2012)。植物体内渗透调节物质不断生成并大量积累, 使细胞浓度增大而渗透势降低, 形成一定的膨压, 从而保证细胞的正常生理过程(包文龙等2014; 季杨等2014; Liang等2013)。植物体内的保护酶, 如超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和过氧化

物酶(peroxidase, POD)等在水分胁迫下不断大量生成, 以保护脂膜和敏感分子免受活性氧的伤害(王晶懋等2012; Munné-Bosch和Alegre 2003)。植物在干旱后复水处理, 随着复水时间的延长, 各项生理指标逐渐恢复, 但抗旱品种的可溶性糖和脯氨酸含量以及丙二醛含量等要先于对照恢复, 表现出复水后较强的补偿效应(郭贤仕等2012; 李文烧等2008)。

*HRD*基因是由Aarati等(2007)从拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)突变体中获得的一个新功能基因, 研究发现, *HRD*基因作为AP2/EREBP家族转录因子的成员, 过量表达, 可增加叶片横截面海绵组织

收稿 2014-11-04 修定 2015-03-25

资助 新疆农业大学科学技术学院青年科研启动基金项目(2014-KJKY005)。

* 通讯作者(E-mail: cq0707@sina.com; Tel: 13579992731)。

和栅栏组织, 有效提高植物的水分利用率。在埃及车轴草(*Trifolium alexandrinum*)中过表达, 可降低车轴草蒸腾速率, 降低 Na^+ 的积累, 保护光合作用系统不受离子侵害(Abogadallah等2011)。

我实验室前期通过对6种短命植物的种子和幼苗进行了干旱实验, 筛选出抗旱性较强的线果芥材料(许春华等2012)。因此本研究选用线果芥为实验材料, 从中克隆HRD基因, 转入烟草, 通过对干旱胁迫下转CpHRD基因烟草与野生型烟草的6项生理生化指标以及形态、气孔变化进行了综合对比分析, 为选择抗旱育种的目的候选基因以及揭示CpHRD基因的抗旱机理提供了依据。

材料与方法

1 材料

线果芥(*Conringia planisiliqua* Fisch. et Mey.)种子采自新疆乌鲁木齐市雅玛里克山, 野生型烟草(*Nicotiana tabacum* L.)种子(NC89)由本实验室保存, 将线果芥和烟草材料种于温室, 22 °C, 16 h·d⁻¹光照, 相对湿度60%培养备用。

2 试剂

质粒提取试剂盒、TaqDNA聚合酶、大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5a感受态为北京天根生化科技有限公司产品; 限制性内切酶Sall和BamHI购自TaKaRa试剂公司; 根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) EHA105及植物表达载体pCAM-BIA1301均由新疆农业大学生物技术重点实验室提供。甲硫氨酸、四氮唑蓝、聚乙烯吡咯烷酮、核黄素、三氯乙酸、硫代巴比妥酸、茚三酮、磺基水杨酸、蒽酮和过氧化氢等均为国产分析纯, 引物合成、测序工作由上海生工生物工程有限公司完成。

3 方法

3.1 载体构建

以PCAMBIA1301为载体, 进行Sall/BamHI双酶切, 与测序正确的目的片段连接, 构建植物表达载体PCAMBIA1301-CpHRD, 该载体含有GUS融合蛋白基因作为筛选报告基因。

3.2 转基因烟草的获得和鉴定

采用根癌农杆菌介导的叶盘法转化烟草(何华纲和朱姗姗2011)。取生长幼嫩的烟草无菌苗叶片, 去主脉, 剪成1 cm×1 cm的方块, 放入含PCAM-

BIA1301-CpHRD质粒的农杆菌EHA105菌中浸染15 min。暗培养2 d, 后转到筛选培养基(MS+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ NAA+30 mg·L⁻¹ Hyg+200 mg·L⁻¹ Cef, pH 5.8), 每15 d更换一次培养基。待分化出小苗后, 切下, 转入生根培养基(MS+0.1 mg·L⁻¹ NAA+30 mg·L⁻¹ Hyg+200 mg·L⁻¹ Cef, pH 5.8), 获得再生苗。经炼苗, 移栽至花盆中(珍珠岩:蛭石:营养土=1:1:1), 22 °C, 光/暗周期16 h/8 h温室培养, 获得转基因烟草。

进一步用GUS组织化学染色法(Jefferson等1987)和RT-PCR方法筛选阳性转基因植株。RT-PCR时用Trizol试剂盒法提取线果芥总RNA, 经DNaseI消化后用cDNA第一链合成试剂盒获得cDNA, 以2 μL cDNA为模板, 取CpHRD基因特异引物5' GGATCCATGCAAGGAACCTCCAAAGAC 3'和5' GTCGACTCATGGAAAATTCCACAAGTA-AT 3'各1 μL, 2×Power Taq PCR MasterMix 12.5 μL, 用ddH₂O补足20 μL, 退火温度52 °C, 产物564 bp。

3.3 转基因烟草的抗旱性测定

选取生长一致的已鉴定有CpHRD基因表达的T₀代阳性转基因植株及野生型植株各18株, 进行土壤自然干旱处理, 设置3个重复, 每个重复6株。野生型和转基因烟草同时停止浇水, 每3 d采样一次(从上到下第5片功能叶), 检测生理指标、测量气孔开度(每株10个视野)、观察形态变化, 于第20天充分灌水, 进行复水, 全程23 d。

用硫代巴比妥酸法测定MDA含量。游离脯氨酸含量测定用酸性茚三酮比色法。用蒽酮比色法测定淀粉和可溶性糖含量。过氧化氢酶(catalase, CAT)活性测定采用紫外吸收法。SOD活性测定采用氮蓝四唑比色法(邹琦等2000)。

气孔形态观察采用印迹法(陈佰鸿等2004), 用Nikon Ci-L荧光显微镜软件测量气孔开度。随机选取样本叶片20个视野观察气孔数目, 测量气孔开度。

数据输入、作图用Excel处理, 用SPSS 17.0软件进行多重比较。

实验结果

1 转基因烟草的获得和鉴定

将侵染后的烟草叶片放至筛选培养基上筛选,

15 d左右可见叶盘边缘出现绿色小芽(图1-A), 50 d左右抗性芽长至2~3 cm后(图1-B), 剪断置于生根培养基上生根培养(图1-C), 有部分抗性芽叶片变黄逐渐死去, 为假阳性。待苗长出5片叶子时移栽到花盆中(图1-D)。与野生型烟草相比, 转基因烟草表现出植株矮小、叶片颜色较深的表型, 转基因烟草的主根粗壮, 侧根发达, 移栽时也较容易成活。

选取 T_0 代转基因植株进行GUS组织化学染色后发现, Hyg抗性再生苗叶片显示蓝色(图2)。用RT-PCR进一步筛选鉴定, 非转基因烟草无扩增条带, 转基因植株在564 bp左右处得到一条清晰的条带(图3), 证明PCAMBIA1301-*CpHRD*基因已整合到烟草基因组中并可以表达。

2 自然干旱对转基因烟草生理指标的影响

CAT和SOD是植物细胞内 H_2O_2 的重要清除剂, 具有较强的抗旱、伤害修复和超补偿能力(赵咏梅2011), 可作为植物耐旱性评价的一个重要指标。如图4-A所示, 在自然干旱胁迫中, 转基因的烟草CAT活性出现先减弱后升高又减弱, 在野生型烟草的水平上下浮动; 在第18天时达到最大值, 是胁迫前的2.35倍。表明CAT主要在胁迫后期大量参与清除活性氧的活动, 从而对植物细胞起到保护作用(陈金峰等2008)。SOD活性始终显著高于野生型烟草, 第9天是胁迫前的1.6倍(图4-B), 表明转基因烟草能通过歧化反应清除生物细胞中的超氧自由基, 从而减少自由基对植物细胞膜的毒害。

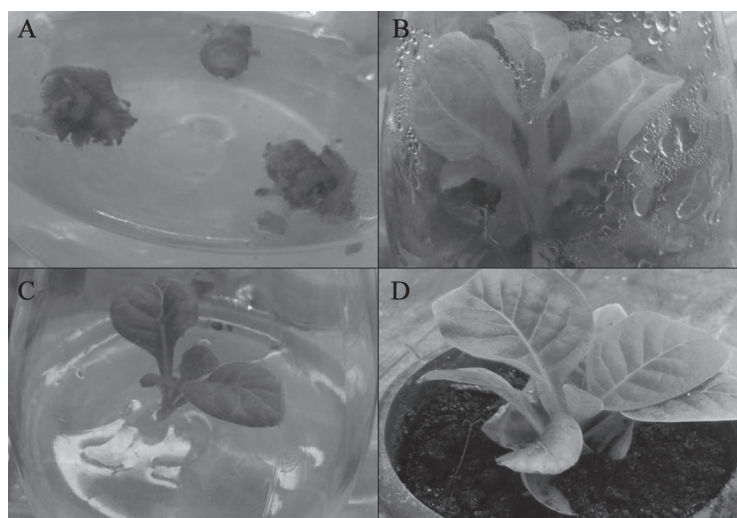
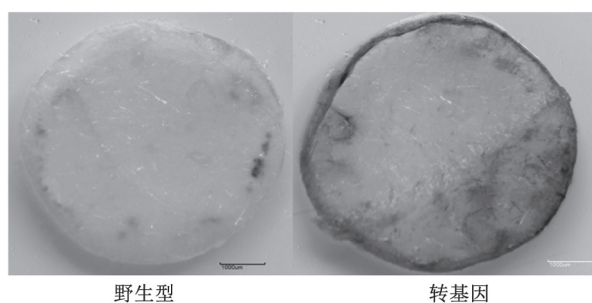


图1 转基因烟草的再生体系

Fig.1 Regeneration system of transgenic tobacco

A: 烟草愈伤组织; B: 抗性筛选再生苗; C: 再生苗生根培养; D 移栽。



野生型

转基因

图2 烟草叶片GUS染色图

Fig.2 GUS histochemical staining of tobacco leaf

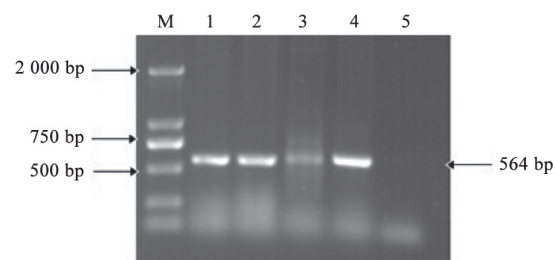


图3 转基因烟草RT-PCR电泳图

Fig.3 RT-PCR electrophoresis of transgenic tobacco

M: DNA标准分子量DL2000; 1~4: 转*CpHRD*基因烟草; 5: 野生型烟草。

转基因烟草的MDA、脯氨酸和可溶性糖含量均随胁迫时间延长有所上升,复水后呈现迅速下降趋势(图4-C、D和E)。其中MDA含量上升幅度没有野生型明显,说明转*CpHRD*基因烟草的细胞膜系统在胁迫后也发生了氧化作用,但对比野生型较轻。而脯氨酸含量大幅增加,在第12天左右达到最大,是胁迫前的2倍,含量始终显著高于野生型($P<0.01$),复水之后出现小幅减小。同时

随着淀粉酶活性的增加,转基因烟草叶片的可溶性淀粉含量不断减少,复水后又大幅度增加(图4-F)。说明在逆境下可溶性淀粉通过加快代谢的途径,以适应环境变化,表现出较强的恢复补偿效应。

3 转基因烟草的形态和气孔的观察

如图5所示,在自然干旱胁迫下,野生型烟草植株叶片在第14天开始萎蔫,到第18天已整株萎蔫,复水后不能生长。而转基因的烟草植株在停

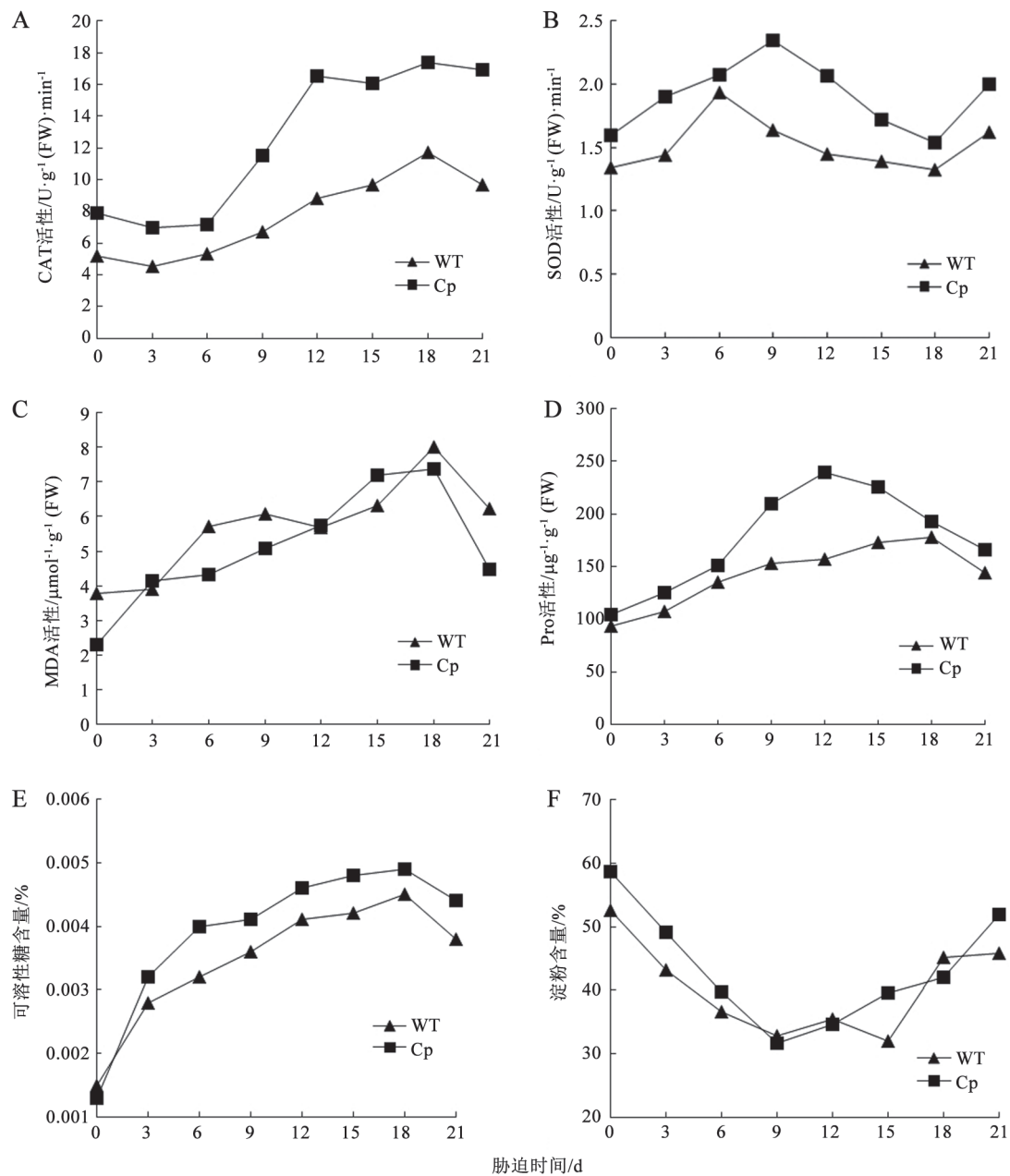


图4 干旱对转基因烟草生理指标的影响

Fig.4 Effect of drought stress on physiological indexes of transgenic tobacco

WT: 野生型; Cp: 转基因烟草。

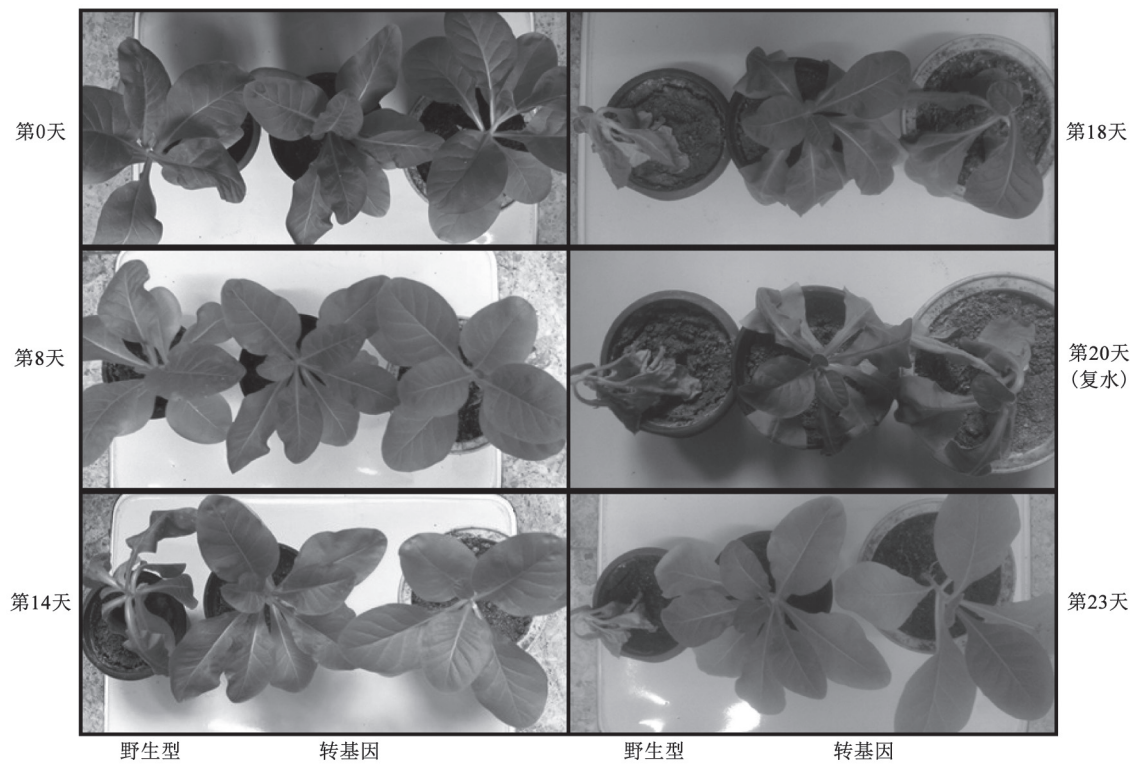


图5 干旱胁迫下转基因烟草形态的变化

Fig.5 Morphological changes of transgenic tobacco under drought stress

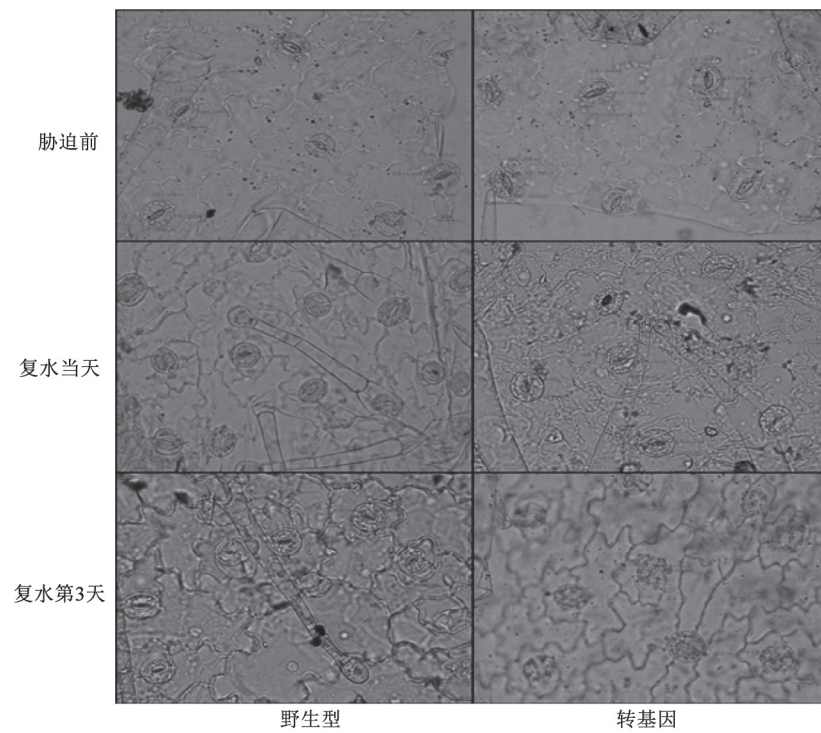


图6 干旱胁迫下转基因烟草气孔的变化

Fig.6 The changes in stomates of transgenic tobacco under drought stress

止浇水后的第18天才开始萎蔫,第20天叶片卷曲明显,但顶部叶片仍挺拔翠绿,复水后正常生长。可见,在自然干旱胁迫实验中,转*CpHRD*基因烟草植株耐旱性明显优于野生型烟草。

如图6所示,在干旱条件下,烟草叶片气孔密度均降低,气孔相对开度在胁迫下变小,复水后增大,转基因烟草变化尤为明显。说明转基因烟草为了适应水分胁迫环境,通过关闭气孔或减小气孔开度来减少蒸腾作用,提高了抗旱性和水分利用效率。

讨 论

干旱胁迫和旱后复水条件下,植物的形态指标和生理指标都会表现出一系列的适应性变化,甚至产生一定的抗性,因此可以通过植物的形态指标(叶片、气孔等)及相应的生理指标(MDA、游离脯氨酸、CAT和SOD等)来判断植物对干旱的响应程度及适应性。

*CpHRD*基因属于AP2/EREBP家族,该家族是植物特有的一类转录因子家族,主要参与植物多个生长发育及应答外界环境信号的过程。本研究结果表明,随着水分胁迫程度的加强,转*CpHRD*基因烟草的SOD和CAT活性、脯氨酸和可溶性糖含量都明显高于对照。转基因烟草首先通过增强渗透调节类物质,即可溶性糖、淀粉以及游离脯氨酸的含量来维持细胞微环境的膨压,保持原生质体结构的完整(胡国霞等2011);其次通过增加SOD、CAT等酶的活性清除氧自由基,减少活性氧的积累(Munné-Bosch和Alegre 2003),从而降低水分胁迫下烟草叶片MDA的产量(邓苙明等2010);再次通过控制气孔开度减少叶片水分蒸腾,以提高水分利用效率。同时,转基因烟草在复水后具有较强的补偿能力,促使整个植株能够恢复正常生长,表现出比野生型烟草更强的耐旱能力。该实验结果证实*CpHRD*基因可以提高植物的抗旱性,也为进一步揭示*CpHRD*基因的抗旱机理提供了依据。

参考文献

包文龙,张楚涵,陈雅君,肖爽,夏学成,朱峻磊(2014). 干旱胁迫及复水对硬质早熟禾细胞内渗透调节物质的影响. 黑龙江农业科学, (3): 84-87
陈佰鸿,李新生,曹孜义,姚庆荣(2004). 一种用透明胶带粘取叶片

表皮观察气孔的方法. 植物生理学通讯, (2): 215-218
陈金峰,王宫南,程素满(2008). 过氧化氢酶在植物胁迫响应中的功能研究进展. 西北植物学报, (1): 188-193
党云萍,李春霞,刘东雄(2012). 水分胁迫对植物生理生化研究进展. 陕西农业学报, (5): 89-122
邓苙明,熊格生,袁小玲,贾菲,刘志(2010). 棉花不同耐高温品系的SOD、POD、CAT活性和MDA含量差异及其对盛花期高温胁迫的响应. 棉花学报, (3): 242-247
何华纲,朱姗姗(2011). 分子生物学与基因工程实验教程. 河北: 中国轻工业出版社, 88-98
胡国霞,马莲菊,陈强,赵贵林,褚妍,任菲,李雪梅(2011). 植物抗氧化系统对水分胁迫及复水响应研究进展. 安徽农业科学, (3): 1278-1280, 1282
郭贤仕,于显枫,苏敏,马一凡,谭雪莲(2012). 旱后复水对不同玉米品种蒸腾效率的影响. 玉米科学, (1): 95-99
季杨,张新全,彭燕,梁小玉,黄琳凯,马啸,马迎梅(2014). 干旱胁迫对鸭茅根、叶保护酶活性、渗透物质含量及膜质过氧化作用的影响. 草业学报, (3): 144-151
李文娆,张岁岐,山仑,张彤,山颖(2008). PEG模拟旱后复水对紫花苜蓿茎叶生理生态特性的影响. 西北农业学报, (6): 247-252
刘红茹,冯永忠,王得祥,崔宏安(2012). 延安城区10种阔叶园林植物叶片结构及其抗旱性评价. 西北植物学报, 32 (10): 2053-2060
王晶懋,张楚涵,闫庆伟,王艳彬,陈雅君(2012). 植物抗旱的生理渗透调节及保护酶活性研究进展. 黑龙江生态工程职业学院学报, (2): 31-33
许春华,陈全家,郭忠军,高文伟,苏秀娟,曲延英(2012). 两种十字花科短命植物抗旱性分析及其指标研究. 新疆农业大学学报, 35 (2): 107-111
赵咏梅(2011). 植物SOD在抵抗干旱胁迫中的作用. 生物学教学, (3): 4-5
邹琦,赵世杰,王忠(2000). 植物生理学实验指导. 北京: 中国农业出版社, 110-173
朱旗,徐吉臣(2010). 植物抗旱分子机制研究进展. 安徽农业科学, (26): 14198-14205
Abogadallah GM, Nada RM, Malinowski R, Quick P (2011). Overexpression of *HARDY*, an *AP2/ERF* gene from *Arabidopsis*, improves drought and salt tolerance by reducing transpiration and sodium uptake in transgenic *Trifolium alexandrinum* L. *Planta*, 233 (6): 1265-1276
Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987). GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene. *EMBO J*, 6 (13): 3901-3907
Karaba A, Dixit S, Greco R, Aharoni A, Trijatmiko KR, Marsch-Martinez N, Krishnan A, Natargja KN, Udayakumar M, Pereira A (2007). Improvement of water use efficiency in rice by expression of *HARDY*, an *Arabidopsis* drought and salt tolerance gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104 (39): 15270-15275
Liang XW, Zhang L, Natarajan SK, Becker DF (2013). Proline mechanisms of stress survival. *Antioxid Redox Signal*, 19 (9): 998-1011
Munné-Bosch S, Alegre L (2003). Drought-induced changes in the redox state of α -tocopherol, ascorbate, and the diterpene carnosic acid in chloroplasts of labiate species differing in carnosic acid contents. *Plant Physiol*, 131: 1816-1825