

转*TPSI*基因促进干旱胁迫条件下的花青素积累提高玉米植株抗旱性

项阳¹, 刘延波¹, 赵德刚^{1,*}, Yi Li²

¹贵州大学生命科学学院, 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, 贵阳550025;

²Department of Plant Science and Landscape Architecture, University of Connecticut, Storrs, CT 06269, USA

摘要: 以不同浓度的PEG-6000溶液模拟干旱胁迫条件, 研究转*TPSI*基因玉米植株抗旱性增强的原因。结果表明, 随着干旱胁迫加重, 野生型和转基因玉米植株的叶片相对含水量和耐旱系数逐渐降低; 但转基因玉米植株叶片相对含水量和耐旱系数高于野生型, 表明转基因玉米植株比野生型更抗旱。同时随着干旱加重, 野生型和转基因玉米植株花青素含量也随之增加, 且转基因玉米植株的花青素含量高于野生型。相关性分析表明, 花青素含量与转基因玉米抗旱性增强显著相关。干旱胁迫前, 转*TPSI*基因玉米植株花青素含量与野生型植株无显著差异, 而在10% PEG-6000模拟干旱胁迫条件下, 转*TPSI*基因玉米植株根、茎、叶的花青素含量极显著高于野生型, 分别是野生型的8.5、5.4和1.8倍。分析调控花青素合成基因的相对表达量结果表明, 正调控基因*PLI*、*RI*和*PAC1*在转基因植株根、茎、叶中表达均上调, 而负调控基因*c1-I-2KI*在根、茎、叶中表达下调。表明*TPSI*基因的表达影响花青素合成调控基因的表达促进花青素积累, 进而提高植株抗旱性。此外, 干旱胁迫后, 转基因植株的CAT活性比野生型高56.3%, MDA含量比野生型低36.7%, 说明*TPSI*基因的表达提高了玉米抗氧化能力。

关键词: 玉米; *TPSI*基因; 花青素; 抗旱性

Improve Drought Tolerance via Accumulating Anthocyanidin under Drought Stress in *TPSI* Transgenic Maize

XIANG Yang¹, LIU Yan-Bo¹, ZHAO De-Gang^{1,*}, Yi Li²

¹The Key Laboratory of Plant Resources Conservation and Germplasm Innovation in Mountainous Region, Ministry of Education, College of Life Sciences and Institute of Agro-Bioengineering, Guizhou University, Guiyang 550025, China; ²Department of Plant Science and Landscape Architecture, University of Connecticut, Storrs, CT 06269, USA

Abstract: In this paper, we studied mechanism of transgenic maize plants drought-resistant enhancement based on former studies. Under different concentrations of PEG-6000 solution simulated drought stress conditions, leaf relative water content and drought-resistant coefficient of wild type and transgenic maize plants decreased with aggravating drought degree; and under conditions of each degree, both leaf relative water content and drought-resistant coefficient of genetically modified maize plants was higher than wild type, which indicated drought resistance of transgenic plants was more than wild type. At the same time, with drought aggravating, anthocyanin content also increased in wild type and transgenic maize plants, and that of transgenic maize plants were higher than wild type in each drought stress condition. Correlation analysis showed anthocyanin content in transgenic plants had significantly correlated to drought resistance. Anthocyanin content in roots, stems and leaves of wild-type and *TPSI* transgenic maize plants was no significant difference before drought stress, but that of transgenic maize was significantly higher than wild type under drought stress, representing an increase of 8.5, 5.4 and 1.8 folds, respectively. Gene expression analysis of transcription factors that regulating anthocyanin biosynthesis showed that relative expression of positive regulator gene *PLI*, *RI*, *PAC1* was up-regulated, and that of negative regulator gene *c1-I-2KI* was down-regulated in roots, stems and leaves of transgenic maize, which suggested that transcription factors were influenced anthocyanin accumulation by *TPSI* in roots, stems and leaves of *TPSI* transgenic maize, and then improved drought resistance of plants. Results also showed that CAT activity and MDA content were no significant difference between transgenic plants and wild type before

收稿 2015-09-23 修定 2015-11-02

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和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: 0851-83863615)。

drought stress, but compared with wild type plants, CAT activity was increased 56.3% and MDA content was decreased by 36.7% in transgenic plants after drought stress, which suggested *TPSI* gene increased the antioxidant capacity of maize result in improving maize drought resistance.

Key words: maize; *TPSI* gene; anthocyanidin; drought tolerance

花青素(anthocyanidin)又叫花色素,属于黄酮类化合物,是一类广泛存在于植物中的水溶性天然色素(Pascual-Teresa和Sanchez-Ballesta 2008),其主要积累在植物的液泡中,不仅是植物的主要呈色物质(许志茹和李玉花2006),也是植物适应环境的重要物质(胡可等2010)。植物在干旱、低温等逆境中会积累花青素,这是由于花青素可以通过降低细胞渗透势和冰点等方式来帮助植物适应逆境(孙明霞等2003)。Mahajan和Yadav (2014)研究发现过量表达花青素合成的关键基因*CsF3H*能够提高马铃薯抗逆性,表明花青素的合成与植物抗逆性相关。

在干旱条件下,增强细胞渗透调节能力的关键是细胞内渗透调节物质的主动积累(江龙1999)。其中,植物积累的花青素可通过增强细胞渗透调节能力来提高植物的抗旱性(孙明霞等2003)。Sherwin和Farrant (1998)研究发现花青素积累与复苏植物的耐旱性有关,对复苏植物进行脱水处理后,其花青素含量比正常植株提高了将近3倍,这表明花青素积累能够有效提高植物的抗旱性。Teng等(2005)用100 mmol·L⁻¹的海藻糖对拟南芥幼苗进行处理,5 d后发现植株中花青素含量提高了2倍以上;Gravot等(2011)发现在用浓度为20、40、60 mmol·L⁻¹的海藻糖处理拟南芥时,花青素含量均比对照含量增加,且具有显著差异。说明海藻糖能有效促进花青素在植株中的积累。同样,在拟南芥中,海藻糖诱导*APL3*表达后提高AGPase的活性(Wingler等2000),在基因诱导调控AGPase活性的马铃薯组培苗中出现花青素的积累(白桦等2013)。Cortina和Culiáñez-Macià (2005)将酵母*TPSI* (海藻糖-6-磷酸合成酶1, trehalose-6-phosphate synthase 1)基因遗传转化到番茄(*Lycopersicon esculentum*)中,研究表明转基因番茄比野生型更耐盐,同时发现在盐胁迫条件下转基因番茄叶片出现花青素积累。Antal等(2013)研究发现在马铃薯中过表达*TPSI*基因时,转基因马铃薯的花青素含量比野生型高2倍左右。

植物中的转录因子对次生产物代谢发挥着重要调节作用,花青素作为次生代谢产物的终产物之一,转录因子对其合成具有重要的调节作用(乔小燕等2009)。在玉米中具有编码MYB转录因子的*PL1* (Cocciolone和Cone 1993)、*cl-I-2K1* (Chen等2004)、编码bHLH转录因子的*R1* (Petroni和Tonelli 2011)和编码WD40蛋白的*PAC1* (Carey等2004)是花青素合成相关基因的调控关键基因,调节着花青素的合成(闵远琴等2010)。前期我们在研究转*TPSI*基因玉米抗旱性提高原因时发现,转基因玉米植株中*SDD1*表达升高导致叶片气孔密度减少,减少了水分蒸腾(Liu等2014),提高了植株的抗旱性,同时也发现,干旱胁迫条件下*TPSI*基因促进玉米根系生长,提高了水分利用率,增强了抗旱性(项阳等2015)。本文在前期研究的基础上,进一步探讨转*TPSI*基因玉米植株抗旱性增强的原因,为抗旱玉米新品种的培育提供理论指导。

材料与方法

1 实验材料

野生型玉米(*Zea mays* L.)品种为‘交51’,转*TPSI*基因玉米的种子为本研究组前期工作所获(Liu等2014),由贵州大学农业生物工程研究院保存。质粒pGM626-*Ubi-BG-rd29A-TPSI*为贵州大学农业生物工程研究院与康涅狄格大学合作构建并保存,含有*Ubi-Bar::GUS-NOS*和*rd29A-TPSI-NOS*表达元件(Liu等2014)。K-TREH海藻糖检测试剂盒购于爱尔兰Megazyme公司;RNA提取试剂盒购于OMEGA公司;反转录试剂盒和SYBR Green PCR Master Mix均购于ABI公司;real-time PCR相关引物均由Invitrogen公司合成。CAT和MDA测定试剂盒均购于南京建成生物工程研究所。

2 实验方法

2.1 处理方法

参照Mohammadkhani和Heidari (2008)和吴妍等(2010)的方法,挑选子粒饱满、大小一致的野生型与转基因的玉米种子,播在装有珍珠岩的塑料

盘中,置于(25±2) °C培养箱中培养。白天光照500~700 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,光暗周期10 h (光)/14 h (暗),空气相对湿度(RH) 60%~70%。在幼苗第3片叶子完全展开时,各选取50株生长一致的植株移至1/2Hoagland营养液,每组10株,分成5组。分别加入PEG-6000溶液使其浓度为0、10%、20%、30%和40%,每隔1 d重新加入PEG-6000溶液,以保证处理浓度恒定,干旱胁迫7 d后取样进行实验。重复测定3次,数据分析用SPSS 22.0和Excel进行处理。

2.2 花青素含量测定

参照王仙萍等(2013)方法进行花青素含量测定。精确称取0.2 g样品于容量瓶中,加入10 mL 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸乙醇溶液后置于60 °C避光处浸提,肉眼观察组织完全变白后,冷却至室温,用0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸乙醇溶液定容至25 mL得到提取液。以0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸乙醇溶液作为空白对照,测定分别为530、620和650 nm波长下的光密度值。根据Greedy公式计算花青素含量。花青素光密度值 $\text{OD}_\lambda=(\text{OD}_{530}-\text{OD}_{620})-0.1\times(\text{OD}_{650}-\text{OD}_{620})$;花青素含量($\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$)= $[(\text{OD}_\lambda/\epsilon)\times(V/m)]\times 1\ 000\ 000$;式中: ϵ 为花青素摩尔消光系数 4.62×10^6 ;V为提取液总体积(mL);m为取样质量(g)。每个处理重复测定3次。

2.3 玉米叶片相对含水量和耐旱系数测定

选取PEG-6000溶液处理浓度为0、10%、20%、30%和40%的野生型和转基因玉米相同部位的叶片,参照高俊凤(2006)的方法测定其叶片相对含水量。剪取玉米叶片,称出叶片鲜重(m_1)。放

入105 °C烘箱中0.5 h杀青,然后在80 °C下烘干至恒重,称出叶片干重(m_2)。按照公式计算叶片相对含水量:叶片相对含水量($\%$)= $(m_1-m_2)/m_1\times 100$,式中: m_1 为叶片鲜重, m_2 为叶片干重。选取PEG-6000溶液处理浓度为0、10%、20%、30%和40%的野生型和转基因玉米各3株,参照刘贤德等(2004)测定其耐旱系数,耐旱系数($\%$)= $(\text{干旱胁迫处理(植株干重+根干重)}/\text{正常供水处理(植株干重+根干重)})\times 100$ 。

2.4 玉米植株中海藻糖含量测定

选取正常处理和10% PEG-6000溶液模拟干旱胁迫处理的野生型和转基因植株的叶片,参照海藻糖检测试剂盒说明书进行海藻糖含量检测,每组重复3次。

2.5 CAT活性及MDA含量测定

选取10% PEG-6000溶液模拟干旱胁迫处理的野生型和转基因植株相同部位的叶片,参照南京建成试剂盒说明书进行CAT活性、MDA含量测定。测定样品在405和532 nm波长下的吸光值,计算CAT活性和MDA含量,重复3次。

2.6 调控花青素合成相关基因的表达分析

根据NCBI数据库中报道的TPS1基因序列和调控花青素合成的编码转录因子基因PL transcription factor (PL1)、Myb-related Protein c1-I-2K1 (c1-I-2K1)、anthocyanidin regulator R1 (R1)和pale aleurone color 1 (PAC1)的序列,设计各基因的RT-PCR扩增引物,以玉米Actin为内参基因,分析各基因相对表达量。设计的引物序列见表1。

表1 调控花青素合成的转录因子real-time PCR引物序列

Table 1 Primers sequence of regulating anthocyanidin synthesis genes for real-time PCR

基因	GenBank登录号	引物序列(5'→3')
TPS1	Y0856.1	正向: GGAATGGGTTGATAGCGTAAAGC 反向: TCTTGCTTGAAGTCTCCCGAAC
PL1	NM_001112415.1	正向: CGAAGGCAAATGGAGGGA 反向: TCCTCGTCGTAGGAGATGTT
c1-I-2K1	NM_001112540.1	正向: AACAGGTGGTCGCTGATTG 反向: CGTGCTGTTCCAGTAGTTCTT
R1	NM_001112603.1	正向: CCGCAGAGATTGCTGAAGA 反向: GTTCTTGGTGGCACTCATTTT
PAC1	NM_001158243.1	正向: TTACGCGCAGGAGTTTCT 反向: CGGTCAACACAACGTGATATG
Actin	J01238.1	正向: GTATGTTGCTATCGAGGCTGTTC 反向: TCATTAGGTGGTCGGTGAGGTC

分别取3株10% PEG-6000溶液模拟干旱胁迫处理的野生型和转基因玉米植株相同部位的根、茎、叶各0.1 g, 提取总RNA, 参照ABI公司说明反转录为cDNA。以玉米*Actin*作为内参基因, 利用SYBR Green I实时定量PCR染料法分别对相关基因的表达进行分析。按照ABI公司说明书以 $\Delta\Delta C_T$ 法计算和分析各基因表达水平。Real-time PCR反应体系为20 μ L, 含Power SYBR Green PCR Master Mix (2 \times) 10 μ L、引物各1.0 μ L、cDNA 4.0 μ L和ddH₂O 4.0 μ L。扩增条件为: 95 $^{\circ}$ C 10 min; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 40个循环。每个样品设置3个重复。

实验结果

1 干旱胁迫对转*TPSI*基因玉米叶片相对含水量和耐旱系数的影响

叶片相对含水量能够反映植株水势, 是衡量植物耐旱性的重要指标, 通常耐旱植物的叶片相对含水量和耐旱系数较高(刘贤德等2004)。研究发现随着PEG-6000溶液处理浓度的增加, 野生型和转基因玉米的叶片相对含水量(图1)和耐旱系数(图2)逐渐降低; 但同一处理浓度下, 转基因玉米的叶片含水量和耐旱系数显著高于野生型玉米, 说明转*TPSI*基因玉米比野生型更抗旱。

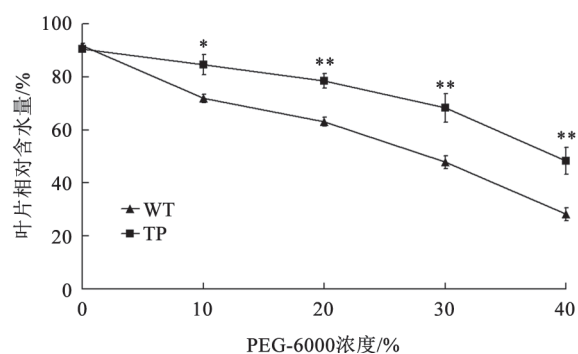


图1 干旱胁迫对转*TPSI*基因玉米叶片相对含水量的影响
Fig.1 Effects of drought treatments on leaf relative water content of *TPSI* transgenic maize

WT: 野生型玉米, TP: 转*TPSI*基因玉米; *表示同一PEG-6000浓度下TP和WT之间差异显著($P < 0.05$), **表示差异极显著($P < 0.01$)。下图同。

2 干旱胁迫对转*TPSI*基因玉米花青素含量的影响

花青素是植物呈色的重要物质, 植物在干旱等胁迫下会积累花青素来帮助植物适应逆境(孙明

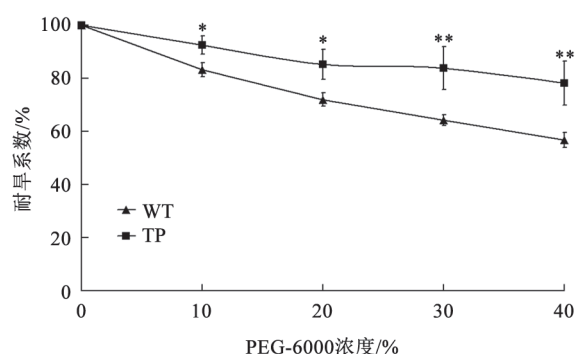


图2 干旱胁迫对转*TPSI*基因玉米耐旱系数的影响
Fig.2 Effects of drought treatments on drought tolerance coefficient of *TPSI* transgenic maize

霞等2003)。对不同浓度PEG-6000溶液处理的野生型和转基因玉米的叶片进行花青素含量测定发现, 野生型和转基因玉米随着处理浓度的增加, 花青素含量也随之积累; 但在同一处理条件下, 转基因玉米的花青素含量显著高于野生型, 这表明转基因玉米比野生型更能够积累花青素(图3)。分析转基因玉米的花青素积累量和耐旱系数相关性发现两者具有显著相关性($R^2=0.912$), Sherwin和Farrant (1998)的研究证明花青素积累能提高植物的抗旱性, 因此转基因玉米抗旱性增强的原因可能是花青素的积累。

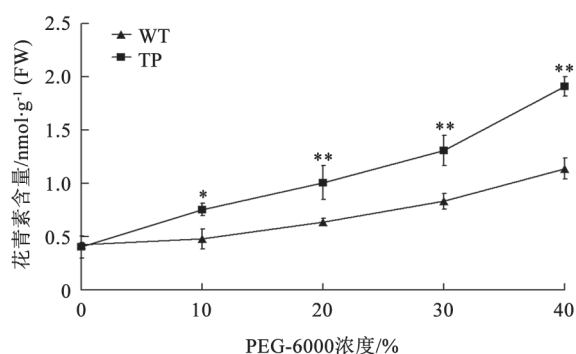


图3 干旱胁迫对转*TPSI*基因玉米中花青素含量的影响
Fig.3 Effects of drought treatments on anthocyanidin content of *TPSI* transgenic maize

3 转*TPSI*基因玉米植株海藻糖含量测定

选取正常处理和10% PEG-6000溶液模拟干旱胁迫处理的野生型和转基因植株各3株测定海藻糖含量发现干旱胁迫前后野生型玉米植株中检测不到海藻糖的存在, 也未检测到*TPSI*基因表达。有研

究表明在3种干旱条件下的6个玉米自交系,利用高效液相色谱法(HPLC)均未检测到海藻糖的存在(付凤玲等2011),说明野生型玉米中不含有 $TPSI$ 基因。转基因玉米植株在干旱胁迫前未检测到海藻糖含量,但是转基因玉米植株在干旱胁迫后检测到海藻糖,其平均含量为 $1.23\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (图4)。Real-time PCR分析发现干旱胁迫前转基因玉米植株 $TPSI$ 基因未表达,而转基因玉米植株在10% PEG-6000溶液模拟干旱胁迫条件下检测到 $TPSI$ 基因的表达(图5)。这是因为驱动 $TPSI$ 基因表达的启动子为逆境诱导启动子 $rd29A$,在非胁迫条件下不启动基因表达,干旱条件 $rd29A$ 启动 $TPSI$ 基因表达(Liu等2014)。

4 干旱胁迫对转 $TPSI$ 基因玉米植株形态的影响

在干旱胁迫前,野生型与转基因玉米植株的

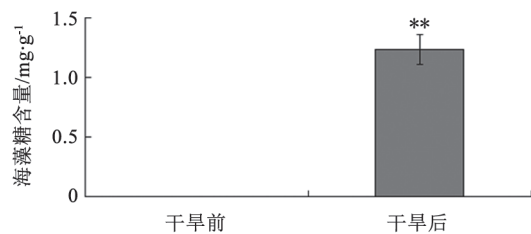


图4 干旱胁迫前后转 $TPSI$ 基因玉米中海藻糖含量

Fig.4 Trehalose content of $TPSI$ transgenic maize before and after drought stress

根、茎、叶颜色无显著差异,而在10% PEG-6000溶液模拟干旱胁迫条件下,转基因与野生型植株颜色差异显著(图6-A),转基因玉米的根(图6-B)、茎(图6-C)、叶(图6-D)均呈现明显的紫红色。花青素含量测定表明,干旱胁迫前野生型和转基因玉米植株的根、茎、叶中花青素含量无显著差异,

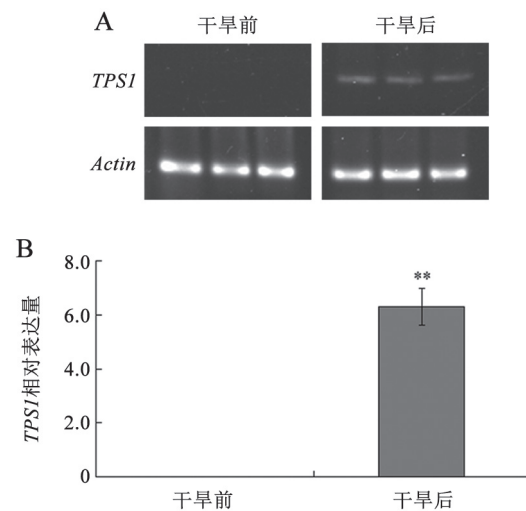


图5 干旱胁迫前后转 $TPSI$ 基因玉米中 $TPSI$ 基因的表达

Fig.5 Relative expression level of $TPSI$ gene before and after drought stress

A: 干旱胁迫前后转基因玉米中 $TPSI$ 基因的半定量RT-PCR分析; B: 干旱胁迫前后转基因玉米中 $TPSI$ 基因的相对表达量分析。

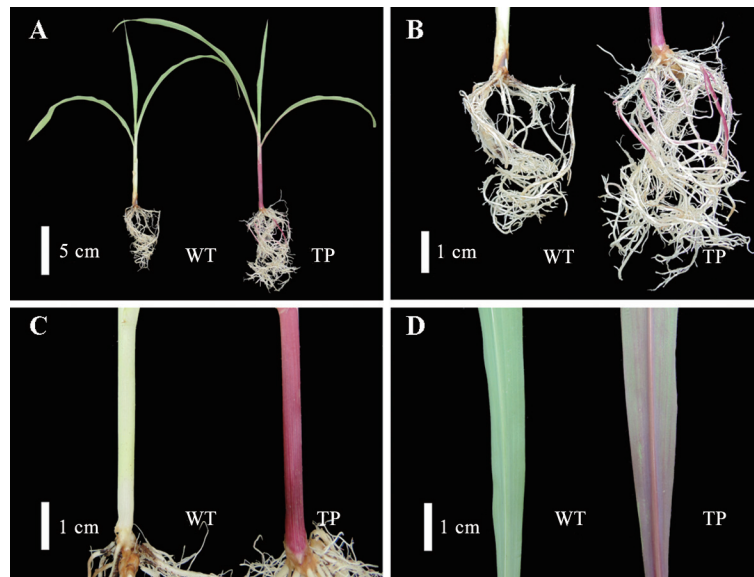


图6 干旱胁迫对转 $TPSI$ 基因玉米根、茎、叶形态的影响

Fig.6 Effects of drought treatments on appearance of roots, stems and leaves of $TPSI$ transgenic maize

A~D: 分别是干旱胁迫下野生型与转基因玉米的植株、根、茎和叶的形态。

而10% PEG-6000溶液模拟干旱胁迫条件下转基因玉米植株的根、茎、叶中花青素含量极显著高于野生型, 根、茎、叶中花青素含量分别是野生型的8.5倍、5.4倍和1.8倍(图7)。

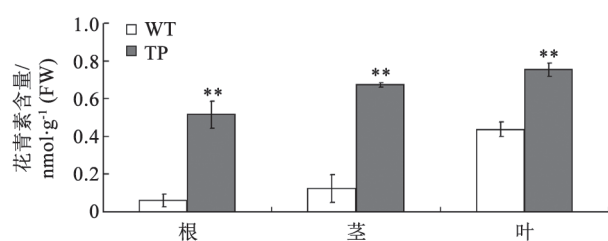


图7 干旱胁迫下转*TPSI*基因玉米根、茎、叶的花青素含量
Fig.7 Anthocyanidin content of *TPSI* transgenic maize under drought stress

5 *TPSI*基因对花青素合成调控基因表达的影响

转录因子是花青素合成的重要调节因子(乔小燕等2009)。研究表明10% PEG-6000溶液模拟的干旱胁迫条件下转*TPSI*基因玉米植株的根中正调控基因*PLI*、*PAC1*和*RI*的表达量较野生型上调, *PLI*表达量是野生型的26.6倍, *PAC1*表达量是野生型的1.5倍, *RI*表达量是野生型的2.9倍。而负调控基因*c1-I-2K1*表达量比野生型下降了63.8% (图8-A)。转基因植株的茎中正调控基因*PLI*、*PAC1*和*RI*表达量分别是野生型的5.2、1.4和1.6倍; 而负调控基因*c1-I-2K1*表达量比野生型下降了60.2% (图8-B)。转基因植株的叶中正调控基因*PLI*、*PAC1*和*RI*表达量分别是野生型的4.1、2.0和3.8倍, 负调控基因*c1-I-2K1*表达量比野生型下降了85.1% (图8-C)。说明转*TPSI*基因玉米中花青素含量的增加, 与*TPSI*基因表达而影响花青素合成调控因子表达有关。

6 干旱胁迫对转*TPSI*基因玉米植株抗氧化能力的影响

干旱胁迫会使植物细胞积累H₂O₂并且导致脂膜过氧化, CAT是清除H₂O₂的一种酶, 能够减少H₂O₂对细胞的毒害; MDA是膜脂过氧化的主要产物, 其含量与植物抗旱性呈反比, 两者都是评价植物抗旱性的重要指标(张立新和李生秀2007)。研究表明在10% PEG-6000溶液模拟干旱胁迫条件下, 转基因玉米的CAT活性比野生型提高了56.3% (图9-A), 极显著高于野生型。而转基因玉米的

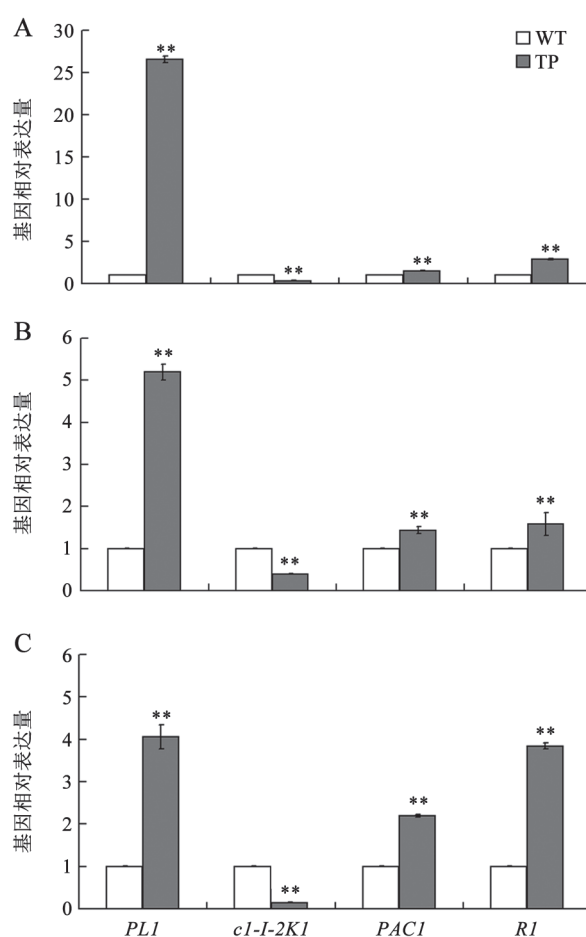


图8 干旱胁迫下转*TPSI*基因玉米根、茎、叶中花青素合成调控基因的表达分析

Fig.8 Expression analysis of transcription factor related to anthocyanidin synthesis under drought stress

A~C分别为干旱胁迫下转基因玉米根、茎和叶中花青素合成调控基因的表达。

MDA含量与野生型相比, 降低了36.7% (图9-B), 表明转*TPSI*基因玉米植株的抗氧化能力提高了。

讨 论

有研究报道*TPSI*基因提高植物抗旱性的可能机制包括: 第一, 在干旱等胁迫条件下, *TPSI*基因表达合成海藻糖阻止了蛋白失活和细胞膜变性(Elbein等2003); 第二, *TPSI*基因影响气孔开闭程度, 从而减少水分的蒸发(Van Houtte等2013)。我们前期的研究结果表明, 转*TPSI*基因玉米抗旱性增强的原因中证明*SDD1*基因表达升高和气孔密度减少能提高转*TPSI*基因玉米植株的抗旱性(Liu等2014)。将玉米*ZmSDD1*基因导入烟草中, 提高了

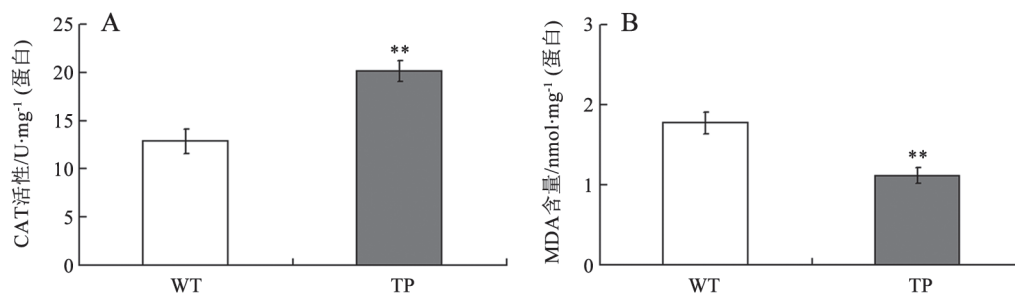


图9 干旱胁迫下转*TPSI*基因玉米的CAT活性和MDA含量

Fig.9 CAT activity and MDA content of *TPSI* transgenic maize plants under drought stress

A: 干旱胁迫下野生型与转基因玉米CAT活性; B: 干旱胁迫下野生型与转基因玉米MDA含量。

烟草的抗旱性, 且转基因烟草的气孔密度同时降低(刘延波等2014)。随后研究发现*TPSI*基因在干旱胁迫下促进玉米根系生长也是转*TPSI*基因玉米植株抗旱性增强的原因之一(项阳等2015)。

花青素是一种有效而有广谱性的保护因子, 不仅能提高抗旱能力, 还能够提高植物抗冻、抗氧化以及抗菌能力(孙明霞等2003)。花青素以糖苷形式存在, 极易溶于水, 并且容易在液泡中积累, 可作为渗透调节剂, 提高植物抗旱性。Nogués等(1998)报道, UV-B照射诱导产生的花青素可以降低豌豆(*Pisum sativum*)在干旱胁迫下的受害程度, 提高了豌豆的抗旱性。有研究表明随着干旱胁迫程度加重, 植物的花青素含量逐渐增加(许雨颖等2007; Efeoğlu等2009)。本研究在前期工作的基础上进一步研究转*TPSI*基因玉米植株中抗旱性增强的原因, 发现随着干旱胁迫加重, 野生型和转基因玉米植株的叶片相对含水量和耐旱系数逐渐降低; 转基因玉米植株的叶片相对含水量和耐旱系数在每个干旱胁迫条件下均高于野生型, 表明转基因玉米植株比野生型更加抗旱。同时野生型和转基因玉米植株随着干旱加重, 花青素含量也随之增加, 且转基因玉米植株的花青素含量在每个干旱胁迫条件下均高于野生型。同时, 相关性分析表明花青素含量与转基因玉米抗旱性增强显著相关。在10% PEG-6000溶液模拟干旱胁迫条件下, 转基因玉米的根、茎、叶的花青素含量均高于野生型。Sherwin和Farrant (1998)的研究证明花青素积累能提高植物的抗旱性, 因此花青素积累可能是玉米植株抗旱性提高的原因之一, 能够减缓干旱胁迫对植株的损害程度。转录因子在花青素合

成的过程中起到重要调控作用, 调控花青素合成的主要转录因子有WD4、bHLH和MYB等。转*TPSI*基因玉米植株中花青素积累可能与花青素合成的相关转录因子调控有关。在10% PEG-6000溶液模拟干旱胁迫条件下, 编码WD40转录因子的*PAC1*基因在根、茎、叶中表达量均有所增加, 尤其是叶片中的表达量是野生型的2倍以上。油菜(*Brassica napus*)中表达的WD40蛋白能够提高油菜渗透调节能力(Lee等2010), 说明转*TPSI*基因玉米植株WD40蛋白编码基因表达量增加可能提高了玉米抗旱性。另外, 转*TPSI*基因玉米植株中编码bHLH转录因子的*RI*基因以及编码MYB转录因子的*PLI*基因表达水平在根、茎、叶中均表现上调。*RI*和*PLI*基因在叶中均表达上调最高, 表达量分别是野生型的3.8倍和4倍以上。Nakabayashi等(2014)报道了拟南芥中过表达调控花青素合成的编码MYB转录因子的基因*PAP1*不仅可以提高拟南芥的抗旱性, 还提高了抗氧化能力, 说明与拟南芥中*PAP1*基因具有相同功能的*PLI*基因(Katia和Chiara 2011)的表达升高有利于提高玉米的抗旱性。此外, 花青素合成的负调控基因*c1-I-2KI*在转*TPSI*基因玉米的根、茎、叶中均表达下调, 表达量与野生型相比下降了60%以上。Chen等(2004)研究发现在烟草中导入源于玉米的*c1-I-2KI*基因能够抑制花色素的形成。但*TPSI*基因通过何种途径来影响转录因子表达还需进一步研究。转*TPSI*基因玉米植株中花青素积累可能是*TPSI*基因表达影响花青素合成调控基因的表达而促进花青素积累, 从而提高玉米抗旱性。

植物在水分胁迫下积累活性氧, 导致膜脂过

氧化, 因此, 植物在抵御氧化伤害时, 需要抗氧化酶或抗氧化剂抵御伤害(葛体达等2005)。干旱后植物体内的CAT活性和MDA含量能够反映植物的抗旱性, CAT活性上升幅度越大, MDA含量下降幅度越大, 表明植物越抗旱(张立新和李生秀2007)。干旱胁迫前野生型和转基因玉米植株的CAT活性、MDA含量没有差异。在10% PEG-6000溶液模拟干旱胁迫条件下, 转基因玉米CAT活性比野生型上升了56.3%, MDA含量比野生型降低了36.7%。表明*TPSI*基因表达也提高了转基因玉米抗氧化能力, 从而减少干旱胁迫对玉米的受害程度。

参考文献

- 白桦, 王佩云, 田晓伟, 姚新灵(2013). 植物6-磷酸海藻糖参与的调控途径. 生物技术通报, (10): 12~17
- 付凤玲, 阎雨, 刘卫国, 李晚忱(2011). 玉米海藻糖含量测定及其合成酶(TPS)基因序列分析. 核农学报, 25 (6): 1107~1116
- 高俊凤(2006). 植物生理学实验指导. 北京: 高等教育出版社, 15~16
- 葛体达, 隋方功, 白莉萍, 吕银燕, 周广胜(2005). 水分胁迫下夏玉米根叶保护酶活性变化及其对膜脂过氧化作用的影响. 中国农业科学, 38 (5): 922~928
- 胡可, 韩科厅, 戴思兰(2010). 环境因子调控植物花青素合成及呈色的机理. 植物学报, 45 (3): 307~317
- 江龙(1999). 作物抗旱性的研究方法. 贵州农业科学, 27 (5): 70~72
- 刘贤德, 李晓辉, 李文华, 李明顺, 李新海(2004). 玉米自交系苗期耐旱性差异分析. 玉米科学, 12 (3): 63~65
- 刘延波, 项阳, 秦利军, 赵德刚(2014). 转玉米*ZmSDD1*基因烟草降低气孔密度提高抗旱性. 植物生理学报, 50 (12): 1889~1898
- 闵远琴, 闫海芳, 李玉花(2010). 花青素合成中的WD40蛋白. 植物生理学通讯, 46 (9): 863~870
- 乔小燕, 马春雷, 陈亮(2009). 植物类黄酮生物合成途径及重要基因的调控. 天然产物研究与开发, 21 (2): 354~360
- 孙明霞, 王宝增, 范海, 赵可夫(2003). 叶片中的花色苷及其对植物适应环境的意义. 植物生理学通讯, 39 (6): 688~694
- 王仙萍, 李敏, 张敏琴, 曾章丽, 向阳, 韩宏仕, 杜才富, 沈奇(2013). 贵州紫苏资源收集以及叶色多样性分析. 中国农学通报, 29 (10): 132~136
- 吴妍, 张岁岐, 刘小芳, 山仑(2010). 水分胁迫及复水条件下外源Ca²⁺对玉米幼苗根系水力导度及生长的影响. 作物学报, 36 (6): 1044~1049
- 项阳, 刘延波, 秦利军, 赵德刚(2015). 酵母*TPSI*基因促进干旱胁迫下玉米的根系生长. 植物生理学报, 51 (3): 363~369
- 许丽颖, 赫玉苹, 王刚, 赵和祥, 赵启军, 郭太君(2007). 水分胁迫对紫叶李叶片色素含量与PAL活性的影响. 吉林农业大学学报, 29 (2): 168~172
- 许志茹, 李玉花(2006). 利用cDNA微阵列分离津田茺菁花青素生物合成相关基因. 遗传, 28 (9): 1101~1106
- 张立新, 李生秀(2007). 氮、钾、甜菜碱对水分胁迫下夏玉米叶片膜脂过氧化和保护酶活性的影响. 作物学报, 33 (3): 482~490
- Antal F, Kondrák M, Kovács G, Bánfalvi Z (2013). Influence of the StubSNF1 kinase complex and the expression of the yeast *TPSI* gene on growth and tuber yield in potato. *Plant Growth Regul*, 69 (1): 51~61
- Carey CC, Strahle JT, Selinger DA, Chandler VL (2004). Mutations in the *pale aleurone color1* regulatory gene of the *Zea mays* anthocyanin pathway have distinct phenotypes relative to the functionally similar *TRANSPARENT TESTA GLABRA1* gene in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 16 (2): 450~464
- Chen B, Wang X, Hu Y, Wang Y, Lin Z (2004). Ectopic expression of a *cl-1* allele from maize inhibits pigment formation in the flower of transgenic tobacco. *Mol Biotechnol*, 26 (3): 187~192
- Cocciolone SM, Cone KC (1993). *Pl-Bh*, an anthocyanin regulatory gene of maize that leads to variegated pigmentation. *Genetics*, 135 (2): 575~588
- Cortina C, Culiáñez-Macià FA (2005). Tomato abiotic stress enhanced tolerance by trehalose biosynthesis. *Plant Sci*, 169 (1): 75~82
- Efeoğlu B, Ekmekci Y, Cicek N (2009). Physiological responses of three maize cultivars to drought stress and recovery. *S Afr J Bot*, 75 (1): 34~42
- Elbein AD, Pan YT, Pastuszak I, Carroll D (2003). New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology*, 13 (4): 17R~27R
- Gravot A, Grilllet L, Wagner G, Jubault M, Lariagon C, Baron C, Deleu C, Delourme R, Bouchereau A, Manzaneres-Dauleux MJ (2011). Genetic and physiological analysis of the relationship between partial resistance to clubroot and tolerance to trehalose in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol*, 191 (4): 1083~1094
- Katia P, Chiara T (2011). Recent advances on the regulation of anthocyanin synthesis in reproductive organs. *Plant Sci*, 181: 219~229
- Lee S, Lee J, Paek KH, Kwon SY, Cho HS, Kim SJ, Park JM (2010). A novel WD40 protein, BnSWD1, is involved in salt stress in *Brassica napus*. *Plant Biotechnol Rep*, 4: 165~172
- Liu YB, Han LZ, Qin LJ, Zhao DG (2014). *Saccharomyces cerevisiae* gene *TPSI* improves drought tolerance in *Zea mays* L. by increasing the expression of *SDD1* and reducing stomatal density. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 119 (1): 1~11
- Mahajan M, Yadav SK (2014). Overexpression of a tea flavanone 3-hydroxylase gene confers tolerance to salt stress and *Alternaria solani* in transgenic tobacco. *Plant Mol Biol*, 85: 551~573
- Mohammadkhani N, Heidari R (2008). Drought-induced accumulation of soluble sugars and proline in two maize varieties. *World Appl Sci J*, 3 (3): 448~453
- Nakabayashi R, Yonekura-Sakakibara K, Urano K, Suzuki M, Yamada Y, Nishizawa T, Matsuda I, Kojima M, Sakakibara H, Shinozaki K et al (2014). Enhancement of oxidative and drought tolerance in *Arabidopsis* by overaccumulation of antioxidant flavonoids. *Plant J*, 77: 367~379
- Nogués S, Allen DJ, Morison JIL, Baker NR (1998). Ultraviolet-B radiation effects of water relations, leaf development, and photosynthesis in droughted pea plants. *Plant Physiol*, 117: 173~181
- Pascual-Teresa S, Sanchez-Ballesta MT (2008). Anthocyanins: from plant to health. *Phytochem Rev*, 7 (2): 281~299
- Petroni K, Tonelli C (2011). Recent advances on the regulation of

- anthocyanin synthesis in reproductive organs. *Plant Sci*, 181 (3): 219~229
- Sherwin HW, Farrant JM (1998). Protection mechanisms against excess light in the resurrection plants *Craterostigma wilmsii* and *Xerophyta viscosa*. *Plant Growth Regul*, 24 (3): 203~210
- Teng S, Keurentjes J, Bentsink L, Koornneef M, Smeeckens S (2005). Sucrose-specific induction of anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis* requires the *MYB75/PAP1* gene. *Plant Physiol*, 139 (4): 1840~1852
- Van Houtte H, Vandesteene L, López-Galvis L, Lemmens L, Kissel E, Carpentier S, Feil R, Avonce N, Beeckman T, Lunn JE et al (2013). Overexpression of the trehalase gene *AtTRE1* leads to increased drought stress tolerance in *Arabidopsis* and is involved in abscisic acid-induced stomatal closure. *Plant Physiol*, 161 (3): 1158~1171
- Wingler A, Fritzius T, Wiemken A, Boller T, Aeschbacher RA (2000). Trehalose induces the ADP-glucose pyrophosphorylase gene, *ApL3*, and starch synthesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 124 (1): 105~114