

李葵花,高玉亮,吴京姬. 转 *P5CS* 基因马铃薯“东农 303”耐盐、抗旱性研究[J]. 江苏农业科学,2014,42(11):131-133.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2014.11.045

转 *P5CS* 基因马铃薯“东农 303”耐盐、抗旱性研究

李葵花¹, 高玉亮², 吴京姬²

(1. 延边大学农学院, 吉林延吉 133002; 2. 延边朝鲜族自治州农业科学院, 吉林龙井 133400)

摘要:利用拟南芥 Δ^1 -吡咯啉-5-羧酸合成酶基因(*P5CS*)进行了马铃薯品种“东农 303”的遗传转化,在盐和干旱胁迫下研究转基因植株的耐盐性和抗旱性。经 PCR 扩增,证实 *P5CS* 基因已整合到马铃薯基因组中。用 150 mmol/L NaCl 溶液和干旱(基质含水量为 20%~25%)胁迫处理 20 d,发现转基因植株叶片的脯氨酸含量显著增加,SOD 活性明显上升,而丙二醛积累量则缓慢,从而说明该品种更适合生长在干旱和盐胁迫条件下。

关键词:马铃薯;*P5CS* 基因;耐盐性;抗旱性;SOD;丙二醛

中图分类号: S532.03 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)11-0131-03

在干旱和盐碱土壤等逆境条件下生长的农作物,因受到渗透胁迫而严重影响其新陈代谢,造成大幅减产。据统计,全球干旱、半干旱地区约占陆地面积的 34.9%,在我国,由于干旱引起的主要农作物减产约为总产量的 50%,盐碱地面积则高达 9 913.3 万 hm^2 ,且有增加趋势^[1-2]。植物体在一定范围的干旱和盐碱胁迫下,大量合成并积累脯氨酸、甜菜碱等有机化合物来调节渗透压,降低水势,完全或部分地维持细胞膨压,从而保证植物体生理生化过程的顺利进行^[3-4]。在渗透胁迫下脯氨酸主要来源于谷氨酸合成途径, Δ^1 -吡咯啉-5-羧酸合成酶(Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase, *P5CS*)是脯氨酸合成的关键酶,催化谷氨酸磷酸化并还原谷氨酸- γ -半醛,同时 *P5CS* 活性又受到脯氨酸的反馈调节。*P5CS* 基因可被干旱、高盐和脱落酸诱导表达,对高温或低温诱导没有反应^[5]。过量表达 *P5CS* 基因的烟草植株在干旱和盐胁迫下大量积累脯氨酸来维持其渗透压,在 400 mmol/L 的盐胁迫下,转基因烟草植株根的干物质量增加^[6];转 *P5CS* 基因水稻实生 1 代的组织培养苗在 100 mmol/L NaCl 胁迫下植株高度、鲜质量比对照植株均有明显增加;转豇豆 *P5CS* 基因水稻实生 1 代在田间干旱条件下积累大量脯氨酸,生长势明显优于对照植株,表明水稻实生 1 代可稳定表达外源 *P5CS* 基因,并具有抗干旱、抗盐碱能力^[7]。在 250 mmol/L 盐胁迫下,转 *P5CS* 基因水稻细胞系的鲜重比野生型高 6~8 倍,其脯氨酸含量为对照的 241%^[8];转拟南芥 *P5CS* 基因大豆在干旱胁迫下能够快速积累脯氨酸,提高抗旱性;在正常供水条件下,转 *P5CS* 基因柑橘的脯氨酸含量与对照无明显差异,而在水分胁迫下,转基因植株脯氨酸积累量明显高于对照,抗旱性得到了较大增强^[9]。上述试验均证明 *P5CS* 基因的转入能提高植物的抗逆性。

目前,我国东北地区土壤盐碱化面积日渐扩大,旱涝等非

生物胁迫逆境环境也频繁发生,开发适合栽培于逆境土壤的抗旱、抗盐碱等抗逆性作物势在必行。马铃薯是常见的粮菜间作作物,生育期短、适应性强、产量高,具有较好的经济效益。本研究把拟南芥 *P5CS* 基因转入马铃薯品种“东农 303”中,并在干旱和盐碱胁迫环境下测定了转基因植株体内脯氨酸、丙二醛的含量及 SOD 活性,为选育抗旱耐盐的马铃薯新品种奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 遗传转化受体材料及菌株

将消毒的“东农 303”马铃薯微型薯切成 10.0 mm × 10.0 mm × 1.5 mm 大小的薄片作为农杆菌转化的受体材料;菌株为含有 pCAM-BIA-1301-*P5CS* 质粒的 LBA4404 根癌农杆菌,由笔者所在实验室保存。

1.2 农杆菌介导遗传转化

将受体材料浸泡于 LBA4404 农杆菌悬浮液(吸光度 $D_{600\text{nm}}=0.3$)20 min,共侵染 1 000 个外植体。侵染外植体置于再分化培养基(MS 基本培养基 + 5.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L IAA + 30 g/L 蔗糖 + 500 mg/L 羧苄青霉素 + 6 mg/L 潮霉素)中,在 25℃、16 h/d 光照条件下培养,每 15 d 继代 1 次。外植体在再分化培养基中约 4 周开始分化出芽,当再生芽长到 20 mm 高度时,继代到抗性生根培养基上(MS 基本培养基 + 30 g/L 蔗糖 + 500 mg/L 羧苄青霉素 + 10 mg/L 潮霉素),统计遗传转化率(遗传转化率 = 再生抗性植株/侵染外植体总数 × 100%)。

1.3 PCR 检测

取抗性植株叶片,用 CTAB 法提取植物总 DNA,以引物 *P5CS*-F(5'-GTTTTGAATCCCGGCCTGA-3')和 *P5CS*-R(5'-TCCACTTGGCGGAGGAATAT-3')检测 *P5CS* 基因。PCR 反应条件:94℃ 预变性 4 min;94℃ 变性 30 s,58℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,35 个循环;于 72℃ 延伸 7 min,用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4 胁迫处理材料培养

当转基因和非转基因试管苗长至 8~10 张叶时,将其切成茎段(带 1~2 张叶)后接入 MS + 30 g/L 蔗糖的液体培养

收稿日期:2014-01-17

基金项目:国家自然科学基金(编号:31260470);延边大学科技发展计划项目启动金(编号:2011800-601010018)。

作者简介:李葵花(1970—),女,吉林延吉人,博士,副教授,从事园艺学研究。E-mail:khli@ybu.edu.cn。

基中静置培养,在 25 ℃、光强 2000 lx、光照时间 16 h/d 条件下培养。培养 20 d 后将生根试管苗从培养基中取出栽植到含等量腐殖土和草炭土的营养钵中,每营养钵栽 1 株。将这些营养钵置于玻璃温室内,每隔 2 d 浇透水。20 d 后当植株长至约 15 cm 时,用于胁迫处理。

1.5 盐和干旱胁迫处理

分别选取 30 株在营养钵中生长 20 d 的长势一致的转基因和非转基因植株,每天 08:00 进行胁迫处理。盐胁迫:每隔 2 d 浇 1 次 150 mmol/L NaCl 溶液,每次浇灌 500 mL/钵,处理 7 次,随机选取培养 20 d 的植株中间同一部位的叶片用于耐盐性鉴定。干旱胁迫:干旱胁迫处理开始前 2 d 停止浇水,使基质处于含水量为 20% ~ 25% 的干旱条件,并维持干旱条件 20 d,随机选取胁迫处理植株的中间同一部位叶片进行抗旱性鉴定。盐胁迫和干旱胁迫分别处理 5 株,3 次重复,同时观察植株生长势。

1.6 耐盐性和抗旱性鉴定

采用硫代巴比妥酸显色法测定丙二醛(MDA)含量,茚三酮比色法测定脯氨酸含量,核黄素-NBT 法测定 SOD 活性。

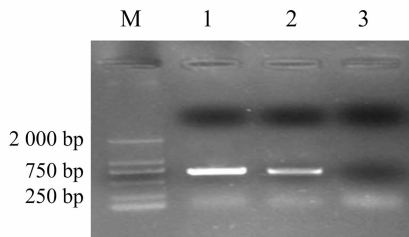
1.7 数据统计与分析

试验数据采用 SPSS 软件进行 Duncan's 多重比较($P < 0.05$)检验显著性,采用 Excel 2007 软件作图。

2 结果与分析

2.1 抗性植株的 PCR 检测

用 6 mg/L 潮霉素筛选农杆菌介导遗传转化的再生抗性芽,共获得 3 个抗性株系,遗传转化效率为 0.3%。把抗性芽继代至抗性生根培养基(含 10 mg/L 潮霉素)中,其中 1 个株系生长正常,另 2 个株系生长较缓慢;对正常生长株系进行大量扩繁。用 CTAB 法提取叶片总 DNA 进行 PCR 检测,扩增产物电泳分析结果表明,转基因植株与阳性质粒均扩增出 701 bp 相同大小的特异条带(图 1),而非转基因植株则无此特异条带,证明 *P5CS* 基因已整合到再生抗性马铃薯植株中。



M—DNA 分子量标准(DL2000); 1—质粒阳性对照;
2—转基因植株; 3—非转基因植株

图1 转 *P5CS* 基因马铃薯植株的 PCR 检测

2.2 耐盐性和抗旱性

2.2.1 游离脯氨酸含量 植物在高盐、干旱等逆境下会大量积累游离脯氨酸来降低渗透胁迫所造成的氧伤害,保护胁迫下的植物体,因此,在相同胁迫条件下,同品种马铃薯植株中脯氨酸积累量越多,表明其抗逆性越强。图 2 表示转基因和非转基因植株在 150 mmol/L NaCl 胁迫和基质含水量为 20% ~ 25% 的干旱胁迫下叶片中游离脯氨酸的含量。从图 2 可知,转基因和非转基因植株在盐和干旱胁迫下均有脯氨酸积累,尤其是在盐胁迫下积累了大量脯氨酸;盐和干旱胁迫下

转基因植株的脯氨酸含量分别为非转基因植株的 1.7 倍和 1.3 倍,明显高于非转基因植株。表明转 *P5CS* 基因植株在盐和干旱胁迫下可大量合成脯氨酸,从而更能适应逆境环境。

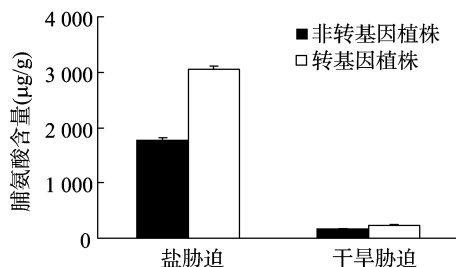


图2 盐和干旱胁迫下转基因与非转基因植株叶片中脯氨酸含量的差异

2.2.2 丙二醛(MDA)含量 植物在逆境或衰老过程中遭受伤害时,因膜脂过氧化而导致生物膜的破坏,最终分解为 MDA。MDA 含量的高低与细胞膜的伤害程度呈正相关,即 MDA 含量可反映植物遭受逆境伤害的程度,含量越高表明对膜和细胞造成的伤害越大^[10]。由图 3 可知,在盐和干旱胁迫下转基因和非转基因植株均产生 MDA,但转基因植株叶片 MDA 的产生量明显低于非转基因植株。在 150 mmol/L NaCl 胁迫和 20% ~ 25% 的基质含水量条件下,转基因植株叶片中的 MDA 含量只有非转基因植株的 50.3% 和 65.8%,表明在盐和干旱胁迫下转基因植株积累的 MDA 含量较少,使细胞膜伤害程度明显降低而达到植株能够较正常生长。

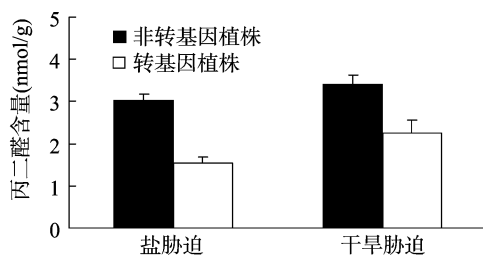


图3 盐和干旱胁迫下转基因与非转基因植株叶片中MDA含量的差异

2.2.3 超氧化物歧化酶(SOD)活性 SOD 是清除植物体内活性氧自由基的最重要的保护酶之一,在植物器官衰老或在逆境胁迫下,SOD 能够使细胞免受伤害从而起到保护作用,其活性越高清除活性氧的能力就越强。由图 4 可以看出,转基因和非转基因植株在盐胁迫和干旱胁迫下均具 SOD 活性,但转基因植株的 SOD 活性显著高于非转基因植株。在 150 mmol/L NaCl 胁迫和基质含水量为 20% ~ 25% 的干旱胁迫下,转基因植株的 SOD 活性是非转基因植株的 2.67 倍和 2.87 倍。表明转 *P5CS* 基因植株在盐和干旱胁迫条件下能够增强 SOD 活性,进而减轻植株受胁迫的程度。

2.2.4 盐和干旱胁迫下植株生长势的初步观察 用 150 mmol/L NaCl 和含水量为 20% ~ 25% 的基质对转基因和非转基因植株胁迫处理 20 d 后的植株形态学观察表明,转基因植株的耐盐和抗干旱能力显著提高。从图 5 可以看出,在干旱胁迫下,转基因植株的下部叶片生长较正常,上部叶除叶尖发黄外其他叶片的长势良好;而非转基因植株中,下部叶片已干枯、死亡,上部叶片也明显卷曲、干枯,叶片趋于死亡。在

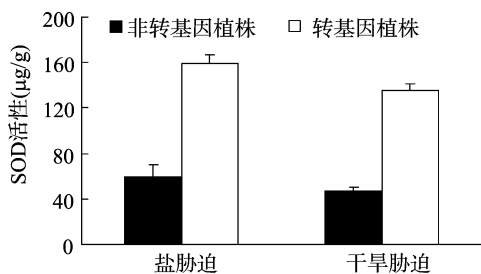
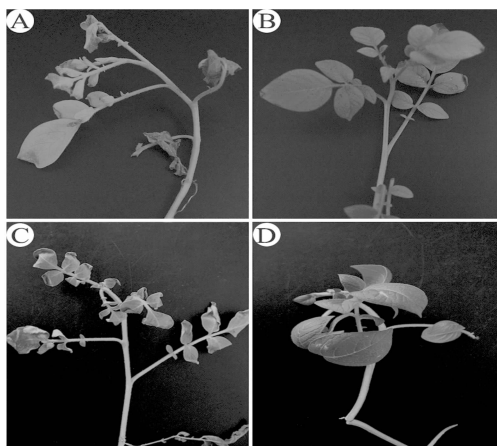


图4 盐和干旱胁迫下转基因与非转基因植株叶片中SOD活性的差异

盐胁迫下,转基因植株生长较良好,只有部分叶呈现少量的白色斑点或叶尖发黄、叶片发生微微卷曲、植株节间缩短的现象;而非转基因植株叶片则全部萎蔫、卷曲严重,甚至干枯死亡。表明转 *P5CS* 基因的“东农 303”马铃薯植株在盐和干旱胁迫下生长势明显优于非转基因植株。



A、B—干旱胁迫; C、D—盐胁迫; A、C—非转基因植株; B、D—转基因植株

图5 转基因与非转基因植株在盐和干旱胁迫下的形态学表现

3 结论与讨论

与非转基因植株相比,转拟南芥 *P5CS* 基因的马铃薯品种“东农 303”在盐和干旱胁迫下叶片中脯氨酸含量显著增加,SOD 活性明显上升,而丙二醛积累量则缓慢,说明转 *P5CS* 基因“东农 303”具有一定的耐盐性和抗旱性。盐和干旱等渗透胁迫会扰乱植物细胞的水分平衡,造成植物细胞缺水,最直接的表现就是叶片的萎蔫程度。Sherraf 等研究表明,在 50 mmol/L NaCl 胁迫下,马铃薯植株生长势是非胁迫下的 50%;在 150 mmol/L NaCl 胁迫下,马铃薯植株的生长势会完全受到抑制,根部吸收能力受到阻碍,细胞间隙之间由碱性物质所饱和,最终造成细胞坏疽和细胞死亡^[11],该研究结果与本试验在 150 mmol/L NaCl 胁迫下非转基因植株叶片已干枯死亡的结果相一致。很多研究已证明转入抗旱或耐盐相关基因可提高农作物对渗透胁迫的耐受能力,进而培育出高抗逆性的新品种。脯氨酸作为植物抵抗渗透胁迫的重要渗透物质,其积累是植物对逆境胁迫所采取的一种自我保护性措施,其含量可反映细胞抗逆性和受害程度^[12-13]。Hmida - Sayari 等将拟南芥的 *P5CS* 基因转入马铃薯中,获得了 4 个转基因株系,在 100 mmol/L NaCl 胁迫下,转基因植株的脯氨酸积累

量在 180 ~ 1 100 μg/g 鲜叶质量,表明在相同的胁迫条件下,转基因株系间脯氨酸的合成量具有较大差异^[14]。本研究中的转基因马铃薯植株在 150 mmol/L NaCl 胁迫下脯氨酸积累量约为 3 000 μg/g 鲜叶质量,较高,认为转 *P5CS* 植株中脯氨酸的积累量可能是受品种、NaCl 胁迫浓度、胁迫处理时间、目的基因拷贝数等的影响,具体的原因有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] 张建锋. 盐碱地的生态修复研究[J]. 水土保持研究, 2008, 15 (4): 74 - 78.
- [2] 赵雅静, 翁伯琦, 王义祥, 等. 植物对干旱胁迫的生理生态响应及其研究进展[J]. 福建稻麦科技, 2009, 27 (2): 45 - 50.
- [3] Hamilton E W, Heckathorn S A. Mitochondrial adaptations to NaCl. Complex I is protected by anti-oxidants and small heat shock proteins, whereas complex II is protected by proline and betaine[J]. Plant Physiology, 2001, 126 (3): 1266 - 1274.
- [4] Hong Z, Lakkineni K, Zhang Z, et al. Removal of feedback inhibition of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress[J]. Plant Physiology, 2000, 122 (4): 1129 - 1136.
- [5] Yoshida Y, Kiyosue T, Katagiri T, et al. Correlation between the induction of a gene for Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase and the accumulation of proline in *Arabidopsis thaliana* under osmotic stress[J]. The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology, 1995, 7 (5): 751 - 760.
- [6] Kavi Kishor P B, Hong Z L, Miao G H, et al. Overexpression of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants[J]. Plant Physiology, 1995, 108: 1387 - 1394.
- [7] Zhu B C, Su J, Chang M C, et al. Overexpression of a Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase gene and analysis of tolerance to water- and salt-stress in transgenic rice[J]. Plant Science, 1998, 139: 41 - 48.
- [8] De Ronde J A, Cress W A, Krüger G H, et al. Photosynthetic response of transgenic soybean plants, containing an *Arabidopsis P5CR* gene, during heat and drought stress[J]. Journal of Plant Physiology, 2004, 161 (11): 1211 - 1224.
- [9] Molinari H B, Marur C J, Filho J C, et al. Osmotic adjustment in transgenic citrus rootstock Carrizo citrange (*Citrus sinensis* Osb. × *Poncirus trifoliata* L. Raf.) overproducing proline[J]. Plant Science, 2004, 167 (6): 1375 - 1381.
- [10] 刘金龙, 杨秀清, 姚延涛. 铜锌元素与华北落叶松丙二醛含量关系的研究[J]. 山西农业大学学报: 自然科学版, 2003, 23 (3): 212 - 215.
- [11] Sherraf I, Tizroutine S, Chaput M H, et al. Production and characterization of intergeneric somatic hybrids through protoplast electrofusion between potato (*Solanum tuberosum*) and *Lycopersicon pennellii* [J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1994, 37 (2): 137 - 144.
- [12] 支立峰, 陈明清, 余涛, 等. *p5cs* 转化水稻细胞系的研究[J]. 湖北师范学院学报: 自然科学版, 2005, 25 (4): 39 - 43, 51.
- [13] 郭旭, 雷江丽, 唐益雄, 等. 农作物抗渗透胁迫与 *P5CS* 基因工程研究进展[J]. 河南农业科学, 2007 (2): 15 - 19.
- [14] Hmida - Sayari A, Gargouri - Bouzid R, Bidani A, et al. Overexpression of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers salt tolerance in transgenic potato plants[J]. Plant Science, 2005, 169 (4): 746 - 752.