

李静婷,赵旭耀,刘超凡,等. 热胁迫对转 *TasHSP16.9* 拟南芥幼苗生长生理特性的影响[J]. 江苏农业科学,2016,44(10):113-116.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.10.027

热胁迫对转 *TasHSP16.9* 拟南芥幼苗生长生理特性的影响

李静婷, 赵旭耀, 刘超凡, 秦永兴

(平顶山学院化学与环境工程学院,河南平顶山 467000)

摘要:首先研究小麦 16.9 ku 小分子热激蛋白(small heat shock protein,简称 sHSP)基因(*sHSP16.9*)3'-UTR 中微型反向重复转座元件(miniature inverted-repeat transposable elements,简称 MITE)插入对基因表达调控的影响,结果显示:热胁迫下,具有 MITE 插入的基因型中 *sHSP16.9* 基因转录水平较无 MITE 插入的基因型明显提高,而 MITE 是一类特殊的 DNA 介导的转座子,推测其参与基因表达调控。随后研究 MITE 参与基因表达调控的机制,构建 2 种不同的植物表达载体 pCAMBIA Super-1300 + *sHSP16.9*、pCAMBIA Super-1300 + *sHSP16.9* + MITE 转化拟南芥,结果显示:*sHSP16.9* + MITE 超表达的转基因拟南芥中,*sHSP16.9* 基因表达量较 *sHSP16.9* 超表达的转基因拟南芥明显提高;高温胁迫下,*sHSP16.9* + MITE 超表达的转基因拟南芥中种子发芽率、幼苗存活率、游离脯氨酸含量均较 *sHSP16.9* 超表达的转基因拟南芥明显提高,而丙二醛含量升高的幅度明显低于 *sHSP16.9* 超表达的转基因拟南芥。由结果可知,*sHSP16.9* + MITE 超表达的转基因拟南芥耐热性水平较 *sHSP16.9* 超表达的转基因拟南芥高,推测 *sHSP16.9* 基因 3'-UTR 中 MITE 插入增强该基因的表达。

关键词:MITE;*TasHSP16.9*;3'-UTR;拟南芥;基因调控;小麦;耐热性;生理指标

中图分类号:S188;Q786 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)10-0113-03

在热胁迫条件下,高等植物中诱导合成大量热激蛋白,最丰富的为小分子热激蛋白(small heat shock protein,简称 sHSP)。进一步研究发现,高等植物中的 sHSP 还可在其他环境胁迫条件(如低温、重金属、高盐、干旱等)下诱导合成,而在正常生长环境条件下表达量很低,表明 sHSP 可能在植物耐胁迫方面发挥重要作用^[1-2]。同时,大量研究表明,将 *sHSP* 基因转入植物体后,可以显著提高植物的耐热性。Sanmiya 等将番茄线粒体 *sHSPs* 基因转化烟草,显著提高了烟草的耐热性^[3];张路等用灰岩皱叶报春 *sHSP17-1* 基因转化拟南芥,转基因拟南芥耐热能力明显提高^[4]。热胁迫影响植物的形态结构和生理功能,发芽率、幼苗存活率、丙二醛(MDA)含量、游离脯氨酸含量等指标均能在一定程度上反映植物对高温的抗性水平。

微型反向重复转座元件(miniature inverted-repeat transposable elements,简称 MITE)是一类特殊的 DNA 介导的转座子,经常插入到基因的编码区、内含子、启动子、非翻译区(UTR)而与基因紧密相关。但是,关于 MITE 插入与基因表达二者之间本质关系的研究还比较少^[5-9]。笔者所在课题组前期研究中通过单倍体分析发现,小麦中存在 2 种单倍型的 *sHSP16.9* 基因,即在 *sHSP16.9* 基因 3'-UTR 存在 1 个 276 bp MITE 的插入/缺失。克隆 2 种单倍型小麦的

sHSP16.9 基因全长进行比对分析发现,启动子区仅有单碱基突变差异,对关键顺式作用元件并无影响,主要差异在于 3'-UTR 内 276 bp MITE 的插入/缺失。在高温、低温胁迫条件下,具有 MITE 插入的基因型中 *sHSP16.9* 基因转录水平较无 MITE 插入的基因型显著提高^[10]。进一步分别构建 2 种不同的植物表达载体 pCAMBIA Super-1300 + *sHSP16.9*、pCAMBIA Super-1300 + *sHSP16.9* + MITE 转化拟南芥,经潮霉素筛选和 PCR 检测,获得转基因拟南芥 T₃ 代纯系^[11]。

本试验利用已筛选获得的 2 种不同植物表达载体转化的拟南芥纯系进行热胁迫处理,测定种子发芽率、幼苗存活率、丙二醛和游离脯氨酸含量等生长生理指标,分析 2 种类型转基因植株的耐热能力,进而推测 MITE 对 *sHSP16.9* 基因表达的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

供试品种是转 *sHSP16.9* + MITE 基因拟南芥纯系、转 *sHSP16.9* 基因拟南芥纯系,由笔者所在课题组前期筛选获得;此外还有哥伦比亚野生型拟南芥(WT)。

1.2 方法

1.2.1 转基因拟南芥植株热胁迫条件的设定 将转基因拟南芥种子用 5% 次氯酸钠溶液(含体积分数 0.1% 的 TritonX-100)处理 5 min 进行表面消毒,用蒸馏水冲洗 6 遍。4℃ 春化处理 3 d 后,将转基因拟南芥种子播种于含 25 μg/mL 潮霉素的 MS 培养基上,在温室中培养,光一暗周期为 16 h—8 h,昼一夜温度周期为 22℃—18℃,湿度 60%。培养 10 d 后选取长势好的幼苗移栽到营养土中,培养 4 周

收稿日期:2016-03-28

基金项目:国家自然科学基金(编号:31501310);平顶山学院高层次人才科研启动项目(编号:2011015G)。

作者简介:李静婷(1983—),女,内蒙古包头人,博士,讲师,主要从事小麦遗传育种学研究。E-mail:jingting_lee@163.com。

后,选取生长一致的转基因植株进行 42 ℃ 高温胁迫处理,处理时间分别为 2、4、8、12、24 h,光—暗周期为 16 h—8 h。分别以 2 种供试类型的正常生长条件转基因拟南芥植株为对照,每个处理组进行 3 次独立的生物学重复试验。

1.2.2 种子萌发的热胁迫处理 将消毒处理后的转基因、野生型拟南芥种子春化处理 3 d 后,在 48 ℃ 水浴中处理 2、3、4、5 h,分别播种在含 25 μg/mL 潮霉素及普通 MS 培养基上,于光照培养箱中培养,2 周后观察种子的萌发情况,拍照并统计种子的萌发率。

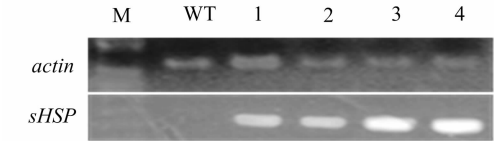
1.2.3 幼苗的热胁迫处理 将消毒、春化处理后的转基因、野生型拟南芥种子分别播种在含 25 μg/mL 潮霉素及普通 MS 培养基上,在组培瓶中培养 3 周后,对转基因、野生型拟南芥幼苗进行获得耐热性检测,即首先在 38 ℃ 预处理 2 h,随后转移至 45 ℃ 致死高温下分别处理 1、2、3 h。处理后的拟南芥仍放回光照培养箱中恢复生长 6 d,观察表型并且拍照统计成活率。

1.2.4 生理指标测定 取上述热胁迫处理的转基因、野生型拟南芥植物的叶片进行生理指标测定,每个样品平行测定 3 次,取平均值。MDA 含量采用硫代巴比妥酸比色法^[12-13]测定;游离脯氨酸含量采用磺基水杨酸提取比色法^[12-13]测定。试验数据利用 Excel 2007、SPSS 18.0 进行分析。

2 结果与分析

2.1 转基因拟南芥中 *sHSP16.9* 的表达模式

对转基因拟南芥 T₃ 代纯系进行半定量分析发现,*sHSP16.9* + *MITE* 超表达的转基因拟南芥中 *sHSP16.9* 基因表达量较 *sHSP16.9* 超表达的转基因拟南芥明显提高(图 1)。推测 *sHSP16.9* 基因 3′-UTR 中 *MITE* 插入增强了 *sHSP16.9* 基因的表达。



1、2—*sHSP16.9* 超表达的转基因拟南芥纯系;
3、4—*sHSP16.9*+*MITE* 超表达的转基因拟南芥纯系
图1 半定量检测转基因拟南芥中*sHSP16.9*的表达模式

2.2 热胁迫对种子萌发的影响

分别统计处理不同时间点的种子萌发率,由表 1 可以看出:在 48 ℃ 热胁迫下,拟南芥种子的萌发受到破坏或抑制,随着热激处理时间延长,种子萌发率逐渐下降,在热激处理 5 h 后,2 种类型转基因、野生型拟南芥种子都未萌发;在同一热激处理时间点,转 *sHSP16.9* + *MITE* 基因拟南芥种子萌发率最高,转 *sHSP16.9* 基因拟南芥次之,WT 的萌发率最低。本试验结果表明,*sHSP16.9* 超表达能明显提高转基因拟南芥的耐热性,而且 *sHSP16.9* + *MITE* 超表达的转基因拟南芥较 *sHSP16.9* 超表达的转基因拟南芥耐热性高。结果同时也表明,转 *sHSP16.9* + *MITE* 基因拟南芥中 *sHSP16.9* 基因表达量较转 *sHSP16.9* 基因拟南芥明显提高。

2.3 热胁迫对幼苗的影响

分别统计处理不同时间点的幼苗存活率,由表 2、图 2 可以看出:随着 45 ℃ 热激处理时间延长,拟南芥植株成活率逐渐下降;45 ℃ 致死高温处理 3 h,野生型拟南芥幼苗已完全白

表 1 热胁迫对转 *sHSP16.9* 基因拟南芥种子萌发的影响

拟南芥 品种	48 ℃ 不同热激处理时间的种子萌发率(%)			
	2 h	3 h	4 h	5 h
WT	1	1	0	0
CT	7	3	1	0
TT	13	5	1	0

注:WT 表示野生型拟南芥;CT 表示转 *sHSP16.9* 基因拟南芥;TT 表示转 *sHSP16.9* + *MITE* 基因拟南芥。表 2、图 2 同。

表 2 3 种拟南芥在热胁迫处理后成活率的变化

45 ℃ 处理时间 (h)	幼苗成活率(%)		
	WT	CT	TT
1	70	90	100
2	34	68	90
3	0	20	44

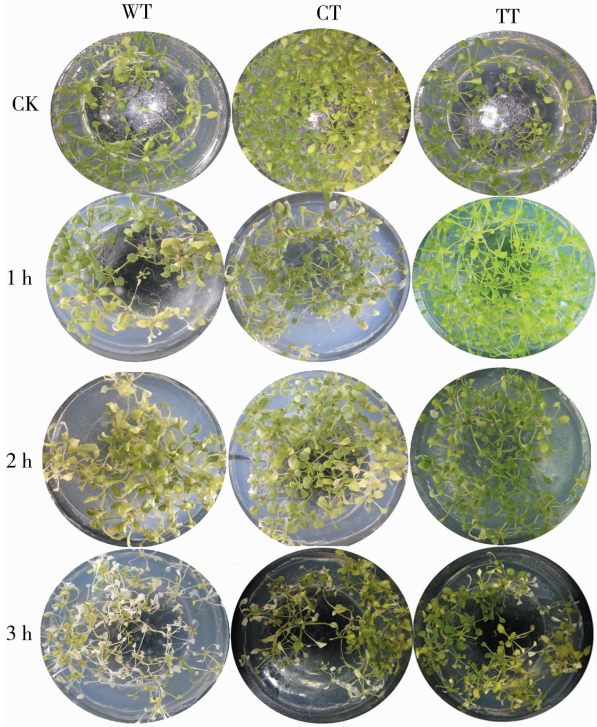


图2 热胁迫对幼苗的影响

化、死亡,转基因拟南芥部分幼苗也出现白化,部分幼苗叶片大面积出现黄绿色,但仍然能够生长,转 *sHSP16.9* + *MITE* 基因拟南芥幼苗成活率最高。本试验结果表明:*sHSP16.9* 超表达能明显提高转基因拟南芥的耐热性,而且转 *sHSP16.9* + *MITE* 基因拟南芥耐热性较转 *sHSP16.9* 基因拟南芥明显提高;同时表明,转 *sHSP16.9* + *MITE* 基因拟南芥中 *sHSP16.9* 基因表达量较转 *sHSP16.9* 基因拟南芥明显提高。

2.4 热胁迫对转 *sHSP16.9* 基因拟南芥生理指标的影响

2.4.1 高温胁迫下丙二醛含量的变化 由图 3 可以看出,在高温胁迫下,2 种类型转基因拟南芥叶片中 MDA 含量均明显增加,都明显高于相应对照;但是转 *sHSP16.9* + *MITE* 基因拟南芥中叶片 MDA 含量在各处理时间点都低于转 *sHSP16.9* 基因拟南芥,表明转 *sHSP16.9* + *MITE* 基因拟南芥的膜脂过氧化作用较小,因而具有更强的耐热能力。

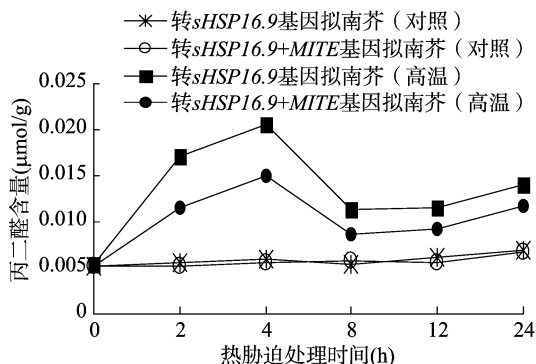


图3 高温胁迫下转基因拟南芥叶片的MDA含量变化

在热胁迫前4 h, 2种类型转基因拟南芥叶片MDA含量均升高, 可能是由于高温造成植物体内的自由基代谢平衡失调、MDA积累; 热胁迫8 h, MDA含量均迅速下降, 可能是拟南芥内源热激蛋白被诱导大量表达, 协助热变性的蛋白进行正确折叠, 并保护细胞膜结构的稳定性, 导致MDA含量均迅速下降; 随后MDA含量均迅速上升, 可能由于拟南芥诱导产生的内源热激蛋白开始降解, 膜脂过氧化程度加剧, 膜脂过氧化产物MDA含量迅速上升。

2.4.2 高温胁迫下游离脯氨酸含量的变化 由图4可以看出, 高温胁迫会使拟南芥叶片游离脯氨酸含量明显提高, 都明显高于对照水平, 但转*sHSP16.9 + MITE*基因拟南芥中叶片游离脯氨酸含量在各处理时间点上均高于转*sHSP16.9*基因拟南芥。可见转*sHSP16.9 + MITE*基因拟南芥对高温胁迫有更积极的响应和应对, 表现出较强的耐热性。在前4 h的热处理中, 转*sHSP16.9*基因拟南芥叶片游离脯氨酸含量缓慢提高, 2种类型转*sHSP16.9*基因拟南芥差异不明显; 但是在热处理4 h以后, 2种类型转*sHSP16.9*基因拟南芥叶片游离脯氨酸含量迅速提高, 且差异明显, 可能是拟南芥内源热激蛋白被诱导大量表达, 提高了细胞稳定性, 促使合成大量游离脯氨酸, 从而提高了细胞的耐热性。

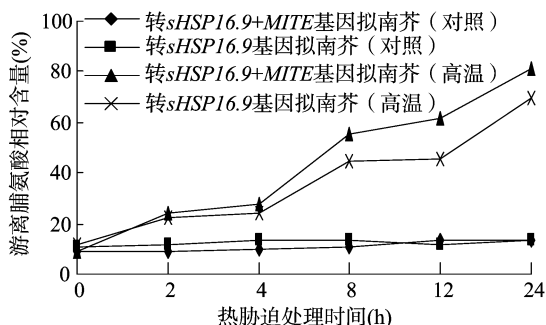


图4 高温胁迫下转基因拟南芥叶片的游离脯氨酸含量

3 讨论与结论

小麦是我国重要的粮食作物, 在农业生产中具有重要地位, 但是随着工业经济的迅速发展, 温室气体大量排放, 全球温度逐渐上升, 严重影响了小麦的正常生长发育。由于干热风的影响, 一般年份小麦减产10%~20%, 严重年份减产30%以上。为此, 我国育种学家一直致力于小麦耐热品种的选育和相关耐热基因的功能研究。

在逆境下, 植物细胞内氧自由基平衡遭到破坏, 发生膜脂过氧化作用, 而丙二醛是膜脂过氧化的主要产物, 可以反映细胞膜的损伤程度, 丙二醛含量越高, 说明质膜受损越严重。因此, 逆境下的丙二醛含量可以显示质膜受损程度, 反映植物的耐热性大小。大量研究表明, 在高温胁迫下, 植物体内丙二醛含量显著增加, 但是耐热品种中丙二醛含量低于热敏感品种^[14-15]。在热胁迫下, 报春*PFsHSPs17-1*转基因拟南芥叶片中丙二醛含量上升幅度低于野生型对照, 表现出较高的抗膜脂过氧化能力, 因而具有更强的高温适应能力^[4]。

在高温胁迫下, 植物为防止细胞脱水而受害, 会生成并积累大量渗透调节物质, 提高原生质亲水性, 有助于细胞持水, 保护细胞膜的完整性。游离脯氨酸便是一类重要的渗透调节物质, 因此可作为植物抗逆性的一项生化指标。大量研究表明, 在高温胁迫下, 细胞内游离脯氨酸含量会明显增加, 以增强植物的耐热性^[15-16]。在高温胁迫下, 报春*PFsHSPs17-1*转基因拟南芥叶片中游离脯氨酸含量明显高于野生型对照, 转基因拟南芥对高温胁迫有更积极的响应, 表现出较强的耐热性^[4]。

在本试验中, 转*sHSP16.9 + MITE*基因拟南芥叶片中丙二醛含量上升幅度低于转*sHSP16.9*基因拟南芥, 而前者游离脯氨酸含量、种子发芽率和幼苗成活率均明显高于后者, 表明转*sHSP16.9 + MITE*基因拟南芥具有更强的耐热性。同时研究表明, 将*sHSP*转基因超表达后, 可以显著提高植物的耐热性^[3-4]。也证明转*sHSP16.9 + MITE*基因拟南芥中*sHSP16.9*表达量高于转*sHSP16.9*基因拟南芥, 进而推测*sHSP16.9*基因3'-UTR中MITE插入增强了*sHSP16.9*基因的表达。同时, 本试验中转*sHSP16.9*基因拟南芥种子发芽率、幼苗成活率均明显高于野生型拟南芥, 证明*sHSP*对提高植物耐热性具有重要的作用, 为小麦耐热性育种研究提供了新思路。

参考文献:

- [1] Sato Y, Yokoya S. Enhanced tolerance to drought stress in transgenic rice plants overexpressing a small heat-shock protein, *sHSP17.7* [J]. *Plant Cell Reports*, 2008, 27(2): 329-334.
- [2] Mahmood T, Safdar W, Abbasi B H, et al. An overview on the small heat shock proteins [J]. *African Journal of Biotechnology*, 2009, 8(25): 7290-7302.
- [3] Sanmiya K, Suzuki K, Egawa Y, et al. Mitochondrial small heat-shock protein enhances thermos tolerance in tobacco plants [J]. *FEBS Letters*, 2004, 557(1/2/3): 265-268.
- [4] 张路, 胡伟娟, 张启翔, 等. 报春*PF sHSP 17-1*基因转化拟南芥及耐热鉴定[J]. *生物技术通报*, 2011(11): 177-181.
- [5] Yang G, Dong J, Chandrasekharan M B, et al. Kiddo, a new transposable element family closely associated with rice genes [J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2001, 266(3): 417-424.
- [6] Patel M, Jung S, Moore K, et al. High-oleate peanut mutants result from a MITE insertion into the *FAD2* gene [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2004, 108(8): 1492-1502.
- [7] Yang G, Lee Y H, Jiang Y, et al. A two-edged role for the transposable element Kiddo in the rice ubiquitin2 promoter [J]. *The Plant Cell*, 2005, 17(5): 1559-1568.
- [8] Magalhaes J V, Liu J, Guimarães C T, et al. A gene in the multidrug

陈明辉, 张志录, 杨雨华, 等. 红豆杉种质资源遗传多样性的目标起始密码子多态性(SCoT)分析[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(10): 116–119. doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.10.028

红豆杉种质资源遗传多样性的目标起始密码子多态性(SCoT)分析

陈明辉, 张志录, 杨雨华, 佟伟霜, 杨风岭

(平顶山学院, 河南平顶山 467000)

摘要:采用目标起始密码子多态性(SCoT)分子标记技术,研究红豆杉 18 份种质的遗传多样性及种质间的遗传关系,为红豆杉资源的保护、利用以及遗传育种提供依据。以 18 份红豆杉种质资源为材料,从 80 条引物中筛选出 19 条重复性好、条带清晰的引物进行 PCR 扩增,利用 NTSYS-pc2.10e 软件对其扩增位点多态性进行分析。结果表明:19 条引物共扩增出 134 条带,其中 97 条具有多态性,多态性带比率为 72.39%。18 个红豆杉种质间遗传相似系数在 0.31~0.89 之间,说明 SCoT 标记能够揭示材料间较高的遗传多样性。利用 UPGMA 进行系统的聚类分析显示,在相似系数 0.53 处可将 18 份红豆杉资源分成两大类;主坐标分析结果与聚类分析结果相一致。红豆杉资源具有较丰富的遗传多样性,SCoT 分子标记技术可有效地从分子水平揭示红豆杉种质资源的遗传背景和亲缘关系。

关键词:红豆杉;目标起始密码子多态性(SCoT);遗传多样性;聚类分析;亲缘关系

中图分类号: S791.490.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)10-0116-04

红豆杉[*Taxus chinensis* (Pilger) Rehd.]是第四纪孑遗植物,已在地球上生活 250 万年,是我国 I 级重点保护野生植物,被称为活化石^[1-2]。1971 年,美国科学家 Wani 等首次从短叶红豆杉(*Taxus brevifolia*)树皮中提取获得抗癌药物紫杉醇(Taxol)^[3],此后红豆杉的药用价值及其开发在我国广泛开展。红豆杉生长缓慢,极少成林,资源极其贫乏,而且紫杉醇含量仅为 0.01%,由于红豆杉资源遭到严重破坏而数量急剧下降,目前天然红豆杉已处于严重濒危状态;所以,关于红豆杉的繁殖、保护与利用已成为当前多个学科的研究热点^[4-11]。

目前红豆杉分子标记研究取得了一定的成果。张雪梅等

通过对南方红豆杉 18 个居群进行了 RFLP 分析,发现南方红豆杉现在的遗传结构可能源于居群的片段化效应^[12];Miao 等利用 SSR 技术对 14 个居群的南方红豆杉生境断裂谱系和遗传效应进行了研究,结果发现生境断裂导致了云南红豆杉近亲繁殖和种群分化^[13];吴琼等利用基于红豆杉转录组进行高通量测序进而发掘基因表达谱多态性标记^[14]。但这些分子标记方法成本较高,操作复杂。目标起始密码子多态性(start codon targeted polymorphism, SCoT)分子标记技术是 Collard 等^[15]开发的一种基于 SPAR(单引物扩增反应)的目的基因分子标记新技术。SCoT 依据植物基因中的 ATG 翻译起始位点侧翼序列的保守性,设计单引物并对基因组进行扩增^[16]。SCoT 标记结合 ISSR 标记和 RAPD 标记的优点,操作简单、成本低廉、多态性丰富,能有效地产生与性状联系的标记,是一种能跟踪性状的新的分子标记,有利于分子辅助育种^[17-18]。该分子标记技术已被成功应用于花生^[19]、龙眼^[20]、芒果^[21-22]等植物。本研究利用 SCoT 分子标记技术,从 DNA 水平研究了红豆杉 18 份种质的遗传多样性及种质间的遗传关系,以期对其亲缘关系有更全面了解,为资源的保护、利用以及遗传育种提供依据。

收稿日期:2015-09-25

基金项目:河南省科学攻关计划(编号:122102310652);河南省环境科学重点学科建设项目(编号:Pxy-zdxk-2013003)。

作者简介:陈明辉(1974—),男,河南平顶山人,博士,讲师,主要从事植物生理生化及分子生物学研究。E-mail:cmh_abc@126.com。

通信作者:杨风玲,博士,教授,主要从事植物化学研究。E-mail:yangfl0001@163.com。

and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum[J]. Nature Genetics, 2007, 39(9): 1156–1161.

[9] Hou J N, Long Y, Raman H, et al. A Tourist-like MITE insertion in the upstream region of the *BnFLC. A10* gene is associated with vernalization requirement in rapeseed (*Brassica napus* L.)[J]. BMC Plant Biology, 2012, 12(1): 463–480.

[10] Li J T, Wang Z Z, Peng H R, et al. A MITE insertion into the 3'-UTR regulates the transcription of *TaHSP16.9* in common wheat[J]. Crop Journal, 2014, 2(6): 381–387.

[11] 李静婷, 王健胜, 杨风玲. 小麦 MITE 转座子对 *sHSP* 基因的表达调控研究[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(12): 29–32.

[12] 陈建勋, 王晓峰. 植物生理学实验指导[M]. 广州: 华南理工大学出版社, 2002.

[13] 侯福林. 植物生理学实验教程[M]. 北京: 科学出版社, 2004.

[14] 叶凡, 侯喜林, 袁建玉. 高温胁迫对不结球白菜幼苗抗氧化酶活性和膜脂过氧化作用的影响[J]. 江苏农业学报, 2007, 23(2): 154–156.

[15] 彭华婷, 高悦, 杜红梅, 等. 高温胁迫对大花三色堇幼苗相关生理指标的影响[J]. 上海交通大学学报: 农业科学版, 2012, 30(6): 66–71.

[16] 万里强, 李向林, 何峰, 等. 热胁迫下两种禾草抗性生理指标的变化[J]. 西南农业学报, 2012, 25(4): 1468–1472.