

# 导入反义 **trxs** 基因改变小麦发芽特性

## Modify Germination Characters by Introducing Anti-trxs into Wheat

硫氧还蛋白 **h**(thioredoxin **h**, **Trx h**) 是一种能催化二硫键氧化还原反应的蛋白质, 它参许多重要的生命活动。种子中的 **Trx h** 在发芽时能促进淀粉酶和蛋白质水解酶的活性提高、增加贮藏蛋白的水溶性、使种子中贮藏的营养物质更易分解, 加速胚乳中的碳氮代谢。trxs 基因与硫氧还蛋白 **h** 基因(trxh)属于同一基因家族, 它们的 cDNA 有 94% 的同源性, 表达产物也有相似的生物功能。前人通过转入 trxh 基因的途径增加种子 **Trx h** 活性, 并发现种子中淀粉酶活性、贮藏蛋白的还原状态以及发芽势也随之上升; 然而, 关于 **Trx h** 活性下降对种子发芽的影响尚鲜见报道。本研究将反义 trxs 基因导入小麦, 以降低种子中 **Trx h** 的表达水平及其催化能力, 进而研究 **Trx h** 活性下降对种子中水溶蛋白和醇溶蛋白的还原状态、 $\alpha$ -淀粉酶的活性以及种子发芽特性的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 植物材料

小麦品种豫麦 34 为受体材料, T<sub>2</sub> 代转基因子粒为生化检测和发芽比较试验的材料。

### 1.2 质粒

trxs 基因反向连接在小麦醇溶蛋白启动子下游, 插入载体 pBluescript SK+ 的多克隆位点。

### 1.3 转化及再生培养

用基因枪将反义 trxs 基因导入豫麦 34 的幼胚愈伤组织, 经组织培养获得再生植株。

### 1.4 再生植株的分子检测

进行 PCR、嵌套 PCR 和 PCR 产物酶切检验。

### 1.5 生化测定和发芽比较试验

用二硫苏糖醇还原牛胰岛素法检测子粒的 **Trx h** 的催化活性。用 Bveridge 法测定巯基含量, 然后求出巯基含量与蛋白质总量间的比率。用 DNS 法测定  $\alpha$ -淀粉酶活性。T<sub>2</sub> 种子和豫麦 34 的种子(ck)在 24℃培养箱中进行 1~5 d 的发芽比较。

## 2 结果与讨论

经转化和再生培养共得到 3 株可育的抗性植株(T<sub>0</sub> 植株), T<sub>1</sub> 代材料在温室中加代繁殖。T<sub>1</sub> 代植株经 PCR、嵌套 PCR 和酶切检测, 得到了与预期长度相符合的 DNA 片段, 证明了 T<sub>1</sub> 个体中含有结构完整的反义 trxs 基因。

**Trx h** 催化活性的检测结果显示, T<sub>2</sub> 转基因种子的 **Trx h** 催化活性比对照下降了 76%, 这说明反义 trxs 基因在子粒

中具有生物活性。

在 T<sub>2</sub> 小麦种子中, 水溶蛋白和醇溶蛋白的还原型巯基含量比率都有所下降, 说明转基因种子的胚乳蛋白还原状态降低了。据报道, 胚乳蛋白有较高的还原状态, 能促进 S-S 还原, 有利于蛋白水解, 加速种子氮代谢的进程。胚乳蛋白还原状态的降低将不利于蛋白水解, 并延缓发芽时的氮代谢进程。

在 5 d 的发芽过程中, 转基因种子和对照的  $\alpha$ -淀粉酶活性都在上升, 但转基因材料的上升速率比对照低 25%; 第 5 d 时, 二者的发芽率已很接近, 但  $\alpha$ -淀粉酶活性的差异仍较明显。这表明  $\alpha$ -淀粉酶活性的高低变化与种子发芽率的变化呈正相关, 但发芽率相同的种子也可能有不同的  $\alpha$ -淀粉酶活性。

在 **Trx h** 活性降低的 T<sub>2</sub> 种子中,  $\alpha$ -淀粉酶的活性也出现下降, 表明二者有相同的变化趋势。此结果支持了关于 **Trx h** 促进  $\alpha$ -淀粉酶合成和调节 **Trx h** 的活性可以改变种子中  $\alpha$ -淀粉酶的活性的报道。前人发现, 除  $\alpha$ -淀粉酶外 **Trx h** 还能影响  $\beta$ -淀粉酶和脱支淀粉酶活性, 它们都是重要的淀粉水解酶, 对发芽时碳代谢活动有重要的影响。

可见 **Trx h** 活性变化影响着种子萌发时的碳、氮代谢进程, 进而影响种子萌发所需的能量和物质的供给, 最终改变种子发芽特性。在发芽比较试验的前两天内, T<sub>2</sub> 转基因种子的发芽势明显低于对照。此后, 转基因种子的发芽势率较前期出现大幅度上升, 到第 5 d 时其发芽势已接近对照。这表明反义 trxs 基因的导入对种子发芽势的影响较大, 而对种子的最终发芽率的影响并不明显。这可能是因为 **Trx h** 活性的下降使种子中与 S-S 还原有关的某些生化反应(如淀粉、蛋白质水解或其实酶活性调节等)速度降低, 因而导致发芽势的下降; 但那些因 S-S 还原速度下降而受到影响的生化反应在经过较长时间的反应和积累后, 仍能为种子发芽提供所需的能量和物质, 满足种子发芽的要求, 所以种子的最终发芽率所受的影响不大。

## 3 结论

本研究通过导入反义 trxs 基因降低了小麦子粒中 **Trx h** 活性、胚乳还原状态和  $\alpha$ -淀粉酶活性, 这些变化影响着种子发芽时的碳氮代谢, 本研究中转基因种子的发芽势有明显下降。结果表明通过转基因技术调节 **Trx h** 活性的方法有望成为改变种子发芽特性的新途径。

刘 雷<sup>1</sup>, 尹 钧<sup>2</sup>, 任江萍<sup>2</sup>, 韩锦峰<sup>2</sup>

(1. 四川农业大学学院, 雅安 625014,

2. 河南农业大学, 郑州 450002)