

# 逆境下转 BADH 基因小麦甜菜碱醛脱氢酶活性 表达与甜菜碱积累

张艳敏<sup>1</sup>, 丁生<sup>1</sup>, 温之雨<sup>1</sup>, 蒋春志<sup>2</sup>, 李辉<sup>2</sup>,  
霍云谦<sup>1</sup>, 朱至清<sup>3</sup>, 陈受宜<sup>4</sup>, 郭北海<sup>1</sup>

(1. 河北省农林科学院遗传生理研究所, 河北石家庄 050051; 2. 河北省农科院粮油作物所,  
石家庄 050031; 3. 中国科学院植物所, 北京 100093; 4. 中国科学院遗传发育研究所, 北京 100101;)

**摘要:**对盐、旱逆境下转 BADH 基因小麦品系 99T6 的生长发育、甜菜碱醛脱氢酶活性及甜菜碱积累等进行了研究分析, 结果表明, 转 BADH 基因株系在盐逆境下具有明显的生长优势, 耐盐能力达到 100 mmol/L; 电导率和质膜相对透性表明转基因株系抗膜损伤能力增强; 甜菜碱醛脱氢酶活性的增强和甜菜碱积累的增加, 说明转基因株系的盐旱逆境抗性是通过甜菜碱积累这一长期、持久的方式解除渗透胁迫, 而不是通过脯氨酸积累这种临时的应急反应; 以甜菜碱作为靶标性状采用基因工程方法提高植物盐旱耐性是可行的。

**关键词:** 小麦; 转基因; 甜菜碱醛脱氢酶活性; 耐盐性

中图分类号: S512.01 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2003)院庆专辑-0036-04

## Betaine Accumulation and Aldehyde Betaine Dehydrogenase Enzyme Activity for Transgenic Wheat under Stress Condition

ZHANG Yan-min<sup>1</sup>, DING Zhan-sheng<sup>1</sup>, WEN Zhi-yu<sup>1</sup>, JIANG Chun-zhi<sup>2</sup>,  
LI Hui<sup>2</sup>, HUO Yun-qian<sup>1</sup>, ZHU Zhi-qing<sup>3</sup>, CHEN Shou-yi<sup>4</sup>, GUO Bei-hai<sup>1</sup>

(1. Institute of Genetics and Physiology, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050031, China; 2. Institute of Cereal and Oil Crops, Shijiazhuang 050031, China; 3. Institute of Botany, Chinese Academy of Science, Beijing, 100093, China; 4. Institute of Genetic and Developmental Biology Sciences, Chinese Academy of Science, Beijing, 100101, China)

**Abstract:** Assay for salt tolerance and drought resistance of transgenic wheat with BADH cDNA by biolistic method were conducted under simulated salt/drought stress condition. The results indicated that the transgenic wheat has many obvious advantages over its received plants, such as the more vigorous development of seedlings, the well developed root system and the greater root activity under salt/drought stress condition, as well as the improved plasma membrane protection of excised leaf. The betaine aldehyde dehydrogenase enzyme activity under different salt concentration is also higher, and more betaine accumulation under drought condition, than its received plant. This indicated that the introduction of BADH gene into wheat may affect a series of physiological reaction to adapt stress condition, this may be one of the reasons for its higher salt/drought tolerance. The way to increase crop stress tolerance/resistance through transgenic method may be effective.

**Key words:** Transgenic; Transgenic wheat; BADH; Drought resistance; Salt tolerance

甜菜碱是植物体内非常重要的渗透调节化合物。其生物合成是由胆碱经两步脱氢氧化来完成,

收稿日期: 2003-06-20

基金项目: 国家 863 计划(2001AA212121): 植物转基因产业化专项(J99-B-010)资助

作者简介: 张艳敏(1963-), 女, 河北盐山人, 副研究员, 硕士, 主要从事组织培养与细胞工程育种研究工作, 陈受宜、郭北海为通讯作者。

其中第二步是在甜菜碱醛脱氢酶(BADH)的催化下将甜菜碱醛转变为甜菜碱。目前已清楚 BADH 由单一核基因编码,从菠菜、甜菜、山菠菜、大麦<sup>[1]</sup>、高粱<sup>[2]</sup>及大肠杆菌<sup>[3]</sup>等多种植物和微生物中已克隆了 BADH 基因,已经证明 BADH 基因的过量表达能提高植物的耐逆性<sup>[1,4]</sup>。郭岩等<sup>[5]</sup>将山菠菜 BADH 导入水稻,得到了能耐 0.5% NaCl 的转基因株系,已获准进行中间试验,通过 4 年田间实验已得到遗传稳定的株系;李银心等<sup>[6]</sup>又将该基因成功导入豆瓣菜。郭北海等<sup>[7]</sup>则将该 BADH 导入了小麦栽培品种,获得外源 BADH 基因高效表达的转基因小麦,其中 99T4 品系经室内逆境模拟及控制条件下的耐旱耐盐鉴定,表现突出,已通过国家转基因生物安全管理委员会批准,进入中间试验阶段。本文用另一高盐、旱抗性的转 BADH 基因品系 99T6 为材料研究了在盐、旱胁迫条件下转基因品系叶片中甜菜碱醛脱氢酶基因的表达与甜菜碱积累,及其与植株盐、旱抗性的关系。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试材料

供试材料为转 BADH 基因品系 99T6(T5),以受体品种石 4185 为对照。石 90-4185 由河北省石家庄市农科院培育,农艺性状优良,在品种区试中连续多年作为对照品种。转化所用质粒 pABH9(携带山菠菜 BADH 和 bar 基因,均由玉米 ubiquitin1 启动子控制)由中国科学院遗传发育所构建(图 1)。供试的转基因株系通过基因枪转化获得<sup>[7]</sup>,且经 PCR 检测和 Southern 杂交分析等证明为成功的转 BADH 基因植株后代。

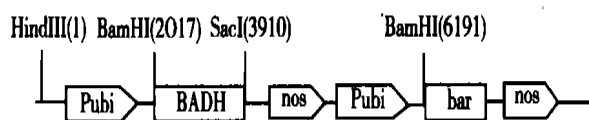


图 1 pABH9 质粒结构示意图

### 1.2 BADH 活性检测

采用琼脂固化方法将小麦培养至三叶期,琼脂中含有不同浓度的氯化钠,即 0、50、100、125 和 150 mmol/L,3 次重复。测定根条数、根长、苗高,测定叶片电导率、根系活力(TTC 法)、脯氨酸含量(水杨酸钠法)和 BADH 活性。BADH 活性检测主要参考刘风华等<sup>[8]</sup>和 Holmstrom 等<sup>[4]</sup>的方法,略有改动。用 BECKMAN DU640 型蛋白核酸分析仪测定蛋白浓度。

BADH 活性测定:反应总体积为 4 mL,含有 50 mmol/L Hepes, KOH(pH 8.0)、1 mmol/L EDTA、5 mmol/L DTT、1 mmol/L NAD、1 mmol/L 甜菜碱醛和 4 mg 蛋白的上述酶提取液。以煮沸 5 min 的酶提取液为空白对照。反应在 37 °C 下进行,时间严格控制在 10 min。以 NADH 在 340 nm 处的摩尔消光系数为 6 220(a/mol·L)来计算酶活性(比色杯后为 1 cm)在上述反应体积下 1 个酶活力单位定义为每分钟消耗 1 nmol/L NAD。

### 1.3 甜菜碱含量的测定

采用盆栽种植方式。将生长至三叶期的小麦材料进行控水干旱胁迫处理,待叶片呈现萎蔫状态时(7 d 时间)采集叶片,以不控水的为对照。80 °C 烘箱烘至干燥。3 次重复。甜菜碱的提取及毛细管电泳检测方法均参考文献[9],毛细管电泳仪为 Beckman P/ACE System 5500 型,样品的离析电压为 15 KV,本分析在河北省分析测试研究中心完成。

## 2 结果与分析

### 2.1 植株生长发育、质膜透性及根系活力

为了克服水培、砂培等方法中基质盐离子浓度不稳定、不能直接观察根系发育等缺陷,在室内采用 NaCl 琼脂固化培养方法,对获得的转 BADH 基因纯系 99T6 的第 5 代材料进行了耐盐性鉴定。所用琼脂浓度为 0.45%,NaCl 浓度分别为 0、50、100、150、200 mmol/L,以受体石 4185 为对照。培养温度为 25 °C,每天 2 000 lx 光照 10 h。10 d 后调查根条数及长度和苗高,测定叶片电导率和根系活力(TTC 法)。结果表明,在各种盐浓度下,99T6 的生长发育均优于对照石 4185,直观表现为根长、苗高、根条数多等。以根长为例,在上述 5 个盐浓度范围内,99T6 的根长分别比对照增加 1.68%、15.29%、18.64%、20.45% 和 140%,随盐浓度的增加,根系优势增强。

除了 200 mmol/L 浓度条件下植株发育严重受阻,不能获得足够的叶片和根系进行生理指标测定外,试验所设计的另外 4 个盐浓度下,99T6 的叶片电导率及质膜相对透性均明显低于对照(图 2)。根系活力测定表明同等盐胁迫强度下 99T6 的根系活力较对照高 15% 以上。如 50 mmol/L 盐浓度下,99T6 的根系还原强度为 4.8461 mg/(g·h),对照为 4.2642 mg/(g·h),99T6 较对照高 14.12%;100 mmol/L 盐浓度下分别为 3.8315 和 3.2126 mg/(g·h),99T6 较对照高 19.26%。另一组 NaCl 胁迫的

水培试验结果表明,在盐胁迫条件下 99T6 的叶片脯氨酸含量显著低于对照石 4185,各处理中平均 99T6 的叶片脯氨酸含量(以干重计)为 51.17  $\mu\text{g/g}$ ,

而对照 4185 为 95.85  $\mu\text{g/g}$ ,99T6 较对照石 4185 降低 46.61%。

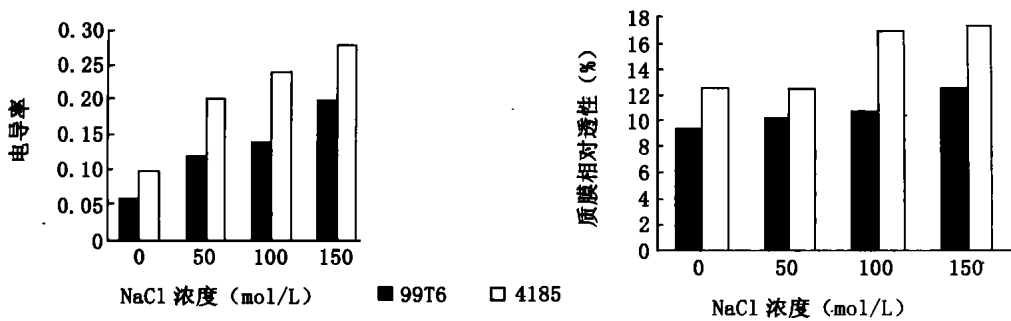


图 2 不同盐浓度下的叶片电导率及质膜相对透性

## 2.2 甜菜碱醛脱氢酶活性

叶片甜菜碱醛脱氢酶活性的测定结果表明,在各盐浓度下,99T6 品系的甜菜碱醛脱氢酶活性均高于对照石 4185(表 1),各处理平均,99T6 较对照 4185 高 17.6%,经方差分析,差异达到 1% 极显著水平。不同盐浓度下生长的植株叶片甜菜碱醛脱氢酶活性随盐浓度的增加而降低,两品种表现了相同的趋势,经方差分析,0 mmol/L,50~100 mmol/L,125~150 mmol/L 三组间达到 5% 显著差异水平,但 50 与 100 mmol/L,125 与 150 mmol/L 浓度处理间差异不显著。

表 1 不同盐浓度下的 BADH 活性(活力单位)

材料	NaCl 浓度( mmol/L)				
	0	50	100	125	150
99T6	11.63	9.11	7.54	4.92	3.86
4185	8.96	7.85	6.40	4.38	3.27
平均	10.29	8.48	6.88	4.65	3.57

## 2.3 甜菜碱的积累

PCR、分子杂交等从分子水平上证明外源 BADH 基因在小麦中已得到表达,逆境模拟也表明在植株水平上转 BADH 基因小麦的抗旱耐盐性、甜菜碱醛脱氢酶活性明显增强,那么,逆境下基因终极表达产物的含量是否增加?为此用毛细管电泳法对干旱胁迫下转基因品系的甜菜碱含量进行了检测。为避免快速、高强度胁迫可能致使植株来不及反应而死亡,本研究采用模拟田间干旱的控水方法,对植株进行干旱处理,待叶片因缺水呈现萎蔫状态时采集叶片。根据 3 个重复的毛细管电泳测定结果,99T6 的叶片甜菜碱含量(以干重计)为 22.93 mg/g,对照 4185 为 16.93 mg/g,99T6 较对照高

35.44%,但方差分析差异不显著。

## 3 讨论

外源甜菜碱可以提高植物对盐旱的逆境胁迫<sup>[1,4,10,11]</sup>,刘凤华等将山菠菜 BADH 基因导入草莓和烟草,获得了能耐 0.4%~0.7% NaCl 的转基因草莓和耐 2% NaCl 的转基因烟草。郭岩等将从山菠菜中克隆的 BADH 基因导入水稻,得到了遗传稳定,能耐 0.5% NaCl 的转基因株系。李银心等将 BADH 基因导入豆瓣菜,获得了在 0.5%~0.8% 培养基上正常生长的转化植株。本研究表明,转 BADH 基因小麦的耐盐能力可以达到 100 mmol/L NaCl,在此浓度范围内,植株可以正常生长,苗高、根条数与零胁迫对照没有明显差异,盐浓度超过 125 mmol/L,植株生长速度明显减慢,根长、苗高显著降低。

衣艳君等<sup>[12]</sup>测定了转 BADH 基因烟草植株的叶绿素荧光诱导瞬变特性、呼吸酶和光呼吸酶活性等,认为 BADH 基因的导入,除了使植物可能通过渗透调节提高耐盐耐旱能力外,还可能使植物增加某种“非渗透功能”,这种非渗透功能比 BADH 基因自身“固有”的渗透调节功能可能更重要。本研究表明,盐逆境下转 BADH 基因小麦的甜菜碱醛脱氢酶活性明显提高,各盐浓度平均,99T6 转基因株系比受体对照高 17.6%。随盐浓度的提高,甜菜碱醛脱氢酶活性降低,一方面可能是随盐浓度的提高,植株各种生理代谢活动受抑制程度增加,另一方面也可能是在本研究采用的胁迫处理方式条件下,植株对不同程度的逆境已经有了适应反应,它不同于非逆境生长、酶活性测定前再实施短时胁迫的条件,需要

进一步的实验来证明。

叶片脯氨酸含量的升高通常作为植物对逆境胁迫的应急反应, 已有多人对抗旱性不同的作物品种进行脯氨酸含量的比较, 结论不一致。有人认为抗旱性强的品种在逆境下脯氨酸含量高于抗旱性弱的品种, 也有研究表明抗旱性强的品种在逆境下的脯氨酸含量低于抗旱性弱的。这种结论的不一致可能与不同作者所采用的胁迫程度以及施加胁迫处理的时间不同有关。对于本研究而言, 99T6 转基因株系与其受体对照在脯氨酸含量上的差异可以认为是源于二者对逆境的认同差异, 可以造成受体对照石 4185 的逆境未必构成 99T6 转基因株系的逆境; 另一可能的原因是转 BADH 基因株系从另一途径, 如增加甜菜碱的合成积累(甜菜碱含量测定证实了这一点), 通过这一长期、持久的方式解除渗透胁迫, 而不是通过脯氨酸积累这种临时的应急反应。

综上所述, BADH 基因的导入对提高植物的渗透调节能力, 增强对盐旱逆境的抗性是十分重要的; 以甜菜碱作为靶标性状采用基因工程方法提高植物盐旱耐性是可行。我们已经将甜菜碱合成代谢相关的另一重要酶系基因 CMO 导入小麦, 获得了同时转 BADH 和 CMO 基因的二价转基因小麦, 其中一个株系 01T198 在 2002 年小麦生长后期干旱的情况下, 表现出良好的抗干热风能力, 有关的耐盐鉴定正在进行。

#### 参考文献:

- [1] Ishitani M, Nakamura M, Han S Y, *et al.* Expression of the betaine aldehyde dehydrogenase gene in barley in response to osmotic stress[J]. *Plant Mol Biol*, 1995, 27: 307– 315.
- [2] Wood A J, Saneoka H, Rhodes D, *et al.* Betaine aldehyde dehydrogenase in sorghum [J]. *Plant Physiol*, 1996, 110: 1301– 1308
- [3] Lamark T, Kaasen I, Eshoo M W, *et al.* DNA sequence and analysis of the bet genes encoding the osmoregulatory choline glycine betaine pathway of *Escherichia coli* [J]. *Mol Microbiol*, 1991, 5: 1049– 1064.
- [4] Holmström K O, Welin B, Mandal A, *et al.* Production of the *Escherichia coli* betaine-aldehyde dehydrogenase, an enzyme required for the synthesis of the osmoprotectant glycine betaine, in transgenic plants[J]. *Plant J*, 1994, 6: 749– 758.
- [5] 郭 岩, 张 莉, 肖 岗, 等. 转甜菜碱醛脱氢酶基因在水稻中表达及转基因植株的耐盐性研究[J]. *中国科学(C)*, 1997, 27(2): 151– 155.
- [6] 李银心, 常凤启, 杜立群, 等. 转甜菜碱醛脱氢酶基因豆瓣菜的耐盐性. *植物学报*, 2000, 42: 480– 484.
- [7] 郭北海, 张艳敏, 李洪杰, 等. 甜菜碱醛脱氢酶 (BADH) 基因转化小麦及其表达[J]. *植物学报*, 2000, 42: 279– 283.
- [8] 刘凤华, 郭 岩, 谷冬梅, 等. 转甜菜碱醛脱氢酶基因植物的耐盐性研究[J]. *遗传学报*, 1997, 24(1): 54– 58.
- [9] Naoki Nishimura, Jinghua Zhang, Mitsuru Abo, *et al.* Application of capillary electrophoresis to the simultaneous determination of betaines in plants[J]. *ANALYTICAL SCIENCES*, 2001, 17: 103– 106.
- [10] Kishitani S, Watanabe K, Yasuda S, *et al.*, Accumulation of glycinebetaine during cold acclimation and freezing tolerance in leaves of winter and spring barley plants[J]. *Plant Cell and Environment*, 1994, 17: 89– 95.
- [11] Lillus G, Holmberg N, Bulow L. Enhanced NaCl stress tolerance in transgenic tobacco expressing bacterial choline dehydrogenase[J]. *Bio/ Technology*, 1996, 14: 177– 180.
- [12] 衣艳君, 刘家尧. 转 BADH 基因烟草的光系统 II 和呼吸酶活性变化[J]. *植物学报*, 1999, 41: 993– 996.