

doi:10.7668/hbnxb.2014.06.027

转盐地碱蓬 *SsDREB* 基因烟草的抗逆生理机制分析

孙晓波,贾新平,刘晓雪,马鸿翔,叶晓青

(江苏省农业科学院 江苏省农业生物学重点实验室,江苏 南京 210014)

摘要:为了研究盐地碱蓬 *SsDREB* 基因在转基因烟草中的功能,探究转基因烟草的抗逆生理机制,我们构建了 *SsDREB* 基因的植物高效表达载体 pCambia2301-*SsDREB*,并通过农杆菌介导法将其导入烟草 NC89 中,通过 Kan 抗性、PCR 及 RT-PCR 筛选鉴定阳性苗;对转基因烟草苗进行高盐、干旱等抗逆性分析,同时测定在不同浓度 NaCl 和 PEG6000 处理后转基因烟草叶片的净光合速率(Pn)、气孔导度(Gs)、光能转化效率(Fv/Fm)、实际光量子效率(ϕ PS II)以及脯氨酸和可溶性糖的含量。结果表明:通过 Kan 抗性、PCR 及 RT-PCR 筛选鉴定,最终获得 12 个株系转基因阳性苗。转基因植株的抗逆性与对照相比明显提高。在不同浓度 NaCl 和 PEG6000 处理下,对照和转基因苗的 Pn 和 Gs 随着处理浓度的提高均呈现逐渐下降趋势,但在相同浓度处理下转基因苗的 Pn 和 Gs 均比对照高;随着 NaCl 处理浓度的增大,对照和转基因植株的 Fv/Fm 和 ϕ PS II 均逐渐降低,但转基因苗的降低幅度比对照小;随着 PEG 处理浓度的提高,对照和转基因植株的 Fv/Fm 逐渐降低,但转基因苗的降低程度较对照小,而 ϕ PS II 下降趋势基本相同。在不同浓度 NaCl 和 PEG 处理后,转基因植株和对照植株脯氨酸和可溶性糖含量均随着 NaCl 处理浓度的增加而提高,但是转基因植株较对照植株增高更快。

关键词:烟草;*SsDREB* 基因;转基因;抗逆性;生理指标

中图分类号:S572.01 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2014)06-0155-08

Analysis of Physiological Mechanism of Stress Tolerance in *SsDREB* Transgenic Tobacco

SUN Xiao-bo, JIA Xin-ping, LIU Xiao-xue, MA Hong-xiang, YE Xiao-qing

(Key Laboratory of Jiangsu Province for Agrobiolgy, Jiangsu Academy of
Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: To study the function of *SsDREB* gene in transgenic tobacco and analyze physiological mechanisms of transgenic tobacco. In this study, the *SsDREB* gene driven by constitutive promoter CaMV 35S was transformed into tobacco NC89 with *Agrobacterium* EHA105 containing the plant expression vectors pCambia2301-*SsDREB*. The positive tobacco plants were selected by Kan resistance, PCR and RT-PCR. Drought and high salt tolerance of transgenic tobacco seedlings was determined, and net photosynthetic rate (Pn), stomatal conductance (Gs), the energy conversion efficiency (Fv/Fm), the actual photochemical efficiency (ϕ PS II), and the content of proline and soluble sugar of leaves of transgenic tobacco treated with different concentrations of NaCl and PEG6000 respectively were measured. The results showed that 12 lines of positive transgenic seedlings were finally identified by Kan resistance, PCR and RT-PCR. The results of stress tolerance experiments showed that the overexpression of *SsDREB* could improve resistance of transgenic tobacco to abiotic stress. Under NaCl and PEG6000 treatments with different concentrations, the Pn and Gs in control and transgenic plants decreased gradually with the increase of the treatment concentration, however, at the same treatment concentration, the Pn and Gs were higher in transgenic plants than that in control plants. With the increase of the treatment concentration of NaCl, Fv/Fm and ϕ PS II in the control and the transgenic plants declined gradually, but those of the transgenic plants decreased more slowly than those of con-

收稿日期:2014-09-07

基金项目:江苏省盐土生物资源研究重点实验室开放课题项目(JKLBS 2012004)

作者简介:孙晓波(1974-),女,内蒙古鄂伦春人,副研究员,博士,主要从事植物生理与分子生物学研究。

通讯作者:马鸿翔(1965-),男,江苏宝应人,研究员,博士,博士生导师,主要从事作物遗传育种与生物技术研究。

叶晓青(1965-),女,安徽巢湖人,研究员,硕士,硕士生导师,主要从事园艺作物生物技术和设施栽培研究。

trol plants. Under different concentration of PEG treatment, Fv/Fm of control and transgenic plants gradually decreased, with the increase of the PEG concentration but the decrease of transgenic plant Fv/Fm was slower when compared with control plants; However, the ϕ PS II did not show obvious differences in changes between the transgenic and control plants. Proline and soluble sugar contents of the transgenic and control plants increased with the increase of the treatment concentration of NaCl and PEG, but proline and soluble sugar contents in the transgenic plants were higher than those in control plants.

Key words: Tobacco; *SsDREB* gene; Transgene; Stress tolerance; Physiological index

干旱、高盐及低温等环境胁迫严重影响植物的生长发育及产量。研究发现,为适应或抵抗这些不利环境,植物在长期进化过程中演变出不同的转录调控途径,通过调控多个胁迫响应基因的表达对逆境胁迫产生适应性调节反应^[1-2]。长期以来,人们试图通过育种的方法来提高植物的抗逆性。但传统的育种方法育种周期长,植株抗性提高的幅度有限,已经远远不能满足现代农业生产的需要^[3]。近几十年来,人们又尝试通过导入或改良个别功能基因的转基因方法提高植物的抗逆性,但由于植物的抗逆性是由多基因控制的,通过导入或改良单基因的方法很难获得很好的效果。近年来,随着对转录因子的深入研究,植物抗逆分子育种又迈上了一个新的台阶^[4-5]。

转录因子是一种蛋白分子,它能与真核基因启动子区域中的顺式作用元件发生特异性结合,从而使目标基因在特定的时间与空间以特定的强度表达^[4]。逆境胁迫信号常通过植物体内一系列的信号传导使多个胁迫相关转录因子表达,而这些转录因子又与相应的顺式作用元件结合调控其下游逆境胁迫相关功能基因的表达^[2,6]。因此,在植物抗逆性分子育种中,导入一个转录因子基因可以有效提高转基因植物的综合抗逆性。干旱应答元件结合蛋白(DREB)是植物中特有的与低温、高盐和干旱胁迫相关的转录因子,其含有 AP2 结构域,可以特异性识别参与低温、干旱和高盐等逆境胁迫应答的众多基因启动子中的 DRE 元件,激活这些基因的表达,从而调控植物一系列抗胁迫反应,使植物农艺性状得到综合改良^[2,7-10]。近年来,DREB 转录因子在植物抗逆过程中的作用受到广泛重视,已被普遍应用于提高植物抗逆性的基因工程中^[10-12]。

盐地碱蓬(*Suaeda salsa* L.)为藜科碱蓬属一年生草本肉质化真盐生植物,是一种典型的盐碱地指示植物^[13],具有较强耐盐碱^[14]、耐旱^[15]等特性,是研究植物逆境胁迫响应机制极好的基因库。刘晓雪等^[16]通过同源克隆的方法从盐地碱蓬中分离了一个 DREB 同源基因 *SsDREB*,对其 DNA 及编码的氨

基酸序列结构进行了分析,同时研究了 *SsDREB* 的表达特性。本研究构建 *SsDREB* 基因的植物高效表达载体 pCAMBIA2301-*SsDREB*,并通过农杆菌介导法将其导入烟草 NC89 中,通过 Kan 抗性、PCR 及 RT-PCR 筛选鉴定阳性苗;对转基因烟草苗进行高盐、干旱等抗逆性分析,并对其相关生理生化指标进行测定。这为进一步研究和解析 DREB 转录因子的功能提供一定的理论依据,同时也为应用 *SsDREB* 基因提高农作物抗逆性的转基因研究奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

盐地碱蓬采集于江苏省大丰市沿海滩涂。SV Total RNA lysis 试剂盒购自 Promega 公司。LA Taq 酶、RNA 逆转录酶、基因组提取试剂盒均购自 TaKaRa 公司。其他试剂为进口或国产分析纯。

1.2 将 *SsDREB* 基因引入烟草

根据 *SsDREB* 基因编码序列及 pCAMBIA2301 载体的酶切位点合成含有酶切位点 *Xba* I 和 *Sma* I 的引物 Y1: 5'-CGGTCTAGAATGGCAGCTACAACAATGGATATG-3'和 Y2: 5'-CGGCCCGGGTTAAGATGATGATGATAAGATAGC-3'。以 *SsDREB* cDNA 全长为模板,采用引物 Y1 和 Y2,通过 PCR 扩增获得 *SsDREB* 开放阅读框,通过电泳分离、纯化 PCR 产物,并用 *Xba* I 和 *Sma* I 进行双酶切,与经过同样双酶切的 pCAMBIA2301 载体连接,转化大肠杆菌,将获得重组载体命名为 pCAMBIA2301-*SsDREB*。将该载体引入到农杆菌 EHA105 中,经 PCR 筛选阳性克隆用于侵染烟草。以农杆菌介导的叶盘法分别将 2 个植物表达载体 pCAMBIA2301-*SsDREB* 和 pCAMBIA2301 (阴性对照)转入烟草 NC89 中,用含有卡那霉素 100 mg/L 的培养基筛选抗性植株。

1.3 转基因烟草的分子鉴定

剪取抗 Kan 的烟草苗叶片,采用 CTAB 法提取总 DNA 作为模板,以 Y3: 5'-ATGGCAGCTACAACAATGGATATG-3'和 Y4: 5'-TTAAGATGATGATGATAGATAGC-3'为引物,利用 PCR 检测进一步筛选阳性

烟草植株。PCR 反应体系 25 μL 为: 2.5 μL 含 MgCl_2 的 10 \times PCR 缓冲液, 正、反向的引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 1.0 μL , 1.0 μL 的 dNTP (脱氧核苷酸混合物, 10 mmol/L), 1.0 μL DNA (浓度 50 $\text{ng}/\mu\text{L}$) 样品, 0.25 μL LA-*Taq* 酶, 18.25 μL 双蒸水。PCR 扩增程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min 10 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。阳性植株将扩增得到约 1 100 bp 的 DNA 片段, 而阴性对照中没有扩增出片段。选择 PCR 检测为阳性的烟草植株, 剪取叶片, 提取总 RNA, 并反转录为 cDNA 作为模板, 以 Y3/Y4 为引物进行 PCR 扩增, 在 RNA 水平上进一步检测筛选阳性转基因苗。RNA 的提取、逆转录参见购买试剂盒说明书, PCR 扩增条件参照 DNA 检测方法。将 T_0 DNA 鉴定为阳性的转基因株系的种子在含有 200 mg/L 卡那霉素的 MS 培养基上进行筛选, 并将具有卡那霉素抗性的 T_1 烟草苗进一步用 RT-PCR 方法进行检测。最后选择 T_2 种子在含有 200 mg/L 卡那霉素的 MS 培养基上全部成活的株系进行后续抗逆分析试验。

1.4 转基因烟草耐胁迫性试验

将生长整齐、一致的 T_2 转基因纯合株系烟草苗与转 pCAMBIA2301 空载体的纯合株系烟草苗带根取出洗净, 在 MS 液体培养基中恢复培养 7 d 后, 分别转移到含有 20% PEG6000 和 300 mmol/L NaCl 的 MS 液体培养基中, 放入 25 $^{\circ}\text{C}$ 光照培养箱中进行培养, 调查植株生长变化情况并拍照。每个处理选 6 个植株, 3 次重复。

1.5 转基因烟草植株光合参数和荧光参数的测定

将对照植株与转基因植株分别用不同浓度梯度 PEG6000 和 NaCl 处理 2 d 后, 取相同位置的叶片, 分别进行光合和荧光参数的测定。PEG6000 处理浓度分别设定为: 0, 5%, 10%, 15%, 20%; NaCl 处理的浓度分别设定为 0, 50, 100, 150, 200, 250 mmol/L 。采用 LI-6400 便携式光合仪 (LI-COR, USA) 测定叶片的净光合速率 (P_n)。测定时采用内置光源, 测定于晴天 9:00–11:00 进行, 仪器使用开放式气路, 光饱和度控制在 1 200 ~ 1 400 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, CO_2 浓度约为 380 $\mu\text{mol}/\text{mol}$, 温度控制在 23 ~ 28 $^{\circ}\text{C}$ 。使用 LI-1600 稳态气孔仪 (LI-COR, USA) 活体测定气孔导度 (G_s)。根据邹琦等^[17]报道的测定方法, 采用 FMS2 调制式荧光测定仪 (英国 Hansatech 公司) 测定叶绿素荧光参数, 测定时间与光合仪的测定同步。在测定前先用锡纸包住待测定叶片, 暗适应 30 min 后测定, 荧光仪记录光系统 II (PS II) 的初始荧光 (F_0)、最大光系统 II 最大光化学效率 (F_v/F_m)、光

化学淬灭系数 (q_L) 以及电子传递速率 (ETR) 等指标。光能转化效率 (F_v/F_m)、实际光量子效率 ($\phi_{PS II}$) 分别按下式计算: $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$, $\phi_{PS II} = (F_m' - F_s)/F_m'$ 。每处理测定 4 株, 每个叶片测定 4 ~ 5 次, 取平均值计算。

1.6 转基因烟草植株脯氨酸和可溶性糖含量的测定

在将转基因植株与对照植株分别用不同浓度梯度 NaCl 和 PEG6000 处理 2 d 后, 每次取相同位置的叶, 称重后于 105 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱杀青 30 min, 70 $^{\circ}\text{C}$ 烘干至恒重, 称重、磨碎后进行脯氨酸含量的测定。采用 Irigoyen 等^[18]报道的酸性茚三酮比色法测定脯氨酸含量。采用蒽酮法测定可溶性糖含量^[19]。试验每次取样 3 株, 设置 3 次重复。

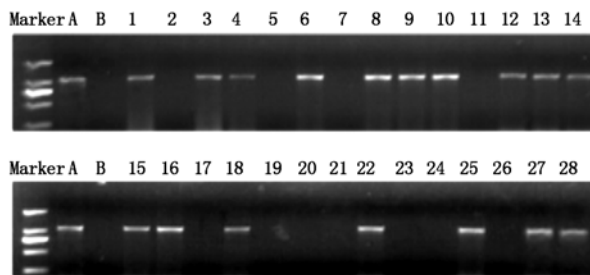
1.7 数据统计与分析

采用 Microsoft Excel 2007 进行数据整理, 使用软件 SPSSv. 13.0 进行统计分析, 用 LSD 法进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 转基因烟草阳性植株的鉴定

通过农杆菌侵染叶盘法对烟草进行遗传转化, 在诱导分化、成苗过程中进行卡那 (Kan) 抗性筛选, 最终获得 28 株转 *SsDREB* 基因烟草。选择 Kan 抗性烟草苗, 剪取其叶片, 采用 CTAB 法提取烟草 DNA。以质粒 pCAMBIA2301-*SsDREB* 为阳性对照, 转 pCAMBIA2301 空载体烟草 DNA 为阴性对照, Y1、Y2 为引物, 对抗 Kan 烟草植株进行 DNA 水平上的检测。采用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物 (图 1)。在具有 Kan 抗性的所有转基因株系中, 共有 17 株在 1 095 bp 处检测到与阳性对照位置相同的特异性扩增条带, 而阴性对照没有扩增出任何条带, 初步证明 *SsDREB* 基因已经整合到烟草基因组中。



M. DNA 标准分子量 DL2000; A. 质粒阳性对照; B. 空载体阴性对照; 1 ~ 28. 转基因烟草。

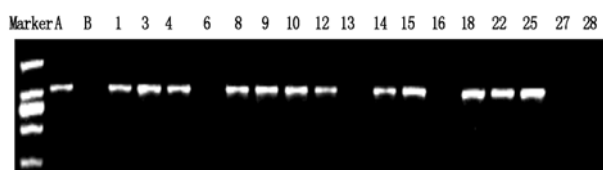
M. DNA DL2000 Marker; A. Positive control;

B. Negative control; 1 ~ 28. Transgenic tobacco lines.

图 1 转基因烟草植株 DNA 水平检测

Fig. 1 PCR amplification of genomic DNA from transgenic tobacco

将 17 个 T_0 DNA 鉴定为阳性的转基因株系的种子在含有 200 mg/L 卡那霉素的 MS 培养基上进行筛选,并将具有卡那霉素抗性的 T_1 烟草苗进一步用 RT-PCR 方法进行检测。剪取卡那抗性为阳性的烟草植株叶片,提取总 RNA,并反转录为 cDNA 作为模板,以 Y1/Y2 为引物进行 PCR 扩增,在 RNA 水平上进一步检测筛选转基因阳性烟草苗。结果表明,在 17 个株系中有 12 个株系 RT-PCR 检测为阳性(图 2),证明 *SsDREB* 已经整合到烟草基因组中并在烟草中进行了表达。最后选择 T_2 种子在含有 200 mg/L 卡那霉素的 MS 培养基上全部成活的 2 个转基因株系 T15 和 T25 进行后续抗逆分析试验。



M. DNA 标准分子量 DL2000; A. 质粒阳性对照;
B. 空载体阴性对照; 1, 3, ……28. 转基因烟草株系。
M. DNA DL2000 Marker; A. Positive control;
B. Negative control; 1, 3, ……28. Transgenic lines.

图 2 RT-PCR 水平上对转基因烟草植株检测

Fig. 2 RT-PCR amplification of transgenic tobacco

2.2 转基因烟草的抗旱、耐盐性分析

将转 *SsDREB* 基因烟草苗与转化 pCambia2301 空质粒烟草苗带根取出,在 MS 液体培养基过渡培养 10 d 后,分别转移到含有 20% PEG6000 的 MS 液体培养基和 300 mmol/L NaCl 的 MS 液体培养基中,

进行抗旱性和耐盐性试验。每个处理选 6 个植株,3 次重复。处理 3 d 后进行抗性调查。结果显示,用 20% PEG6000 进行模拟干旱处理的对照烟草植株在处理 3 d 后叶片萎蔫严重,并出现枯黄,而转基因烟草叶片仍然保持正常的叶色和伸展状态(图 3)。转基因烟草在用 300 mmol/L NaCl 处理 3 d 后无明显变化,而对照烟草已经开始出现叶片叶缘卷曲、心叶萎蔫(图 3)。由此可见,*SsDREB* 基因在烟草中的过量表达能够提高转基因烟草植株对盐渍和干旱的耐受性。

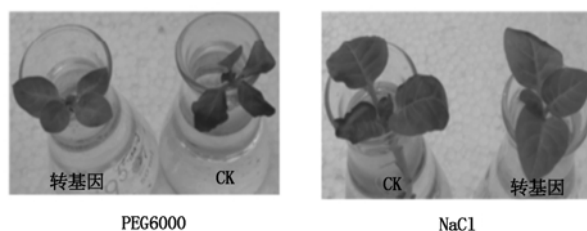


图 3 转基因烟草的抗旱、耐盐性分析

Fig. 3 Resistance analysis of transgenic tobacco treated by NaCl and PEG6000

2.3 转基因烟草植株光合参数的测定

为了进一步研究转基因烟草苗抗旱、耐盐胁迫的生理机制,本研究用不同浓度的 NaCl 和 PEG6000 处理对照和转基因烟草苗 2 d 后,测定叶片的净光合速率和气孔导度,分析比较转基因烟草植株叶片和对照植株叶片在光合效率上的差异。从图 4 可以看出,在不同浓度 NaCl 和 PEG6000 处理下,对照和

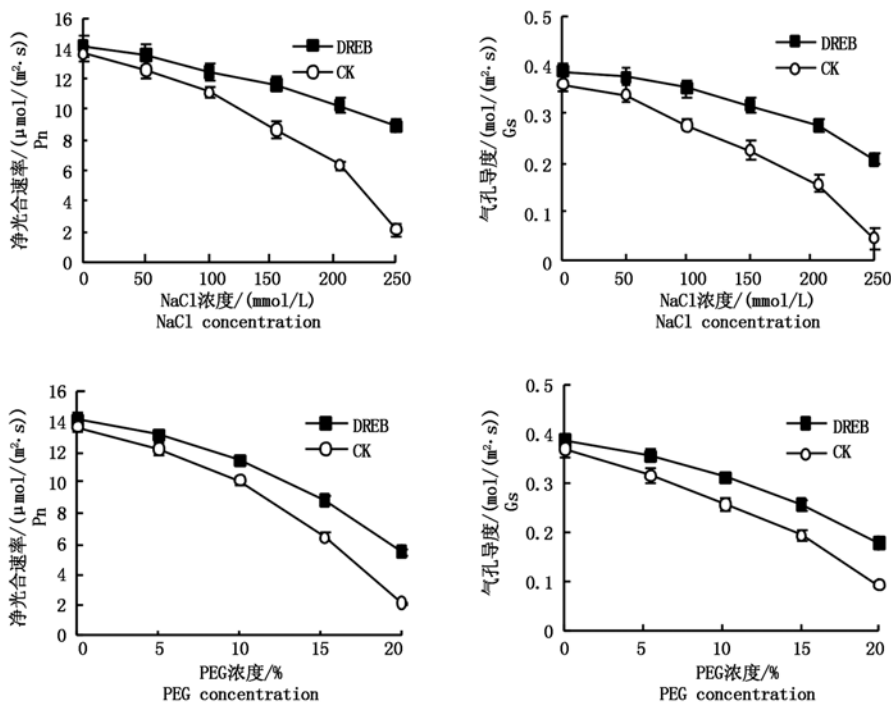


图 4 NaCl 和 PEG6000 处理对转基因和对照烟草植株光合速率和气孔导度的影响

Fig. 4 Effect of NaCl and PEG6000 treatments on net photosynthetic rate and stomatal conductance of transgenic and control tobacco plants

转基因苗的 P_n 和 G_s 随着处理浓度的提高均呈现逐渐下降趋势,但在相同浓度处理下转基因苗的 P_n 和 G_s 均比对照高。在 250 mmol/L NaCl 处理下的转基因烟草苗与未经 NaCl 处理的转基因烟草苗相比, P_n 下降了 35.7%, G_s 下降了 50%; 而在 250 mmol/L NaCl 处理下的对照烟草苗与未经 NaCl 处理的对照烟草苗相比, P_n 下降了 85.1%, G_s 下降了 86.5%。在 20% PEG 处理下的转基因烟草苗与未经 PEG 处理的转基因烟草苗相比, P_n 下降了 61.4%, G_s 下降了 57.5%; 而在 20% PEG 处理下的对照烟草苗与未经 PEG 处理的对照烟草苗相比, P_n 下降了 85.5%, G_s 下降了 73.7%。这些结果说明转基因苗的光合作用机构在干旱和盐胁迫下仍能维持较高的光合能力,从而表现对干旱伤害和高盐伤害具有更高的抗性。

2.4 转基因植株烟草叶绿素荧光参数的测定

为探测逆境胁迫下转基因烟草植株和转空载对照植株在叶绿素荧光参数上的差异,用不同浓度

NaCl 和 PEG6000 处理转基因和对照植株 2 d 后,取植株上相同位置的叶片进行荧光参数的测定。从图 5 可以看到,随着 NaCl 处理浓度的增大,对照和转基因植株的最大光能转化效率(F_v/F_m)和实际光量子效率($\phi PS II$)均逐渐降低,但转基因苗 F_v/F_m 和 $\phi PS II$ 的降低程度比对照下降的幅度小。在 250 mmol/L NaCl 处理下的转基因烟草苗与未经 NaCl 处理的转基因烟草苗相比, F_v/F_m 下降了 8.2%, $\phi PS II$ 下降了 25.4%; 而在 250 mmol/L NaCl 处理下的对照烟草苗与未经 NaCl 处理的对照烟草苗相比, F_v/F_m 下降了 17.6%, $\phi PS II$ 下降了 50.2%。在不同浓度 PEG 处理下,随着处理浓度的提高,对照和转基因植株的 F_v/F_m 逐渐降低,但对照植株的降低程度较转基因苗大;而 $\phi PS II$ 下降趋势基本相同。这些结果表明,与对照植株相比,转基因烟草植株在盐和干旱胁迫下能维持更高的光能转化率,从而对逆境胁迫表现出更高的耐性。

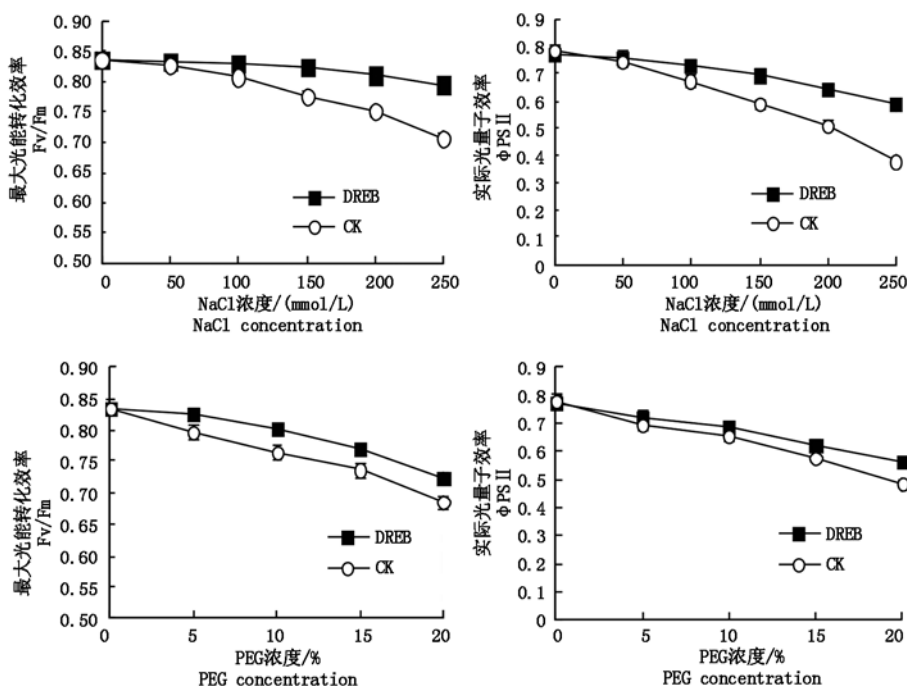


图 5 NaCl 和 PEG6000 处理对转基因和对照烟草植株荧光参数的影响

Fig. 5 Effect of NaCl and PEG6000 treatments on chlorophyll fluorescence of transgenic and control tobacco plants

2.5 转基因烟草植株脯氨酸和可溶性糖含量的测定

脯氨酸作为植物一种重要的有机渗透调节物质,在盐渍、干旱、冰冻、低温、高温等非生物逆境胁迫中起着重要的作用。几乎所有的逆境胁迫都会引起植物体内脯氨酸的积累,并且积累的指数与植物的抗逆性有关^[20-21]。可溶性糖是另一种重要的有机渗透调节物质,在逆境条件下的植物体内常常大量积累,植物通过渗透调节作用提高其对逆境的抵抗能力^[22]。为研究逆境胁迫下转基因烟草植株和转

空载对照植株在渗透调节物质上的差异,用不同浓度 NaCl 和 PEG6000 处理转基因和对照植株 2 d 后,取植株上相同位置的叶片进行脯氨酸和可溶性糖含量的测定。由图 6 可以看出,用不同浓度 NaCl 和 PEG 处理后,转基因植株和对照植株脯氨酸和可溶性糖的含量都随着处理浓度的增加而升高,但是与对照植株相比转基因植株叶片的脯氨酸和可溶性糖含量升高得更快。在 250 mmol/L NaCl 处理下转基因烟草叶片脯氨酸含量从未处理时的 0.1 $\mu\text{g/g}$ 上

升到 $6.8 \mu\text{g/g}$, 是 250 mmol/L NaCl 处理下对照植株脯氨酸含量的 1.8 倍; 可溶性糖含量与未处理时相比提高了 1.2 倍, 是 250 mmol/L NaCl 处理下对照植株可溶性糖含量的 1.5 倍。在 20% PEG 处理下的转基因烟草叶片脯氨酸含量从未处理时的

$0.15 \mu\text{g/g}$ 上升到 $5.2 \mu\text{g/g}$, 是 20% PEG 处理下对照植株脯氨酸含量的 1.6 倍; 可溶性糖含量与未处理时相比提高了 1.1 倍, 是 20% PEG 处理下对照植株可溶性糖含量的 1.3 倍。

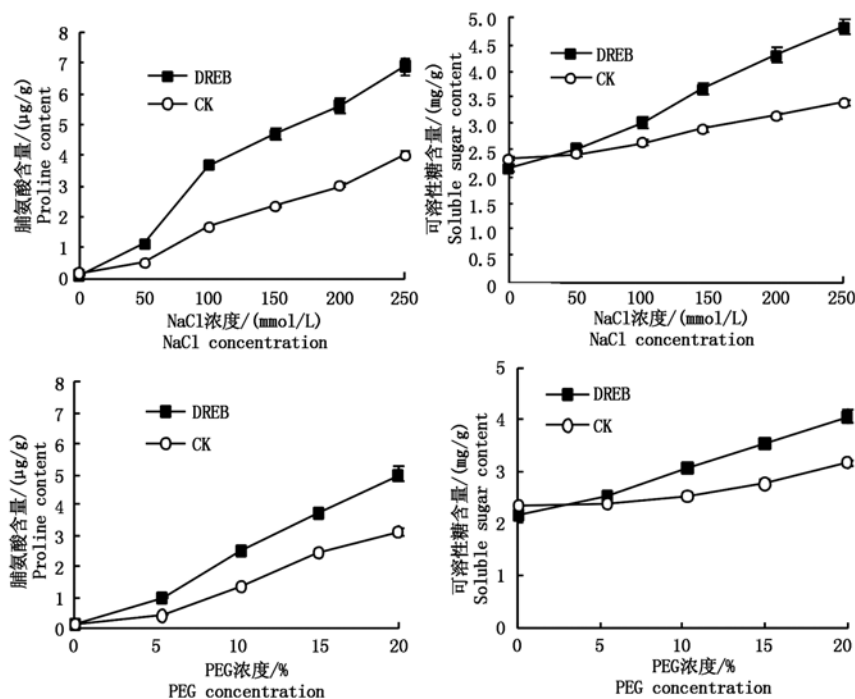


图 6 NaCl 和 PEG6000 处理对转基因和对照烟草植株脯氨酸和可溶性糖含量的影响

Fig.6 Effect of NaCl and PEG6000 treatments on proline and soluble sugar content of transgenic and control tobacco plants

3 讨论

植物中的 DREB 类转录因子可以分为两大类, 一类是 DREB1 类转录因子, 主要受低温诱导; 一类是 DREB2 类转录因子, 主要受高盐和干旱胁迫诱导^[23-25]。DREB2 类转录因子仅在有限数量的植物中被克隆和研究^[26]。进一步从不同的物种分离 DREB2 类基因, 可对 DREB 基因的调控机理获得更全面的解析。SsDREB 是从盐地碱蓬中分离出的一个与 DREB 转录因子同源的新基因^[16]。蛋白序列同源性分析显示 SsDREB 与 DREB2 类转录因子具有非常高的序列一致性, 同时 SsDREB 基因的表达受高盐和干旱诱导, 而对低温处理不响应, 因此, 推断盐地碱蓬 SsDREB 可能属于 DREB2 类转录因子, 其表达受干旱和高盐等逆境胁迫的诱导^[16,27]。许多 DREB2 类基因通过遗传转化被导入到农作物中, 提高了作物的非生物胁迫抗性。例如, 将 BpDREB2 在拟南芥中超量表达能提高转基因植株的耐盐性^[28]。玉米 ZmDREB2A 在拟南芥中超量表达可以提高拟南芥的抗旱性^[29]。本研究将转 SsDREB 基因烟草苗与转化 pCambia2301 空质粒烟草苗转移

至含有 20% PEG6000 的 MS 液体培养基进行模拟干旱试验, 处理 3 d 后, 对照烟草植株叶片萎蔫严重, 并出现枯黄, 而转基因烟草叶片仍然保持正常的叶色和伸展状态; 将转 SsDREB 基因和对照烟草苗转移到含有 300 mmol/L NaCl 的 MS 液体培养基进行耐盐试验, 处理 3 d 后, 转基因烟草植株没有明显变化, 而对照烟草开始出现叶片叶缘卷曲、心叶萎蔫等现象。这些试验结果与前人的报道相一致^[20-31], 表明 SsDREB 基因在烟草中的过量表达能够增强转基因烟草对干旱和盐胁迫的抗性。

光合作用作为能量的来源, 在植物的代谢中起核心作用, 它的强弱对于植物生长、产量及其抗性均具有重要影响。而叶片叶绿素荧光与光合作用中各种反应过程密切相关, 任何环境因子对光合作用的影响都可通过叶片叶绿素荧光动力学反映出来, 因此, 叶绿素荧光是探测植物光合作用动态变化的理想内在探针。许多研究显示, 超量表达 DREB 提高植物的抗性与转基因植株在逆境胁迫下能保持高的光化学效率和光合能力有关^[32-33]。本研究结果显示, 随着胁迫处理时间的延长, 对照和转基因苗的光合参数 (Pn 和 Gs) 和荧光参数 (Fv/Fm 和 $\phi\text{PS II}$)

都呈下降趋势;但与对照相比,转 *SsDREB* 基因烟草植株叶片的叶片光合作用机构在盐渍和干旱胁迫下仍能维持较高的完整程度,保持更高的光能转化率和光合能力,从而表现对干旱伤害和高盐伤害具有更高的抗性。

在干旱、高盐、低温条件下,植物体内会累积大量游离脯氨酸、可溶性糖等渗透调节物质来对抗外界环境胁迫^[34]。渗透调节功能是植物能够忍受长期逆境条件并提高抗逆性的重要生理基础,是其在长期进化过程中演化出的适应逆境胁迫的机制和策略。可溶性糖和脯氨酸等是植物体内重要的渗透调节物质,在逆境胁迫下这些有机溶质大量积累,提高细胞液浓度,降低其渗透势,增强细胞的吸水和持水能力,保持细胞生长、气孔开放和光合作用等生理过程,从而提高植物的抗胁迫能力^[35-36]。在逆境条件下,细胞内可溶性糖的积累是反映抗旱性强弱的有效指标之一,它不仅能够稳定细胞膜和原生质体,提供有机溶质合成和能量来源的碳骨架,还可在细胞内无机离子浓度过高时保护细胞内的酶类^[34]。而另一渗透调节物质脯氨酸不仅能有助于维持植物外界环境和细胞间的渗透平衡,阻止植株水分流失,还能影响蛋白的稳定性,对蛋白起保护作用^[37]。宗俊梅等^[38]报道,在干旱、低温和盐胁迫下,*AaDREB1* 在转基因水稻中超表达不仅提高了转基因水稻的存活率以及脯氨酸和可溶性糖的含量,而且降低了叶绿素的分解。陈浩东等^[39]将受 Ubi 启动子驱动 *CbDREB1A* 基因导入水稻光敏核不育系,转基因水稻在干旱胁迫下脯氨酸含量明显高于对照组,显示出耐寒性增强。Zhao 等^[40]将受 rd29A 驱动的 *AtDREB1A* 基因转入高羊茅,转基因植株对干旱性耐受性显著提高,且体内积累高水平脯氨酸。本研究对转基因烟草苗进行干旱、高盐等抗逆性测定,结果表明在高盐、干旱胁迫下,转基因烟草苗与非转基因植株相比,对逆境的耐受能力明显提高,同时转基因植株叶片的可溶性糖和脯氨酸含量也均高于对照,这些渗透调节物质的大量积累有助于减少盐胁迫和干旱胁迫对植物的伤害。

综上所述,过量表达 *SsDREB* 基因的烟草通过调节渗透调节物质的含量、维持叶片更高的光能转化率和光合能力来提高植株的抗旱、耐盐性,以维持植株正常的生理生化功能。这些研究结果也说明 *SsDREB* 确实是来自盐地碱蓬的 DREB 转录因子,它能调控烟草中与逆境胁迫相关的一些功能基因的表达。

参考文献:

- [1] Barrels D, Sunkar R. Drought and salt tolerance in plants [J]. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2005, 24: 23 - 58.
- [2] Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses [J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2006, 57: 781 - 803.
- [3] 李 杰, 李 晶, 朱延明, 等. *DREB1A* 基因植物表达载体的构建 [J]. *东北农业大学学报*, 2003, 34 (2): 199 - 204.
- [4] Nj1 S, Lourenco T, oliveira M M. Transcription factors and regulation of photosynthetic and related metabolism under environmental stresses [J]. *Annals Botany*, 2009, 103 (4): 609 - 623.
- [5] Nakashima K, Ito Y, Yamaguchi-Shinozaki K. Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in *Arabidopsis* and grasses [J]. *Plant Physiology*, 2009, 149 (1): 88 - 95.
- [6] Magnani E, Sjolander K, Hake S. From endonucleases to transcription factors: Evolution of the AP2 DNA binding domain in plants [J]. *Plant Cell*, 2004, 16 (9): 2265 - 2277.
- [7] Sakuma Y, Liu Q, Dubouzet J G, et al. DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of *Arabidopsis* DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2002, 290 (3): 998 - 1009.
- [8] 赵艳红, 郎明林, 王小龙, 等. 纤毛鹅观草 *DREB* 类基因 *ReDREB1* 的克隆及其蛋白结合干旱应答元件 DRE 的功能验证 [J]. *植物遗传资源学报*, 2013, 14 (5): 857 - 863.
- [9] 张 梅, 刘 炜, 毕玉平. 植物中 DREBs 类转录因子及其在非生物胁迫中的作用 [J]. *遗传*, 2009, 31 (3): 236 - 244.
- [10] Xu Z S, Chen M, Li L C, et al. Functions and application of the AP2/ERF transcription factor family in crop improvement [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2011, 53 (7): 570 - 585.
- [11] Zhang X X, Tang Y J, Ma Q B, et al. OsDREB2A, a rice transcription factor, significantly affects salt tolerance in transgenic soybean [J]. *PLOS One*, 2013, 8 (12): e83011.
- [13] Wang B S, Luttge U, Ratajczak R. Specific regulation of SOD isoforms by NaCl and osmotic stress in leaves of the C-3 halophyte *Suaeda salsa* L. [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2004, 161 (3): 285 - 293.
- [14] Song J, Fan H, Zhao Y Y, et al. Effect of salinity on germination, seedling emergence, seedling growth and ion accumulation of a euhalophyte *Suaeda salsa* in an intertidal zone and on saline inland [J]. *Aquatic Botany*,

- 2008,88(4):331–337.
- [15] 黄 玮,李志刚,乔海龙,等. 旱盐互作对盐地碱蓬生长及其渗透调节物质的影响[J]. 中国生态农业学报,2008,16(1):173–178.
- [16] 刘晓雪,孙晓波,王秀娥,等. 盐地碱蓬 *SsDREB* 基因的克隆与表达分析研究[J]. 核农学报,2011,25(4):684–691.
- [17] 邹 琦. 植物生理生化实验指导[M]. 北京:中国农业出版社,1995:41–46.
- [18] Irigoyen J J, Einerich D W, Sánchez-Díaz M. Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa*) plants [J]. *Physiologia Plantarum*, 1992, 84: 55–60.
- [19] 张志良. 植物生理学实验指导[M]. 北京:高等教育出版社,2002:127–128.
- [20] 陈丽萍,何道一. 植物抗旱耐盐基因的研究进展[J]. 基因组学与应用生物学,2010,29(3):542–549.
- [21] 王小华,庄南生. 脯氨酸与植物抗寒性的研究进展[J]. 中国农学通报,2008,24(11):398–402.
- [22] 张怀山,赵桂琴,栗孟飞,等. 中型狼尾草幼苗对 PEG、低温和盐胁迫的生理应答[J]. 草业学报,2014,23(2):180–188.
- [23] Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, *et al.* Two transcription factors, *DREB1* and *DREB2*, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought-and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 1998, 10(8):1391–1406.
- [24] Chen M, Wang Q Y, Cheng X G, *et al.* GmDREB2, a soybean DRE-binding transcription factor, conferred drought and high-salt tolerance in transgenic plants [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007, 353(2):299–305.
- [25] Lata C, Prasad M. Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2011, 62(14):4731–4748.
- [26] Agarwal P K, Agarwal P, Reddy M K, *et al.* Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants [J]. *Plant Cell Reports*, 2006, 25(12):1263–1274.
- [27] Matsukura S, Mizoi J, Yoshida D, *et al.* Comprehensive analysis of rice DREB2-type genes that encode transcription factors involved in the expression of abiotic stress-responsive genes [J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2010, 283(2):185–196.
- [28] Sun J W, Peng X J, Fan W H, *et al.* Functional analysis of *BpDREB2* gene involved in salt and drought response from a woody plant *Broussonetia papyrifera* [J]. *Gene*, 2014, 535(2):140–149.
- [29] Qin F, Kakimoto M, Sakuma Y, *et al.* Regulation and functional analysis of ZmDREB2A in response to drought and heat stresses in *Zea mays* L. [J]. *Plant Journal*, 2007, 50(1):54–69.
- [30] Wang Q, Guan Y, Wu Y, *et al.* Over expression of a rice *OsDREB1F* gene increases salt, drought, and low temperature tolerance in both *Arabidopsis* and rice [J]. *Plant Molecular Biology*, 2008, 67(6):589–602.
- [31] Chen M, Xu Z, Xia L, *et al.* Cold-induced modulation and functional analyses of the DRE-binding transcription factor gene, *GmDREB3*, in soybean (*Glycine max* L.) [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2009, 60(1):121–135.
- [32] Savitch L V, Allard G, Seki M, *et al.* The effect of overexpression of two *Brassica* CBF/DREB1-like transcription factors on photosynthetic capacity and freezing tolerance in *Brassica napus* [J]. *Plant and Cell Physiology*, 2005, 46(9):1525–1539.
- [33] Oh S J, Kwon C W, Choi D W, *et al.* Expression of barley HvCBF4 enhances tolerance to abiotic stress in transgenic rice [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2007, 5(5):646–656.
- [34] Igarashi Y, Yoshida Y, Sanada Y, *et al.* Characterization of the gene for delta-pyrroline-5-carboxylate synthetase and correlation between the expression of the gene and salt tolerance in *Oryza sativa* L. [J]. *Plant Molecular Biology*, 1997, 33(5):857–865.
- [35] Costa F G, Pham Thi A T, Pimentel C, *et al.* Differences in growth and water relations among *Phaseolus vulgaris* cultivars in response to induced drought stress [J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2000, 43(3):227–237.
- [36] 刘晓东,李洋洋,何 淼. PEG 模拟干旱胁迫对玉带草生理特性的影响[J]. 草业科学,2012,29(5):687–693.
- [37] 谢 虹,杨 兰,李忠光. 脯氨酸在植物非生物胁迫耐性形成中的作用[J]. 生物技术通报,2011(2):23–27, 60.
- [38] 宗俊梅. 冰凌花转录因子 *AaDREB1* 基因的表达分析及功能鉴定[D]. 长春:吉林农业大学,2011.
- [39] 陈浩东,罗伯祥,陈 芬,等. *CbDREB1A* 基因表达载体构建及转化水稻光温敏核不育系的研究[J]. 杂交水稻,2009,24(6):49–53, 76.
- [40] Zhao J S, Ren W, Zhi D Y, *et al.* *Arabidopsis* DREB1A/CBF3 bestowed transgenic tall fescue increased tolerance to drought stress [J]. *Plant Cell Reports*, 2007, 26(9):1521–1528.