

AtDREB1A 基因过量表达对马铃薯盛花期生理生化指标的影响

贾小霞^{1,2}, 汪世刚³

(1. 甘肃省农业科学院马铃薯研究所, 甘肃 兰州 730070; 2. 甘肃省马铃薯种质资源创新工程实验室, 甘肃 兰州 730070; 3. 甘肃农业大学农学院, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 以马铃薯品种陇薯 3 号及其转 AtDREB1A 基因株系 T1 为研究对象, 在干旱胁迫条件下, 研究了 AtDREB1A 基因过量表达对盛花期生理生化指标的影响。分析表明, 在不同程度的干旱胁迫下, 转基因株系 T1 盛花期叶片的超氧化物歧化酶(SOD)活性及脯氨酸(Pro)含量均高于同期非转基因陇薯 3 号对照, 而丙二醛(MDA)含量和相对电导率均低于陇薯 3 号。以上结果初步表明, AtDREB1A 基因的过量表达明显提高了马铃薯对干旱的抗性。

关键词: 马铃薯; AtDREB1A 基因; 盛花期; 抗旱性

中图分类号: S532 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1463(2017)10-0032-04

[doi:10.3969/j.issn.1001-1463.2017.10.010](https://doi.org/10.3969/j.issn.1001-1463.2017.10.010)

Effects of Excessive Expression of AtDREB1A Gene on Physiological and Biochemical Indexes of Potato at Flowering Stage

JIA Xiaoxia^{1,2}, WANG Shigang³

(1. Institute of Potato Research, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou Gansu 730070, China; 2. Gansu Engineering Laboratory of Potato Germplasm Resources Innovation, Lanzhou Gansu 730070, China; 3. College of Agronomy, Gansu Agricultural University, Lanzhou Gansu 730070, China)

Abstract: In order to study the effects of excessive expression of AtDREB1A gene on physiological and biochemical indexes of potato at flowering stage, the cultivar of potato Longshu 3 and its AtDREB1A genetic strain T1 is used as materials and the activity of SOD, the content of Pro, the content of MDA and the electrical conductivity in leaves are analyzed. The result shows that the activity of SOD and the content of Pro in the transgenic potato were higher than those in the non-transgenic control Longshu 3, and the content of MDA and the electrical conductivity in transgenic potato are lower than those of Longshu 3. The result shows that the excessive expression of AtDREB1A gene in potato improved the potato drought-resistance.

Key words: Potato; AtDREB1A gene; Flowering; Drought resistance

植物的耐旱性是一个复杂的多基因控制系统, 转单个功能基因的手段常因作用单一而不尽人意。转录因子 DREB1A 可以调控一系列抗旱相关基因的表达, 用它来提高抗旱性比单基因更有优势。目前, 已利用基因转化技术将 DREB1A 基因转入拟南芥、烟草、水稻、小麦等作物中, 并提高了转基因植物的抗逆性^[1-4]。

AtDREB1A 转化马铃薯并增强其抗寒性、耐热性和抗旱性的研究也有相关报道^[5-7], 但在干旱胁迫下, 关于 AtDREB1A 基因过量表达对马铃薯盛花期生理生化指标影响的研究未见报道。我

们以马铃薯品种陇薯 3 号及其 AtDREB1A 转基因株系 T1 为试验材料, 采用盆栽试验, 通过监测不同水分胁迫下盛花期叶片的 SOD 活性、细胞膜透性、MDA 含量和 Pro 含量的变化规律, 分析比较转基因前后各指标的差异, 研究了 AtDREB1A 基因对马铃薯生理生化特性的影响, 以掌握转录因子 AtDREB1A 基因过量表达引起的生理生化响应。现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为马铃薯品种陇薯 3 号(S3)及其 At-

收稿日期: 2017-06-23; 修订日期: 2017-08-15

基金项目: “国家自然科学基金”项目(31560412)、“国家马铃薯产业技术体系”项目(CAR-10-P05)资助。

作者简介: 贾小霞(1978—), 女, 甘肃定西人, 副研究员, 博士, 主要从事马铃薯种质资源创新工作。E-mail: jiaxx0601@163.com

DREB1A 转基因株系 T1, 由甘肃省农业科学院马铃薯研究所种质资源与生物技术研究室提供, 以陇薯 3 号(S3)为对照。

1.2 试验方案

盆栽试验于 2016 年 4 月中旬在甘肃省农业科学院生物技术研究所温室内进行。试验设置 4 个水分胁迫梯度处理, 分别为田间最大持水量(FWC)的 45%~50%、55%~60%、65%~70%和 75%~80%。将统一繁殖且大小一致的马铃薯品种陇薯 3 号(S3)及其 AtDREB1A 转基因株系 T1 微型薯以相同深度播种于试验盆中, 每盆 1 株, 出苗并正常生长后, 选择大小和长势均匀一致的盆栽马铃薯植株进行水分胁迫处理, 各处理均为 20 盆。试验期间采用土壤水分仪和称重法监测土壤水分, 及时补水, 保证土壤含水量处于设定的干旱胁迫范围。盛花期采集样品进行植株各生理生化指标的测定。

1.3 生理生化指标的测定

Pro 含量、SOD 活性和 MDA 含量的测定均采用苏州科铭生物技术有限公司的测定试剂盒。

1.3.1 Pro 含量测定 称取 0.1 g 马铃薯叶片, 剪碎放置于研钵内, 加入 1 mL Pro 提取液进行冰浴匀浆, 之后置于 1.5 mL 离心管并在 95 ℃水浴震荡 10 min, 室温下 10 000 g 离心 10 min, 取上清液冷却后待测。加 0.5 mL 的样本和 0.5 mL 冰醋酸与 0.5 mL 茚三酮显色液, 在 95 ℃水浴中反应 30 min 冷却后加 1 mL 甲苯振荡, 静置片刻, 使色素转至甲苯层中。吸取 0.8~1.0 mL 甲苯层于 1 mL 玻璃比色皿中, 于 520 nm 波长处比色, 记录吸光值, 对照以 1 mL 蒸馏水代替上清液。

1.3.2 SOD 活性测定 称取 0.1 g 马铃薯叶片, 加入 1 mL 提取液进行冰浴匀浆。4 ℃ 8 000 g 离心 10 min, 取上清液, 置冰上待测。按表 1 中的 SOD 活性测定反应体系往 EP 管中加入试剂, 充分混匀后室温静置 30 min。待反应的步骤结束后, 将反应液混匀, 调节波长为 560 nm, 使用 1 cm 光径的

比色皿, 蒸馏水调零, 进行光度值 A 测定。根据以下公式计算酶活性:

$$\text{SOD 活性} = 11.4 \times \text{抑制百分率} \div (1 - \text{抑制百分率}) \div W \times \text{样本稀释倍数}$$

$$\text{抑制百分率} = (\text{A 对照管} - \text{A 测定管}) \div \text{A 对照管} \times 100\%$$

1.3.3 MDA 含量测定 称取 0.1 g 马铃薯叶片, 加入 1 mL 的提取液, 进行冰浴匀浆。4 ℃ 8 000 g 离心 10 min, 取上清液, 置冰上待测。吸取 0.6 mL 的硫代巴比妥酸于 1.5 mL 的离心管中, 再加入 0.2 mL 样本混匀。95 ℃水浴中保温 30 min 后, 置于冰浴中冷却, 室温下 10 000 g 离心 10 min, 吸取上清液于 1 mL 玻璃比色皿中, 测定 532 nm 和 600 nm 处的吸光度, 记为 A532 和 A600, $\Delta A = A532 - A600$ 。MDA 含量(nmol/g 鲜重) = $25.8 \times \Delta A \div W$ 。

1.3.4 对细胞膜透性的影响 对细胞膜透性的影响采用电导率法测定。准确称取 0.2 g 马铃薯叶片, 将叶片剪碎后放入容量为 15 mL 的带盖离心管中, 加入 10 mL 的蒸馏水, 盖盖密封 12 h 后, 利用电导仪测定其电导率值 R_1 。将测定好的离心管放入沸水浴中煮沸, 直至叶片煮死后取出冷却至室温, 测定电导率 R_2 。电解质渗出率(%) = $R_1/R_2 \times 100\%$ 。

2 结果与分析

2.1 水分胁迫对叶片 Pro 含量的影响

不同水分胁迫下转基因株系 T1 和对照 S3 盛花期叶片的 Pro 含量变化如图 1(左)所示。在不同的水分胁迫下, T1 和 S3 叶片内的 Pro 含量整体表现为先上升后下降, 但 T1 叶片中的 Pro 含量始终高于 S3。

2.2 水分胁迫对叶片 SOD 活性的影响

不同水分胁迫下转基因株系及其对照在盛花期叶片的 SOD 活性变化如图 1(右)所示。在不同水分胁迫下, 转基因株系 T1 的 SOD 活性先上升后下降, 在土壤水分为田间最大持水量的 70% 时达到最大; 而对照 S3 在不同水分胁迫下 SOD 活性呈现逐渐下降的趋势。而且从图 1(右)可以看出, T1 的 SOD 活性在不同水分胁迫下始终高于 S3。表明 DREB1A 基因的过量表达提高了转基因马铃薯的 SOD 活性, 有利于保护细胞内的蛋白和膜系统免受氧化胁迫的伤害, 增强其对干旱环境的耐受能力。

2.3 水分胁迫对叶片 MDA 含量的影响

不同水分胁迫下转基因株系及其对照在盛花

表 1 SOD 活性测定反应体系

试剂种类	测定管	对照管
试剂一	240	240
试剂二	510	510
试剂三	6	6
样本	90	
试剂四	180	180
蒸馏水		90

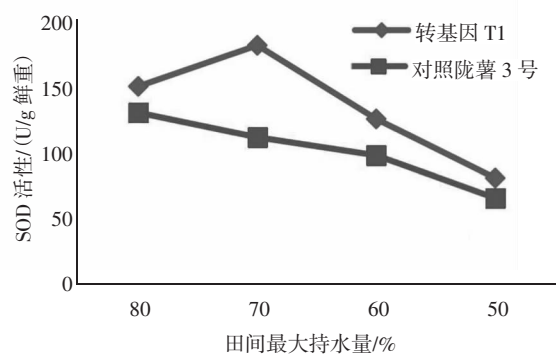
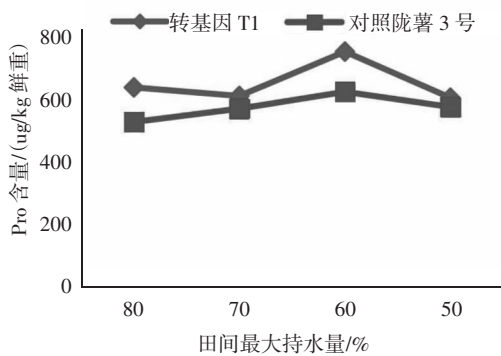


图 1 水分胁迫下盛花期陇薯 3 号及其转基因株系 T1 叶片中 Pro 含量和 SOD 活性

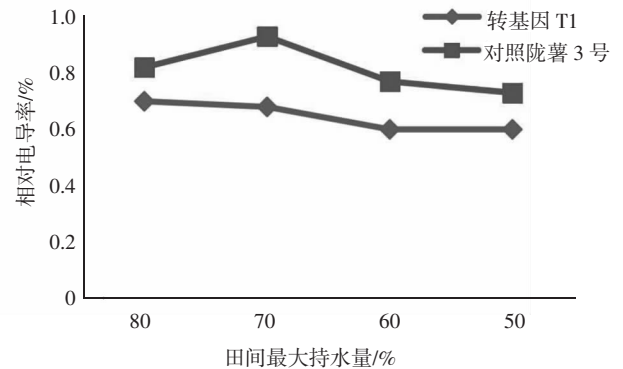
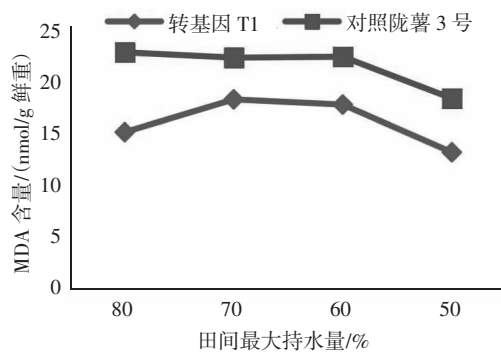


图 2 水分胁迫下盛花期陇薯 3 号及其转基因株系 T1 叶片中 MDA 含量和相对电导率

期叶片的 MDA 含量变化如图 2(左)所示。可以看出,随着土壤水分的降低,转基因株系 T1 的 MDA 含量先上升后下降,土壤水分为田间最大持水量的 70% 时最大,而对照 S3 的 MDA 含量呈现下降趋势。但是在不同水分的处理下,对照 S3 的 MDA 含量始终高于转基因株系,这说明 S3 叶片膜的氧化程度较转基因株系的高。

2.4 水分胁迫对叶片相对电导率的影响

不同水分胁迫下转基因株系及其对照在盛花期叶片的相对电导率变化如图 2(右)所示。在不同的水分胁迫下,对照 S3 的相对电导率先上升后下降,土壤水分为田间最大持水量的 70% 时达到最大;而转基因株系 T1,在不同水分胁迫下相对电导率呈现逐渐下降的趋势。且从图 2(右)可以看出,T1 的相对电导率始终低于 S3。

3 小结与讨论

研究表明,在不同的水分胁迫条件下,转基因株系 T1 的超氧化物歧化酶活性与脯氨酸含量显著高于非转基因对照陇薯 3 号,电导率和 MDA 含量则显著低于对照,表明 AtDREB1A 基因的过量表达提高了转基因马铃薯超氧化物歧化酶的活性,该酶活性的提高,有效的增强了细胞清

除活性氧的能力,进而减轻了活性氧对质膜造成的伤害,明显提高了转基因植物的耐旱性。该结论与 DREB1A 基因转化拟南芥、烟草、水稻和小麦等作物的研究结果一致^[1-4]。

当植物机体处于逆境时,由于受外界不良环境的刺激,细胞内产生大量的活性氧并形成一系列氧化活性物质。在这些氧化物质的作用下,膜脂发生过氧化,细胞质膜透性发生变化,细胞内的电解质外渗导致离子交换规律被破坏^[8],以致植物细胞浸提液的电导率增大。因此,电导率法已成为鉴定植物抗逆性强弱的一个精确而实用的方法。引起质膜透性发生变化的物质有很多种,其中 MDA 因其化学性质稳定,检测方法简单易行,科研工作者常常通过测定 MDA 含量来评估植物细胞质膜的过氧化水平,进而评价植物遭受逆境伤害的程度^[9]。为了消弱甚至消除细胞遭受氧化物质的毒害而使植物适应不良的环境条件,植物细胞内清除活性氧的酶促体系和非酶促体系形成一系列反应机制来维持整个防御系统的动态平衡。SOD 作为酶促体系的重要成员,在维持植物细胞内活性氧代谢平衡中起着非常重要的作用,常被用来衡量逆境胁迫条件下细胞活性氧清除能

4 个藜麦品种在陇东旱作区幼苗生长量及生理生化指标分析

黄 杰, 刘文瑜, 魏玉明, 金 茜, 杨发荣

(甘肃省农业科学院畜草与绿色农业研究所, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 在陇东旱作区测定了 4 个藜麦品种幼苗的株高、根长、生物量及叶片可溶性糖、脯氨酸、MDA、抗氧化酶活性等生理生化指标, 结果表明, 4 个供试藜麦品种抗旱的生理生化指标以陇藜 1 号适应性表现最优, 陇藜 4 号表现次之。

关键词: 旱作区; 藜麦; 生物量; 抗氧化酶

中图分类号: S516 **文献标志码:** A

文章编号: 1001-1463(2017)10-0035-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1463.2017.10.011

藜麦是苋科藜亚科藜属一年生双子叶草本植物^[1], 原产于南美洲安第斯山脉的秘鲁、厄瓜多尔和玻利维亚, 距今已有 7 000 多年的种植历史^[2]。

藜麦籽粒富含蛋白质及人体必需氨基酸、矿物质、维生素等多种营养物质, 且低脂、低升糖、低热量, 被联合国粮农组织(FAO)认定为唯一一种单

收稿日期: 2017-08-02

基金项目: 国家自然科学基金“不同海拔对藜麦产量和品质的影响及生理生态机制”(31660357)、甘肃省科技支撑计划“藜麦等经济作物种质资源开发利用”(1504NKCA078-1)部分内容。

作者简介: 黄 杰(1981—), 男, 甘肃天水人, 助理研究员, 硕士, 主要从事藜麦栽培育种工作。联系电话:(0931)7611739。E-mail: huangjie_0808@126.com。

通信作者: 杨发荣(1964—), 男, 甘肃宁县人, 研究员, 主要从事藜麦引种及栽培工作。E-mail: lzyfr08@163.com。

力的强弱^[10]。植物体内的 Pro 含量, 在一定程度上反映了植物的抗逆性, 抗旱性强的品种中往往积累了较多的脯氨酸。

参考文献:

- [1] LIU Q, KASUGA M. 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: 1391-1406.
- [2] KASUGA M, MIURA S, SHINOZAKI K., et al. A combination of the *Arabidopsis* DREB1A gene and stress-inducible rd29A promoter improved drought and low-temperature stress tolerance in tobacco by gene transfer[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2004, 45(3): 346-350.
- [3] LIU L X, ZHAO L S, LIANG X X. et al. Study on production of transgenic wheat with a stress-inducible transcription factor gene REEB1A by microprojectile bombardment[J]. *China Biotechnology*, 2003, 23(11): 53-56.
- [4] PELLEGRINESCHI A., REYNOLDS M., PACHECO M., et al. Stress-induced expression in wheat of the *Aro-*

bidops *thaliana* DREB1A gene delays water stress symptoms under greenhouse conditions[J]. *Genome*, 2004, 47(3): 493-500.

- [5] 许昆朋. 转 CBF3 基因马铃薯提高抗冷性的研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2011.
- [6] DOUH O, XVK P, MENGQ W, et al. Potato plants ectopically expressing *Arabidopsis thaliana* CBF3 exhibit enhanced tolerance to high-temperature stress[J]. *Plant, Cell and Environment*, 2014, 38: 61-72.
- [7] 贾小霞, 齐恩芳, 王一航, 等. 转录因子 DREB1A 基因和 Bar 基因双价植物表达载体的构建及对马铃薯遗传转化的研究[J]. *草业学报*, 2014, 23(3): 110-114.
- [8] 高文俊, 徐 静, 谢开云, 等. Na₂CO₃ 和 NaHCO₃ 胁迫下冰草的生长及生理响应[J]. *草业学报*, 2011, 20(4): 299-304.
- [9] 李 源, 刘贵波, 高洪文, 等. 紫花苜蓿种质耐盐性综合评价及盐胁迫下的生理反应[J]. *草业学报*, 2010, 19(4): 79-86.
- [10] 张海娜, 李小娟, 李存东, 等. 过量表达小麦超氧化物歧化酶基因对烟草耐盐能力的影响[J]. *作物学报*, 2008, 34(8): 1403-1408.

(本文责编: 郑立龙)