

异源表达胡杨*PeCPD*基因提高烟草对盐、高氮和干旱胁迫的抗性*

陈永富 王阳 冯倩 唐海 吴英青 高永峰**

西南科技大学生命科学与工程学院 绵阳 621010

摘要 油菜素类固醇 (Brassinosteroids, BRs) 在调节植物生长发育和提高植物对非生物胁迫的抗性中起着重要作用, *CPD* (Constitutive Photomorphogenesis and Dwarfism) 基因编码一种甾醇类23a羟化酶, 在BR的生物合成中发挥着重要作用. 本研究克隆胡杨*PeCPD*基因的cDNA序列, 并利用农杆菌介导法, 将*PeCPD*基因植物过表达载体pBI121-35S::PeCPD转化野生型烟草, 筛选得到*PeCPD*基因过表达的转基因烟草植株, 并利用NaCl、高氮和甘露醇分别对转基因和野生型烟草进行胁迫处理, 检测转基因烟草的耐受性和相关的生理生化指标. 结果表明: (1) 在正常条件下, 转基因烟草的鲜重是野生型烟草的1.47倍; (2) 在NaCl、高氮以及甘露醇的胁迫处理下, 转基因烟草植株的根长、叶片叶绿素和类胡萝卜素的含量均显著高于野生型植株, 抗氧化酶SOD和POD活性以及渗透调节物质脯氨酸、可溶性蛋白和可溶性糖的含量也同样表现为转基因烟草显著高于野生型, 而野生型植株的丙二醛 (MDA) 含量显著高于转基因植株. 因此在烟草中异源过表达胡杨*PeCPD*基因不但能够增加烟草的生物量, 而且能够提高烟草对盐、高氮和干旱胁迫的抵抗能力. (图8 参32)

关键词 *PeCPD*; 烟草; 盐胁迫; 高氮; 干旱

CLC Q786 : S572.034

Heterologous overexpression of *Populus euphratica* *CPD* improved tobacco resistance to salt, high nitrogen, and drought stress*

CHEN Yongfu, WANG Yang, FENG Qian, TANG Hai, WU Yingqing & GAO Yongfeng**

School of Life Science and Engineering, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621010, China

Abstract Brassinosteroids (BRs) are a low-dose and high-efficiency steroid hormones, which play an important role in regulating plant growth and enhancing plant resistance to abiotic stress. The constitutive photomorphogenesis and dwarfism (*CPD*) gene encodes a sterol 23a hydroxylase, which plays an important role in the biosynthesis pathway of BRs. In this study, the function of *Populus euphratica* *CPD* gene in abiotic stress (salt, high nitrogen, and drought stress) resistance was investigated by heterologously overexpressing the *PeCPD* gene in tobacco. Cloning the cDNA sequence of the *P. euphratica* *PeCPD* gene, and then transforming the overexpressing vector pBI121-35S::PeCPD into wild-type tobacco by using *Agrobacterium*-mediated transformation obtained *PeCPD* overexpression transgenic tobacco plants. Finally, under different stress treatments (NaCl, high nitrogen, and mannitol), the resistance and related physiological and biochemical indexes of transgenic plants were tested and detected. (1) Under normal conditions, the fresh weight of transgenic tobacco was significantly higher than that of the wild-type plants. (2) Under salt, high nitrogen, and mannitol stress treatments, the root length, chlorophyll, and carotenoid contents of transgenic tobacco plants were significantly higher than those of the wild-type plants, the activity of the antioxidative enzymes such as superoxide dismutase and peroxidase and osmotic-regulating chemical contents such as proline, soluble protein, and soluble sugar in transgenic plants were more than those in the wild-type plants, but malondialdehyde contents in the wild-type plants increased considerably more than that in the transgenic plants. Heterologous overexpression of *PeCPD* in tobacco can not only increase the biomass of tobacco but also enhance the resistance of tobacco to salt, high nitrogen, and drought stress.

Keywords *PeCPD*; tobacco; salt stress; high nitrogen; drought

收稿日期 Received: 2016-10-20 接受日期 Accepted: 2016-11-11

*国家自然科学基金项目 (31270660)、四川省青年科技基金项目 (2014JQ0016)、西南科技大学博士启动资金和西南科技大学杰出青年基金项目资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (31270660), the Sichuan Youth Science and Technology Foundation (2014JQ0016), the Southwest University of Technology Doctoral Start-up Capital and the Southwest University of Science and Technology Outstanding Youth Fund

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: gaoyongfeng0263@gmail.com)

油菜素甾醇 (Brassinosteroids, BRs) 是一种新型的植物生长调节物质, 在植物生长发育的整个周期中都起着重要作用^[1], 如调节植物细胞的分裂与伸长、维管束分化^[2]、叶和根的发育^[3-5]、衰老、种子的育性以及逆境响应等^[6-7]。

在BR的生物合成中主要有6种酶参与, 其中有5种都是细胞色素P450单加氧化酶基因^[8]。*CPD* (Constitutive photomorphogenesis dwarf) 就是其中之一, 其在BR生物合成过程中催化底物22-OH-CR转变为22-OH-4-en-3-one^[9]。*CPD*基因首次在拟南芥中通过T-DNA插入发现, 并证明该基因的缺失突变体表现为去黄化, 在暗培养下, 持续一段时间的处理, 突变体表现为矮化和雄性不育等。外源施加C23羟化BR前体或者过表达拟南芥的*CPD*基因可恢复其表型, 外源施加赤霉素 (GA)、脱落酸 (ABA) 等植物激素并不能恢复表型^[10], 根据此结果推测认为*CPD*基因编码一种BR合成过程中关键的C23羟化酶, 而近期Ohnishi等用异源表达实验结果证实CYP90A1/*CPD*作为C3氧化酶催化早期BR中间产物的C3氧化反应^[9]。此外在植物生长发育过程中, *CPD*基因的转录水平不仅受内源BR负反馈调节, 同时还受到外界环境如光照的调控, 主要表现在黑暗条件下, 3 d后发现子叶和叶原基有*CPD*基因表达, 而在光照条件下, 则是8 d后才在子叶中发现有*CPD*基因表达^[11]。

烟草作为一种重要的经济作物, 研究其对逆境胁迫的抵抗能力, 特别是对非生物胁迫耐受性具有重要的实际和应用价值。胡杨也称为胡桐, 属于杨柳科落叶乔木。胡杨是古地中海植物, 是第三世纪残存的远古物种, 早在六千多万年前, 地球上就有胡杨。胡杨绝大多数生长在沙漠中, 具有耐盐碱、耐低温、抗风沙以及耐旱等特征, 抗逆境胁迫能力极强。胡杨树可高达15-30 m, 并且其根长可下达至地下10 m, 在干旱等逆境条件下有利于根系对水分以及营养物质的吸收。研究表明其体内*PeCPD*基因的表达量显著高于其他的杨树种, 表明该基因可能在胡杨非生物胁迫的抗性中发挥着重要作用^[11]。张炳将胡杨*PeCPD*基因导入马铃薯中, 发现转基因马铃薯的产量和质量都有明显提升^[12]; 武海军通过将胡杨*PeCPD*导入拟南芥中, 发现转基因植株的生物量、种子产量和茎的直径均有明显增加^[13]。为探讨胡杨*PeCPD*基因是否在非生物胁迫也起着重要作用, 以及它的异源表达是否可以提高烟草的抗逆性, 我们以胡杨为材料, 克隆胡杨*PeCPD*基因, 构建其植物过表达载体, 并将其导入烟草中, 获得转基因植株, 研究转基因烟草植株对盐、高氮以及甘露醇胁迫的响应, 旨在为烟草非生物胁迫的抗性遗传改良提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

胡杨 (*Populus euphratica*) 生长于新疆, 后移栽至西南科技大学校园, 生长良好。烟草 (NC89), 生长温度23 ℃, 光照16 h/8 h (白天/夜晚)。大肠杆菌DH 5 α 、根瘤农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) EHA105和植物表达载体pBI121均由本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 总RNA提取和cDNA合成 采用南京溧博基业生物

技术有限公司试剂盒提取胡杨叶片RNA, 用PrimeSeriTM RT reagent Kit with gDNA Eraser反转录试剂盒 (Takara公司) 进行反转录得到cDNA, 放置在-20 ℃冰箱中保存备用。

1.2.2 胡杨*PeCPD*基因的克隆与植物表达载体的构建 根据胡杨*PeCPD*基因 (GenBank登录号为GU326353.1) 序列, 利用Primer v5.0软件, 设计一对带有*Xba*I和*Sac*I双酶切位点的特异引物CPD-F: 5'-ATGGCGGTAATTTCTCTTTAT-3'和CPD-R: 5'-CTTACATGGCCTGGACACG-3'。以胡杨叶片cDNA为模板, 进行扩增, PCR反应条件为: 98 ℃ 3 min; 98 ℃ 15 s, 54.5 ℃ 15 s, 72 ℃ 30 s, 32个循环; 72 ℃延伸5 min。PCR产物使用1%的琼脂糖凝胶电泳检测。切胶回收PCR目的条带, 然后与pEASY-Blunt (北京全式金生物公司) 在室温连接30 min, 连接产物转化*E. coli* DH5 α 感受态细胞中, 对阳性单菌落进行验证, 送北京华大基因科技股份有限公司进行测序。测序正确后, 用*Xba*I和*Sac*I (Thermo公司) 同时双酶切*PeCPD*基因片段和植物表达载体pBI121, 将*PeCPD*基因插入到CaMV35S启动子后, 阳性克隆送华大基因科技股份有限公司测序, 将重组质粒用冻融法转入到农杆菌EHA105感受态细胞中。

1.2.3 烟草的遗传转化和鉴定 采用叶盘转化法^[14]转化野生型烟草。用含有pBI121-35S::PeCPD重组质粒的农杆菌侵染野生型烟草叶片, 随后将叶片置于MS + 3%蔗糖 + 0.7%琼脂 + 200 μ mol/L乙酰丁香酮培养基上, 于(24 $\pm$ 1) ℃、黑暗条件下培养2 d后转移到含有70 mg/L卡那霉素 (Kanamycin sulfate, Kan) 和500 mg/L头孢曲松钠 (Ceftriaxone, Cef) 的MS + 3.0%蔗糖 + 0.7%琼脂 + 3.0 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA分化培养基上, 每7-15 d更换1次培养基, 于上述条件下筛选培养1-2个月。当分化培养基上愈伤组织长出1.5 cm左右新芽时, 切取小芽转移至含有50 mg/L Kan的1/2MS + 3.0%蔗糖 + 0.5%琼脂的生根培养基上进行生根培养和筛选, 获取完整的Kan抗性植株。待根系发达后转移至盆中, 在温室内 (24 $\pm$ 1) ℃、光照16 h/d条件下培养。参照刘继恺等鉴定转基因阳性植株的方法^[15], 用pBI121载体筛选标记基因新霉素磷酸转移酶II (Neomycin phosphotransferase II, NPTII, GenBank登录号为AF485783) 基因片段进行扩增, 设计NPTII的引物NPTII-F: 5'-GCTATGACTGGGCACAACAG-3'和NPTII-R: 5'ATACCGTAAAGCACGAG GAA-3'PCR验证组培植株, 预计长度657 bp。然后利用CPD引物, 以阳性植株DNA为模板扩增*PeCPD*基因。随后, 提取筛选到的阳性植株的叶片RNA, 反转录生成cDNA, 利用半定量PCR检测野生型和转基因植株*PeCPD*基因的表达量, 以烟草Ribosomal protein L2 (*NtRL2*) 基因为内参, 分别设计*PeCPD*基因半定量引物Q-CPD-F: 5'-GGATAGAGAGTGAGTCAGGAGAG-3'和Q-CPD-R: 5'-GAGAGTCATGCTAGTAGATGTGG-3'内参*NtRL2*的引物NtRL2-F: 5'-GTAAGGGAGCGGGTTTCACTCT-3'和NtRL2-R: 5'-AACGGAGCACCCCTACCTG-3'。筛选得到在RNA水平过表达的转基因烟草植株, 进一步培养收获转基因烟草种子。

1.2.4 转基因烟草抗性实验 选取3个不同过表达株系与野生型烟草种子分别置于含有200 mg/L卡那霉素的1/2MS不含卡那霉素的1/2MS培养基上进行萌发, 10 d后^[16], 选取长势一

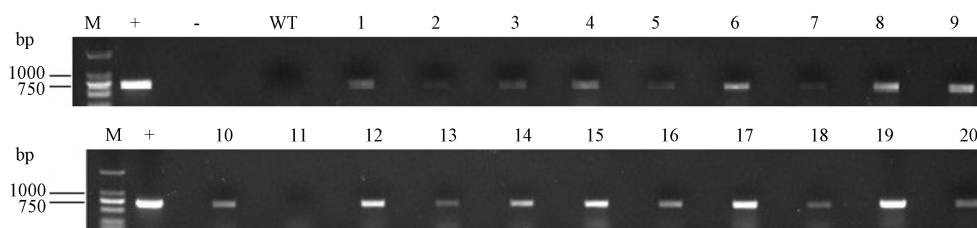


图1 转基因植株NPTII基因的PCR检测. M: DL2000; +: pBI121; -: 水; WT: 野生型烟草; 1-20: 转基因植株.

Fig. 1 PCR analysis for *NPTII* gene in transgenic plants. M: DL2000; +: pBI121; -: Water; WT: Wild type; 1-20: Transgenic plants.

致的转基因和野生烟草幼苗分别转移到含有150 mmol/L的NaCl、KNO₃以及甘露醇的1/2MS固体培养基的垂直平板上进行根长实验, 培养10 d后测量其根长. 将剩下的转基因和野生烟草幼苗移栽到1/2Hoagland营养液^[17]中培养, 28 d后选择长势一致的烟草用含150 mmol/L的NaCl、KNO₃和甘露醇的1/2Hoagland营养液处理, 48 h后取第2、3片叶片测定其生理指标.

1.2.5 生理指标测定方法 叶绿素和类胡萝卜素含量测定参照张政宽的方法^[18]; 可溶性糖含量用蒽酮比色法^[19]; 测定可溶性蛋白含量用考马斯亮蓝G-250法测定, 以牛血清白蛋白(BSA)为标准蛋白^[20]; 游离脯氨酸含量采用酸性茚三酮染色法测定^[21]; 取0.3 g新鲜叶片置于预冷的研钵中, 先加2 mL预冷的提取介质(0.005 mol/L Na₂HPO₄-NaH₂PO₄缓冲液, pH = 7.8, 含1%聚乙烯吡咯烷酮)在冰浴上研磨成匀浆, 再加入2 mL提取介质, 使最终的体积为6 mL, 于4 °C、10 000 r/min离心15 min, 上清液即为粗酶液, 用于超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化物酶(POD)酶活性的测定. SOD活性采用氮蓝四唑(NBT)法^[22]; POD活性测定采用愈创木酚法^[23].

1.3 数据分析

利用DPS v7.05软件进行单因素试验统计分析和LSD多重比较检验处理间差异程度, 利用Excel2007软件进行绘图.

2 结果与分析

2.1 *PeCPD*基因过表达植株的鉴定

利用农杆菌介导法转化野生型烟草, 共得到20株组培植株, 以提取组培植株叶片的DNA为模板, 以pBI121质粒为模板作为正对照, 以H₂O为模板作为负对照, NPTII-F/R为引物进行PCR验证组培植株, 预计长度657 bp. 结果(图1)表明, 负对照和野生型烟草未扩增出条带, 而组培植株中除11号外都扩增出和正对照大小一致的条带, 说明NPTII已经整合到烟草染色体组中, 共检测20株组培烟草, 阳性率为95%. 然后随机选取11株阳性烟草, 以其DNA为模板, 以pBI121-35S::PeCPD重组质粒为正对照, 野生型烟草为负对照, CPD-F/R为引物进行PCR扩增*PeCPD*基因, 预计长度1 441 bp, 结果如图2A所示, 野生型烟草未扩增出目的基因条带, 11株阳性烟草都扩增出与正对照大小一致的条带, 说明*PeCPD*基因已经整合到烟草染色体组中. 随后利用半定量PCR对上述的11株阳性植株中*PeCPD*基因的RNA表达水平进行鉴定, 筛选出表达量最高的3株植株, 分别是CPD-12、CPD-14和CPD-19(图2B).

2.2 转基因烟草在正常条件下的鲜重

为了了解转基因烟草和野生型烟草在正常条件下的生长

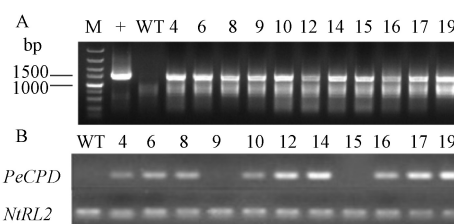


图2 阳性植株*PeCPD*基因PCR检测(A)和半定量PCR(B). M: DL5000; +: pBI121-35S::PeCPD重组质粒; WT: 野生型烟草; 4、6、8、9、10、12、14、15、16、17、19: 阳性植株.

Fig. 2 PCR analysis (A) and semi-quantitative PCR analysis (B) for *PeCPD* gene in transgenic plants. M: DL5000; +: The recombinant plasmid of pBI121-35S::PeCPD; WT: Wild type; 4, 6, 8, 9, 10, 12, 14, 15, 16, 17, 19: positive plants.

情况, 按照Hong等方法^[16]首先将转基因和野生型烟草种子分别置于1/2 MS + 200 mg/L Kan和1/2 MS培养基上进行萌发, 10 d后, 将长势一致的转基因和野生型烟草幼苗同时转入1/2 Hoagland营养液中进行培养, 28 d后, 观察其表型, 并测量其鲜重, 每个转基因株系选取3株测量其鲜重. 结果如图3A和3B, 3个转基因株系的鲜重均显著高于野生型烟草, 分别比野生型烟草增加了32.4%、48.5%和58.7%. 以上表明, 异源过表达*PeCPD*基因能够提高烟草的生物量.

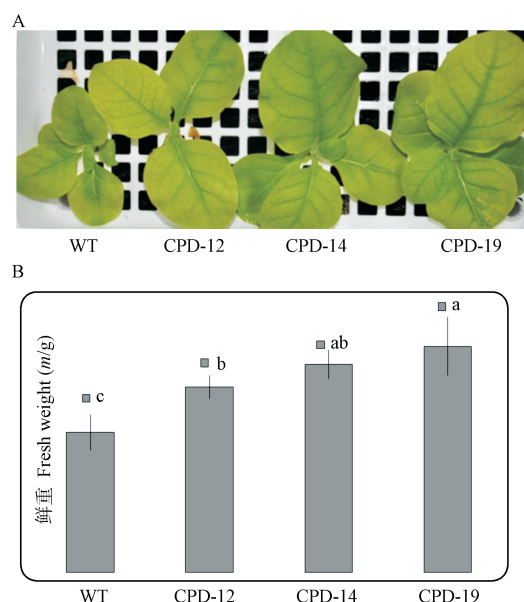


图3 转基因植株在正常条件下的表型(A)和鲜重(B). 图中不同小写字母表示不同株系间差异显著($P < 0.05$).

Fig. 3 Phenotype (A) and fresh weight (B) of transgenic plants under normal conditions. Different lowercase letters indicate significant differences ($P < 0.05$) among different strains.

2.3 转基因烟草在胁迫处理下的根长比较

从图4可知,在正常条件下,3个转基因株系的根长与野生型烟草相比都有所增加,但没有显著性差异。在3种胁迫处理条件下,虽然野生型和转基因烟草的根长均受到了不同程度的抑制,但是转基因植株的根长显著高于比野生型烟草根长,其中在盐胁迫处理下,转基因烟草的根长较野生型相比平均增加了49.10%;在高氮处理下,增加了47.18%;在甘露醇处理下,增加了22.85%。以上表明,异源过表达*PeCPD*基因能够显著促进烟草在逆境胁迫下的根的生长。

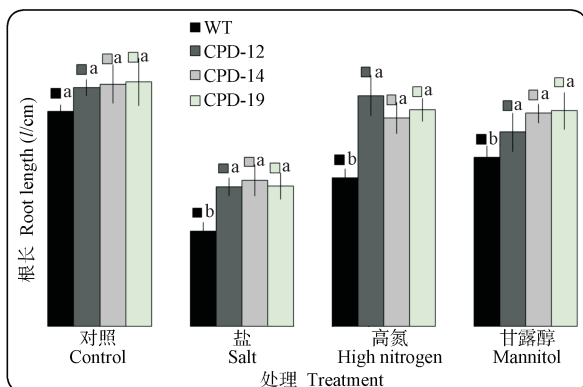


图4 转基因烟草种子在不同处理下的根长。图中不同小写字母表示同一处理间不同株系间差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig. 4 The root length of transgenic tobacco seeds under different treatments. Different lowercase letters indicate significant differences ($P < 0.05$) among different strains of the same treatment.

2.4 转基因烟草在胁迫处理下的叶绿素和类胡萝卜素含量

从图5A、5B可知,在正常条件下,3个转基因株系的叶绿素和类胡萝卜素的含量与野生型烟草相比均有不同程度的升高,但只有CPD-12与野生型相比存在显著性差异。在3种胁迫处理下,虽然野生型和转基因烟草的叶绿素和类胡萝卜素含量都受到了不同程度的抑制,但转基因烟草的叶绿素含量均显著高于野生型烟草,而转基因烟草类胡萝卜素含量除在高氮处理下的CPD-14和甘露醇处理下的CPD-19与野生型相比无显著性差异外,其他的均显著高于野生型烟草,其中在盐胁迫处理下,转基因烟草的叶绿素和类胡萝卜素含量分别较野生型相比平均提高了21.39%和37.93%;在高氮处理下分别提高了46.51%和18.23%;在甘露醇处理下分别提高了51.91%和40.83%。以上表明异源过表达*PeCPD*基因能够缓解逆境胁迫下烟草体内的叶绿素和类胡萝卜素的降解。

2.5 转基因烟草在胁迫处理下的抗氧化酶活性

从图6A、6B可知,在正常条件下,3个转基因株系的SOD和POD活性与野生型烟草相比均有比较明显的提高,且分别提高了13.22%和11.97%。在3种胁迫处理下,虽然野生型和转基因烟草的SOD和POD活性均有不同程度的升高,但是转基因烟草升高的幅度均显著高于野生型烟草,其中在盐胁迫处理下,转基因烟草SOD和POD的活性分别较野生型相比平均提高了77.44%和34.95%;在高氮处理下,提高了94.23%和14.58%;在甘露醇处理下,提高了61.59%和13.87%。以上表明,异源过表达*PeCPD*基因能够提高逆境胁迫下烟草体内的

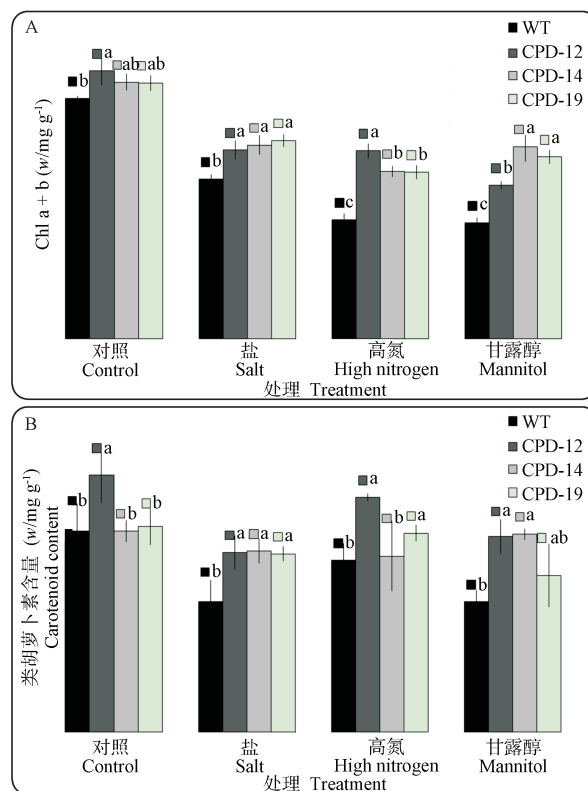


图5 转基因烟草在不同处理下叶绿素 (chl) 含量 (A) 和类胡萝卜素含量 (B)。图中不同小写字母表示同一处理间不同株系间差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig. 5 The chlorophyll (chl) content (A) and carotenoids content (B) of transgenic tobacco under different treatments. Different lowercase letters indicate significant differences ($P < 0.05$) among different strains of the same treatment.

SOD和POD活性。

2.6 转基因烟草在胁迫处理下的渗透物质含量

从图7A、7B和7C可知,在正常条件下,3个转基因株系的脯氨酸、可溶性蛋白和可溶性糖的含量与野生型烟草相比均有不同程度的升高,其中脯氨酸和可溶性糖的含量较野生型相比均显著性升高。在3种胁迫处理条件下,虽然野生型和转基因烟草的脯氨酸、可溶性蛋白和可溶性糖的含量均有不同程度的升高,但是转基因烟草体内渗透物质的含量却始终比野生型烟草的高,且升高的幅度也要比野生型烟草的大。在盐和高氮处理下,转基因植株体内的脯氨酸和可溶性糖的含量较野生型相比均显著性升高,其中在盐胁迫下转基因烟草较野生型相比平均提高了42.92%和37.51%,在高氮处理下,分别提高了24.09%和65.89%,而在上述两种胁迫处理下转基因烟草的可溶性蛋白含量与野生型相比差异均不显著;在甘露醇处理下,转基因烟草的脯氨酸、可溶性蛋白和可溶性糖的含量与野生型烟草相比均显著性升高,且分别提高了66.51%、40.05%和16.36%。以上表明异源过表达*PeCPD*基因能够提高烟草特别是逆境胁迫下烟草体内渗透物质的含量。

2.7 转基因烟草在胁迫处理下的MDA含量

从图8可知,在正常条件下,3个转基因株系的MDA含量与野生型烟草相比有不同程度的下降,但仅CPD-19达到显著下降水平。在3种胁迫处理下,虽然野生型和转基因烟草的MDA含量均有不同程度的升高,但是转基因烟草的MDA含

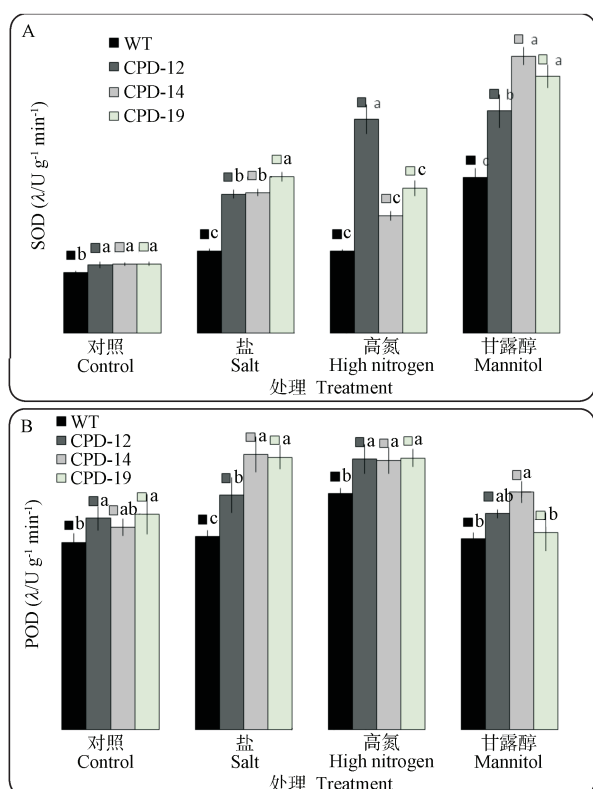


图6 转基因烟草在不同处理下SOD活性(A)和POD活性(B)。图中不同小写字母表示同一处理间不同株系间差异显著($P < 0.05$)。

Fig. 6 The superoxide dismutase (SOD) activity (A) and peroxidase (POD) activity (B) of transgenic tobacco under different treatments. Different lowercase letters indicate significant differences ($P < 0.05$) among different strains of the same treatment.

量均显著低于野生型烟草, 其中在盐胁迫处理下, 转基因烟草的MDA含量较野生型相比平均降低了14.65%; 在高氮处理下, 降低了10.90%; 在甘露醇处理下, 降低了18.83%。以上表明, 异源过表达*PeCPD*基因能够减少逆境胁迫下烟草体内的MDA含量, 保护膜脂的完整性。

3 讨论

BR在植物体内含量极其微量, 但对植物体却表现出不可或缺的作用。如今, 国内外已有大量的实验研究证明, BR可以很好地改善植物的生理生化代谢, 提高植物的抗逆性^[24]以及农作物的品质和产量。*CPD*是编码BR生物合成酶的关键基因之一, 最早在拟南芥中发现。2006年从水稻种克隆到两个与拟南芥*CPD*基因高度同源的*OsCPD1*和*OsCPD2*基因, 研究发现在野生型水稻(*Oryza sativa* L.cv.)中两个基因表达很高并且受到BR的反馈调节。另外通过转座子技术获得*OsCPD1*和*OsCPD2*基因的突变体, 两者的突变体表型和野生型水稻十分接近, 另外*OsCPD1*突变体没有表现出预期的BR缺陷性突变体表型以及BR的负反馈调节, 并推测上述两个基因确实在水稻BR生物合成中起作用^[25]。本研究通过在烟草中异源表达胡杨*PeCPD*基因, 并对转基因烟草进行研究发现, 转基因烟草在盐胁迫、高氮和甘露醇处理下, 都表现出

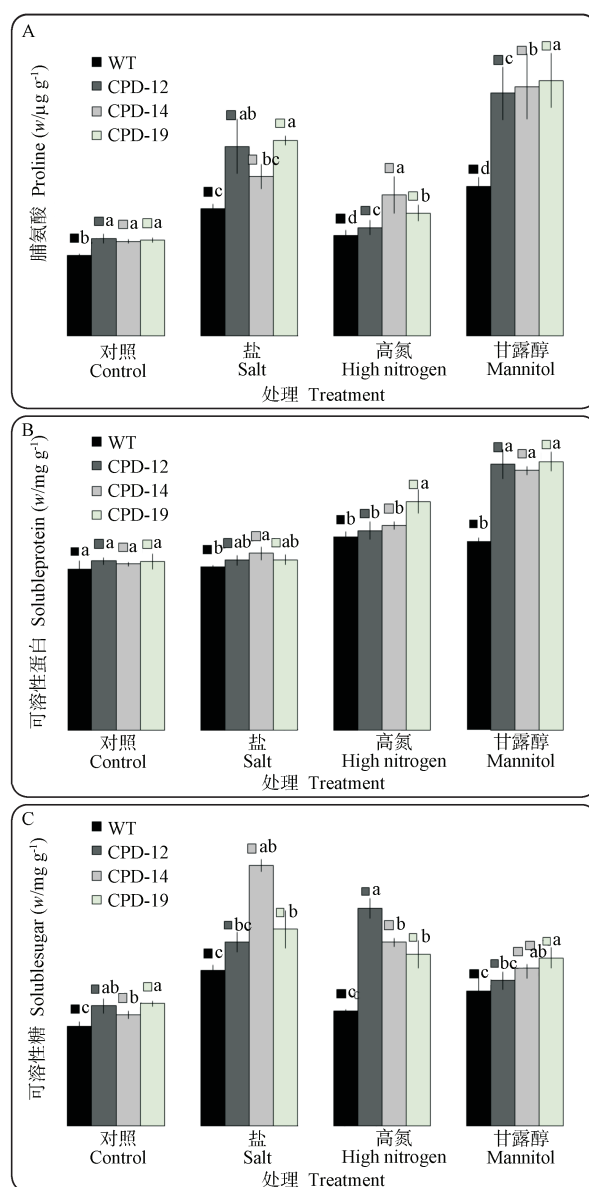


图7 转基因烟草在不同处理下的脯氨酸含量(A)、可溶性蛋白含量(B)和可溶性糖含量(C)。图中不同小写字母表示同一处理间不同株系间差异显著($P < 0.05$)。

Fig. 7 The proline content (A), soluble proteins content (B) and soluble sugar content (C) of transgenic tobacco under different treatments. Different lowercase letters indicate significant differences ($P < 0.05$) among different strains of the same treatment.

比野生型强的抗性, 在正常条件下, 转基因烟草长势好于野生型, 这与武海军在拟南芥中研究的结果相似^[13]。

叶绿素是植物进行光合作用的基础, 非生物胁迫往往会对绿色植物的光合结构和光合色素的含量造成一系列不良的影响^[26-27]。在本研究中, 在盐、高氮和甘露醇处理下, 野生型和3个转基因株系叶绿素和类胡萝卜素含量都下降, 但3个转基因株系叶绿素和类胡萝卜素含量都显著高于野生型。表明转基因烟草对于逆境胁迫下叶绿素和类胡萝卜素的降解具有更好的保护作用。

活性氧(Reactive oxygen species, ROS)是细胞正常条件下进行有氧代谢的副产物, 在正常生理条件下, 活性氧的产

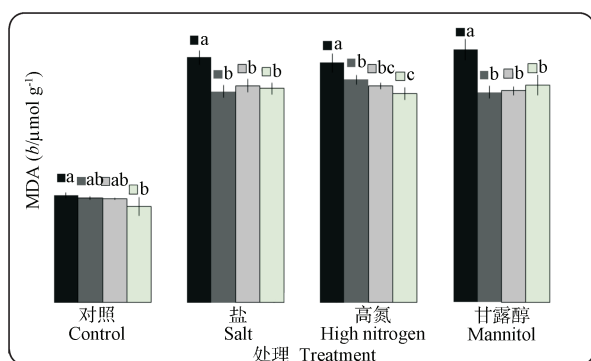


图8 转基因烟草在不同处理下的MDA含量。

Fig. 8 The MDA content of transgenic tobacco under different treatments.

生和消除是一个动态平衡的过程^[28]；但是在逆境胁迫时，植物体内这一平衡将会打破，最终导致植物受到伤害。抗氧化酶系统是植物体内重要的清除自由基的系统，在植物抵御体内抗氧化胁迫过程中起着至关重要的作用。SOD能够清除超氧阴离子自由基 ($O_2^{\cdot-}$)^[29]。POD其主要功能是清除 H_2O_2 和其他羟自由基^[30]。MDA是膜脂质过氧化过程产生的主要产物之一，其含量可以反映脂质过氧化的程度。脂质过氧化通常会破坏膜的稳定性^[31]。本研究3个不同处理后，转基因3个株系的SOD和POD活性都显著高于野生型，其中转基因烟草SOD活性最高是野生型的2.62倍，POD活性最高是野生型的1.43倍，并且转基因烟草3个株系体内MDA含量都显著低于野生型。表明转基因烟草对于体内产生的ROS具有更高效、快速的清除能力，从而降低其膜脂的损伤。

在受到非生物胁迫时，植物可通过产生一系列内源性保护物质来缓解和消除胁迫造成的危害^[32]。脯氨酸、可溶性蛋白和可溶性糖是植物体内重要的渗透保护物质，当受到不良刺激时，他们能够迅速调节胞质中的渗透势从而缓解非生物胁迫对植物细胞的渗透压。本研究中，在盐胁迫、高氮和甘露醇处理下，转基因烟草3个株系的脯氨酸、可溶性蛋白和可溶性糖含量都显著高于野生型。说明在受到3种胁迫时，转基因烟草能够更快地调节胞质的渗透压，从而缓解外界胁迫对植物细胞造成的伤害。

综上所述，烟草异源表达胡杨*PeCPD*基因在正常条件下促进烟草生长，在逆境下能够保持叶片叶绿素含量，同时提高抗氧化酶系统酶的活性，增加了细胞渗透调节能力，降低膜脂过氧化，从而提高了烟草对盐胁迫、高氮和甘露醇的抗性。这可能是异源过表达胡杨*PeCPD*基因增强了烟草内源BR合成的能力，使内源油菜素内酯 (Brassinolide, BL) 升高，从而提高了烟草对盐、高氮和甘露醇胁迫的耐受性。

参考文献 [References]

- He RY, Wang GJ, Wang XS. Effects of brassinolide on growth and chilling resistance of maize seedlings [J]. *Am Chem Soc*, 1991, **474**: 220-230
- Hasan SA, Havat S, Ahmad A. Brassinosteroids protect photosynthetic machinery against the cadmium induced oxidative stress in two tomato cultivars [J]. *Chemosphere*, 2011, **84** (10): 1446-1451
- Kauschmann A, Jessop A, Knocz C, Szekeres M, Willmitzer L, Altmann

- T. Genetic evidence for an essential role of brassinosteroids in plant development [J]. *Plant J*, 1996, **9**: 701-713
- Li J, Nagpal P, Vitart V, Mcmorris TC, Chory J. A role for brassinosteroids in light-dependent development of *Arabidopsis* [J]. *Science*, 1996, **272**: 398-401
- Mussig C. Brassinosteroid -promoted growth [J]. *Plant Biol*, 2005, **7**: 110-117
- Bajguz A, Hayat S. Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2009, **47**: 1-8
- Krishna P. Brassinosteroid-mediated stress responses [J]. *J Plant Growth Regul*, 2003, **22**: 289-297
- Sakamoto T, Matsuoka M. Characterization of constitutive photomorphogenesis and dwarfism homologs in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *J Plant Growth Regul*, 2006, **25**: 245-251
- Ohnishi T, Godza B, Watanabe B, Fujioka S, Hategan L, Ide K, Shibata K, Yokota T, Szekeres M, Mizutani M. CYP90A1/CPD, a brassinosteroid biosynthetic cytochrome P450 of *Arabidopsis*, catalyzes C-3 oxidation [J]. *J Biol Chem*, 2012, **287**: 31551-60
- Szekere M, Németh K, Koncz-Kálmán Z, Mathur J, Kauschmann A, Altmann T, Rédei GP, Nagy F, Schell J, Koncz C. Brassinosteroids rescue the deficiency of CYP90, a cytochrome P450, controlling cell elongation and de-etiolation in *Arabidopsis* [J]. *Cell*, 1996, **85** (2): 171-182
- Mathur J, Molnár G, Fujioka S, Takatsuto S, Sakurai A, Yokota T, Adam G, Voigt B, Nagy F, Maas C, Schell J, Koncz C, Szekeres M. Transcription of the *Arabidopsis CPD* gene, encoding a steroidogenic cytochrome P450, is negatively controlled by brassinosteroids [J]. *P J*, 1998, **14** (5): 593-602
- 张炳. 用胡杨油菜素内酯合成酶基因*PeCPD*转化马铃薯的研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2012 [Zhang B. Studies on transformation of potato with *Populus euphratica* brassinosteroid synthetase gene *PeCPD* [D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2012]
- 武海军. 胡杨油菜素内酯合成酶基因*CPD(PeCPD)*的克隆及功能分析[D]. 兰州: 兰州大学, 2012 [Wu HJ. Cloning and function analysis of *Populus euphratica* brassinosteroids biosynthase gene *CPD (PeCPD)* [D]. LanZhou: Lanzhou University, 2012]
- Horsch RB, Fryj E, Hoffmann NL, Eichholtz D, Rogers SG, Fraley RT. A simple and general method for transferring genes into plants [J]. *Science*, 1985, **227**: 1229-1231
- 刘继恺, 高永峰, 牛向丽, 刘永胜. 番茄*HPI*和*HP2*基因RNA共干涉载体的构建及遗传转化[J]. 应用与环境生物学报, 2009, **15** (5): 591-595 [Liu JK, Gao YF, Niu XL, Liu YX. Construction and transformation of Co-RNAi vector of tomato *HPI* and *HP2* gene [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2009, **15** (5): 591-595]
- Hong XL, Yun PW, Xiao SZ, Gui W, Chao W, Jia F, Tian W. Overexpression of a harpin-encoding gene *popW* from *Ralstonia solanacearum* primed antioxidant defenses with enhanced drought tolerance in tobacco plants [J]. *Plant Cell Rep*, 2016, **35**: 1333-1344
- Hoagland DR, Arnon DI. The water culture method for growing plants without soil [J]. *Galifomia Agric Exp Station Circul*, 1950, **347**: 357-359
- 张宪政. 植物叶绿素含量测定—丙酮乙醇混合液法[J]. 辽宁农业科学, 1986 (3): 26-28 [Zhang XZ. Determination of chlorophyll plant: acetone ethanol mixture method [J]. *Liaoning Agric Sci*, 1986 (3): 26-28]
- 袁晓华, 杨中汉. 植物生理生化实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 1983: 57 [Yuan XH, Yang ZH. Plant Physiological and Biochemical

- Experiments [M]. Beijing: Higher Education Press, 1983: 57]
- 20 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 184 [Li HS. Principles and Techniques of Plant Physiological and Biochemical Experiments [M]. Beijing: Higher Education Press, 2000: 184]
- 21 高俊凤. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 2006: 210 [Gao JF. Plant Physiology Experimental Guide [M]. Beijing: Higher Education Press, 2006: 210]
- 22 Giannoplitis CN, Rie SK. Superoxide dismutases I. Occurrence in higher plants [J]. *Plant Physiol*, 1977, **59**: 309-314
- 23 孙群. 植物生理学研究技术[M]. 杨凌: 西北农林科技大学出版社, 2006: 165-169 [Sun Q. Plant Physiology Research [M]. Yangling: Northwest Agriculture and Forestry University press, 2006: 165-169]
- 24 Yang CJ, Zhang C, Lu YN, Jin JQ, Wang XL. The Mechanisms of brassinosteroids' action: from signal transduction to plant development [J]. *Mol Plant*, 2011, **4**: 588-600
- 25 Sakamoto T, Matsuoka M. Characterization of constitutive photomorphogenesis and dwarfism homologs in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *J Plant Growth Regul*, 2006, **25**: 245-251
- 26 Foyer CH, Furbang RT, Harbinson J, Horton P. The mechanisms contributing to photosynthetic control of electron transport by carbon assimilation in leaves. *Photosynthesis Res*, 1990, **25**: 83-100
- 27 Foyer CH, Neukermans J, Queval G, Noctor G, Harbinson J. Photosynthetic control of electron transport and the regulation of gene expression [J]. *J Exp Bot*, 2012, **63** (4): 1637-1661
- 28 Baxter A, Mittler R, Suzuki N. ROS as key players in plant stress signaling [J]. *J Exp Bot*, 2014, **65** (5): 1229-1240
- 29 Alscher RG, Erturk N, Heath LS. Role of superoxide dismutases (SODs) in control oxidative stress in plants [J]. *J Exp Bot*, 2002, **53**: 1331-1342
- 30 Zhang Q, Zhang JZ, Chow WS, Sun LL, Chen JW, Chen YJ, Peng CL. The influence of low temperature on photosynthesis and antioxidant enzymes in sensitive banana and tolerant plantain (*Musa* sp.) cultivars [J]. *Photosynthetica*, 2011, **49** (2): 201-208
- 31 Kovas V, Gindir OK, Szalai, G, Majath I, Janda T, Pal M. UV-B radiation modifies the acclimation processes to drought or cadmium in wheat [J]. *Environ Exp Bot*, 2014, **100**: 122- 131
- 32 Chen-Tony HH, Murata N. Glycinebetaine: an effective protectant against abiotic stress in plants [J]. *Trends Plant Sci*, 2008, **13** (9): 500-505