

甘蔗 Δ^1 -吡咯啉-5-羧酸合成酶 基因转化烟草的抗旱性分析

李健¹ 杜成忠¹ 王露蓉¹ 邢永秀¹ 李杨瑞² 杨丽涛¹

1. 广西大学农学院/亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 南宁 530005;

2. 广西农业科学院/中国农业科学院甘蔗研究中心/农业部广西甘蔗生物技术与遗传改良重点实验室/
广西甘蔗遗传改良重点实验室, 南宁 530007

摘要 为了分析甘蔗 *P5CS* (sugrcane Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase gene, *SoP5CS*) 基因的抗旱性能, 利用农杆菌介导的叶盘转化法对烟草进行遗传转化, 对拷贝数较低的 4 个转基因株系 (T_1 、 T_4 、 T_6 和 T_9) 进行抗旱性分析。结果显示: 在干旱胁迫下, T_9 株系中 *SoP5CS* 及其编码的蛋白的相对表达量都是最低的, T_1 、 T_4 、 T_6 中 *SoP5CS* 的相对表达量分别是 T_9 的 9.02、3.93 和 8.51 倍, *SoP5CS* 蛋白则分别是 T_9 的 2.22、3.91 和 1.36 倍; 进一步分析发现 T_1 和 T_6 叶片脯氨酸和 ABA 含量相对较高, 且 4 个株系均显著高于对照; MDA 含量则是对照显著高于转基因植株, 其中 T_1 的 MDA 累积量最低; *P5CR* 和 *P5CS* 活性在对照和转基因植株间表现不一, 在 T_1 和 T_4 中, 2 种酶活性均与对照相当, T_6 和 T_9 则是显著高于对照; 对于 CAT 活性, 表现为 T_6 最高, T_1 、 T_4 、 T_9 也显著高于对照; 对于 SOD 活性, 转基因株系均显著比对照高, 其中 T_4 和 T_6 的相对较高; 转基因株系的叶片相对含水量明显高于对照, 叶绿素减少量则低于对照。综合分析发现, T_6 株系的抗旱性表现最好, T_1 株系较好, 表明 *SoP5CS* 基因确实具有较强的抗旱功能。

关键词 甘蔗; *P5CS* 基因; 抗旱性; 转基因烟草

中图分类号 Q 786 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2018)02-0034-09

Δ^1 -吡咯啉-5-羧酸合成酶 (*P5CS*) 是脯氨酸生物合成的关键酶^[1-2]。大量研究发现, 干旱等逆境胁迫可使植物体内的脯氨酸含量急剧增加^[3-7]。甘蔗是重要的糖料和能源作物, 也是很多工业产品的原料来源, 但是中国的甘蔗 80% 以上种植在旱坡地上, 缺乏灌溉条件, 干旱已经成为制约我国甘蔗生产的重要因素^[8]。研究甘蔗 *P5CS* 基因有助于了解植物响应干旱胁迫的分子机制, 为植物的抗旱基因工程研究提供候选基因。

Hu 等^[9] 从豇豆中克隆到高等植物的首个 *P5CS* 基因, 随后, 许多植物的 *P5CS* 基因不断被克隆出来并研究。通过烟草、拟南芥等转基因模式植物的转化研究, 可以从一定程度上揭示外源 *P5CS* 基因的功能。Kishor 等^[2] 将飞蛾豆的 *P5CS* 基因转化烟草进行研究, 发现转基因植株的抗旱性显著

增强。Yamchi 等^[10] 在烟草中过量表达拟南芥的 *P5CS* 基因, 发现在高盐和干旱胁迫下的转基因株系表现出更耐胁迫的特性。陈吉宝等^[11] 将菜豆的 *P5CS* 基因导入烟草, 发现在干旱胁迫下转基因烟草植株的抗旱性得到了增强。Guan 等^[12] 对转化了枸杞 *LcP5CS* 基因的转基因拟南芥进行研究, 发现在干旱胁迫下转基因拟南芥比对照植株表现出极大的耐受性。Ahmed 等^[13] 通过对 *P5CS* 基因进行点突变转化烟草, 获得了耐盐性增强的转基因烟草植株。

大量研究表明, *P5CS* 基因在植物抵御干旱、高盐等逆境胁迫中发挥了重要作用, 并在抗逆基因工程研究中不断得到探讨与证实, 对于进一步揭示 *P5CS* 基因的功能以及调控植物抗逆机制提供了依据。虽然已经从甘蔗中克隆出 *SoP5CS* 基因, 并对

收稿日期: 2017-08-04

基金项目: 国家高技术研究发展计划(“863”计划)课题(2013AA102604); 国际合作项目(2013DFA31600); 广西“八桂学者”和“特聘专家”专项(2013-03); 国家现代农业产业技术体系广西甘蔗创新团队项目(gjnytxgxextd-03); 广西农科院团队项目(桂农科2015YT01)

李健, 博士研究生, 研究方向: 作物生长发育与分子生物学. E-mail: 337375159@qq.com

通信作者: 杨丽涛, 博士, 教授. 研究方向: 甘蔗生理与分子生物学. E-mail: liyr@gxaas.net

其部分片段进行了反义转化烟草研究^[14],但关于完整的甘蔗 *P5CS* 基因转化烟草并从多方面评估转基因烟草的抗旱性还未见报道。本研究构建甘蔗 *P5CS* 基因的植物表达载体并遗传转化烟草,对转基因植株的抗旱生理生化特性及分子生物学进行研究,旨在验证甘蔗 *P5CS* 基因的抗旱功能,为植物抗旱基因工程提供候选基因。

1 材料与方法

1.1 材料

试验在广西大学甘蔗研究所和亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室进行。遗传转化的烟草材料为野生型烟草品种 K346, *SoP5CS* 基因是从甘蔗品种桂糖 21 号(GT21)克隆而得,其序列已经上传至 NCBI,登录号为 KJ546350.1。所用表达载体是由 pCambia3300 改造构建而成的载体 PUBTC^[15],它以玉米 UBI (ubiquitin)启动子驱动、具有除草剂抗性的 *bar* 基因作为抗性筛选标记,所用农杆菌菌株为 EHA105。

1.2 植物表达载体的构建及遗传转化

根据载体酶切位点及目的基因的序列,设计如下引物:*SoP5CSF* (5'-CAGGATCC ATGGCCACCGTG-GACCGGA-3') 和 *SoP5CSR* (5'-CGGAGCTCTTG-CAAAGGAAGGTTCTTATGG-3'),其中下划线的序列分别为添加的 *Bam* H I 和 *Sac* I 酶切位点及其保护碱基。从萌芽约 30 d 的甘蔗幼苗叶片中提取总 RNA,用 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit(Thermo Fisher Scientific)试剂盒反转录合成 cDNA,然后用 PCR 混合液 2× *Taq* MasterMix(康维世纪,北京)进行扩增,程序为:94℃ 3 min;94℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 70 s,35 个循环;最后再 72℃ 延伸 5 min。目的片段经测序正确后用 DNA 连接试剂盒(DNA Ligation Kit Ver.2.1, TaKaRa)与载体进行连接。重组质粒经双酶切及测序验证后转入 EHA105 农杆菌中,参照 Wang 等^[16]的方法通过农杆菌介导的叶盘转化法获得转基因烟草。在分化及生根阶段在培养基中添加 3 mg/L 草丁膦(Phosphinothricin, PPT)进行筛选,待存活的抗性小苗长出完整健康的根系后进行炼苗,随后移栽于一次性培养杯中。并将未进行遗传转化、常规组织培养出来的烟草小苗同步移栽作为对照。

1.3 转基因烟草的 PCR 检测

T₀代转基因植株在移栽约半个月后,成活的烟草植株长出新的完整叶片,此时先对各植株叶片用 0.3% 的除草剂 Basta(上海源叶)进行涂抹,以筛选抗性植株,从显示抗除草剂的植株剪取叶片,提取基因组 DNA,按照康为世纪公司的新型植物基因组 DNA 提取试剂盒(NuClean Plant Genomic DNA Kit)进行操作。以提取的各样品 DNA 为模板进行 PCR,所用引物及反应程序同本文“1.2”。

1.4 转基因烟草的基因拷贝数测定

使用 SYBR Green 荧光染料法对烟草基因组 DNA 进行荧光定量分析以确定外源基因拷贝数,并以烟草中单拷贝的 *RNR2* 为内参基因,设计相应的引物进行荧光定量 PCR。其中内参基因引物为 *RNR2F* (5'-ACCCGTCCTACTGGGAAAC-3') 和 *RNR2R* (5'-TCTAAAACAATGCCGTCTG-3'),扩增产物大小为 92 bp;目的基因引物为 *MDJYF* (5'-AGTGGCAACGGTCTTCTC-3') 和 *MDJYR* (5'-TCAGCGATTTTCATCTCTACTTG-3'),扩增产物大小为 143 bp。荧光定量 PCR 仪为 ABI 7500,所用试剂为 Power qPCR PreMix (GENEray, GK8020)。

通过梯度稀释(10 倍)标准品,计算各梯度标准品所含目的基因拷贝数,对拷贝数与 Ct 值作标准曲线,用 Ct 值和拷贝数的对数作拟合曲线方程,计算各样品目的基因和内参基因的拷贝数,它们的比值即为外源基因的插入拷贝数。

1.5 转基因烟草的抗旱性检测

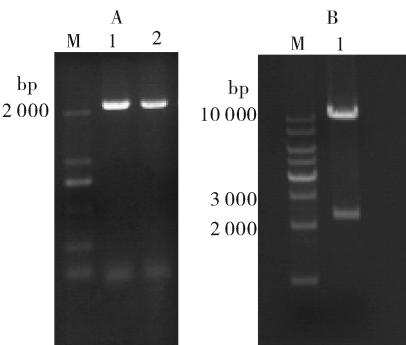
选取拷贝数相对较低的 4 个转基因烟草株系研究过量表达 *SoP5CS* 基因的烟草是否能够增强其抗旱性。对这 4 个烟草株系进行干旱胁迫处理,并以组织培养的非转基因植株作为对照,所有植株均种植于同样规格的营养杯中,待长至株高约 40 cm 时进行干旱胁迫,72 h 后(此时的土壤含水量为 10%~12%)进行取样,样品置于液氮中速冻,然后保存于-80℃超低温冰箱中备用。对样品的相关生理指标,包括丙二醛(MDA)含量、脯氨酸(proline)含量、脱落酸(ABA)含量、过氧化氢酶(CAT)活性、超氧化物歧化酶(SOD)活性、*P5CS* 酶活性、 Δ^1 -吡咯啉-5-羧酸还原酶(*P5CR*)活性、相对含水量、叶绿素相对含量进行测定。叶绿素相对含量采

用便携式叶绿素测定仪测量;采用 qRT-PCR 和 Western blot 分别检测 *SoP5CS* 基因及其编码蛋白在各植株的相对表达量;其余各生理指标均用武汉基因美的酶联免疫分析(ELISA)试剂盒说明书进行测定,所有分析均设 3 次重复。

2 结果与分析

2.1 植物表达载体的构建

以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,扩增产物经 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测得到预期的条带(图 1A)。经测序验证正确的目的片段回收纯化后与 pUBTC 质粒用 *Bam*H I 和 *Sac* I 进行双酶切处理,然后进行胶回收纯化,再根据 DNA Ligation 2.1 连接试剂盒说明书的方法进行连接反应,重组菌液进行 PCR 检测及测序验证正确后提取重组质粒并用 *Bam*H I 和 *Sac* I 进行双酶切验证,结果(图 1B)表明酶切后所得的 2 条带符合 pUBTC 和 *SoP5CS* 的大小,表明植物表达载体 pUBT-*SoP5CS* 构建成功,并将其转化农杆菌备用。



A:*SoP5CS* 的 PCR 扩增,M:DL2000 marker;1~2 为 PCR 产物;B:重组质粒的酶切验证,M:DL10000 marker;1 为酶切产物。A:PCR amplification of *SoP5CS*. M:DL2000 marker; 1-2:Products of PCR; B:Enzyme digestion verification of re-combinant plasmid.M:DL10000 marker; 1:Products of enzyme digestion.

图 1 植物表达载体的构建

Fig.1 Construction of plant expression vector

2.2 转基因烟草的获得

农杆菌侵染的烟草叶片经共培养后置于分化培养基中,数天后叶片逐渐膨大长出愈伤组织(图 2A),经继代培养后分化出不定芽(图 2B)。将较高的不定芽挑出,于含 3 mg/L PPT 的分化筛选培养基上进一步培养,此时未转化成功的植株将逐渐枯死(图 2C)。在 PPT 中完全不受影响且生长正

常的植株再转至含 3 mg/L PPT 的生根筛选培养基进行筛选。正常生长发根的植株长至 6~7 片叶,根系发达时(图 2D)即可进行炼苗并移栽,对照植株也同步进行移栽。移栽后的植株存活并生长稳定(图 2E)后用 0.3% 的除草剂 Basta 涂抹烟草叶片,此时的一些假阳性植株的叶片会逐渐变黄、枯萎(图 2F、G),而那些对于除草剂不敏感的植株即可推定为转化成功的植株。

2.3 转基因烟草的 PCR 检测

经用除草剂 Basta 涂抹叶片筛选后,从推定的转基因植株中选取长势较好的 15 株提取基因组 DNA 进行 PCR 检测,从图 3 可以看出,15 株推定的转基因烟草植株均能检测到目的条带,转化率达到 100%,而作为负对照的非转基因烟草植株则无任何条带。

2.4 转基因烟草的基因拷贝数测定

从 PCR 检测呈阳性的 15 株烟草中,随机挑选 6 株进行拷贝数的测定。首先对引物的特异性进行检验,从图 4 可以看出,所设计的 2 对引物均能扩增出与目的片段大小一致的条带。

目的片段经回收纯化后与克隆载体连接,并经测序验证正确后用该重组质粒构建标准品。通过标准品构建 2 条相应的标准曲线,目的基因(*SoP5CS*)片段和内参基因(*RNR2*)片段的拟合标准曲线方程为: $y = -3.48x + 27.58$ 和 $y = -3.58x + 29.40$,且 R^2 均达 0.999,计算出目的基因和内参基因所对应的值后,它们的比值即为外源插入基因在烟草植株内的拷贝数,结果如表 1 所示,选取的 6 个转基因株系中 *SoP5CS* 的拷贝数不等,分别为 2、11、6、1、8 和 4,而非转基因对照植株则为 0。

表 1 转基因烟草植株 *SoP5CS* 基因的拷贝数

Table 1 Copy numbers of *SoP5CS* gene in transgenic tobacco plants

样品 Sample	目的基因值 Quantity of target gene	内参基因值 Quantity of reference gene	比值 Ratio of quantity	拷贝数 Copy number
T ₁	42.73	19.97	2.14	2
T ₃	262.21	23.47	11.17	11
T ₄	132.03	21.10	6.26	6
T ₆	28.05	19.73	1.42	1
T ₈	159.40	20.12	7.92	8
T ₉	86.54	21.46	4.03	4
CK	0.19	19.18	0	0

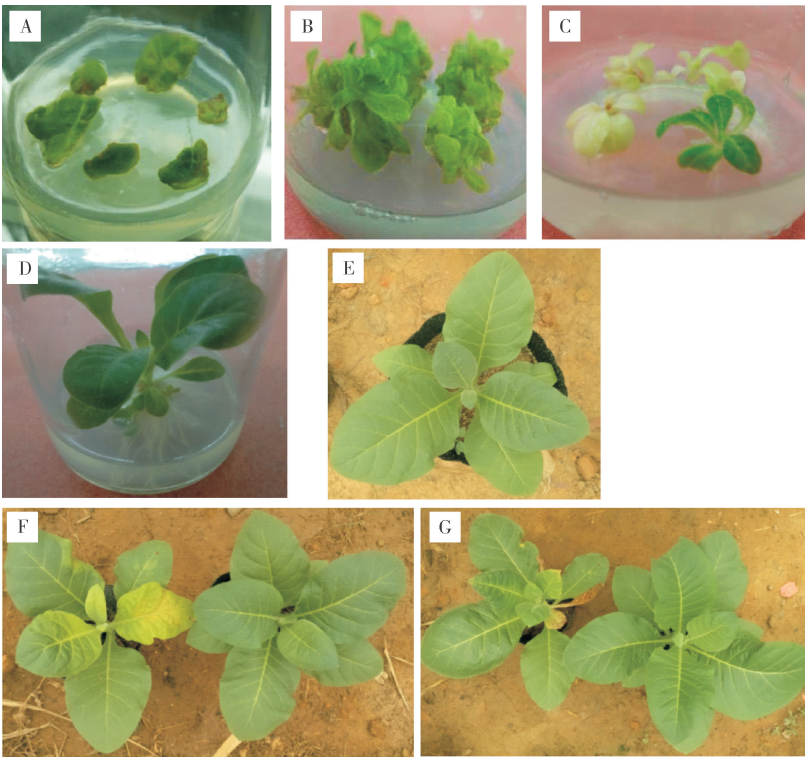
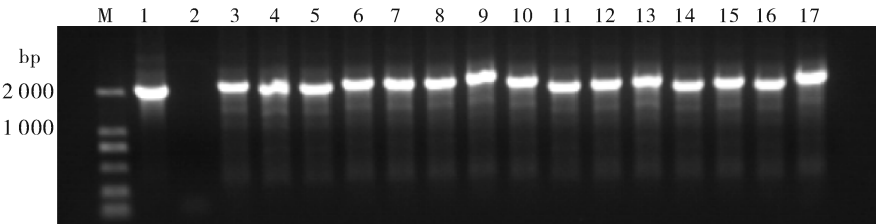


图 2 转基因烟草的获得(A、B、C、D、E)及移栽后的筛选(F、G)

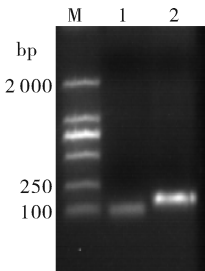
Fig.2 The development of putative transgenic tobacco plants (A,B,C,D,E) and screening with herbicide (Basta) after transplanting (F,G)



M;DL2000 标准；1:正对照(重组质粒 pBUT-SoP5CS)；2:非转基因烟草；3~17:推定的转基因烟草植株。M;DL2000 marker；1;Positive control (pBUT-SoP5CS plasmid)；2;Non-transgenic plants；3-17;Putative transgenic tobacco plants.

图 3 部分转基因烟草的 PCR 检测

Fig.3 PCR detection of putative transgenic tobacco plants



M;DL2000 标准；1:内参基因；2:目的基因。M;DL2000 marker；1;Reference gene；2;Target gene.

图 4 内参基因和目的基因引物的调试

Fig.4 Primers test of reference gene and target gene

2.5 转基因烟草的抗旱性检测

选取拷贝数相对较低的 4 个株系(T₁、T₄、T₆和 T₉)进行干旱胁迫试验,并以组培同步移栽的非转基因植株作为对照,在干旱胁迫 72 h 时对各样品叶片进行取样,运用荧光定量 PCR 和 Western blot 技术分别检测 SoP5CS 及其编码的蛋白在叶片中的相对表达量,同时测定各样品叶片的脯氨酸含量、MDA 含量、ABA 含量、P5CR 活性、P5CS 活性、CAT 活性、SOD 活性、叶片相对含水量以及干旱胁迫前后叶片叶绿素含量 (SPAD 值) 等指标及参数。

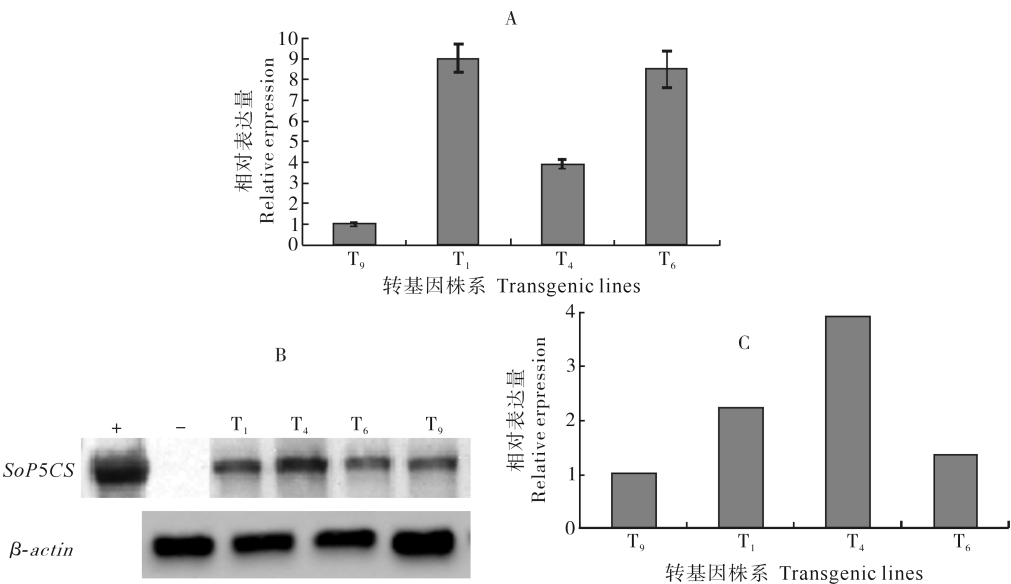
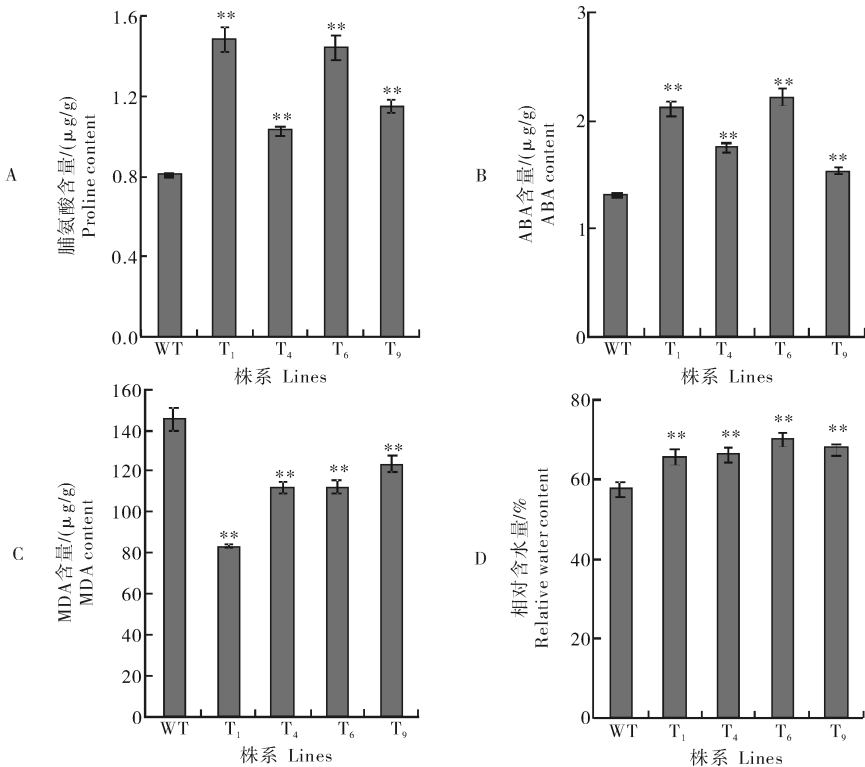


图 5 干旱胁迫下转基因烟草株系叶片中 *SoP5CS* 的相对表达量(A)及其编码蛋白的相对表达量 (B 为 Western blot 结果;C 为 *SoP5CS* 蛋白相对表达量)

Fig.5 Relative expressions of *SoP5CS* (A) and its encoded protein in transgenic tobacco lines under drought stress (B:Results of Western blot; C:Relative expression of *SoP5CS* protein)



* 和 * * 分别表示 WT 和转基因株系间在 $P<0.05$ 和 $P<0.01$ 水平有显著差异,下同。* and * * indicate a significant difference at $P<0.05$ and $P<0.01$, respectively, between WT and transgenic lines,the same as follows.

图 6 干旱胁迫对野生型和 4 个转基因烟草株系叶片中脯氨酸含量(A)、ABA 含量(B)、MDA 含量(C)及相对含水量(D)的影响

Fig.6 Proline content(A) ,ABA content(B) ,MDA content(C) and relative water content(D) in leaves of WT and four tobacco transgenic lines in response to drought stress

qRT-PCR 分析结果(图 5A)表明,在干旱胁迫 72 h 时,当将 *SoP5CS* 表达量最低的株系(T_9)设为 1 时, T_1 、 T_4 、 T_6 中 *SoP5CS* 的相对表达量分别是 T_9 的 9.02、3.93 和 8.51 倍。Western blot 检测结果(图 5B、C)也是 T_9 中 *SoP5CS* 蛋白的表达量最低, T_1 、 T_4 、 T_6 中 *SoP5CS* 蛋白的相对表达量分别是 T_9 的 2.22、3.91 和 1.36 倍。进一步分析发现 T_1 和 T_6 中叶片脯氨酸和 ABA 含量相对较高,且 4 个株系均明显高于对照,与对照的差异达到显著水平(图 6A、B)。4 个转基因株系中的脯氨酸含量比对

照分别上升了 84.27%、27.34%、78.98%和 42.82%; ABA 含量则分别上升了 60.74%、33.09%、68.37% 和 16.93%。MDA 含量则是对照显著高于转基因植株,其中 T_1 的 MDA 积累量是最低的,仅为对照的 57.49%, T_4 、 T_6 、 T_9 则分别为对照的 77.01%、77.26%和 84.84%(图 6C)。对于叶片相对含水量,对照低于 60%,为 57.07%,而 4 个转基因株系分别达到了 65.10%、65.83%、69.40 和 67.00%(图 6D)。对于 SOD 活性,转基因株系均比对照高 20%以上,其中 T_4 和 T_6 相当,分别比对照高 30.80%和 30.99%,

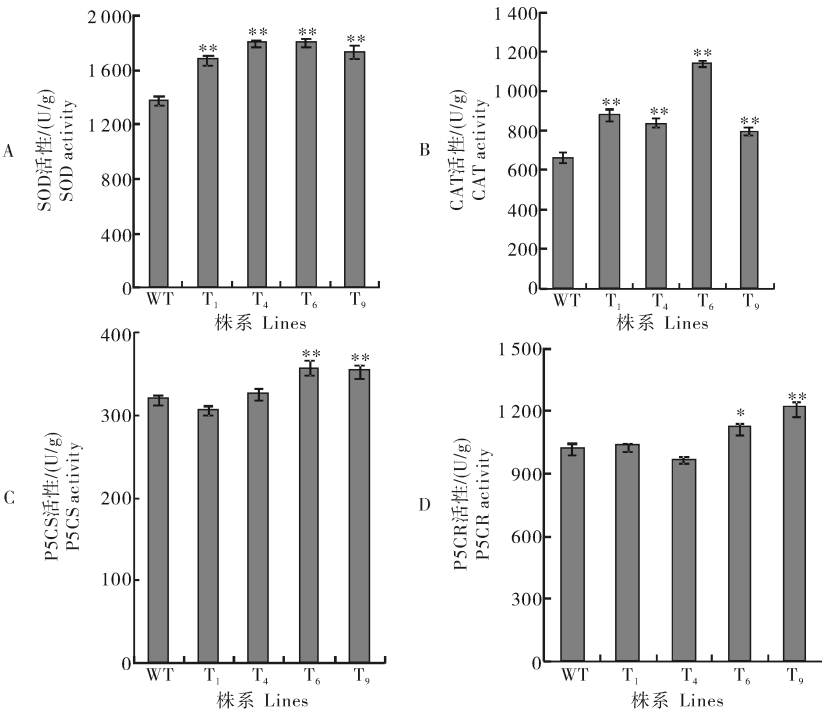


图 7 干旱胁迫对野生型和转基因烟草株系叶片中 SOD 活性(A)、CAT 活性(B)、P5CS 活性(C)及 P5CR 活性(D)的影响
Fig.7 SOD activity (A),CAT activity (B),P5CS activity (C) and P5CR activity (D) in leaves of WT and four tobacco transgenic lines in response to drought stress

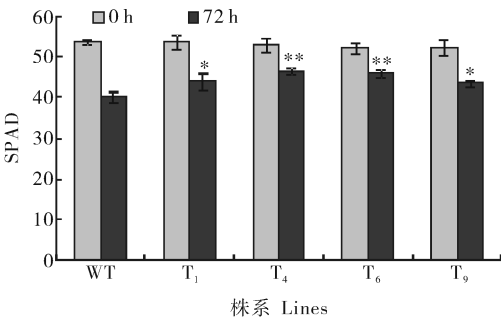


图 8 干旱胁迫对野生型和 4 个转基因烟草株系叶片中 SPAD 值的影响

Fig.8 SPAD value in leaves of WT and four tobacco transgenic lines in response to drought stress

T_1 和 T_9 则分别比对照高 21.75% 和 25.77% (图 7A)。对于 CAT 活性,则是 T_6 最高,比对照上升了 72.03%, T_1 、 T_4 、 T_9 也分别比对照上升了 32.48%、26.73%和 19.61%(图 7B)。P5CR 和 P5CS 活性则在对照和转基因植株间表现不一,在 T_1 和 T_4 株系中,2 种酶的活性均与对照相当, T_6 和 T_9 中则是高于对照,且差异达到显著水平(图 7C、D)。从图 8 中可以看出,干旱胁迫前正常生长的对照和转基因株系叶片的叶绿素含量(SPAD 值)无显著差异,而在胁迫 72 h 时,对照植株叶片的叶绿素含量明显低于转基因植株,其中对照植株在干旱胁迫后叶片叶绿

素含量下降了 24.91%，而转基因株系则分别下降了 18.05%、12.08%、11.99% 和 16.93%。

3 讨 论

作为转基因的模式植物，烟草转基因技术较为成熟。以卡那霉素来筛选的转基因烟草会有不少的假阳性植株^[17-18]，且有一定的转基因生物安全性风险^[19]。本研究采用的载体由玉米 UBI 启动子驱动，并带有抗除草剂的 *bar* 基因，通过层层筛选，大大降低了假阳性植株的出现几率，提高了转化效率。而且 *bar* 基因作为抗性筛选标记基因具有较高的生物安全性^[20]，并广泛应用于植物的遗传转化研究。

传统的转基因外源基因拷贝数的测定采用 Southern blot 技术，该方法能够准确定量外源基因的拷贝数，但也存在步骤繁琐、耗时长、成本高等缺点。近年来，以实时荧光定量 PCR 技术为基础进行的 DNA 定量来测定基因拷贝数在很多植物中得到了应用^[21-23]。一般认为，外源基因以低拷贝的形式整合到受体植物基因组中能够更好地进行表达^[24-25]，而且遗传稳定性也高^[26-27]。本研究以外源的 *SoP5CS* 基因和烟草内源单拷贝 *RNR2* 基因制作标准曲线来测定外源基因在烟草中的拷贝数，并获得了单拷贝或双拷贝外源基因的转基因株系，对各转基因株系进行了初步的筛选，为后续研究打下了基础。

将抗逆性基因转入烟草中，并对转基因烟草植株的抗逆性进行检验是对抗逆基因功能进行研究的一个热点。本研究通过干旱处理分析了外源基因及其编码的蛋白在转基因株系中的表达情况并测定了转基因植株和对照植株叶片相关的生理指标及参数。通过荧光定量分析发现，在选取的几个拷贝数较低的转基因株系中，外源的 *SoP5CS* 基因在 T_9 中的表达量最低，而不是拷贝数更多的 T_4 ，2 个低拷贝的株系则表达量相当，但是双拷贝的 T_1 略高于单拷贝的 T_6 ，这表明外源基因的拷贝数与其表达量没有直接的相关性，这可能与基因的插入位点不同有关^[28]，因为外源基因的活性会因插入位点的不同而受该位点及其旁侧序列的影响^[29]。对转基因拟南芥进行的一些研究发现，干旱胁迫下转基因植株中抗旱相关的外源基因与基因编码蛋白的表达水平较为一致^[30-31]。而本研究中仅是相对表达量最低的

T_9 株系表现为一致，其他株系的表现则与基因的表达水平有较大差异，基因相对表达量较低的 T_4 株系表达的目的蛋白是最多的，这可能与不同基因及其调控的路径存在差异有关，同时也进一步揭示了蛋白表达与基因调控的复杂性。进一步分析转基因株系和对照植株的相关生理生化特性发现，干旱胁迫 72 h 时， T_1 、 T_6 株系积累了更多的脯氨酸和 ABA；MDA 含量则是 T_1 、 T_4 、 T_6 中的较低；P5CR、P5CS 酶活性则无明显大的变化，这可能与转基因植株的综合调控有关；在 CAT 活性、SOD 活性、叶片相对含水量以及叶绿素含量上， T_1 和 T_6 株系均优于其他试验材料。综合各试验结果， T_6 株系的抗旱表现最好， T_1 次之，因此，可以把 T_1 、 T_6 作为优良的转基因烟草候选株系，对其后代做更为深入的分析。本研究对 *SoP5CS* 进行了农杆菌介导的转化烟草研究，通过除草剂的有效筛选、PCR 检测以及拷贝数测定，并对拷贝数较低的 4 个转基因株系进行了抗旱性分析，获得了抗旱性增强的转基因植株，表明 *SoP5CS* 具有较强的抗旱功能，可作为抗旱基因工程研究的候选基因。

参 考 文 献

- [1] DELAUNEY A J, VERMA D P S. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants[J]. Plant journal, 1993, 4: 215-223.
- [2] KISHOR K P B, HONG Z L, MIAO G H, et al. Overexpression of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline overproduction and confers osmotolerance in transgenic plants[J]. Plant physiology, 1995, 108: 1387-1394.
- [3] AZZEME A M, SITI NOR A A, AZIZ M A, et al. Oil palm leaves and roots differ in physiological response, antioxidant enzyme activities and expression of stress-responsive genes upon exposure to drought stress[J]. Acta physiologiae plantarum, 2016, 38: 52.
- [4] DOBRÁ J, VANKOVÁ R, HAVLOVÁ M, et al. Tobacco leaves and roots differ in the expression of proline metabolism-related genes in the course of drought stress and subsequent recovery[J]. Journal of plant physiology, 2011, 168: 1588-1597.
- [5] GOMES F P, OLIVA M A, MIELKE M S. Osmotic adjustment, proline accumulation and cell membrane stability in leaves of *Cocos nucifera* submitted to drought stress[J]. Scientia horticulturae, 2010, 126: 379-384.
- [6] HILL W, JIN X L, ZHANG X H. Expression of an arctic chickweed dehydrin, CarDHN, enhances tolerance to abiotic stress in tobacco plants[J]. Plant growth regulation, 2016, 80: 323-334.

- [7] KISHOR P B K, SANGAM S, AMRUTHA R N, et al. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance[J]. Current science, 2005, 88: 424-428.
- [8] LI Y R, YANG L T. Sugarcane agriculture and sugar industry in China[J]. Sugar Tech, 2015, 17(1): 1-8.
- [9] HU C A A, DELAUNEY A J, VERMA D P S. A bifunctional enzyme (Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase) catalyzes the first two steps in proline biosynthesis in plants[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1992, 89: 9354-9358.
- [10] YAMCHI A, JAZII F R, MOUSAVI A, et al. Proline accumulation in transgenic tobacco as a result of expression of *Arabidopsis* Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS) during osmotic stress[J]. Journal of plant biochemistry and biotechnology, 2007, 16: 9-15.
- [11] 陈吉宝. 普通菜豆 P5CS 基因的克隆、功能验证及单核苷酸多态性[D]. 北京: 中国农业科学院, 2008.
- [12] GUAN C F, JI J, GUAN W Z, et al. A *Lycium chinense*-derived P5CS-like gene is regulated by water deficit-induced endogenous abscisic acid and overexpression of this gene enhances tolerance to water deficit stress in *Arabidopsis* [J]. Molecular breeding, 2014, 34: 1109-1124.
- [13] AHMED A A M, ROOSENS N, DEWAELE E, et al. Overexpression of a novel feedback-desensitized Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline accumulation and confers salt tolerance in transgenic *Nicotiana glauca* [J]. Plant, cell, tissue and organ culture, 2015, 122: 383-393.
- [14] 黄诚梅. 甘蔗脯氨酸积累与 Δ^1 -吡咯琳-5-羧酸合成酶(ScP5CS)基因克隆及转化研究[D]. 南宁: 广西大学, 2007.
- [15] 冯翠莲, 刘晓娜, 张树珍, 等. *CryIA(c)* 基因植物表达载体的构建及转基因甘蔗的获得[J]. 热带作物学报, 2010, 31(7): 1103-1108.
- [16] WANG S, ZHANG K K, HUANG X, et al. Cloning and functional analysis of thylakoidal ascorbate peroxidase (*TAPX*) gene in sugarcane[J]. Sugar Tech, 2015, 17(4): 356-366.
- [17] 厚毅清, 李忠旺, 石有太, 等. 大规模转基因彩色棉花后代筛选方法研究[J]. 中国棉花, 2012, 39(4): 22-25.
- [18] RENCKENS S, DE GREVE H, VAN MONTAGU M, et al. Petunia plants escape from negative selective against a transgene by silencing the foreign DNA via methylation[J]. Molecular genetics and genomics, 1992, 233: 53-64.
- [19] 王紫萱, 易自力. 卡那霉素在植物转基因中的应用及其抗性基因的生物安全性评价[J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23(6): 9-13.
- [20] 林鸿生, 华志华, 张祥喜, 等. *bar* 基因在杂交水稻制种中的应用及其安全性分析[J]. 江西农业学报, 2000, 12(2): 6-10.
- [21] 黄建平, 熊立仲. 水稻低温应答基因 *OsLCL3* 的分离与功能鉴定[J]. 华中农业大学学报, 2016, 35(2): 1-9.
- [22] 王盛, 谢芝勋, 谢丽基, 等. 转基因烟草中外源基因实时荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 南方农业学报, 2015, 46(5): 745-749.
- [23] 庄强, 钱程, 刘立. SYBR Green 实时定量 PCR 检测外源基因拷贝数[J]. 浙江理工大学学报, 2010, 27(1): 125-129.
- [24] FLAVELL R B. Inactivation of gene expression in plants as a consequence of specific sequence duplication[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1994, 91: 3490-3496.
- [25] VAUCHERET H, BECLIN C, ELMAYAN T, et al. Transgene-induced gene silencing in plants[J]. Plant journal, 1998, 16(6): 651-659.
- [26] CHENG M, FRY J E, PANG S, et al. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Plant physiology, 1997, 115 (3): 971-980.
- [27] ISHIDA Y, SAITO H, OHTA S, et al. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Nature biotechnology, 1996, 14(6): 745-750.
- [28] 罗滨, 陈永康, 王莹. 植物外源基因拷贝数及插入位点的检测方法与技术[J]. 河南师范大学学报(自然科学版), 2012, 40(6): 111-116.
- [29] CHANDLER V L, VAUCHERET H. Gene activation and gene silencing[J]. Plant physiology, 2001, 125(1): 145-148.
- [30] LI D K, WANG X Y, YUAN D Z, et al. Over-expression of *Arabidopsis* *EULS3*, confers ABA sensitivity and drought tolerance in *Arabidopsis* [J]. Plant cell, tissue and organ culture, 2014, 117: 431-442.
- [31] WANG F, TONG W, ZHU H, et al. A novel Cys₂/His₂ zinc finger protein gene from sweetpotato, *IbZFP1*, is involved in salt and drought tolerance in transgenic *Arabidopsis* [J]. Plant, 2016, 243: 783-797.

Drought resistance of transgenic tobacco with sugarcane Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthase (*SoP5CS*) gene

LI Jian¹ DO Thanhtrung¹ WANG Lurong¹ XING Yongxiu¹ LI Yangrui² YANG Litao¹

1.Agricultural College,State Key Laboratory of Conservation and Utilization of Subtropical Agro-bioresources,Guangxi University,Nanning 530005,China ;

2.Guangxi Academy of Agricultural Sciences/Sugarcane Research Center,Chinese Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Sugarcane Biotechnology and Genetic Improvement (Guangxi),Ministry of Agriculture/Guangxi Key Laboratory of Sugarcane Genetic Improvement,Nanning 530007,China

Abstract In order to analyze the drought resistance of sugarcane Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthase gene (*SoP5CS*),*SoP5CS* was transformed into tobacco using *Agrobacterium*-mediated leaf discs method. Four transgenic tobacco lines with low copy numbers were screened for drought stress experiment. The results showed that both the relative expression levels of *SoP5CS* and its encoded protein were the lowest in T₉ transgenic tobacco line under drought stress.Compared with T₉,the relative expression level of *SoP5CS* in T₁,T₄ and T₆ lines were 9.02-fold,3.93-fold and 8.51-fold while the protein level of *SoP5CS* in T₁,T₄ and T₆ lines was 2.22-fold,3.91-fold and 1.36-fold,respectively.Results of further analyses showed that the contents of proline and ABA in the four transgenic lines were all significantly higher than those in the control.The contents of proline and ABA in T₁ and T₆ lines were higher than those in the other two lines. The MDA content in the control was significantly higher than that of the transgenic plants.The accumulation of MDA was the lowest in T₁ line. The P5CR and P5CS activities were different between the control and transgenic plants.The activities of both enzymes in T₁ and T₄ lines were nearly the same as those in the control,significantly higher than those in T₆ and T₉ lines. The CAT activity was the highest in T₆ line,which in the other transgenic lines significantly higher than that of the control. SOD activity in all the transgenic lines was significantly higher than that in the control, with which in T₄ and T₆ lines being relatively higher. The relative water content in the leaves of the transgenic lines was significantly higher than that in the control,while the chlorophyll reduction was lower. The result of RA comprehensive analysis showed that the drought resistance of T₆ line was the best,followed by the T₁ line,indicating that drought resistance of *SoP5CS* gene is strong.

Keywords sugarcane; *P5CS* gene; drought resistance; transgenic tobacco

(责任编辑:张志钰)