

网络出版时间:2013-12-25 13:19

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.01.009

网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.01.009.html

胡杨 *PeXTH* 基因的克隆及其转基因烟草的 抗镉性分析

韩彦莎,鲁彦君,于 瑞,赵 瑞,沈 昕,陈少良

(北京林业大学 生物科学与技术学院,北京 100083)

【摘 要】 【目的】克隆胡杨木葡聚糖内转糖苷酶/水解酶基因 *PeXTH*,并研究该基因和植物抗 Cd^{2+} 性之间的关系。【方法】利用 RT-PCR 方法从胡杨中克隆一个木葡聚糖内转糖苷酶/水解酶基因 *PeXTH*,将该基因的全长 cDNA 克隆到植物表达载体 pGreen0029 上,然后通过农杆菌介导法,将重组表达载体转入烟草,并对转基因烟草的抗 Cd^{2+} 能力进行初步分析。【结果】*PeXTH* 基因的开放阅读框(ORF)长 867 bp,含 ATG 起始密码子和 TAG 终止密码子,编码由 288 个氨基酸组成的蛋白;多重氨基酸序列比对结果显示,*PeXTH* 蛋白含有木葡聚糖内转糖苷酶/水解酶(XTHs)的保守催化活性域 DEIDFEFLG 和 N-糖基化位点 NLSG;Real-Time PCR 检测结果表明,*PeXTH* 基因已经成功在 2 个转基因株系(L6 和 L14)中过表达; Cd^{2+} 胁迫后,转基因烟草根组织中积累的 Cd^{2+} 含量显著高于野生型,而叶组织中积累的 Cd^{2+} 含量明显低于野生型; Cd^{2+} 胁迫下,转基因烟草叶片的相对电导率显著低于野生型,但抗氧化酶活性、营养元素含量、叶片净光合速率和蒸腾速率等生理指标都要明显高于野生型。【结论】*PeXTH* 基因的过表达提高了烟草对 Cd^{2+} 的抗性,为进一步深入研究 *PeXTH* 基因在植物抗 Cd^{2+} 机制中的作用奠定了良好基础。

【关键词】 胡杨;烟草;*PeXTH*; Cd^{2+} ;抗 Cd^{2+} 性

【中图分类号】 S722.3⁺6;Q785

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2014)01-0037-09

Cloning of *Populus euphratica* *PeXTH* gene and its effect on Cd^{2+} tolerance of transgenic tobacco

HAN Yan-sha, LU Yan-jun, YU Rui,
ZHAO Rui, SHEN Xin, CHEN Shao-liang

(College of Biological Sciences and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract: 【Objective】 The aim of this study was cloning a putative xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase gene (*PeXTH*) of *Populus euphratica* and analyzing its role in Cd^{2+} tolerance of transgenic tobacco plants. 【Method】 The *PeXTH* gene was isolated from *Populus euphratica* leaves by RT-PCR. The full-length cDNA of *PeXTH* was cloned into the expression vector pGreen0029, and then the recombinant pGreen0029-*PeXTH* was transferred into tobacco plants through *Agrobacterium*-mediated method. Anti- Cd^{2+} characters of the transgenic lines were analyzed. 【Result】 The *PeXTH* gene contained an open reading frame of 867 bp encoding a putative protein with 288 amino acids with the start codon of ATG and the termination codon of TAG. The putative amino acids sequence of *PeXTH* contained the conserved DEI-

【收稿日期】 2013-01-25

【基金项目】 国家自然科学基金项目(31270654,31170570,31200470);北京市自然科学基金项目(6112017);北京市优秀博士学位论文指导教师专项基金项目(YB20081002201);高等学校学科创新引智计划项目(B13007);中央高校基本科研业务费专项(JC2011-2,TD-2012-04)

【作者简介】 韩彦莎(1987—),女,山西忻州人,在读博士,主要从事林木抗逆生理与分子生物学研究。

E-mail:hanyansha1986@163.com

【通信作者】 陈少良(1969—),男,河北霸州人,教授,博士,博士生导师,主要从事林木抗逆生理与分子生物学研究。

E-mail:lschen@bjfu.edu.cn

DFEFLG domain and the N-glycosylation motif NLSG. Real-Time PCR analysis showed *PeXTH* gene was overexpressed in two transgenic tobacco lines. Compared to wild plants, transgenic tobacco had higher Cd^{2+} concentrations in roots and lower Cd^{2+} concentrations in leaves. Under Cd^{2+} stress, the relative electrolytic leakage in leaves of transgenic plants was significantly lower than that of wild plants, while antioxidant enzyme activities, nutrient element contents, net photosynthetic rates and transpiration rates in leaves of transgenic tobacco plants were significantly higher. 【Conclusion】 Overexpression of *PeXTH* enhanced Cd^{2+} tolerance of tobacco plants.

Key words: *Populus euphratica*; tobacco; *PeXTH*; Cd^{2+} ; Cd^{2+} tolerance

近年来,随着化工产业的高度发展及其废弃物的管理不善,土壤重金属污染问题日益严重。镉(Cd)是一种有害的重金属元素,能够经食物链进入人体,直接危害人类健康。 Cd^{2+} 易被植物吸收,通过降低净光合速率、引发氧化胁迫、干扰营养代谢等生理过程来抑制植物生长,甚至导致植物死亡^[1]。如何解决土壤 Cd^{2+} 污染问题、缓解 Cd^{2+} 对植物的毒害作用越来越受到人们的关注。为此,许多研究者开始从分子生物学角度,通过导入外源基因来提高不同植物的抗 Cd^{2+} 能力。Zhu 等^[2]首次将大肠杆菌中的谷胱甘肽合成酶基因 *gshII* 转入印度芥菜(*Brassica juncea*)中,发现印度芥菜地上部分的 Cd^{2+} 含量增加,同时 Cd^{2+} 耐受性增强。Pomponi 等^[3]将拟南芥螯肽合成酶基因 *AtPCS1* 转入烟草,提高了烟草的抗 Cd^{2+} 能力。Liu 等^[4]也报道,过表达金属硫蛋白基因能够有效提高烟草对 Cd^{2+} 的耐受性。

细胞壁是外界 Cd^{2+} 进入植物细胞的第一道屏障,也是植物储存 Cd^{2+} 的关键场所,因此在植物的抗 Cd^{2+} 过程中起着重要作用^[5-6]。Nishizono 等^[7]报道,蹄盖蕨(*Athyrium yokoscense*)根部所吸收的 Cd^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 等有 70%~90% 积累在根尖的细胞壁中。He 等^[8]的研究结果也显示,水稻细胞壁结合的 Cd 占所吸收 Cd 总量的 55%~62%。但迄今为止,对于细胞壁在植物抗 Cd^{2+} 机制中具体作用的研究仍然为数不多。木葡聚糖内转糖苷酶/水解酶(Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase, XTH)是植物细胞壁重构过程中的关键酶,它能够通过催化木葡聚糖的断裂和重连来修饰植物细胞壁中纤维素-木葡聚糖的复合结构,从而实现细胞壁的松弛和伸展^[9-12]。目前,对 XTH 基因的功能研究主要集中在植物初生根伸长^[13]、开花^[14]、果实成熟^[15-16]、木材发育^[17]等方面。作为细胞壁代谢过程中的关键基因,XTH 在植物抗 Cd^{2+} 机制中的作用至今尚未见报道。胡杨作为一种唯一能够在我国西

北干旱盐碱地带形成森林的高大乔木树种,一直以来都是进行木本植物抗逆研究的典型材料。本研究将从胡杨中克隆得到的木葡聚糖内转糖苷酶/水解酶基因 *PeXTH* 成功导入烟草,通过比较转基因植株和野生型植株在 Cd^{2+} 胁迫下的各项生理生化指标,探究 *PeXTH* 基因和植株抗 Cd^{2+} 性之间的关系,为利用胡杨 *PeXTH* 基因改良植物新品种提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

克隆基因所用的胡杨苗取自新疆,栽于 10 L 塑料桶中,培养基质为沙土(土沙质量比为 1:1),在北京林业大学温室中培养,温室中的温度保持在 20~25 ℃,光周期为 12 h 光照/12 h 黑暗。转基因所用的烟草品种为 *Nicotiana tabacum* cv. Wisconsin 38,由中国科学院遗传与发育研究所胡赞民研究员惠赠。

质粒 pGreen0029、菌株 *Escherichia coli* Top10、*Agrobacterium* LBA4404,均由本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 胡杨 *PeXTH* 全长基因的克隆 使用 Trizol 法提取胡杨叶片总 RNA,利用 M-MLV 逆转录酶(Promega,美国)进行反转录合成 cDNA。以胡杨 cDNA 为模板,根据 NCBI 网站检索的毛果杨 *PtXTH* 全长基因(XM_002318900)序列设计引物,进行 PCR 扩增。正向引物序列为 GGTCCCAC-CTCCGAGCTTCC(5'-3');反向引物序列为 GA-CAGGTAATGCAAGGACG(5'-3')。PCR 反应体系为:1 μL cDNA、2 μL dNTP 混合物(2.5 mmol/L)、1 U Ex Taq 聚合酶(Takara,大连)、2.5 μL 10× Ex Taq 缓冲液、正反向引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 0.5 μL 。PCR 反应条件为:95 ℃ 5 min;94 ℃ 30 s,56 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min(35 个循环);72 ℃ 10

min。扩增产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳后,用凝胶回收试剂盒(天根,北京)回收纯化 DNA 片段。将目的片段连接到 pEASY-T1 载体(全式金,北京)后,把连接产物转化大肠杆菌 Top10 感受态细胞,挑取单克隆进行 PCR 鉴定,选阳性单克隆测序,测序结果在 NCBI 网站上进行比对。

1.2.2 *PeXTH* 蛋白序列分析 在 NCBI 网站上通过 Blastp 检索不同植物中 *PeXTH* 的同源蛋白序列。通过在线服务网站 SignalP 4.0 预测 *PeXTH* 蛋白的信号肽。利用 Bioedit Sequence Alignment Editor V7.0 软件,通过 Clustal W 方法进行多重氨基酸序列比对。

1.2.3 植物表达载体 pGreen0029-*PeXTH* 的构建

通过 PCR 的方法扩增得到两端分别带有 *Bam*H I 和 *Spe* I 酶切位点的 *PeXTH* 全长基因,正向引物序列为 CGCGGATCCATGGCTTCATCGAGTACTG (5'-3'),反向引物序列为 GGACTAGTCTAGGACATGCCGCATT (5'-3')。将扩增产物克隆到中间载体 pEASY-T1 上,用 *Bam*H I 和 *Spe* I 双酶切中间载体后,将目的片段连接到经同样酶切后的 pGreen0029 上,获得重组表达载体 pGreen0029-*PeXTH*。将重组表达载体转化大肠杆菌 Top10 感受态细胞,挑取单克隆测序,并提取重组质粒 pGreen0029-*PeXTH*,用 *Bam*H I 和 *Spe* I 双酶切来鉴定表达载体是否构建成功。

1.2.4 植物表达载体 pGreen0029-*PeXTH* 转化农杆菌 利用冻融法^[18]将重组表达载体 pGreen0029-*PeXTH* 转入农杆菌 LBA4404 感受态细胞中,然后选取成功转化的农杆菌,通过叶盘法^[19]侵染烟草 (*Nicotiana tabacum* cv. Wisconsin 38) 嫩叶。经 300 mg/L 卡那霉素筛选,获得阳性转基因烟草株系,并通过 Real-Time PCR 的方法验证 *PeXTH* 基因是否在植株中过表达。烟草在北京林业大学组培室中培养,温度为 (25±1) °C,光照强度为 50 μmol/(m²·s),光周期为 16 h 光照/8 h 黑暗,相对湿度为 50%~60%。

1.2.5 Real-Time PCR 通过 Real-Time PCR 的方法检测烟草中 *PeXTH* 基因的表达水平。由于胡杨 *PeXTH* 基因和烟草 *NtXTH* 基因高度同源,所以必须在 2 个基因序列的非同源区设计引物来保证 PCR 的特异性,所用引物序列为 PeF:AAAGGGTC TGCGTGGGATG(5'-3');PeR:CGGGAGGAGAA GTGGTTG(5'-3')。对转基因烟草和野生型烟草的叶和根组织提取总 RNA(每个样本设 3 个重复),

利用 DNA 酶(Promega,美国)进行去 DNA 处理,然后利用 M-MLV 逆转录酶(Promega,美国)进行反转录合成 cDNA。Real-Time PCR 反应使用 SYBR Green 试剂盒(Bio-Rad,美国),以植物材料的 cDNA 为模板,在 Real-Time PCR 仪(Bio-Rad,美国)中扩增。*EF1α*(基因号:D63396)作为内参基因,所用引物序列为 EFF:GCTGTGAGGGACAT GCGTCAAA(5'-3');EFR:GTAGTAGATATCG-CGAGTACCACCA(5'-3')。PCR 反应条件为:95 °C 5 min;94 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C 30 s(35 个循环);72 °C 10 min。

1.2.6 烟草抗 Cd²⁺ 表型比较 选取 2 个 T₁ 代转基因烟草株系(L6 和 L14)以及野生型株系(WT)进行后期的生理试验。将这 3 个株系的 T₁ 代种子用 2.5% 次氯酸钠消毒后,在含 300 mg/L 卡那霉素的 1/2 MS 培养基上萌发。10 d 后,将萌发的幼苗转移到新鲜 MS 培养基上继续培养。20 d 后,将组培苗从培养瓶中移出,转入 1/4 Hoagland 营养液中水培,适应 7 d 后,再转入分别含有 0 和 100 μmol/L CdCl₂ 的新鲜 Hoagland 营养液中继续水培。5 d 后,观察植株叶和根的生长表型并拍照,然后取下植株的叶和根,测定根长,在 65 °C 烘箱中干燥 48 h 至完全失水,称取干质量,每个样本设 3 个重复。

1.2.7 相对电导率的测定 以未处理(0)和经 100 μmol/L CdCl₂ 处理 5 d 的野生型(WT)和转基因(L6、L14)烟草为材料,根据 Lutts 等^[20]的方法,取烟草叶片用去离子水清洗 3 次,然后用打孔器将叶片打成等面积的小圆片。取 20 个叶圆片放入含有 20 mL 去离子水的试管中,期间不停晃动试管,防止叶圆片彼此粘连。1 h 后,用 DDSJ-308A 电导率仪(雷磁,上海)测定溶液电导值(*L_t*);然后将样品煮沸 20 min 后测定溶液电导值(*L₀*),相对电导率定义为 *L_t*/*L₀*。每个样本设 3 个重复。

1.2.8 Cd²⁺、K⁺、Ca²⁺、Mg²⁺ 含量的测定 以未处理(0)和经 100 μmol/L CdCl₂ 处理 15 d 的野生型(WT)和转基因(L6、L14)烟草的叶和根为材料,充分烘干研磨过筛后,称取 0.2 g 干粉于 50 mL 玻璃试管中,加入 5 mL 浓硫酸消煮 2 h,冷却后用双蒸水定容至 50 mL。利用 Perkin-Elmer 2280 原子吸收光谱仪(PerkinElmer,美国)测定烟草叶组织中 K⁺、Ca²⁺、Mg²⁺ 的含量;利用 AA-240 型石墨炉原子吸收光谱仪(瓦里安,美国)测定烟草叶和根组织中的 Cd²⁺ 含量。每个样本设 3 个重复。

1.2.9 抗氧化酶活性的测定 酶液提取:以未处理

(0) 和经 100 $\mu\text{mol/L}$ CdCl_2 处理 15 d 的野生型 (WT) 和转基因 (L6、L14) 新鲜烟草叶片为材料, 测定超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT)、抗坏血酸过氧化物酶 (APX) 的活性, 每个样本设 3 个重复。称取 0.5 g 新鲜烟草叶片, 置于预冷的研钵中, 加入 3 mL 预冷的磷酸缓冲液 (pH 7.0) 和少许石英砂在冰上研磨成匀浆, 然后定容到 10 mL 容量瓶, 混合均匀后在 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心机中 10 000 r/min 离心 20 min, 上清液即为酶粗提液, 用于后续酶活性的测定。

(1) SOD 活性测定。SOD 活性测定参照 Schickler 等^[21] 的方法。反应体系为 1.79 mL 磷酸钾缓冲液 (50 mmol/L, pH 7.8)、0.3 mL 甲硫铵酸 (130 mmol/L)、0.3 mL 氮蓝四唑 (NBT, 750 $\mu\text{mol/L}$)、0.3 mL EDTA- Na_2 (100 $\mu\text{mol/L}$)、0.3 mL 核黄素 (20 $\mu\text{mol/L}$)、10 μL 酶粗提液。对照以 10 μL 磷酸缓冲液替代。取 10 mL 透光好的试管 4 支, 2 支对照管、2 支测定管 (各管的透光尽量一致), 将反应溶液混合均匀后, 把 1 支对照管放在暗处, 其他 3 支置于 4 000 lx (30 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$) 日光灯下反应 6 min, 然后在 560 nm 比色, 记录吸光度, 一个 SOD 单位定义为引起 50% NBT 光还原所需的酶量。

(2) CAT 活性测定。CAT 活性测定参照李妮亚^[22] 的方法。反应体系为 2.47 mL 磷酸钾缓冲液 (50 mmol/L, pH 7.0)、0.5 mL 2% H_2O_2 溶液、30 μL 酶粗提液。加入酶液后启动反应, 240 nm 下吸光度下降的初始直线部分被用于计算酶的活性。

(3) APX 活性测定。APX 活性测定参照李妮亚^[22] 的方法。3 mL 反应混合液中含 50 mmol/L 磷酸钾缓冲液 (pH 7.0)、0.1 mmol/L EDTA- Na_2 、0.3 mmol/L ASA、0.06 mmol/L H_2O_2 、30 μL 酶粗提液。加 H_2O_2 后启动反应, 290 nm 下吸光度下降的初始直线部分被用于计算酶的活性。

1.2.10 净光合速率和蒸腾速率的测定 以未处理 (0) 和经 100 $\mu\text{mol/L}$ CdCl_2 处理 15 d 的野生型 (WT) 和转基因 (L6、L14) 烟草为材料, 利用 LI-6400 光合仪 (Li-Cor, 美国) 测定烟草叶片的净光合速率和蒸腾速率。每个样本设 3 个重复。

2 结果与分析

2.1 胡杨 *PeXTH* 全长基因的克隆和 *PeXTH* 蛋白的序列分析

以胡杨叶片 cDNA 为模板, 通过 RT-PCR 的方

法克隆得到 *PeXTH* 全长 cDNA, 将其连接到 pEASY-T1 载体上, 再转化到 Top10 感受态细胞, 挑取阳性单克隆测序, 并利用 NCBI 进行序列比对, 确证为胡杨 *PeXTH* 基因。该基因的开放阅读框长 867 bp, 含 ATG 起始密码子和 TAG 终止密码子, 编码由 288 个氨基酸组成的多肽。

利用 NCBI 网站的蛋白质序列数据库, 通过 Blastp 程序在杂交山杨 (*Populus tremula* L. $\times$ *P. tremuloides*)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、蓖麻 (*Ricinus communis*)、玉米 (*Zea mays*)、小麦 (*Triticum aestivum*) 等植物中找到 5 个 *PeXTH* 的同源蛋白序列, 分别是 PttXTH16 (ABM91073)、AtXTH24 (NP_194756)、RcXTH (XP_002526228)、ZmXTH4 (NP_001130486)、TaXTH5 (AAT94297)。它们和 *PeXTH* 的同源性都在 68%~99%, 体现了 *PeXTH* 在进化上的高度保守性。多重氨基酸序列比对结果显示, *PeXTH* 预测蛋白含有 2 个高度保守的结构域, 一个是木葡聚糖内转糖苷酶/水解酶 (XTHs) 的催化活性域 DEIDFEFLG^[23], 一个是紧跟着催化活性域的 N-糖基化位点 NLSG; 此外, *PeXTH* 还具有由 24 个氨基酸组成的 N 端信号肽序列 (图 1)。

2.2 转基因烟草的获得和鉴定

将重组表达载体 pGreen0029-*PeXTH* 经酶切鉴定后导入农杆菌 LBA4404 中, 利用农杆菌介导法转化烟草。经过 4 周的分化培养, 在烟草的叶盘边缘长出抗性再生芽, 待再生芽长至 1 cm 长时转入生根培养基上继续生根, 从而获得 10 株抗性再生苗。提取这 10 株再生苗的基因组 DNA 进行 PCR 检测, 得到 5 个含 *PeXTH* 基因的株系, 它们的扩增条带与阳性对照大小一致 (均为 900 bp 左右), 而野生型烟草株系没有扩增出该条带 (图 2), 初步说明 *PeXTH* 基因已成功转入烟草中。

进一步收取这 5 个转基因株系的 T_1 代种子, 并选择其中 2 个株系 (L6 和 L14) 进行后续研究。提取这 2 个株系叶和根组织中的总 RNA, 通过 Real-Time PCR 的方法检测叶和根组织中 *PeXTH* 的表达水平, 结果见图 3。由图 3 可以看出, L6 和 L14 转基因株系叶组织中的平均 *PeXTH* 表达量分别是野生型株系的 43 和 47 倍, 根组织中的平均 *PeXTH* 表达量分别是野生型的 44 和 57 倍, 说明 *PeXTH* 基因已经成功在这 2 个转基因株系中过表达。

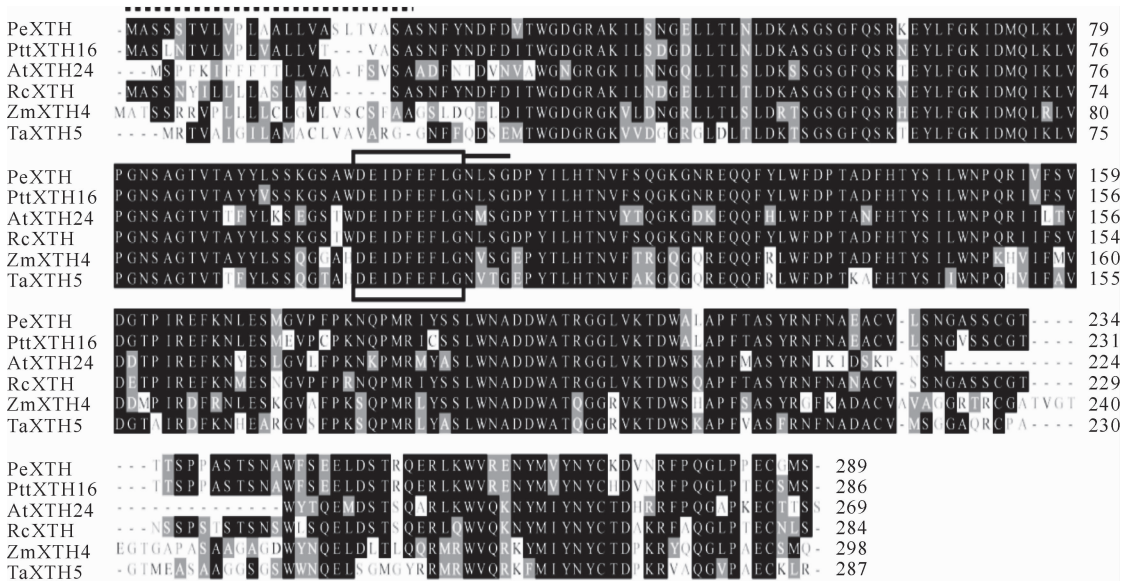


图 1 *PeXTH* 和来自不同植物的 XTH 蛋白的多重序列比对

黑色和灰色分别代表氨基酸的一致性和相似性;方框和短实线分别标注的是 XTHs 的催化活性域 DEIDFEFLG 和 N-糖基化位点 NLSG;虚线标注的 24 个氨基酸是预测的 N 端信号肽序列

Fig. 1 Multiple sequence alignment of *PeXTH* and XTHs from other plants

Dark and grey boxes refer to identity and similarity of amino acids, respectively;Boxed residues indicate the conserved DEIDFEFLG catalytic domain of XTHs;Putative N-glycosylation motif NLSG is marked with solid line; Dashed line indicates the predicted N-terminal signal peptide sequence of *PeXTH*

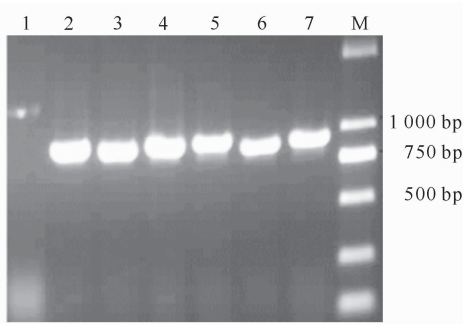


图 2 *T₀* 代烟草叶片的基因组 PCR 检测

M. Marker;1.野生型烟草;2.阳性对照 (pGreen0029-*PeXTH* 质粒);3~7.转基因烟草

Fig. 2 Genomic PCR detection of *T₀*-generation tobacco leaves

M. Marker;1. Wild tobacco;2. Positive control (pGreen0029-*PeXTH*);3-7. Transgenic tobacco

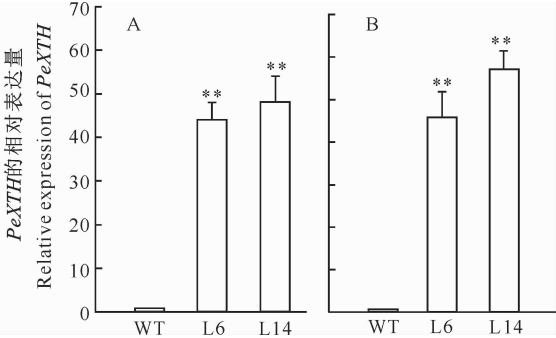


图 3 *T₁* 代烟草叶和根组织的 Real-Time PCR 检测结果

A. 叶组织;B. 根组织;内参基因均是 *EF1 α* ;每个株系设 3 个重复; “*”表示转基因株系与野生型株系之间存在极显著差异($P < 0.01$)

Fig. 3 Real-Time PCR detection of *T₁*-generation tobacco leaves and roots

A. Leaf tissues;B. Root tissues;*EF1 α* was used internal control gene;Each group has 3 replicates;“*” indicates significant difference between transgenic and wild plants ($P < 0.01$)

2.3 转基因烟草的抗镉性

2.3.1 Cd^{2+} 胁迫后烟草植株的生长表现 100 $\mu\text{mol/L}$ Cd^{2+} 处理 5 d 后,野生型烟草的生长明显受到抑制,没有新叶长出,老叶发黄变卷(图 4-A),根部褐化坏死、侧根稀少(图 4-B),而转基因烟草的叶和根都没有明显的受损症状。与野生型烟草相比, Cd^{2+} 胁迫后转基因烟草的根长约是野生型烟草的

1.5 倍(图 5-A),根和叶组织的干质量也显著高于野生型($P < 0.05$)(图 5-B)。

2.3.2 Cd^{2+} 胁迫对烟草叶片细胞膜透性的影响 Cd^{2+} 对植物毒害的一个重要方面就是能够引发细胞膜脂质过氧化,破坏细胞膜结构,从而导致电解质外渗,细胞膜透性增加,相对电导率增大。由图 6 可以看出,100 $\mu\text{mol/L}$ Cd^{2+} 处理 5 d 后,野生型烟草

叶片的相对电导率高达 83%，而转基因烟草只有 30%左右，表明转基因烟草受 Cd^{2+} 胁迫的毒害程度要远低于野生型烟草。

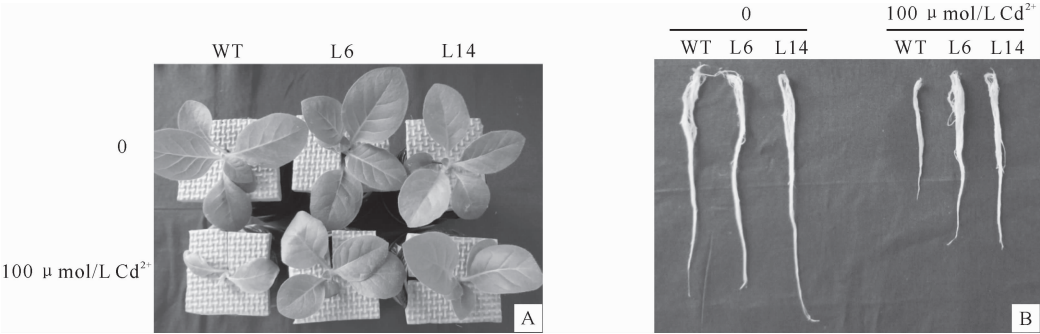


图 4 转基因和野生型烟草在 Cd^{2+} 胁迫后的表型比较
A. 叶; B. 根

Fig. 4 Phenotypic comparison of transgenic and wild tobacco plants after Cd^{2+} stress
A. Leaf; B. Root

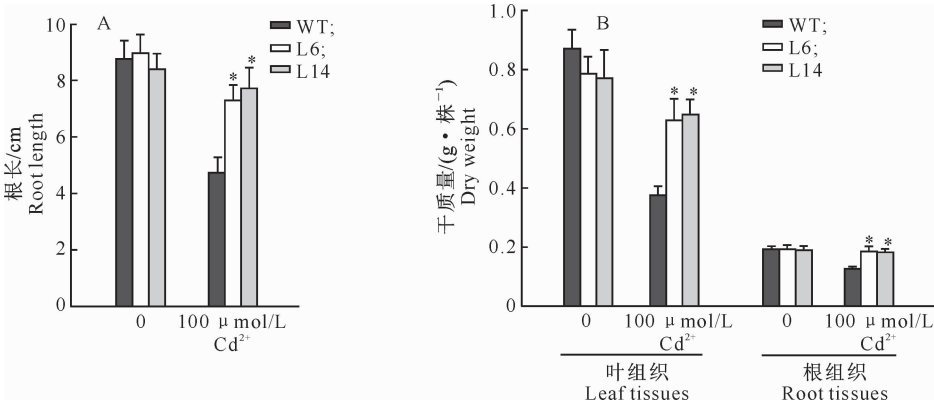


图 5 转基因和野生型烟草在 Cd^{2+} 胁迫后生长情况的比较
A. 根长比较; B. 根叶组织干质量比较; 每个株系设 3 个重复;

“*”表示转基因株系和野生型株系之间存在显著差异 ($P < 0.05$)。下图同

Fig. 5 Growth of transgenic and wild tobacco plants after Cd^{2+} stress

A. Root length; B. Dry weight of root and leaf tissues; Each group has 3 replicates;

“*” indicates significant difference between transgenic and wild plants ($P < 0.05$). The same for figures below

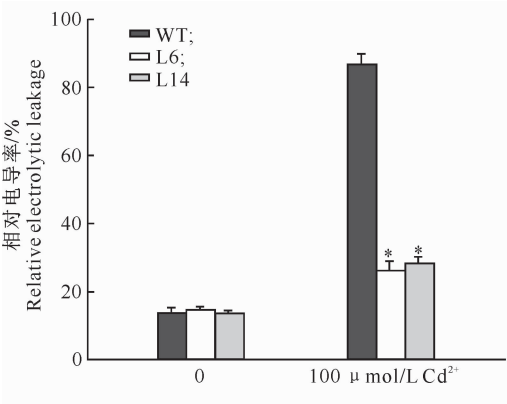


图 6 Cd^{2+} 胁迫对转基因和野生型烟草叶片
相对电导率的影响

Fig. 6 Effects of Cd^{2+} stress on the relative electrolytic leakage in leaves of transgenic and wild tobacco plants

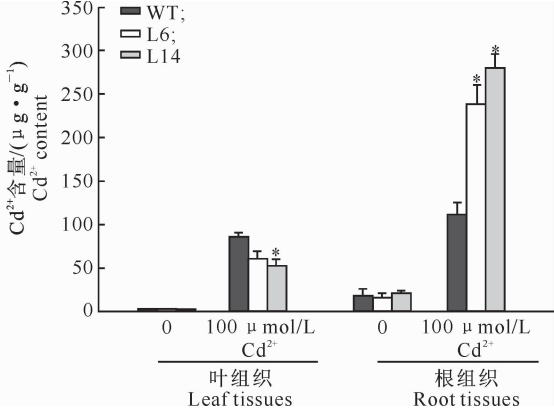


图 7 Cd^{2+} 胁迫对转基因烟草和野生型烟草
根叶组织中 Cd^{2+} 含量的影响

Fig. 7 Cd^{2+} contents in roots and leaves of transgenic and wild tobacco plants before and after Cd^{2+} stress

2.3.3 Cd^{2+} 胁迫后烟草根、叶组织中 Cd^{2+} 含量的变化 由图 7 可以看出,100 $\mu\text{mol/L}$ Cd^{2+} 处理 15 d 后,转基因株系(L6 和 L14)根组织中积累的 Cd^{2+} 含量分别是野生型株系的 2.2 倍和 2.5 倍;而在 2 个转基因株系的叶组织中, Cd^{2+} 含量却只有野生型株系的 78.2%和 67.5%。可见 Cd^{2+} 胁迫下,转基因烟草根部积累 Cd^{2+} 的能力要远高于野生型烟草。

表 1 Cd^{2+} 胁迫对转基因和野生型烟草叶片中营养元素含量的影响

Table 1 Effects of Cd^{2+} stress on nutrient element contents in leaves of transgenic and wild tobacco plants

株系 Strain	Cd^{2+} 处理 Treatment Cd^{2+}	K^{+} / ($\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1}$)	Ca^{2+} / ($\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1}$)	Mg^{2+} / ($\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1}$)
WT	0	1.363±0.029 a	2.951±0.239 a	0.385±0.008 a
	100 $\mu\text{mol/L}$	1.032±0.014 b	1.642±0.169 b	0.369±0.013 a
L6	0	1.228±0.022 a	2.467±0.273 a	0.367±0.031 a
	100 $\mu\text{mol/L}$	1.366±0.053 a	2.032±0.135 a	0.361±0.003 a
L14	0	1.351±0.032 a	2.961±0.284 a	0.371±0.019 a
	100 $\mu\text{mol/L}$	1.339±0.038 a	2.102±0.162 a	0.388±0.014 a

注:每一数值都是 3 个重复样品的平均值。同列中不同小写字母表示各个株系各指标处理与对照之间的差异达到显著水平($P<0.05$)。下表同。
Notes: Each group has 3 replicates. Different lowercase letters in each column indicate significant difference between treated and control plants within each line ($P<0.05$). The same for tables below.

2.3.5 Cd^{2+} 胁迫后烟草叶片抗氧化酶活性的变化 植物体内的 SOD 是重要的抗氧化酶,能够有效清除细胞内产生的超氧阴离子,使之歧化成 H_2O_2 ,过量的 H_2O_2 再由 CAT 和 APX 进一步清除。由表 2 可知, Cd^{2+} 胁迫不同程度地提高了转基因烟草叶片

2.3.4 Cd^{2+} 胁迫后烟草叶片中营养元素含量的变化 由表 1 可以看出,100 $\mu\text{mol/L}$ Cd^{2+} 处理 15 d 后,野生型烟草的 K^{+} 和 Ca^{2+} 含量都显著降低($P<0.05$),分别是对照的 76%和 55%, Mg^{2+} 含量没有显著改变($P<0.05$);而转基因烟草 K^{+} 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 含量在处理 and 对照中的变化都不大。

SOD、CAT、APX 的活性。100 $\mu\text{mol/L}$ Cd^{2+} 处理 15 d 后,L6 和 L14 的 SOD 活性分别比对照增加了 20%和 36%,而野生型株系的 SOD 活性却比对照降低了 24%;CAT 和 APX 的变化趋势与 SOD 类似。

表 2 Cd^{2+} 胁迫对转基因和野生型烟草叶组织抗氧化酶活性的影响

Table 2 Effects of Cd^{2+} stress on anti-oxidative enzyme activities in leaves of transgenic and wild tobacco plants

株系 Strain	Cd^{2+} 处理 Treatment Cd^{2+}	SOD/ ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$)	CAT/ ($\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$)	APX / ($\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$)
WT	0	119.3±10.9 a	142.4±5.3 a	106.3±5.6 a
	100 $\mu\text{mol/L}$	91.1±7.1 a	123.5±12.5 a	103.9±6.3 a
L6	0	122.8±8.6 a	112.4±6.5 b	123.6±3.3 a
	100 $\mu\text{mol/L}$	147.7±6.1 a	136.7±3.0 a	127.7±4.7 a
L14	0	113.4±10.7 b	127.8±9.7 a	118.7±8.3 b
	100 $\mu\text{mol/L}$	154.6±8.7 a	130.6±11.4 a	149.5±7.2 a

2.3.6 Cd^{2+} 胁迫后烟草叶片净光合速率和蒸腾速率的变化 Cd^{2+} 胁迫能够降低植物的净光合速率

和蒸腾速率。 Cd^{2+} 胁迫对转基因和野生型烟草叶片净光合速率和蒸腾速率的影响见图 8。

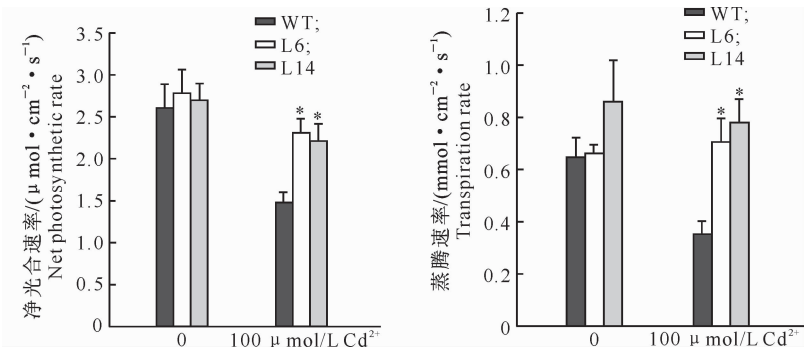


图 8 Cd^{2+} 胁迫对转基因和野生型烟草叶片净光合速率和蒸腾速率的影响
Fig. 8 Effects of Cd^{2+} stress on the net photosynthetic rates and transpiration rates in leaves of transgenic and wild tobacco plants

由图 8 可以看出,100 $\mu\text{mol/L}$ Cd^{2+} 处理 15 d 后,野生型株系叶片的净光合速率比对照下降了 43%,而转基因株系 L6 和 L14 只分别比对照下降了 17%和 19%;此外, Cd^{2+} 处理后,野生型烟草的蒸腾速率大幅度降低,而转基因烟草降低的程度很小,L6 的蒸腾速率甚至有所提高。

3 讨 论

本研究从胡杨中克隆了一个木葡聚糖内转糖苷酶/水解酶基因 *PeXTH*,对其蛋白序列的比对分析结果显示,该蛋白和同样来自杨属的杂交山杨的 XTH 蛋白高度同源,并且含有木葡聚糖内转糖苷酶/水解酶的高度保守的结构域 DEIDFEFLG 和 N-糖基化位点 NLSG,这些结果都预示着 *PeXTH* 具有和其他 XTH 蛋白类似的结构和酶活性。

有研究表明,细胞壁的组成成分(如纤维素、半纤维素、果胶)对重金属离子有结合作用。例如小麦(*Triticum aestivum* L.)细胞壁中的果胶是铝离子结合的主要位点之一^[24]。蹄盖蕨(*Athyrium yokoscense*)根部所吸收的 Cd^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 等金属离子中有大部分是与纤维素及木质素结合存在的^[7]。而木葡聚糖内转糖苷酶/水解酶(XTH)是细胞壁重构过程中的关键酶^[9-10],具有改变细胞壁中纤维素、木质素等成分含量的作用^[25-26],由此可以推断木葡聚糖内转糖苷酶/水解酶基因(*XTHs*)很可能通过调节细胞壁中 Cd^{2+} 结合成分的含量来提高细胞壁对 Cd^{2+} 的区隔能力,从而降低 Cd^{2+} 对植物的毒害。为了验证胡杨 *PeXTH* 基因在植物抗 Cd^{2+} 中的作用,本研究将该基因在烟草中过表达,结果显示转 *PeXTH* 基因的烟草在 Cd^{2+} 胁迫后,根长和根叶组织干质量都显著高于野生型烟草,并且没有表现出典型的 Cd^{2+} 毒害症状,说明转基因烟草的 Cd^{2+} 耐受性明显增加,而进一步的生理指标测定结果也证实了这一现象。根叶组织 Cd^{2+} 含量的测定结果显示, Cd^{2+} 胁迫下,转基因烟草根部积累 Cd^{2+} 的能力要远高于野生型烟草。这种现象的发生很可能与 *PeXTH* 基因在烟草中的过表达相关。可以推测,转 *PeXTH* 基因的烟草很可能通过增加根组织细胞壁对 Cd^{2+} 的区隔能力而将大量的 Cd^{2+} 积累在根部,从而避免过多 Cd^{2+} 向地上部分转运,以保证烟草各项生理机能的正常进行。

Cd^{2+} 胁迫使植物体内产生大量活性氧(如超氧阴离子、过氧化氢等),引发膜脂过氧化,损伤细胞膜系统,从而影响植物的正常生长^[27]。同时,植物本

身也存在着维持体内活性氧平衡的机制。许多研究表明, Cd^{2+} 胁迫能够诱导植物 SOD、POD、CAT、APX 等抗氧化酶活性的增加,从而及时清除体内产生的多余活性氧,维持植物的正常机能^[28-29],但这种自我保护能力是有限度的,当细胞所受 Cd^{2+} 胁迫超过一定范围时,植物就有可能丧失维持活性氧平衡的能力。本研究结果表明, Cd^{2+} 胁迫后,野生型烟草叶组织中 SOD、CAT、APX 的活性降低,相对电导率明显增加,而转基因烟草叶组织中这 3 种抗氧化酶活性明显提高,相对电导率变化幅度较小,细胞膜没有受到明显破坏。这可能是由于 *PeXTH* 基因的过表达使转基因烟草细胞壁结合 Cd^{2+} 的能力增强,从而相应减小了 Cd^{2+} 在细胞原生质体中的含量,保证了细胞内部正常活性氧平衡机制的运行;而野生型烟草细胞壁区隔 Cd^{2+} 的能力较弱,容易造成胞内过强的 Cd^{2+} 胁迫,超出自身的活性氧防御能力,从而使植株受到重度损伤。

除了破坏组织和细胞的活性氧平衡之外, Cd^{2+} 还能够竞争性结合植物营养阳离子的转运蛋白,从而影响营养元素的吸收^[30]。本研究结果发现, Cd^{2+} 处理明显降低了野生型烟草叶组织中 K^{+} 和 Ca^{2+} 的含量,而对转基因烟草中这 2 种离子的影响不是很大。这可能是由于转基因烟草细胞壁较强的 Cd^{2+} 区隔能力使得 Cd^{2+} 向胞质内的转运减少,从而降低了对 K^{+} 、 Ca^{2+} 的转运竞争,保证了细胞对这 2 种营养阳离子的正常吸收。此外, Cd^{2+} 胁迫能够降低植物叶片 PSII 活性^[31] 和光合色素含量^[32],从而影响植物正常的光合速率。本研究结果表明, Cd^{2+} 处理后,转基因烟草叶片的净光合速率和蒸腾速率都显著高于野生型,进一步说明 *PeXTH* 基因的过表达使得转基因烟草的抗 Cd^{2+} 性增强。

综上所述,本文从胡杨中克隆得到一个木葡聚糖内转糖苷酶/水解酶基因 *PeXTH*,初步证明了该基因能够将大量 Cd^{2+} 区隔在根组织中,减少 Cd^{2+} 向地上部分的转运,从而增强烟草对 Cd^{2+} 的抗性,但具体的分子和生理机制还有待深入研究,比如 *PeXTH* 基因在烟草组织细胞壁区隔 Cd^{2+} 中所发挥的具体作用,以及该基因在 Cd^{2+} 胁迫下所参与的信号传递等,这些问题的阐明将对植物抗 Cd^{2+} 机制的研究产生十分重要的意义。

[参考文献]

- [1] Sanitadi Toppi L, Gabbriellini R. Response to cadmium in higher plants [J]. Environmental and Experimental Botany, 1999, 41

- (2);105-130.
- [2] Zhu Y L, Pilon-Smits E A H, Jouanin L, et al. Overexpression of glutathione synthetase in Indian mustard enhances cadmium accumulation and tolerance [J]. *Plant Physiology*, 1999, 119 (1):73-80.
- [3] Pomponi M, Censi V, Di Girolamo V, et al. Overexpression of *Arabidopsis* phytochelatase in tobacco plants enhances Cd^{2+} tolerance and accumulation but not translocation to the shoot [J]. *Planta*, 2006, 223(2):180-190.
- [4] Liu J R, Suh M C, Choi D. Phytoremediation of cadmium contamination: Overexpression of metallothionein in transgenic tobacco plants [J]. *Bundesgesundheitsbl-Gesundheitsforsch-Gesundheitsschutz*, 2000, 43(2):126-130.
- [5] Carrier P, Baryl A, Havaux M. Cadmium distribution and microlocalization in oilseed rape (*Brassica napus*) after long-term growth on cadmium-contaminated soil [J]. *Planta*, 2003, 216 (6):939-950.
- [6] Lozano-Rodríguez E, Hernández L, Bonay P, et al. Distribution of cadmium in shoot and root tissues of maize and pea plants: Physiological disturbances [J]. *Journal of Experimental Botany*, 1997, 48(1):123-128.
- [7] Nishizono H, Ichikawa H, Suzuki S, et al. The role of the root cell wall in the heavy metal tolerance of *Athyrium yokoscense* [J]. *Plant and Soil*, 1987, 101(1):15-20.
- [8] He J Y, Zhu C, Ren Y F, et al. Uptake, subcellular distribution, and chemical form of cadmium in wild-type and mutant rice [J]. *Pedosphere*, 2008, 18(3):127.
- [9] Fry S C, Smith R C, Renwick K F, et al. Xyloglucan endotransglycosylase, a new wall-loosening enzyme activity from plants [J]. *Biochemical Journal*, 1992, 282(3):821-828.
- [10] Nishitani K, Tominaga R. Endo-xyloglucan transferase, a novel class of glycosyltransferase that catalyzes transfer of a segment of xyloglucan molecule to another xyloglucan molecule [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1992, 267(29):21058-21064.
- [11] Rose J K C, Braam J, Fry S C, et al. The XTH family of enzymes involved in xyloglucan endotransglucosylation and endohydrolysis: Current perspectives and a new unifying nomenclature [J]. *Plant and Cell Physiology*, 2002, 43(12):1421-1435.
- [12] Vissenberg K, Fry S C, Pauly M, et al. XTH acts at the microfibril-matrix interface during cell elongation [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2005, 56(412):673-683.
- [13] Osato Y, Yokoyama R, Nishitani K. A principal role for AtXTH18 in *Arabidopsis thaliana* root growth: A functional analysis using RNAi plants [J]. *Journal of Plant Research*, 2006, 119(2):153-162.
- [14] Harada T, Torii Y, Morita S, et al. Cloning, characterization, and expression of xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase and expansin genes associated with petal growth and development during carnation flower opening [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2011, 62(2):815-823.
- [15] Saladié M, Rose J K C, Cosgrove D J, et al. Characterization of a new xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase (XTH) from ripening tomato fruit and implications for the diverse modes of enzymic action [J]. *The Plant Journal*, 2006, 47(2):282-295.
- [16] Miedes E, Lorences E P. Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolases (XTHs) during tomato fruit growth and ripening [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2009, 166(5):489-498.
- [17] Nishikubo N, Takahashi J, Roos A A, et al. Xyloglucan endotransglycosylase-mediated xyloglucan rearrangements in developing wood of hybrid aspen [J]. *Plant Physiology*, 2011, 155(1):399-413.
- [18] An G. Binary Ti vectors for plant transformation and promoter analysis [J]. *Methods in Enzymology*, 1987, 153:292-305.
- [19] Horsch R B, Fry J E, Hoffmann N L, et al. A simple and general method for transferring genes into plants [J]. *Science*, 1985, 227(4691):1229-1231.
- [20] Lutts S, Kinet J M, Bouharmont J. NaCl-induced senescence in leaves of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance [J]. *Annals of Botany*, 1996, 78(3):389-398.
- [21] Schickler H, Caspi H. Response of antioxidative enzymes to nickel and cadmium stress in hyperaccumulator plants of the genus *Alyssum* [J]. *Physiologia Plantarum*, 1999, 105(1):39-44.
- [22] 李妮亚. 两种红树幼苗离子平衡及活性氧调控与耐盐性研究 [D]. 北京:北京林业大学, 2008.
- Li N Y. Regulation of ionic and reactive oxygen species homeostasis in seedlings of two mangrove and the relevance to salinity [D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2008. (in Chinese)
- [23] Campbell P, Braam J. Co- and/or post-translational modifications are critical for TCH4 XET activity [J]. *The Plant Journal*, 1998, 15(4):553-561.
- [24] Zheng S J, Lin X Y, Yang J L, et al. The kinetics of aluminum adsorption and desorption by root cell walls of an aluminum resistant wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivar [J]. *Plant and Soil*, 2004, 261:85-90.
- [25] Genovesi V, Fornalé S, Fry S C, et al. ZmXTH1, a new xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase in maize, affects cell wall structure and composition in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2008, 59(4):875-889.
- [26] Alexandersson E, Becker J V W, Jacobson D, et al. Constitutive expression of a grapevine polygalacturonase-inhibiting protein affects gene expression and cell wall properties in uninfected tobacco [J]. *BMC Research Notes*, 2011, 4:493.
- [27] Smeets K, Cuypers A, Lambrechts A, et al. Induction of oxidative stress and antioxidative mechanisms in *Phaseolus vulgaris* after Cd application [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2005, 43(5):437-444.
- [28] Fornazier R F, Ferreira R R, Vitória A P, et al. Effect of cadmium on antioxidant enzyme activities in sugar cane [J]. *Biologia Plantarum*, 2002, 45(1):91-97. (下转第 50 页)