

网络出版时间:2013-09-22 16:57

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20130922.1657.006.html>

超表达水稻 *MGD* 基因(*OsMGD*)烟草植株的耐低磷胁迫能力

史中惠^{a,b}, 王仕稳^b, 殷俐娜^b, 张梅娟^c, 邓西平^{a,b}

(西北农林科技大学 a 林学院, b 黄土高原土壤侵蚀与旱地农业国家重点实验室, c 生命科学学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘要] **【目的】**研究超表达 *OsMGD* 基因烟草植株在低磷条件下的生长情况,为明确 *OsMGD* 基因对植物耐低磷胁迫的影响机理奠定基础。**【方法】**通过构建表达载体 pGWB2-*OsMGD* 和农杆菌介导的转化方法,获得超表达 *OsMGD* 基因烟草植株,用磷浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$ 的 HS 营养液对转基因烟草植株进行低磷处理后,研究转基因烟草植株 MGD 活性、脂质和脂肪酸含量、叶绿素含量、根系鲜质量、根冠比和磷含量的变化情况。**【结果】**超表达 *OsMGD* 基因烟草植株中 MGD 活性增加了 1~3.5 倍;在转基因烟草植株中,半乳糖脂(MGDG 和 DGDG)、磷脂和总脂肪酸含量均显著高于野生型植株,但是转基因烟草植株中的脂肪酸组分与野生型相比无显著差异。低磷处理后,转基因烟草植株的生长情况明显优于野生型植株,转基因烟草植株中叶绿素含量、根系鲜质量和根冠比均显著高于野生型;在正常和低磷条件下,转基因烟草植株中的磷含量与野生型相比无显著差异。**【结论】**超表达 *OsMGD* 基因能增加烟草植株的细胞膜脂含量,使植物体内累积大量半乳糖脂和磷脂,从而提高了烟草植株耐低磷胁迫的能力。

[关键词] 单半乳糖甘油二酯(MGDG);磷脂;低磷胁迫;烟草

[中图分类号] Q945.79

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2013)10-0097-08

Tolerance of tobacco plans with *OsMGD* gene to low phosphorus stress

SHI Zhong-hui^{a,b}, WANG Shi-wen^b, YIN Li-na^b, ZHANG Mei-juan^c, DENG Xi-ping^{a,b}

(a College of Forestry, b State Key Laboratory of Soil Erosion and Dryland Farming on Loess Plateau,

c College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: **【Objective】**This research was to investigate the growth of transgenic tobacco with *OsMGD* under phosphorous deficiency. **【Method】**Tobacco plants with *OsMGD* gene were constructed through the construction of expression vector pGWB2-*OsMGD* and agrobacterium mediated transformation methods. After being treated with Hoagland nutrient solution (phosphorus concentration 5 $\mu\text{mol/L}$), the changes of MGD activity, lipids and fatty acid contents, chlorophyll content, root fresh weight, root shoot ratio and phosphorus content in transgenic tobacco plants were investigated. **【Result】**MGD synthase activity of tobacco with overexpression *OsMGD* increased by 1—3.5 folds. The contents of galactolipids (MGDG and DGDG), phospholipids and total fatty acids in transgenic tobaccos were significantly higher than that in wild type. But the fatty acid contents of all lipids were unchanged compared with wild type. After low phosphorus treatment, the transgenic tobacco growth was significantly better than wild type. The chlorophyll content, root fresh weight and the ratio of root to shoot in transgenic tobacco were significantly higher than wild type. Under the conditions of normal and low phosphorus, phosphorus contents in transgenic tobacco

[收稿日期] 2012-11-19

[基金项目] 中央高校基本科研业务费专项资金项目(QN2012048);高等学校学科创新引智计划项目(B12007)

[作者简介] 史中惠(1987—),女,山西临汾人,在读硕士,主要从事植物水分生理与抗逆性研究。E-mail:shizhong2007@126.com

[通信作者] 邓西平(1962—),男,陕西西安人,研究员,博士生导师,主要从事植物生理生态学研究。

E-mail:dengxp@ms.iswc.ac.cn

plants were not significantly different compared with wild type. 【Conclusion】 Overexpression *OsMGD* gene increased cell membrane lipid content of tobacco plant. The plant accumulated a large number of galactolipids and phospholipids, which improved the resistance of tobacco plant to low phosphorus stress.

Key words: monogalactosyldiacylglycerol (MGDG); phospholipid; phosphorus deficiency; tobacco

单半乳糖甘油二酯 (Monogalactosyldiacylglycerol, MGDG) 是种子植物中一种重要的半乳糖脂, 其含量占叶绿体膜脂的一半以上, 对质体膜的完整性和光合能力的维持都起着至关重要的作用。MGDG 还是双半乳糖甘油二酯 (DGDG) 的前体物质, DGDG 是质体膜中含量仅次于 MGDG 的一种半乳糖脂, 其与 MGDG 的总量占到了叶绿体膜脂的 80% 以上, 在维持光合膜结构和功能方面也起着重要作用^[1]。单半乳糖甘油二酯合成酶 (MGD) 位于质体膜上, 催化甘油二酯 (DAG) 和 UDP-半乳糖合成 MGDG, 参与的是 MGDG 合成的最后一步反应, 所以被认为是 MGDG 合成的关键酶^[1], 并可间接影响 DGDG 的合成。敲除掉编码 *MGD* 基因的拟南芥突变体 *mgd-1* 为白化植株^[2], MGDG 的缺失会影响基粒类囊体和膜上光合复合体的形成^[3], 并可影响 DGDG 的合成。由于 MGDG 和 DGDG 在光合膜中的重要作用, 因此 MGD 也被认为是光合膜形成的关键酶^[4-5]。

磷作为植物生长发育的必需元素之一, 直接参与了核酸和膜系统的能量代谢和生物合成, 也在光合作用、呼吸作用及许多酶代谢调节上发挥着作用。在拟南芥叶片中, 接近 1/3 结合态的磷是与磷脂相结合的^[6]。因此, 磷的供应直接影响到植物体内磷脂的含量和合成。在磷缺乏时, 细胞膜中的磷脂含量显著降低^[7], 细胞会通过分解磷脂释放结合态的磷, 磷脂的分解则会导致细胞膜的稳定性遭到破坏, 这时细胞膜中不与磷结合的半乳糖脂, 如 MGDG 和 DGDG 会参与细胞膜中磷含量的调节, 从而维持细胞膜结构的稳定; 同时, 在缺磷条件下, MGDG 合成酶和 DGDG 合成酶的活性会增加, 在质体膜上诱导合成的 DGDG 会转移到质体膜外替代缺失的磷脂。这种替代现象在原核生物和真核生物中都已见报道, 例如, 通过分析紫细菌和蓝藻中脂类的新陈代谢发现, 磷缺乏条件下, 细胞膜上会积累糖脂以代替减少的磷脂^[8]。衣藻细胞在磷酸盐限制条件下, 磷脂酰甘油 (PG) 含量下降, 硫代异鼠李糖甘油二酯 (SQDG) 含量上升, 但是叶绿体中的膜脂含量却维持在稳定水平^[9]。在缺磷条件下, 高等植物拟南芥的 DGDG、SQDG 含量均会上升^[10]。这些研究说明, 在缺磷条件下, 植物体会增加糖脂合成以补充缺

失的磷脂, 但是目前尚无糖脂合成增加与植物耐低磷能力关系的研究报道。为此, 本研究以超表达水稻 *MGD* 基因 (*OsMGD*) 的烟草植株为材料, 分析转基因植株在低磷胁迫下的生理反应, 以期明确 *OsMGD* 基因对植物耐低磷胁迫的机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 表达载体的构建

对包含 *OsMGD* 基因 (GenBank 登录号: AB112060) 的 cDNA 进行 PCR 扩增, 基因特异性引物为 5'-ACCATGGAGAGCTCGTACAAGTT-3' 和 5'-CATAABTTGTATAGGTGTGGTTTC-3'。PCR 反应体系为 10 μ L: 包括模板 DNA 1 μ L, 2 mmol/L dNTP 2.5 μ L, 1 $\times$ NH₄⁺ 反应缓冲液 2.5 μ L, 1.35 mmol/L MgCl₂ 2.5 μ L, 0.2 U BioTaq DNA 聚合酶 (Bioline, USA) 0.5 μ L, 正反引物 (0.5 μ mol/L) 各 0.5 μ L。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 1 min; 94 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min, 扩增产物于 4 $^{\circ}$ C 保存 (Takara Thermal Cycler, TP600, Japan)。将 PCR 产物与 pENTR 定向 TOPO 克隆试剂盒中的 pENTR TOPO 载体混合, 室温培养 5 min。然后用混合物转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 并在含有 50 μ g/mL 卡那霉素 LB 培养基的培养皿上培养, 选择含有 pENTR-*OsMGD* 的阳性转化株并培养。用植物表达载体 pG-WB2^[11] 转化 *E. coli* DH5 α , 随后用含有 50 μ g/mL 潮霉素的 LB 培养基对转化子进行筛选。利用电穿孔技术 (设置为 600 Ω , 25 μ F 和 2.5 kV) (Bio-Rad Gene Pulser, Model # 1652098), 将转化子 (pG-WB2-*OsMGD*) 克隆到农杆菌菌株 C58C1 中, 得到的农杆菌菌株用于农杆菌介导烟草转化试验。

1.2 农杆菌介导的烟草转化与植株培养

农杆菌介导的烟草 (*Nicotiana tabacum* L. cv. SR-1) 转化参照文献^[12]的方法进行。先用 ISO-PLANT II 试剂盒 (Nippon gene, Co., Toyama, Japan) 从转基因和野生型 (SR-1) 烟草植株叶片中提取基因组 DNA, 通过 PCR (反应体系 10 μ L: 包括模板 DNA 1 μ L, 2 $\times$ Master Mix (TIANGEN, KT221) 5 μ L, ddH₂O 3 μ L, 正反引物 (10 μ mol/L) 各 0.5

μL ;反应条件同 1.1 节 PCR),验证转基因植株基因组中是否存在 *OsMGD* 基因。

根据蛋白质表达水平,从得到的一系列转 *OsMGD* 基因烟草株系中选用 2 种转基因株系 MGD-3 和 MGD-5 进行试验。转基因株系的烟草种子用原始转基因系(T0)的自交后代(T1)。转基因植株 T1 代和野生型烟草种子用质量分数为 1%的次氯酸钠灭菌 20 min 后播种在装有 1/6 MS(含 12.5 mg/L 潮霉素, $\text{pH}=5.8$)培养基的培养皿中。将这些培养皿在黑暗条件下垂直放置 3~4 d,待幼根长至约 3 mm 时,培养皿倾斜 45°放置到日光灯下培养,继续生长 28 d 后转移到 1/4 HS 营养液中,每隔 2 d 换 1 次营养液。培养条件为 14 h 光照,恒温 25 °C,湿度 45%~55%。

1.3 蛋白印迹分析(Western-blot)

用磷酸钾缓冲液(50 mmol/L 磷酸钾,1 mmol/L EDTA 和 5 mmol/L DTT)从转基因和野生型烟草叶片中提取蛋白质,取 25 μg 蛋白质样品在 12%SDS-PAGE 上分离并通过 ATTO 半干的传递细胞(ATTO Corporation, Tokyo, Japan)转移到尼龙硝酸纤维膜(Amersham Biosciences, UK)上。免疫检测时,一抗是豚鼠体内产生的带抗组氨酸标记的 *OsMGD* 蛋白,稀释 2 000 倍使用;二抗是与山葵过氧化物酶结合的抗豚鼠免疫球蛋白(Sigma, St. Louis, USA),稀释 5 000 倍使用^[13]。

1.4 MGD 活性的测定

取生长 28 d 的烟草叶片(2 种转基因株系 MGD-3 和 MGD-5 以及野生型 SR-1)在液氮中研磨。研磨后的粉末悬浮在均匀的缓冲液(50 mmol/L MOPS-KOH(pH 7.8),1 mmol/L DTT,6 mmol/L CHAPS,25 mmol/L KCl,25 mmol/L KH_2PO_4 ,质量分数 2%甘油,150 mmol/L NaCl)中^[14],用组织质量 10 倍体积的缓冲液来均化。反应混合液包含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 二精油、12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 磷脂酸,酶 10 或 50 μL ,总体积为 400 μL ,加入 5 μL UDP-gal[6-³H]后于 25 °C 培养 30 min,提取的脂类用蒸馏水冲洗 1 遍。分离脂质层并与液态闪烁体混合,测量其放射活性。用液态闪烁法测得的脂质放射活性表示 MGD 酶活性。

1.5 脂质和脂肪酸含量的测定

烟草叶片在蒸馏水中煮沸 5 min 使内生的脂肪酶分解后,测定脂质即半乳糖脂(MGDG,DGDG)和磷脂含量,其中磷脂包括磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酰乙醇胺(PE)、磷脂酰甘油(PG)、磷脂酰肌醇(PI)和磷脂酰丝氨酸(PS)。叶片脂质提取根据参考文献^[15]的方

法,将提取的脂质溶于氯仿,并用质量分数为 0.05%的丁基羟基甲苯作为抗氧化剂,于 -20 °C 贮存。MGDG 和 DGDG 用单向薄层色谱(TLC)分离,涂好的硅胶板厚 0.25 mm(Merck),展开剂分别用丙酮/苯/水(91:30:18,体积比)和氯仿/甲醇/水(70:21:3,体积比),在硅胶板上喷洒质量分数为 80%的丙酮(其中含有质量分数 0.01%的樱草素)后放置在 UV 灯下,然后从硅胶板上刮掉,加入 1 μL 十五烷酸作为内标,与含有质量分数 5% HCl 的甲醇于 80 °C 加热 2 h 后测定。从叶片中分离磷脂时用单向的 TLC,展开剂是氯仿/甲醇/水(65:25:8,体积比),用钼蓝试剂喷洒后直接观察,刮掉后用质量分数 60% HClO_4 加热成粉末,最终磷酸盐的测定用总脂质中释放出的无机磷酸盐估算总的磷脂含量^[16]。脂肪酸的定量用气液色谱法(GLC),毛细管柱是 0.25 mm $\times$ 50 cm,Shinwa HR-Thermon 3 000 B,温度梯度从 160~210 °C 以 2 °C/min 的速率递增^[16]。

1.6 低磷处理

待 1/4 HS 营养液中培养的烟草幼苗长到 5 叶期时,挑选长势相当的幼苗进行低磷处理,缺磷营养液(LP)中 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 浓度为 5 $\mu\text{mol}/\text{L}$,不缺磷营养液(HP)采用正常 HS 溶液中的磷浓度 167 $\mu\text{mol}/\text{L}$,每处理 8 次重复,7 d 后测定植株叶绿素含量、地上部分和根系鲜质量和磷含量。测定叶绿素含量时取从下往上数第 2~3 片烟草叶片,剪碎后称取鲜样 0.2 g 用纯丙酮和质量分数 80%丙酮提取叶绿素,分别在 645,663 和 652 nm 处比色,读取吸光值,得到叶片中的叶绿素含量^[17],每个处理 8 次重复。根据烟草地上部分和根系鲜质量计算根冠比,每个处理 8 次重复。称量后的烟草放入烘箱于 105 °C 杀青,75 °C 恒温烘干后放在研钵中磨成粉末,用浓硫酸和双氧水消煮后采用钒钼黄比色法^[17]测定植株全磷含量,每处理 3 次重复。

2 结果与分析

2.1 超表达 *OsMGD* 基因烟草植株的获得

用转化了 pGWB2-*OsMGD* 的农杆菌侵染野生型烟草 SR-1 的叶片,并在含有潮霉素的培养基中筛选。从转基因植株和野生型植株中提取基因组 DNA,经 PCR 证实有 4 种转 *OsMGD* 基因烟草株系,分别为 MGD-2、MGD-3、MGD-4 和 MGD-5(图 1A)。Western-blot 结果显示,*OsMGD* 蛋白在 MGD-2、MGD-3 和 MGD-5 中的表达水平较高,而在 MGD-4 中的表达水平较低;在野生型 SR-1 中没

有检测到该蛋白(图 1B)。但由于在试验中发现, MGD-2 烟草植株种子发芽率极低, 因此, 本研究选择 MGD-3 和 MGD-5 2 种转基因株系进行后续试验。

2.2 超表达 *OsMGD* 基因烟草植株的 MGD 活性

图 2 显示, 超表达 *OsMGD* 基因烟草株系的

MGD 活性均显著高于野生型烟草, 为野生型烟草的 2~4.5 倍。其中, MGD-5 的酶活性最高, 说明在转基因烟草植株中超表达的 *OsMGD* 确实编码生成了 MGD 酶。

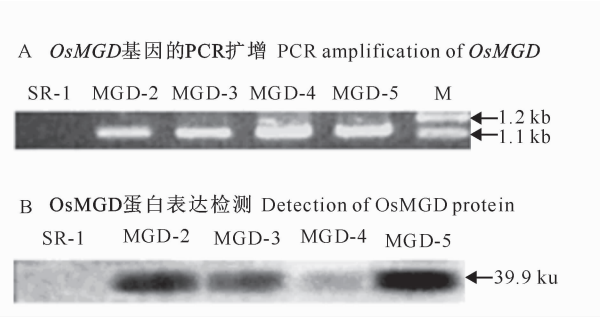


图 1 超表达 *OsMGD* 基因烟草植株叶片 DNA 的 PCR 电泳及 Western-blot 分析

SR-1. 野生型烟草; MGD-3~5. 转基因烟草; M. DNA Marker

Fig. 1 DNA PCR and Western-blot analysis of overexpression *OsMGD* gene in tobacco leaves

SR-1. Wild type tobacco; MGD-3~5. Transgenic tobacco; M. DNA Marker

2.3 超表达 *OsMGD* 基因烟草叶片中半乳糖脂和磷脂含量的变化

由图 3 可见, 转基因烟草植株 MGD-3 和 MGD-5 的 MGDG 含量均显著高于 SR-1 ($P<0.05$); 而 DGDG 的含量在 MGD-5 中显著升高 ($P<0.05$), MGD-3 与 SR-1 的差异未达到显著水平 ($P>$

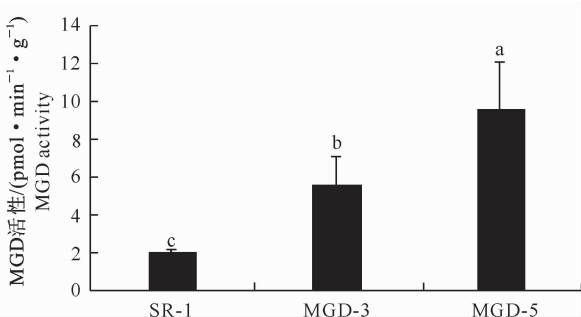


图 2 超表达 *OsMGD* 基因烟草植株的 MGD 酶活性 图柱上标小写字母表示各株系差异

达显著水平 ($P<0.05$), 下图同

Fig. 2 MGD activity in leaves of transgenic tobacco with overexpression *OsMGD* gene

Lowercase letters indicate significant difference ($P<0.05$). The same below

0.05)。DGDG/MGDG 虽然在 MGD-5 中显著升高, 但是只比野生型植株 SR-1 增加了 17.8%, 而 SR-1 与 MGD-3 之间无显著差异。转基因烟草植株中 PC、PE 和 PG 的含量均显著高于野生型烟草。而转基因烟草的 PI+PS 总量与野生型烟草相比无显著变化。

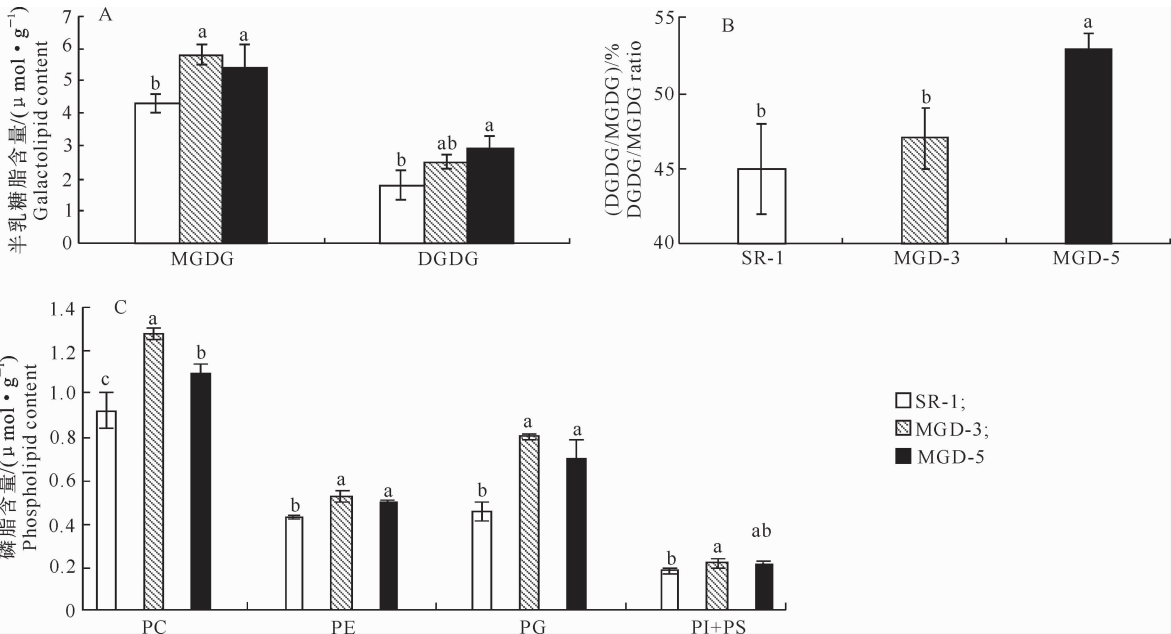


图 3 超表达 *OsMGD* 基因烟草叶片中半乳糖脂和磷脂的变化

Fig. 3 Changes of galactolipids and phospholipids in leaves of tobacco with overexpression *OsMGD* gene

2.4 超表达 *OsMGD* 基因烟草叶片中脂肪酸含量的变化

对转基因和野生型烟草植株叶片细胞膜中的脂肪酸含量进行分析后发现,2 种转基因烟草(MGD-3 和 MGD-5)的总脂肪酸含量均显著高于野生型烟草

(SR-1)植株(图 4A)。其中,18 : 3 不饱和脂肪酸在转基因烟草和野生型烟草叶片细胞中所占比重最大,且转基因烟草植株中 18 : 3 不饱和脂肪酸含量显著高于野生型烟草植株(图 4B)。

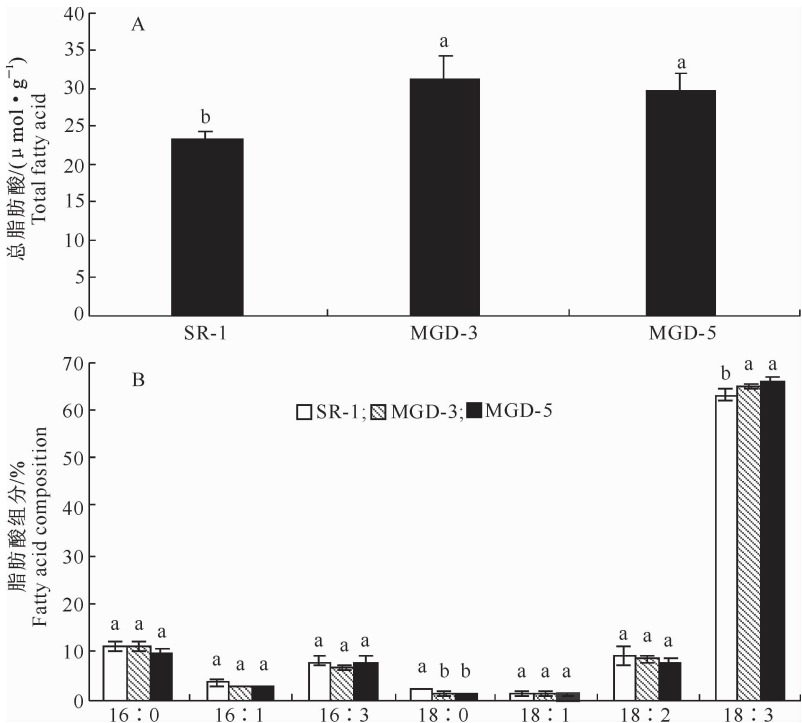


图 4 超表达 *OsMGD* 基因烟草叶片中脂肪酸含量的变化
Fig. 4 Changes of fatty acid content in leaves of tobacco with overexpression *OsMGD* gene

2.5 超表达 *OsMGD* 基因烟草的耐低磷胁迫能力
2.5.1 叶片的耐低磷胁迫能力 由图 5 可以看出,对烟草幼苗进行低磷处理后,野生型烟草植株 SR-1 的叶片出现了明显的黄色斑块,转基因植株 MGD-3 和 MGD-5 的叶片生长正常。由图 6 可见,

经 LP 处理后,3 种烟草幼苗叶片中的叶绿素含量均显著低于正常磷(HP)水平($P<0.05$);但 MGD-3 和 MGD-5 植株中的叶绿素含量在正常和缺磷条件下均显著高于 SR-1($P<0.05$),分别比 SR-1 高 34.6%,36.7%和 18.9%,23.8%。

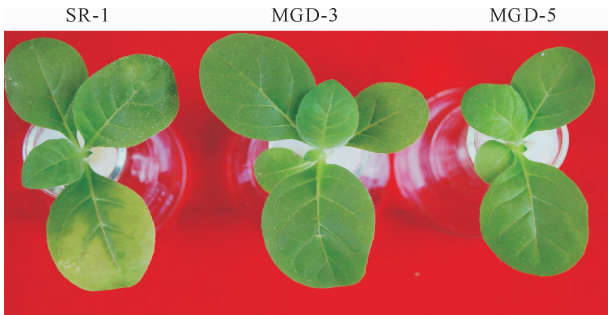


图 5 超表达 *OsMGD* 基因烟草
在低磷条件下的叶片生长状况

Fig. 5 Leaf growth of tobacco with overexpression *OsMGD* gene under phosphorus deficiency

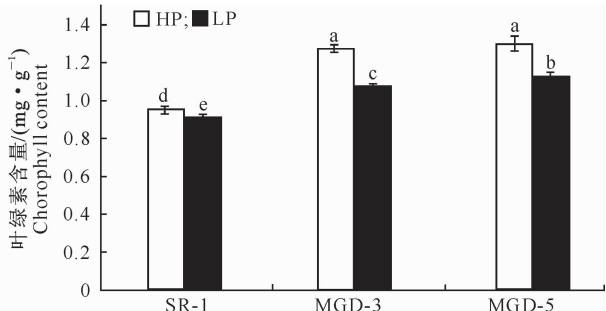


图 6 超表达 *OsMGD* 基因烟草在低磷条件下
叶片叶绿素含量的变化

Fig. 6 Changes of chlorophyll content in leaves of tobacco with overexpression *OsMGD* gene under phosphorus deficiency

2.5.2 根系的耐低磷胁迫能力 图 7A 显示,LP 处理后,野生型烟草植株 SR-1 的根系明显少于 MGD-3 和 MGD-5 2 种转基因烟草植株;在 HP 条件下,转基因和野生型烟草植株根系形态无明显区别。图 7B 显示,LP 处理前和 HP 条件下,SR-1 与

MGD-3 和 MGD-5 的根系鲜质量无显著差异。LP 处理后,MGD-3 和 MGD-5 植株根系鲜质量显著高于 SR-1 植株($P<0.05$),根系鲜质量的平均值分别为 SR-1 的 1.7 和 2.3 倍。

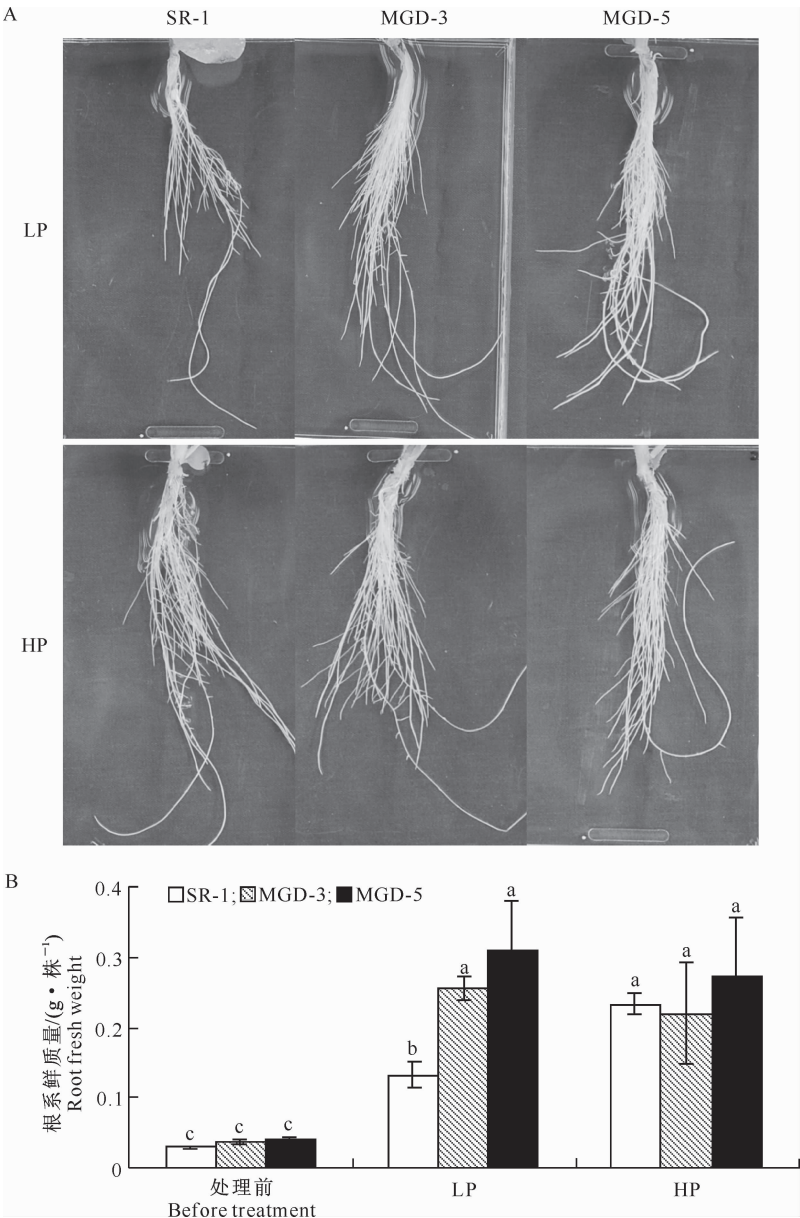


图 7 超表达 *OsMGD* 基因烟草植株的根系形态(A)和鲜质量(B)

Fig. 7 Root morphology (A) and weight (B) of tobacco with overexpression *OsMGD* gene

2.6 超表达 *OsMGD* 基因烟草在低磷胁迫下根冠比和磷含量的变化

图 8 为 3 种烟草幼苗在 HP 和 LP 条件下根冠比的变化。由图 8 可见,LP 处理后,野生型烟草植株和 2 种转基因烟草植株的根冠比均有所增加。其中,转基因植株 MGD-3 的根冠比升高了 2 倍, MGD-5 的根冠比提升了 1 倍,二者增加的幅度均达

到显著水平($P<0.05$);而野生型烟草植株 SR-1 的根冠比仅增加了 20%,并未达到显著水平。

LP 处理 7 d 后,对整株烟草体内磷含量进行测定后发现,无论在 HP 还是 LP 培养条件下,SR-1、MGD-3 和 MGD-5 间磷含量都没有显著差异。在 HP 营养液中培养的烟草植株的磷含量为 8.6~8.8 mg/g;LP 处理后烟草植株磷含量为 3.9~4.1

mg/g,烟草植株磷含量均降低约 50%(图 9)。

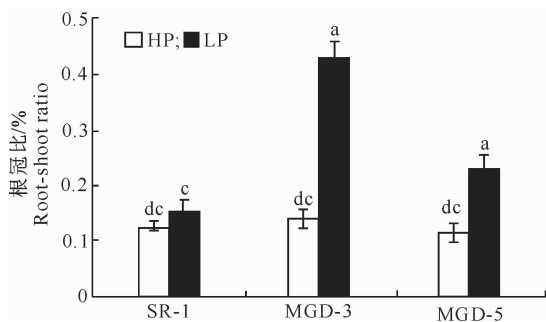


图 8 超表达 *OsMGD* 基因烟草植株根冠比的变化

Fig. 8 Change of root-shoot ratio in tobacco with overexpression *OsMGD* gene

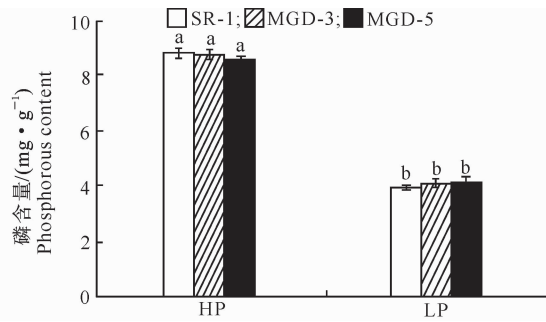


图 9 超表达 *OsMGD* 烟草植株的磷含量变化

Fig. 9 Change of phosphorus content in tobacco with overexpression *OsMGD* gene

3 讨 论

本研究用超表达 *OsMGD* 基因烟草植株探索了 *OsMGD* 基因在植物耐低磷胁迫和脂类代谢中的作用,结果表明,在超表达 *OsMGD* 基因烟草植株中, *MGD* 的活性显著提高,说明转入了正确的 *MGD* 基因。在转基因烟草中积累了大量 *MGDG*,表明转入烟草植株内的 *OsMGD* 基因编码了功能性的 *MGD*。 *MGD* 基因在烟草体内超表达不仅积累了大量的 *MGDG* 还增加了 *DGDG* 的含量,表明 *MGD* 对细胞中的 2 种半乳糖脂水平都有影响。同时发现, *DG-DG/MGDG* 虽然在 *MGD-5* 中显著升高,但是只比野生型植株 *SR-1* 增加了 17.8%,而 *MGD-3* 与 *SR-1* 之间无显著差异,说明 *MGD* 增多后会诱导 *DGD* 的生成,进而增加 *DGDG* 的合成,以维持细胞中 2 种半乳糖脂的最适比例。超表达 *OsMGD* 基因还使得烟草植株中的磷脂和脂肪酸含量发生了变化,这可能是由于 *MGD* 活性的升高对磷脂和脂肪酸的合成有一定的调节作用^[18-19]。

本试验发现,超表达 *MGD* 烟草植株细胞膜中的半乳糖脂、磷脂和脂肪酸的含量均发生了明显变化。转基因烟草植株在 *LP* 条件下叶片生长正常,叶绿素含量也显著高于野生型烟草,说明转基因烟草叶片中叶绿体膜的受损程度小于野生型植株。 *LP* 处理后,转基因烟草根系明显比野生型烟草根系强壮,对根系生物量和根冠比的分析结果也与这一现象相符。通常在低磷条件下,耐低磷植物的根面积和根部生物量会显著高于缺磷敏感型植株,且其根冠比也会增加^[20]。从以上生理现象可以看出,超表达 *OsMGD* 烟草的耐低磷能力增强。

对缺磷前后烟草体内磷含量的测定发现,在

HP 和 *LP* 条件下,转基因烟草与野生型烟草体内磷含量无显著差异。这说明转基因烟草耐低磷能力的提高并不是由于增加了磷的吸收,而可能是由于半乳糖脂对缺失的磷脂的补充。前人的研究表明,植物在低磷条件下,质体膜上的磷脂含量会急剧减少,但是 *DGDG* 含量会显著增加,植物本身会根据细胞膜对磷脂的需要程度将诱导合成的 *DGDG* 从质体内膜转移到质体外膜以补充缺失的磷脂, *DGDG* 还会通过膜的直接接触转移到线粒体膜上,对呼吸电子链的传递起到保护作用^[21]。本试验中,转基因烟草中不仅积累了大量的半乳糖脂,其叶片中的磷脂含量也显著增加。由于在 *LP* 条件下,植物体内的磷脂会急剧减少,叶片中大量的磷脂储备可能会降低缺磷对细胞膜的损害程度;与全营养培养的植株相比,燕麦在无磷条件下培养后根系质膜中 70% 的磷脂被 *DGDG* 替代^[22]。在拟南芥中, *MGDG* 合成酶被分为 2 个亚型:亚型 A(*atMGD1*) 和亚型 B(*atMGD2* 和 *atMGD3*),在低磷条件下亚型 B 在根中的表达增加,并且根中原质体会累积大量 *DGDG*,质体外增加的半乳糖脂会替代缺失的磷脂以维持磷酸盐平衡^[23]。

总之,在烟草中超表达 *OsMGD* 基因后, *MGD* 活性提高,植株对低磷的耐受能力也有所增加。转基因植株耐低磷能力的提升与体内大量累积的半乳糖脂和磷脂有关,由于脂类物质之间的相互替换补充才维持了转基因植株膜的结构和功能。因此,超表达 *MGD* 基因可以提高植物的耐低磷能力。

【参考文献】

[1] Dormann P. Synthesis and function of the galactolipid digalactosyldiacylglycerol [M]//Christoph B. The chloroplast. Springer Netherlands, Michigan State University, 2010: 203-

- 211.
- [2] Kobayashi K, Kondo M, Fukuda H, et al. Galactolipid synthesis in chloroplast inner envelope is essential for proper thylakoid biogenesis, photosynthesis, and embryogenesis [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007, 104(43): 17216-17221.
- [3] Adam Z, Charuvi D, Tsabari O, et al. Biogenesis of thylakoid networks in angiosperms: Knowns and unknowns [J]. Plant Mol Biol, 2011, 76(3/4/5): 221-234.
- [4] Shimojima M, Ohta H, Iwamatsu A, et al. Cloning of the gene for monogalactosyldiacylglycerol synthase and its evolutionary origin [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997, 94(1): 333-337.
- [5] Awai K, Marechal E, Block M A, et al. Two types of MGDG synthase genes, found widely in both 16 : 3 and 18 : 3 plants, differentially mediate galactolipid syntheses in photosynthetic and nonphotosynthetic tissues in *Arabidopsis thaliana* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001, 98(19): 10960-10965.
- [6] Andersson M, Dormann P. Chloroplast membrane lipid biosynthesis and transport [M]//Sandelius A, Aronsson H. The chloroplast. Springer Berlin: Heidelberg, 2009: 125-158.
- [7] 王海英, 许亦农. 缺磷胁迫下烟草叶片磷脂酰甘油(PG)含量降低的分子机理 [J]. 植物生理与分子生物学学报, 2006, 32(6): 643-648.
- Wang H Y, Xu Y N. Molecular mechanism of the decrease in phosphatidylglycerol content in tobacco leaves under phosphate deficiency stress [J]. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology, 2006, 32(6): 643-648. (in Chinese)
- [8] Benning C, Ohta H. Three enzyme systems for galactoglycerolipid biosynthesis are coordinately regulated in plants [J]. Journal of Biological Chemistry, 2005, 280(4): 2397-2400.
- [9] Sato N, Hagio M, Wada H, et al. Environmental effects on acidic lipids of thylakoid membranes [J]. Biochemical Society Transactions, 2000, 28(9): 12-14.
- [10] Essigmann B, Hespeneide B M, Kuhn L A, et al. Prediction of the active-site structure and NAD(+) binding in SQD1, a protein essential for sulfolipid biosynthesis in *Arabidopsis* [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1999, 369(1): 30-41.
- [11] Nakagawa T, Kurose T, Hino T, et al. Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2007, 104(1): 34-41.
- [12] Badawi G H, Yamauchi Y, Shimada E, et al. Enhanced tolerance to salt stress and water deficit by overexpressing superoxide dismutase in tobacco (*Nicotiana tabacum*) chloroplasts [J]. Plant Science, 2004, 166(4): 919-928.
- [13] Zhang L, Xi D M, Li S W, et al. A cotton group C MAP kinase gene, GhMPK2, positively regulates salt and drought tolerance in tobacco [J]. Plant Mol Biol, 2011, 77(12): 17-31.
- [14] Dubots E, Audry M, Yamaryo Y, et al. Activation of the chloroplast monogalactosyldiacylglycerol synthase MGD1 by phosphatidic acid and phosphatidylglycerol [J]. Journal of Biological Chemistry, 2010, 285(9): 6003-6011.
- [15] Huynh V B, Repellin A, Zuily-Fodil Y, et al. Aluminum stress response in rice: Effects on membrane lipid composition and expression of lipid biosynthesis genes [J]. Physiol Plant, 2012, 146(3): 272-284.
- [16] Sakaki T, Zahringer U, Warnecke D C, et al. Sterol glycosides and cerebrosides accumulate in *Pichia pastoris*, *Rhynchosporium secalis* and other fungi under normal conditions or under heat shock and ethanol stress [J]. Yeast, 2001, 18(8): 679-695.
- [17] 张志良, 瞿伟菁. 植物生理学实验指导 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2003: 74-77.
- Zhang Z L, Qu W J. Experimental guidance for plant biology [M]. Beijing: Higher Education Press, 2003: 74-77. (in Chinese)
- [18] Klaus D, Hartel H, Fitzpatrick L M, et al. Digalactosyldiacylglycerol synthesis in chloroplasts of the *Arabidopsis* dgd1 mutant [J]. Plant Physiology, 2002, 128(3): 885-895.
- [19] Andersson M X, Larsson K E, Tjellstrom H, et al. The plasma membrane and the tonoplast as major targets for phospholipid- to-glycolipid replacement and stimulation of phospholipases in the plasma membrane [J]. Journal of Biological Chemistry, 2005, 280(30): 27578-27586.
- [20] 高家合, 邓碧儿, 曾秀成. 烟草磷效率的基因型差异及其与根系形态构型的关系 [J]. 西北植物学报, 2010, 30(8): 1606-1613.
- Gao J H, Deng B E, Zeng X C. Genotypic variation in phosphorus efficiency of tobacco in relation to root morphological characteristics and root architecture [J]. Acta Bot Boreal, 2010, 30(8): 1606-1613. (in Chinese)
- [21] Jouhet J, Marechal E, Baldan B, et al. Phosphate deprivation induces transfer of DGDG galactolipid from chloroplast to mitochondria [J]. The Journal of Cell Biology, 2004, 167(5): 863-874.
- [22] Tjellstrom H, Hellgren L I, Wieslander A, et al. Lipid asymmetry in plant plasma membranes: Phosphate deficiency-induced phospholipid replacement is restricted to the cytosolic leaflet [J]. Faseb Journal, 2010, 24(4): 1128-1138.
- [23] Hartel H, Dormann P, Benning C. DGD1-independent biosynthesis of extraplastidic galactolipids after phosphate deprivation in *Arabidopsis* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97(19): 10649-10654.