

过表达 *TaLEA1* 和 *TaLEA2* 基因提高转基因拟南芥的耐盐性

姜奇彦¹, 李丽丽², 牛凤娟¹, 孙现军¹, 胡正¹, 张辉¹

(¹中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081; ²山东师范大学生命科学学院, 济南 250014)

摘要:我国土壤盐碱化日益严重, 对我国的粮食安全造成了严重威胁。耐盐基因挖掘对作物耐盐育种非常重要。LEA 蛋白家族是一个多基因家族, 在植物应对非生物胁迫中发挥重要作用。本课题组前期研究阐明小麦 *TaLEA1* 基因在拟南芥中过表达可以提高转基因植物的耐盐性和抗旱性。本研究系统分析了小麦 *TaLEA2* 基因表达蛋白的理化性质、基因表达模式及启动子功能区域, 并在拟南芥中过表达 *TaLEA2* 基因及共表达 *TaLEA1* 和 *TaLEA2* 基因, 分析 *TaLEA2* 基因的抗逆功能及 2 个 *LEA* 基因的抗逆效果。结果表明, *TaLEA2* 基因的表达产物属于第 3 组 LEA 蛋白, 是稳定的亲水蛋白, 富含 α -螺旋、 β -转角等结构。*TaLEA2* 基因在小麦根、茎、叶、花、种子等不同组织中均有表达, 盐胁迫条件诱导其高表达。在拟南芥中过表达 *TaLEA2* 基因, 或过表达 *TaLEA1* 和 *TaLEA2* 基因都能够提高转基因拟南芥的耐盐性和抗旱性, 转基因株系的种子萌发率、根长及叶绿素含量显著高于野生型, 且双基因过表达的转基因植物的抗逆能力高于单个基因过表达株系。本研究结果为 *LEA* 基因抗逆机理的研究和多基因共转提高植物抗逆性提供了重要信息。

关键词:小麦; *TaLEA1*; *TaLEA2*; 共表达; 耐盐

Overexpression of *TaLEA1* and *TaLEA2* Genes Improves Salt Tolerance in *Arabidopsis*

JIANG Qi-yan¹, LI Li-li¹, NIU Feng-juan¹, SUN Xian-jun¹, HU Zheng¹, ZHANG Hui¹

(¹Institute of Crop Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081;

²College of Life Science, Shandong Normal University, Ji'nan 250014)

Abstract: Soil salinization is becoming more and more serious in cultivated land in China, which poses a major threat to China's food security. Identifying novel genes conferring salt tolerance and understanding their functions in salt stress adaptation are vitally important for improving crop stress tolerance. The late embryogenesis abundant (LEA) proteins, usually encoded by a multigene family in higher plants, play a positive role in plant response to abiotic stress. We have previously shown that overexpression of *TaLEA1*, originally isolated in wheat, conferred salt and drought tolerance in *Arabidopsis*. In this study, we isolated *TaLEA2* gene from wheat, analyzed the physical and chemical properties of its deduced protein, determined its expression pattern and promoter region, and examined its function through overexpression in *Arabidopsis*. Furthermore, we reported the effects of simultaneous overexpression of *TaLEA1* and *TaLEA2* genes in transgenic *Arabidopsis*. The results showed that *TaLEA2* belonged to the third group of LEA proteins. *TaLEA2* was likely a stable hydrophilic protein and rich in α -helix and β -turn, thus providing a structural basis for its function in stress tolerance. *TaLEA2* expression was detected in wheat root, stem, leaf, flower and seed tissues, and up-regulated by high salt treatment. Overexpression of *TaLEA2* alone, or *TaLEA1* and *TaLEA2*

收稿日期: 2016-05-26 修回日期: 2016-06-24 网络出版日期: 2016-12-07

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20161207.1611.004.html>

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31601302); 转基因植物新材料的育种价值评估(2016ZX08010-005); 中国农业科学院科技创新工程/作物种质资源鉴定与发掘团队

第一作者主要从事抗逆种质资源鉴定评价及抗逆机理研究。E-mail: jiangqiyang@caas.cn

通信作者: 张辉, 主要从事抗逆种质资源鉴定评价及抗逆机理研究。E-mail: zhanghui06@caas.cn

simultaneously, conferred salt and drought tolerance in *Arabidopsis*, with the transgenic lines exhibiting higher seed germination rate, longer root length and higher chlorophyll content than the wild type (WT) controls. More importantly, the double overexpressors displayed a higher level of stress tolerance than single overexpressors and WT controls. This study generated valuable information on the function of wheat *LEA* genes in salt and drought stress, which may facilitate the deployment of these genes in enhancing crop tolerance to abiotic stresses in the future.

Key words: wheat; *TaLEA1*; *TaLEA2*; simultaneous overexpression; salt tolerance

盐胁迫不可逆地影响植物生长与产量,由盐胁迫造成的作物减产或绝收是农业生产与粮食安全的一个重要威胁。为了应对高盐胁迫,植物会有一系列基因表达发生变化,缓解盐胁迫对植物造成的伤害^[1]。目前为止,已经鉴定了大量与盐胁迫及渗透胁迫相关的基因,如 *LRR-RLK*、*Me-LEA3*、*POD*、*SsNHX1 VHA-c* 等^[2-6]。LEA 蛋白是一类在种子胚胎发育后期大量富集的脱水保护因子,近年来,有关 LEA 蛋白在植物抗逆境胁迫过程中的生物学功能备受关注^[7]。大量研究表明,植物 LEA 蛋白具有很强的亲水性和热稳定性,在植物的根和叶片等不同器官中均可被干旱、高盐等逆境胁迫诱导而大量表达,LEA 基因在植物中的过量表达也可有效提高转基因植物的抗旱和耐盐碱能力^[8-9]。

非生物逆境非常复杂,涉及很多基因。有研究者同时转入多个基因提高植物耐盐能力。如 G. Z. Qu 等^[10]将柽柳中的 *LEA* 基因及 *BZIP* 基因转入烟草,在 CaMV 35S 启动下过表达,双基因过表达转基因株系的耐盐和抗旱能力高于野生型及单基因过表达转基因株系,NaCl 胁迫下,转双基因株系与转单基因株系相比,丙二醛含量较低,叶绿素含量较高,说明转入 *LEA* 和 *BZIP* 两个基因与转入一个基因相比可以更有效地缓解盐胁迫带来的氧化胁迫伤害及对叶绿体的伤害。S. Zhou 等^[11]将盐角草 (*Salicornia europaea* L.) 的液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因 *NHX1* 与榆钱菠菜 (*Atriplex hortensis* L.) 的甜菜碱合成基因 *BADH* 在烟草中共同过表达,结果发现双基因转基因植物比单基因转基因植物具有更高的耐盐性,也同样说明 *NHX1* 和 *BADH* 双基因共转化可能产生了加性或互相促进的作用效果,其耐盐效果强于单基因的耐盐效果。

本课题组通过蛋白质组学方法研究发现盐胁迫下小麦 *LEA1* 蛋白(Q8GV49)和 *LEA2* 蛋白(Q8GV48)上调表达,在 NCBI 上找到其对应的完整 cds 序列,GenBank 登陆号 AY148490.1 和 AY148491.1,即 *Ta-*

LEA1 基因和 *TaLEA2* 基因。*TaLEA1* 基因在拟南芥中过表达显著提高了转基因植物的耐盐性和抗旱性^[12]。赵咏梅等^[13]将 *TaLEA2* 基因转入拟南芥,用 35S 驱动表达,结果表明转基因拟南芥在 10% PEG6000 及 0.8% NaCl 培养基上长势均好于野生型,说明 *TaLEA2* 基因在植物水分调节方面可能具有重要作用,但也只是对 T₀ 转基因株系进行了表型上简单的抗逆性鉴定。本研究首先以小麦 *TaLEA2* 为研究对象,在氨基酸序列、理化性质分析、表达模式及启动子分析的基础上,在拟南芥中过表达 *TaLEA2* 基因,进一步验证 *TaLEA2* 在高盐胁迫下的生物学反应。然后将 *TaLEA1* 基因和 *TaLEA2* 基因共转入拟南芥,研究 2 个基因同时在拟南芥中过表达对提高植物抗逆性的作用,并比较分析了双基因转基因植物与单基因转基因植物的抗逆效果,为 *LEA* 基因抗逆机理的研究和多基因共转提高植物抗逆性提供重要信息。

1 材料与方法

1.1 材料和菌种

小麦材料为济麦 19,拟南芥生态型为 Col-0 型,大肠杆菌菌株为 DH5 α ,农杆菌菌株为 GV3101。以上材料和菌种均保存在中国农业科学院作物科学研究所抗逆课题组。

1.2 *TaLEA2* 基因克隆及表达分析

根据 *TaLEA2* 基因(GenBank 登录号:AY148491.1)序列设计引物 LEA2-gene(表 1),以小麦品种济麦 19 根部 RNA 反转录获得的 cDNA 为模板进行 *TaLEA2* 基因的 cds 扩增,并以小麦品种济麦 19 的 DNA 为模板进行 *TaLEA2* 基因组序列的扩增。

根据 *TaLEA2* 的 cds 序列设计引物 LEA2-RT(表 1),分析小麦在正常及 350 mmol/L NaCl 盐胁迫不同时间(2 h、6 h、12 h、24 h、48 h)以及不同组织(根、茎、叶、花、种子)的表达模式,以小麦 *Tubulin* 基因为内参,引物序列见表 1。

表 1 实验所用引物列表

Table 1 The primers used in this study

引物名称	引物序列-正向引物(5'-3')	引物序列-反向引物(5'-3')
Primer name	Primer sequence-Forward (5'-3')	Primer sequence-Reverse (5'-3')
LEA2-gene	ATGGCCTCCAACCAGAACC	TTACACCAAATGGGCGGAAA
LEA2-RT	CGCACAGTACACCAAGGAATCAGC	GCGAAGACCAAACGAGTAAAGG
Tubulin	GAGGCCTCGTGTGCTGCTTTGT	GCCCAGTTGTTACCCGACCCAGA
UBQ3	CGGAAAGACCATTACTCTGCA	CAAGTGTGCGACCATCTCTCAA
LEA2-Vec	catgccATGGCCTCCAACCAGAACC	gaagatctTACACCAAATGGGCGGAAA
LEA2-Pro-GUS-1	cgggatccTATGAGGAGGGTGGTTTC	catgccatggCTCCTCTTGTCTTCTCTCTCAC
LEA2-Pro-GUS-2	cgggatccTCCTGGACCTGTCTTTAC	catgccatggCTCCTCTTGTCTTCTCTCTCAC
LEA2-Pro-GUS-3	cgggatccGATTCATCCAAGCCAGAG	catgccatggCTCCTCTTGTCTTCTCTCTCAC

1.3 *TaLEA2* 基因序列分析

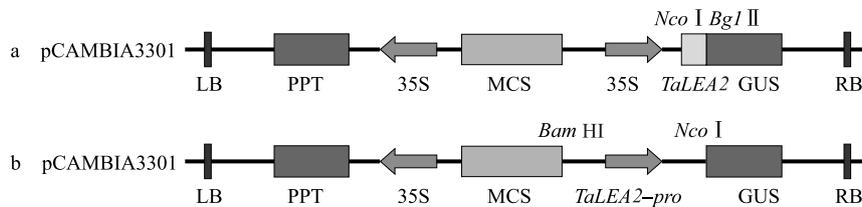
克隆得到的基因序列,通过 ProtParam 软件对小麦 LEA2 蛋白的氨基酸序列进行理化性质分析;利用 SOPMA 进行小麦 LEA2 蛋白质的二级结构预测;通过 EditSeq 软件,将基因序列翻译为氨基酸序列,利用 MEGA5.1 程序提供的 Jotun Hein 法将小麦 LEA2 的氨基酸序列与其他 LEA 蛋白的氨基酸序列进行比对,进化树分析采用 MEGA5.1 提供的 N-J 法。利用 PLACE 网站在线分析 *TaLEA2* 基因启动子可能存在的顺式作用元件。

1.4 *TaLEA2* 基因植物表达载体构建

根据 *TaLEA2* 基因序列和 pGFPGUSplus 载体酶切位点,设计引物 LEA2-Vec(序列见表 1,上下游引物 5'端分别增加一个 *Nco*I 和 *Bgl* II 酶切位点),从含有 *TaLEA2* 基因的质粒中扩增 *TaLEA2* 基因的 cds

序列,目的片段回收后连接至 pEASY-Blunt 克隆载体,转化大肠杆菌并提质粒,质粒经测序验证正确后经 *Nco*I 和 *Bgl* II 双酶切,并连接至 pCAMBIA3301 植物表达载体上 *GUS* 基因之前 35S 启动子之后的位置(图 1a)。通过 PCR 检测,得到含有 *TaLEA2* 基因的阳性转化质粒 35S::*TaLEA2*-pCAMBIA3301,用于转化拟南芥,研究 *TaLEA2* 基因功能。

根据 *TaLEA2* 启动子序列和 pCAMBIA3301 载体上 35S 启动子两侧的酶切位点,设计引物 LEA2-Pro-GUS-1,2,3 扩增 *TaLEA2* 基因启动子不同片段序列(序列见表 1,上下游引物 5'端分别增加一个 *Bam*HI 和 *Nco*I 酶切位点),并将启动子片段连接至 pCAMBIA3301 载体上,替换 *GUS* 基因之前的 35S,构建载体 *TaLEA2*-Pro-GUS(图 1b),研究 *TaLEA2* 基因启动子不同片段对 *GUS* 基因的驱动表达能力。

图 1 35S::*TaLEA2*-pCAMBIA3301 (a) 和 *TaLEA2*-Pro-GUS (b) 表达载体构建示意图Fig. 1 Construction of 35S::*TaLEA2*-pCAMBIA3301 (a) and *TaLEA2*-Pro-GUS (b)

1.5 转基因拟南芥及烟草瞬时表达

将阳性转化质粒 35S::*TaLEA2*-pCAMBIA3301 转入农杆菌 GV3101,并采用浸花法转化拟南芥。转化后收获的 T_1 种子播种于土中,待长出 4 片叶时,喷除草剂(1/1000 Basta)筛选阳性植株,并提取阳性苗叶片 DNA,PCR 检测目的基因,单株收获 T_2 种子,并在含除草剂的 MS 固体培养基上筛选有 3:1 性状分离的株系,移栽并单株收获 T_3 种子,在含除

草剂的 MS 固体培养基上筛选不发生抗性分离的纯合株系。以拟南芥 *AtUBQ3* 基因(引物序列见表 1)作为内参,用 LEA1-RT 引物(表 1)对纯合株系进行 RT-PCR 检测后,用于后续转基因拟南芥抗性分析。对于 *TaLEA1* 和 *TaLEA2* 双基因转基因拟南芥的获得方法同上,只是含 2 个基因的菌液同时侵染同一个植株时,先用含潮霉素的培养基筛选,再喷除草剂筛选,并结合 PCR 检测的结果,得到同时含

TaLEA1 和 *TaLEA2* 基因的阳性植株。

将阳性转化质粒 *TaLEA2-Pro-GUS* 转入农杆菌 GV3101 后注射本明烟草叶片背面,注射后的烟草暗处理 12~18h,移至培养室培养,48~72 h 内取注射后的叶样,并进行 GUS 染色。

1.6 转基因拟南芥抗逆性分析

转 *TaLEA1* 与 *TaLEA2* 基因及转双基因的拟南芥耐盐性分析包括萌发率、根长的统计分析;幼苗盐胁迫处理下的表型分析,以及叶片水分丧失率、水分利用效率、叶绿素含量的测定。

萌发率实验:在含有 150 mmol/L NaCl 的 MS 平板中点种野生型和转基因拟南芥植物种子,分析种子萌发对 NaCl 的敏感性。播种后,4 °C 春化 3 d 后置于温室(22 °C)正常培养。当种子幼根已经穿出种皮则认为萌发,每天统计种子的萌发率。

根长实验:转基因和 WT 种子种植在 MS 平板中萌发。5 d 后,野生型和转基因株系萌发的幼苗被小心地转移至含有 100 mmol/L NaCl 的新的 MS 平板中,竖直培养 7 d 后,测量幼苗的根长。

苗期盐胁迫分析:转基因和 WT 种子在 MS 平板中萌发并生长 10 d 后移苗至营养土与蛭石(1:1)混合土中,每盆移栽 5 株,正常培养浇水 45 d 后,在托盘底部浇灌 350 mmol/L NaCl,待土壤吸收盐溶液饱和后,去除盐溶液,盐胁迫 8 d 后观察植物在盐胁迫下的表型,测定植株叶绿素含量。

叶绿素含量的测定:80% 丙酮萃取叶绿素,使用 DU800 分光光度计(Fullerton, CA, USA)测量 663 nm 和 645 nm 的吸光率。叶绿素含量计算公式为 $Chl = (0.0802 \times A_{663} + 0.202 \times A_{645}) / W$,单位为 mg/g,其中 A_{663} 、 A_{645} 分别是叶绿素溶液在波长 663 nm 和 645 nm 处的吸光值。每个株系测定 5 个植株,W 为植株重量,独立实验重复 3 次。

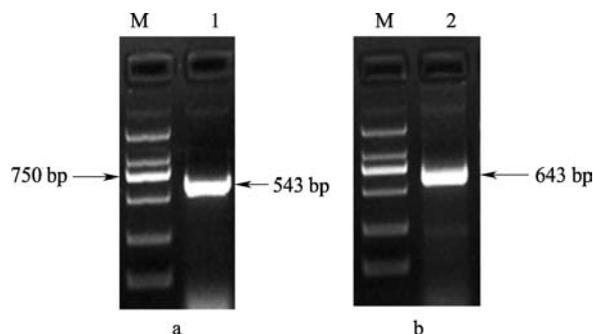
苗期早胁迫分析:将野生型以及转基因拟南芥种子直接撒播在混合土(营养土与蛭石比例 2:1)中,培养室(22 °C,70%湿度,12 h 光照/12 h 黑暗循环)中正常条件培养,拟南芥幼苗长至 4 叶时,将其单株移至新的混合土(营养土与蛭石比例 2:1)中,正常条件培养 45 d 后,拟南芥幼苗长至莲座期大小,停止供水,早胁迫处理 15 d 后恢复供水,复水 4 d 后统计野生型以及转基因拟南芥存活率,实验重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 *TaLEA2* 基因克隆及序列分析

在小麦根中克隆得到 *TaLEA2* 的 cds 序列(图

2a)以及 DNA 序列(图 2b),序列分析发现其完整开放阅读框为 543 bp,编码由 181 个氨基酸构成的蛋白质,预测其分子量和等电点(pI)分别为 18.79 kD 和 6.09。基因组起始密码子到终止密码子间序列为 643 bp,包含 2 个外显子,大小分别为 61 bp 和 482 bp,1 个内含子,大小为 100 bp。



M:DL2000 marker;1:*TaLEA2* 的 cDNA PCR 扩增产物;
2:*TaLEA2* 的 DNA PCR 扩增产物
M:Marker DL2000,1:cDNA fragment of *TaLEA2*,
2:Genomic DNA fragment of *TaLEA2*

图 2 *TaLEA2* PCR 扩增

Fig.2 PCR amplification of *TaLEA2*

2.2 小麦 LEA2 蛋白的氨基酸分析

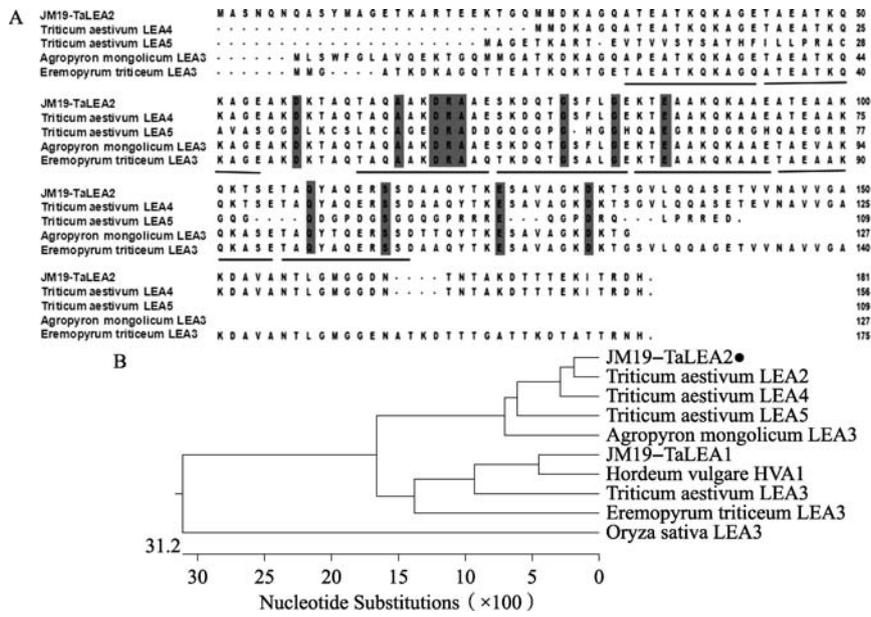
通过 ProtParam 软件对小麦 LEA2 蛋白的氨基酸序列进行理化性质分析(表 2),其极性氨基酸(亲水氨基酸)所占比例为 62.8%,不稳定指数为 28.19,结果表明该蛋白为稳定的亲水性蛋白(不稳定指数小于 40)。经过 SOPMA 软件预测小麦 LEA1 蛋白的二级结构,发现该蛋白具有 80.56%的 α -螺旋(Hh, alpha helix)、3.33%的 β -转角(Tt, beta turn)、1.67%的 β -片层(Ee, extended strand)以及 14.44%的无规则卷曲(Cc, random coil)等结构,其中 α -螺旋是其主要的蛋白二级结构,具有典型的 LEA 蛋白结构域。

表 2 小麦 LEA2 的氨基酸理化性质分析

Table 2 The analysis of physical and chemical properties of amino acid of LEA2 protein

理化性质 Physical and chemical properties	分析值 Value
氨基酸数 Number of amino acids	180
理论等电点 Theoretical pI	5.99
酸性氨基酸比例(%) Proportion of acidic amino acids	15
碱性氨基酸比例(%) Proportion of basic amino acids	15
极性氨基酸比例(%) Proportion of polar amino acids	62.8
疏水性平均值 Grand average of hydropathicity	-1.05
不稳定指数 Instability index	28.19

TaLEA2 基因表达蛋白的氨基酸序列分析(图 3),发现其具有 7 个由 11-氨基酸残基(TAQAAKEKAGE)



A: *TaLEA2* 与其他植物 *LEAs* 氨基酸序列比对,下划线表示 11-氨基酸基元序列;B: *TaLEA2* 与其他植物 *LEAs* 进化树分析
 A: Sequence alignment of *TaLEA2* with other LEA proteins, The 11-amino-acid repeating motif is underlined,
 B: Phylogenetic tree of *TaLEA2* and other plant LEA genes

图 3 *TaLEA2* 与 LEA 家族氨基酸序列及进化树分析

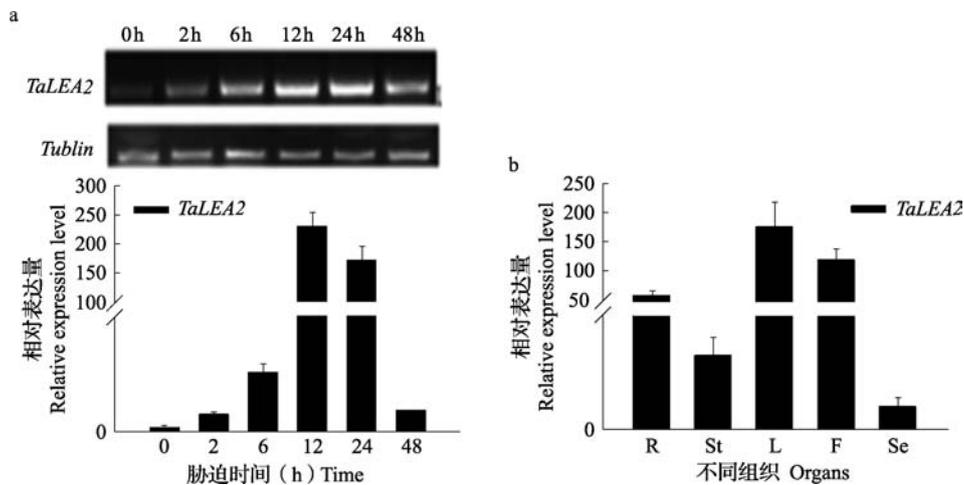
Fig. 3 Sequence alignment and phylogenetic tree of *TaLEA2* and other plant LEA genes

构成的基元序列,这些基元序列也说明小麦 *LEA2* 蛋白属于第 3 组 LEA 蛋白。进化树分析发现,与中国春的 *LEA2*、*LEA4*、*LEA5* 和沙芦草的 *LEA3* 聚在同一分支,燕麦 19 和中国春的 *LEA2* 基因序列相似,它们与中国春 *LEA4* 亲缘关系很近。

2.3 *TaLEA2* 基因的表达模式

通过半定量及荧光定量 PCR 的方法,研究 *Ta-*

LEA2 基因在盐胁迫下表达模式。发现盐胁迫处理 2 h、6 h、12 h、24 h 与 48 h 后, *TaLEA2* 基因在小麦根中的表达量均高于处理前(0 h),且盐胁迫处理不同时间 *TaLEA2* 基因表达量呈先升高后下降趋势,在 12 h 时表达量最高(图 4a)。在小麦不同组织中根、茎、叶、花、种子中均有表达,呈组成型表达模式(图 4b)。



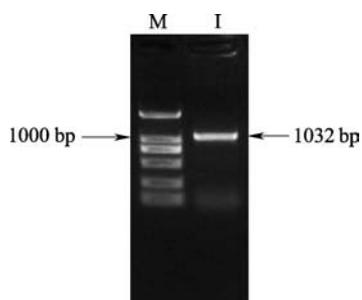
a: 半定量及荧光定量 PCR 分析小麦根中 *TaLEA2* 基因在正常和 2% 盐胁迫 2 h、6 h、12 h、24 h 和 48 h 后表达量;
 b: 荧光定量 PCR 检测 *TaLEA2* 基因在小麦根(R)、茎(St)、叶(L)、花(F)、种子(Se)中表达量
 a: Expression analysis of *TaLEA2* under control and 2 h, 6 h, 12 h, 24 h and 48 h of 2% NaCl stress in wheat root tissues by RT-PCR and qRT-PCR, b: Expression analysis of *TaLEA2* in root, stem, leaf, flower and seed tissues of wheat by qRT-PCR

图 4 *TaLEA2* 基因表达分析

Fig. 4 The expression of *TaLEA2* gene

2.4 *TaLEA2* 启动子克隆及作用区域分析

根据 *TaLEA2* 基因 ATG 上游 2000 bp 序列设计引物,从小麦基因组 DNA 中克隆了 *TaLEA2* 基因的启动子序列 1032 bp(图 5)。分析启动子顺式作用元件,发现该基因具有一系列与冷、ABA、脱水等胁迫相关的顺式作用元件,例如:与冷胁迫相关的 CBF 作用元件有 6 个,与 ABA 胁迫相关的 ABRE 作用元件有 10 个,DPBF 作用元件 5 个,与冷胁迫和脱水胁迫相关的 MYB 作用元件 15 个,MYC 作用元件 10 个等,这些顺式作用元件对于植物应对脱水等非生物胁迫,启动基因表达具有重要意义(表 3)。

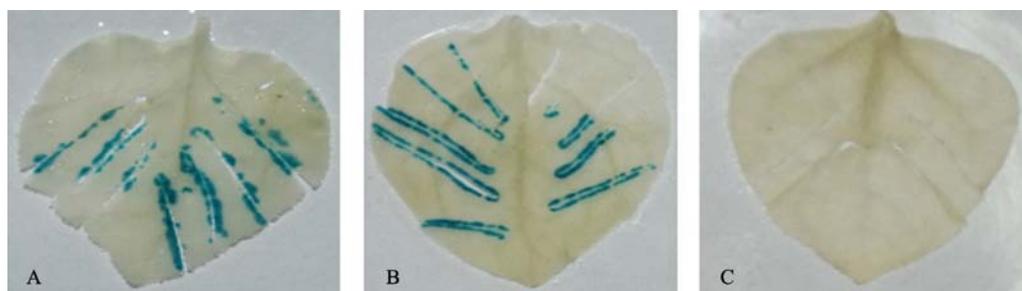


M:DL2000 marker;I:*TaLEA2* 启动子 PCR 扩增产物

M:Marker DL2000,I:The PCR product of *TaLEA2* promoter

图 5 *TaLEA2* 启动子的 PCR 扩增结果

Fig.5 Identification of *TaLEA2* promoter by PCR



A:870 bp;B:323 bp;C:93 bp

图 6 组织化学分析 *TaLEA2* 启动子驱动的 *GUS* 基因在烟草中的表达

Fig.6 Histochemical assay of *GUS* gene expression driven by the *TaLEA2* promoter in tobacco

2.5 过表达 *TaLEA2* 增强拟南芥的耐盐和抗旱能力

荧光定量及半定量 PCR 表明 *TaLEA2* 基因在野生型中没有表达,在 3 个纯合的 T_3 转基因株系中有表达(图 7a)。150 mmol/L NaCl 胁迫条件下,3 个转基因株系的相对萌发率高于野生型(图 7b),说明过表达 *TaLEA2* 基因可以提高转基因株系的相对萌发率,提高转基因植物种子萌发期的耐盐能力。盐胁迫处理条件下,转基因株系根长显著长于野生型(图 7c)。生长 45 d 的拟南芥,350 mmol/L NaCl 处

表 3 *TaLEA2* 启动子顺式作用元件分析

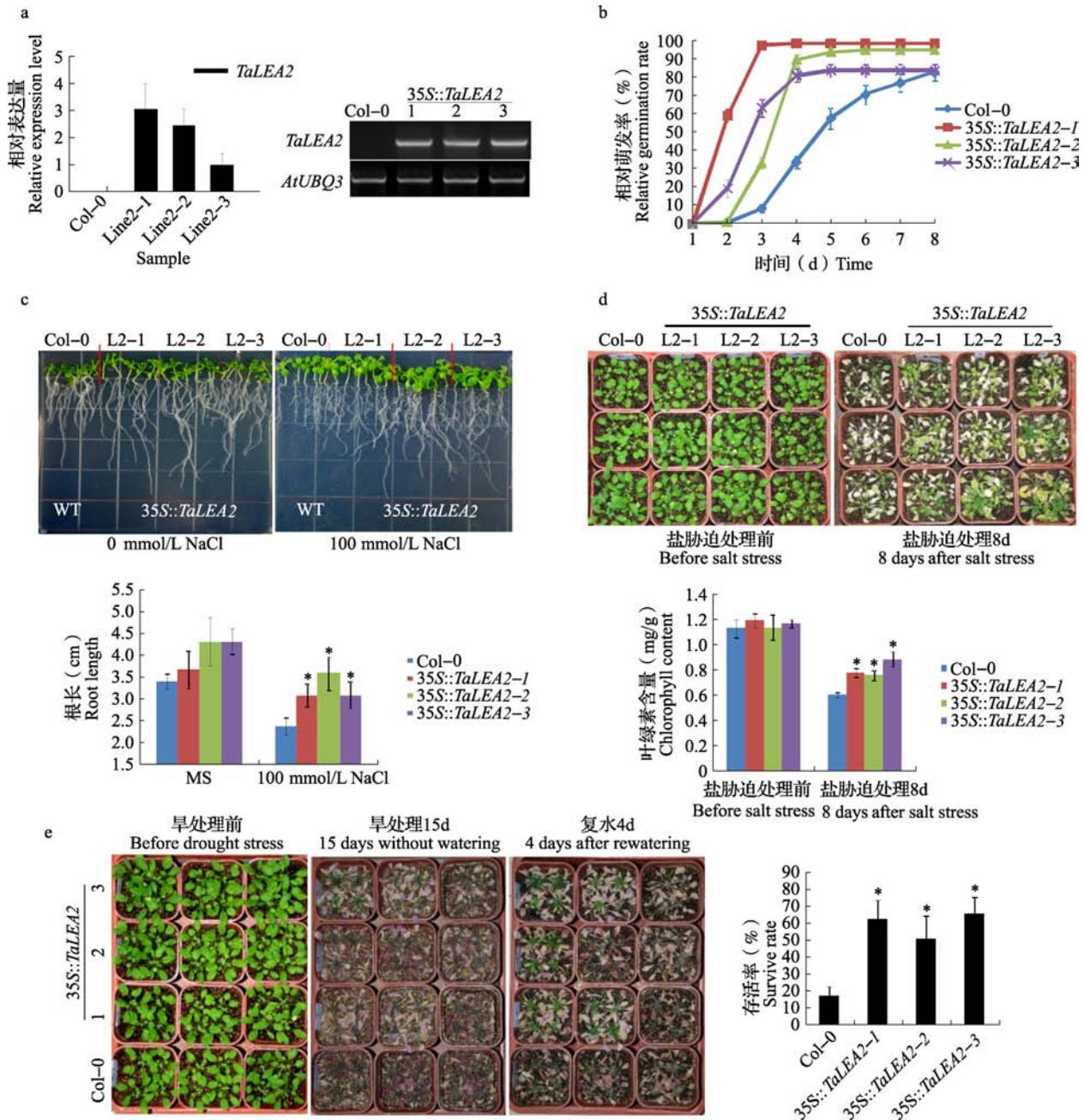
Table 3 The analysis of *cis*-acting elements in the promoter of *TaLEA2*

Cis-acting element 顺式作用元件	Number 数目	Core sequence 核心序列	Function 功能
ABRE	10	ACGTG	ABA
CBF	6	RYCGAC	cold
RYC	3	CCAAT	HSE
CRT	2	GTCGAC	cold
DPBF	5	ACACNNG	ABA
DRE	2	RCCGAC	cold
LTRE	2	CCGAC	cold, drought, ABA
MYB	15	VNCTTR	ABA, dehydration
MYC	10	CANNTG	ABA, cold

为了分析 *TaLEA2* 启动子的功能,设计引物将 *TaLEA2* 启动子序列分为 3 个区域片段,大小分别是 870 bp、323 bp、93 bp,并将其连接 *GUS* 报告基因,农杆菌侵染转化烟草,分析发现 *TaLEA2* 启动子区域的 870 bp、323 bp 片段能够启动 *GUS* 表达,但 93 bp 大小的启动子不具有启动 *GUS* 表达的功能(图 6)。

理后发现和转基因拟南芥相比,野生型拟南芥失绿严重(图 7d)。3 个转基因株系的叶绿素含量显著高于野生型对照的叶绿素含量(图 7d),说明过表达 *TaLEA2* 基因植株苗期的耐盐性高于野生型。

同样,野生型和转基因拟南芥在土壤中正常条件下培养 45 d 后停止供水,15 d 后复水。复水 4 d 后,大部分野生型拟南芥不能恢复且最终死亡,仅有 18.3% 存活率,转基因拟南芥叶片重新伸展,复绿,转基因株系复水后存活率显著高于野生型(图 7e),说明过表达 *TaLEA2* 基因可以提高转基因株系的抗旱能力。



a: 荧光定量及半定量检测转基因株系中 *TaLEA2* 基因的表达; b: 野生型及转基因株系相对发芽率;
c: 野生型及转基因株系根长比较; d: 正常及盐胁迫条件下转基因株系及野生型表型及叶绿素含量测定;
e: 正常及早胁迫条件下野生型及转基因株系表型及复水后幼苗存活率

a: Detection of *TaLEA2* mRNA level in 35S::*TaLEA2* using real-time PCR and semi-quantitative RT-PCR,
b: Relative germination rate of wild type and 35S::*TaLEA2*, c: Comparing the root length between 35S::*TaLEA2* and wild-type,
d: The phenotype and chlorophyll content of wild-type and 35S::*TaLEA2* under normal and salt conditions,
e: The phenotype and survive rate of wild-type and 35S::*TaLEA2* under normal and drought conditions

图 7 过表达 *TaLEA2* 基因提高转基因拟南芥耐盐和抗旱能力

Fig. 7 Overexpression of *TaLEA2* in *Arabidopsis* confers salt and drought tolerance of transgenic plants

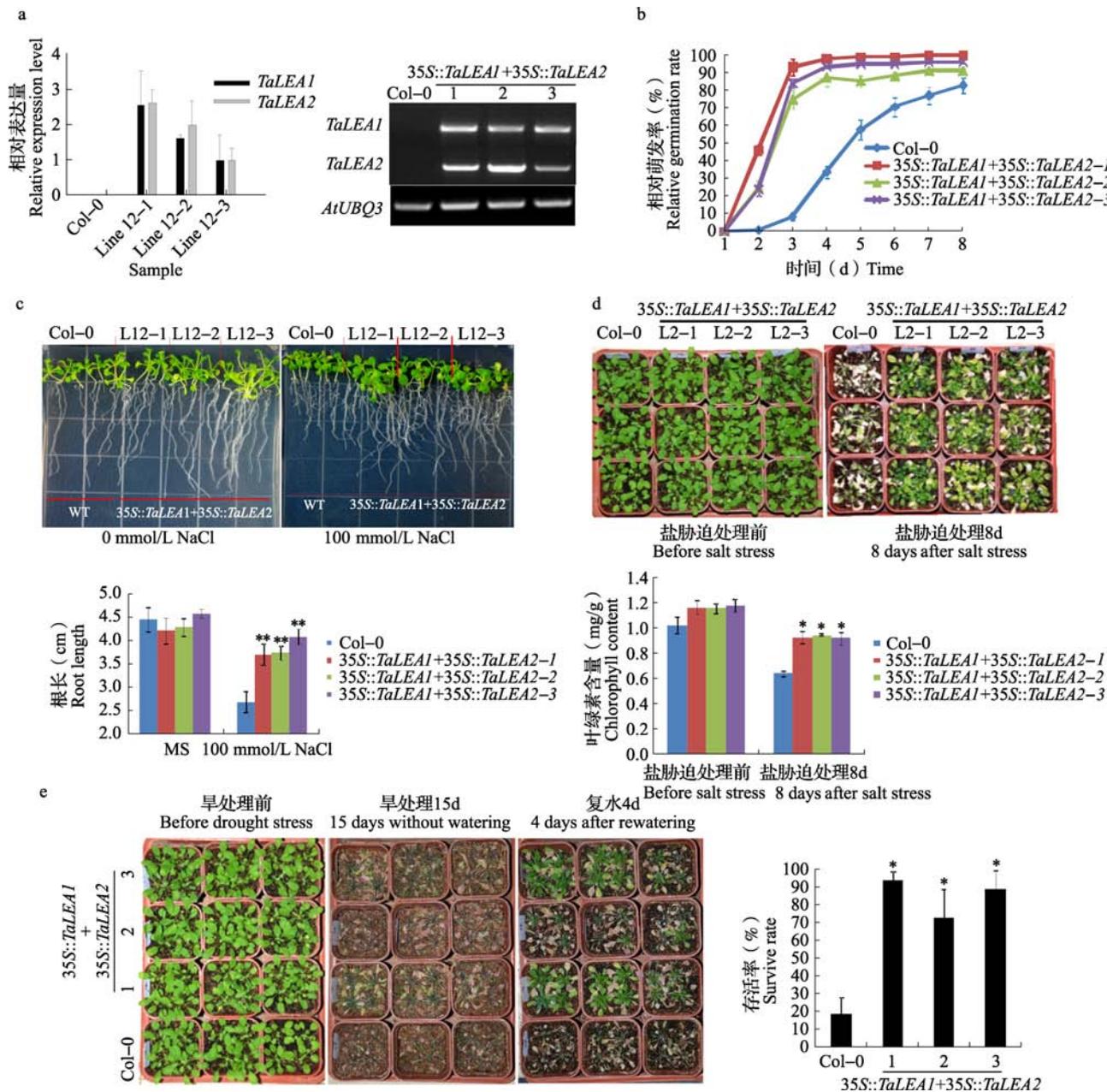
2.6 过表达 *TaLEA1* 和 *TaLEA2* 双基因增强转基因拟南芥的耐盐和抗旱能力

将之前研究获得的 *TaLEA1* 基因及本研究克隆的 *TaLEA2* 基因共同转入拟南芥, 获得双基因转基

因拟南芥株系。 *TaLEA1* 和 *TaLEA2* 基因在野生型中都没有表达, 在 3 个纯合的 T_3 转基因株系中有表达(图 8a), 说明 *TaLEA1* 和 *TaLEA2* 基因共同转入拟南芥中。盐胁迫条件下, 3 个转基因株系的相

对萌发率高于野生型(图 8b),根长显著长于野生型(图 8c)。生长 45 d 的拟南芥,盐胁迫处理后,3 个转基因株系的叶绿素含量显著高于野生型(图 8d),说明过表达 *TaLEA1* 和 *TaLEA2* 基因植株耐盐能力提高。

同样,野生型和转基因拟南芥在土壤中正常条件下培养 45 d 后停止供水,15 d 后复水。复水 4 d 后,大部分野生型拟南芥不能恢复且最终死亡,转基因株系复水后存活率显著高于野生型(图 8e),说明过表达 *TaLEA1* 和 *TaLEA2* 基因植株抗旱能力提高。



a: 荧光定量及半定量检测转基因株系中 *TaLEA1* 和 *TaLEA2* 基因的表达; b: 野生型及转基因株系相对发芽率; c: 野生型及转基因株系根长比较; d: 正常及盐胁迫条件下转基因株系及野生型表型及叶绿素含量测定; e: 正常及早胁迫条件下野生型及转基因株系表型及复水后幼苗存活率

a: Detection of *TaLEA1* and *TaLEA2* mRNA level in transgenic lines using real-time PCR and semi-quantitative RT-PCR,

b: Relative germination rate of wild type and transgenic lines, c: Comparing the root length between the transgenic lines than the wild-type;

d: The phenotype and chlorophyll content of wild-type and transgenic lines under normal and salt conditions,

e: The phenotype and survive rate of wild-type and transgenic lines under normal and drought conditions

图 8 *TaLEA1* 和 *TaLEA2* 双基因过表达提高转基因拟南芥耐盐和抗旱能力

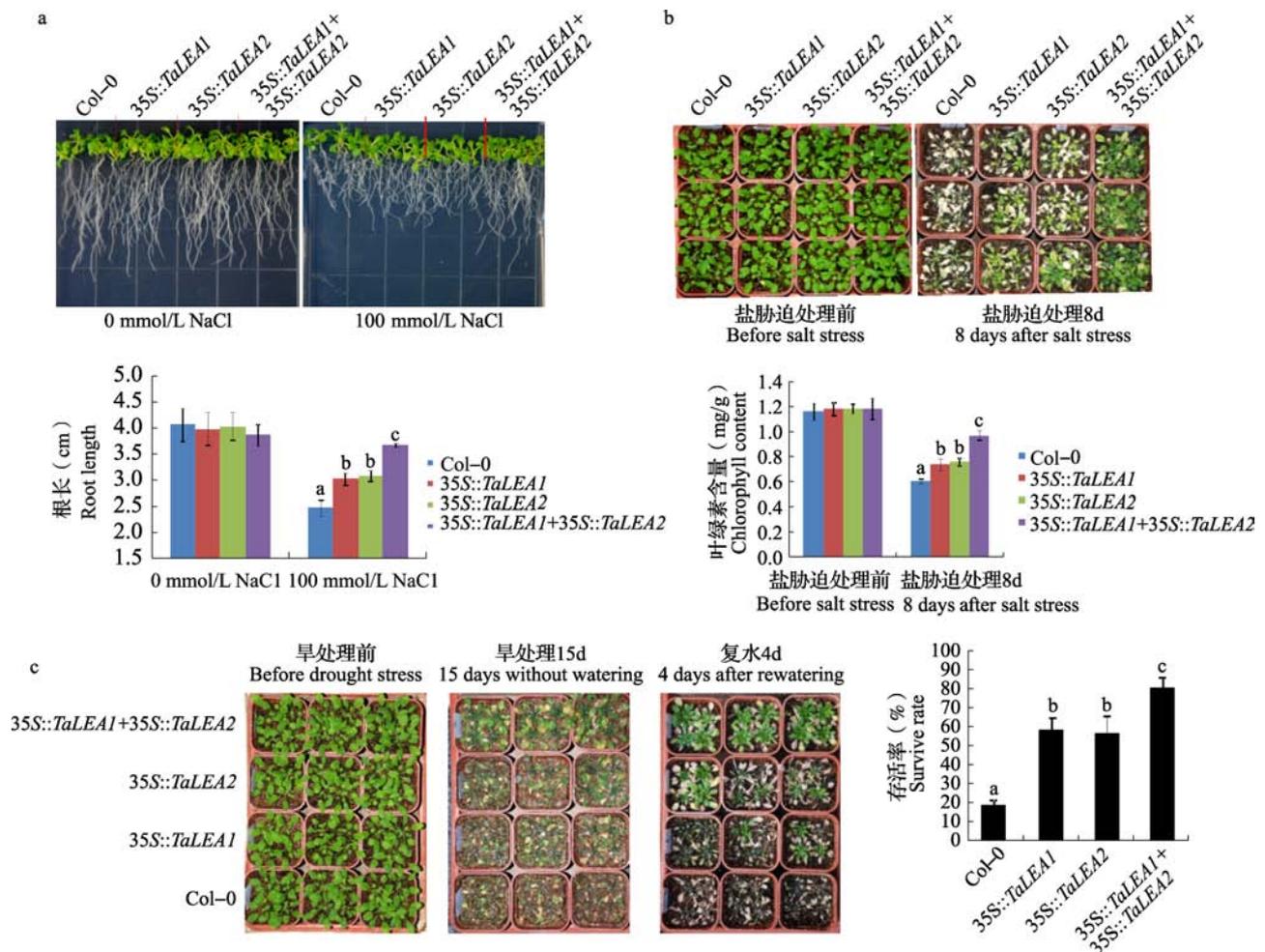
Fig. 8 Overexpression of *TaLEA1* and *TaLEA2* in *Arabidopsis* confers salt and drought tolerance to transgenic plants

2.7 双基因转基因植物抗逆能力高于单基因转基因植物

将 *TaLEA1* 和 *TaLEA2* 双基因过表达转基因株系与之前研究获得的 *TaLEA1* 单基因过表达转基因株系及本研究中的 *TaLEA2* 单基因过表达转基因株系进行抗逆性比较分析发现,单基因及双基因过表达株系的根长都显著高于野生型,而双基因过表达株系的根长显著长于 *TaLEA1* 或 *TaLEA2* 单基因过表达株系(图 9a)。生长 45 d 的拟南芥,盐胁迫处理后,野生型拟南芥失绿严重,单基因及双基因过表达株系的叶绿素含量均显著高于野生型(图 9b),且

双基因过表达株系的叶绿素含量显著高于单基因过表达株系,说明过表达 *TaLEA1* 或 *TaLEA2* 基因,以及同时过表达 *TaLEA1* 和 *TaLEA2* 基因均可以提高转基因植物的耐盐性,且双基因过表达株系耐盐能力更高。

同样,单基因及双基因过表达株系在干旱复水后的幼苗存活率都显著高于野生型,而双基因过表达株系的存活率显著高于单基因过表达株系(图 9c),说明过表达 *TaLEA1* 或 *TaLEA2* 基因,以及同时过表达 *TaLEA1* 和 *TaLEA2* 基因均可以提高转基因植物的抗旱性,且双基因过表达株系抗旱能力更高。



a: 盐胁迫条件下根长比较; b: 盐胁迫条件下表型及叶绿素含量测定; c: 旱胁迫条件下表型及复水后幼苗存活率

a: The root length was longer in the double overexpressors than the wild-type controls and single overexpressors,

b: The phenotype and chlorophyll content of wild-type and transgenic plants under normal and salt conditions,

c: The phenotype and survive rate of wild-type and transgenic plants under normal and drought conditions

图 9 *TaLEA1* 和 *TaLEA2* 双基因转基因株系抗逆能力高于单基因转基因株系

Fig. 9 Simultaneous overexpression of *TaLEA1* and *TaLEA2* resulted in higher stress tolerance than overexpressing either gene alone

3 讨论

根据生化特性和基元序列的同源性,LEA 蛋白可分为 5 组,有研究者分为 6 组。每组在耐逆应答中的作用不同。第 1 组具有较高的水合能力,是防止细胞在干旱胁迫时水分流失的水分结合蛋白^[14-15]。第 2 组也称脱水素^[16],是目前研究较为深入的一类 LEA 蛋白,在水分胁迫时稳定和保护蛋白质的结构及功能^[17-18]。第 3 组为参与植物渗透胁迫的一类蛋白^[19],该组蛋白 11 个氨基酸残基基元序列可形成两性 α -螺旋结构,可整合细胞液干旱脱水过程中浓缩的 Na 等离子,减缓离子浓度升高对细胞带来的不可逆伤害,防止组织过度脱水^[16-17],近年的研究表明,第 3 组 LEA 基因在植物抵御干旱和高盐等非生物胁迫的过程中发挥着重要作用^[20-23]。第 4 组可能起束缚离子的作用或形成一种保护结构,以利于细胞干燥脱水时保持膜稳定性^[24]。第 5 组含有比其他几组更多的疏水氨基酸残基,但缺乏高度的残基专一性^[14]。本研究在济麦 19 中克隆获得 *TaLEA2* 基因,其表达产物的氨基酸序列分析发现该基因具有 7 个 11-氨基酸基元序列,符合第 3 组 LEA 蛋白的氨基酸序列特点,同时小麦 *LEA3*、*LEA2* 基因与中国春 *LEA4* 基因亲缘关系很近,中国春 *LEA4* 基因编码蛋白属于第 3 组 LEA 蛋白^[25]。理化性质分析发现 *TaLEA2* 为稳定的亲水蛋白,另外 *TaLEA2* 具有 80.56% 的 α -螺旋、3.33% 的 β -转角,这些结构特点对其提高植物的抗逆性具有非常重要的作用^[26]。在 *TaLEA2* 的 1256 bp 启动子区域中发现了许多胁迫相关的顺式作用元件,包括 10 个 ABRE,15 个 MYB 和 10 个 MYC。这些顺式作用元件和相应的转录因子在 ABA 信号和非生物胁迫应答中具有十分重要的作用^[27]。另外,本研究在 *TaLEA2* 的启动子区域发现 2 个脱水应答顺式作用元件 (DRE, dehydration-responsive element)。在不依赖 ABA 的调控途径中,DRE 是一个主要的顺式作用元件,在应答非生物胁迫的基因表达中具有重要作用^[27]。分析 *TaLEA2* 启动子的功能,发现 870 bp、323 bp 的启动子能够启动 *GUS* 表达,但 93 bp 的启动子不能启动 *GUS* 表达,可能与启动子序列在 101 bp 处开始存在 TATA BOX,155 bp 处开始存在 CAAT BOX 有关。LEA2 蛋白的结构特点及基因的序列特点为其在应答逆境胁迫过程中发挥重要作用提供结构基础。

盐胁迫下 *TaLEA2* 表达量提高,且在植物不同

组织中均有表达,说明 *TaLEA2* 基因可能在植物应对高盐胁迫过程中发挥重要作用。将 *TaLEA2* 基因在拟南芥中过表达显著提高了转基因拟南芥的耐盐性,进一步证实了 *TaLEA2* 基因的抗逆功能。*TaLEA2* 基因过表达一方面提高转基因拟南芥盐胁迫下种子萌发率。*TaLEA2* 蛋白具有高亲水性,含有高达 80.56% 的 α -螺旋,它能够避免盐胁迫导致的细胞内高浓度的离子积累所引起的损伤,减弱细胞组织内的过度失水^[28],可能因此与野生型拟南芥相比提高了盐胁迫下转基因拟南芥的种子萌发率。另一方面,*TaLEA2* 基因过表达促进盐胁迫下植株根系生长。同样,在水稻中,ABA 胁迫下 LEA 蛋白家族的 *HVA1* 基因过量表达,明显促进水稻初生根和侧生根扩展,提高转基因水稻耐盐性^[29]。另外,转基因拟南芥苗期耐盐性和抗旱性提高,可能是由于 *TaLEA2* 基因过表达促进植物根系生长,进而提高植物营养物质的吸收,并提高细胞质膜的抗氧化的能力,减轻质膜损伤,提高幼苗吸水保水能力以及 Na^+ 和 K^+ 吸收能力,促进水分平衡及离子均衡,从而提高植物抗旱、耐盐能力^[30]。同属于第 3 组 LEA 蛋白的大麦 *LEA* 基因 *HVA1* 导入水稻^[29]、烟草^[31] 和桑树^[23] 后,也促进了转基因植株的根系生长,提高了转基因植株的抗旱和耐盐能力。

目前已经挖掘了大量的耐盐基因,也通过转基因方法验证了很多基因的耐盐功能。但非生物逆境非常复杂,涉及很多基因。有研究者同时转入多个基因提高植物耐盐能力。如 G. Z. Qu 等^[10] 将柃柳中 *LEA* 与 *BZIP* 基因中的 1 个或 2 个基因转入烟草,在 CaMV35S 启动下过表达,NaCl、甘露醇、PEG 6000 胁迫下,双基因过表达转基因株系的种子萌发率和生长率高于野生型及单基因过表达转基因株系,NaCl 胁迫下,转双基因株系与转单基因株系相比,丙二醛含量较低,叶绿素含量较高,说明转入 2 个基因 *LEA* 和 *BZIP* 与转入 1 个基因相比可以更有效地缓解盐胁迫带来的氧化胁迫伤害及对叶绿体的伤害。S. Zhou^[11] 等将盐角草 (*Salicornia europaea* L.) 的液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因 *NHX1* 与榆钱菠菜 (*Atriplex hortensis* L.) 的甜菜碱合成基因 *BADH* 在烟草中共同过表达,结果发现双基因转基因植物比单基因转基因植物具有更高的耐盐性,也同样说明 *NHX1* 和 *BADH* 双基因共转化可能产生了加性或互相促进的作用效果,其耐盐效果强于单基因的耐盐效果。本研究中将 *TaLEA1* 和 *TaLEA2* 两个基因同时过表达同样显著提高了转基因植物的抗逆能

力,且双基因过表达转基因株系抗逆能力高于单基因过表达转基因株系,说明 *TaLEA1* 和 *TaLEA2* 双基因的抗逆效果强于其中任何一个单基因的抗逆效果。本研究为 *LEA* 基因抗逆机理的研究和多基因共转提高植物抗逆性提供了重要信息,但 *TaLEA1* 和 *TaLEA2* 基因如何产生加性或者互相促进作用,显著提高植物抗逆能力的机理还需要进一步研究。

参考文献

- [1] Basyuni M, Kinjo Y, Baba S, et al. Isolation of salt stress tolerance genes from roots of mangrove plant, *Rhizophora stylosa* Griff., using PCR-based suppression subtractive hybridization[J]. Plant Mol Biol Rep, 2011, 29: 533-543
- [2] Alam M M, Sharmin S, Nabi Z, et al. Putative leucine-rich repeat receptor-like kinase of jute involved in stress response[J]. Plant Mol Biol Rep, 2010, 28: 394-402
- [3] Costa C D N M, Brígida A B S, Borges B D N, et al. Levels of Me-LEA3, a cDNA sequence coding for an atypical late embryogenesis abundant protein in Cassava, increase under in vitro salt stress treatment[J]. Plant Mol Biol Rep, 2011, 29(4): 997-1005
- [4] Gao C, Wang Y, Liu G, et al. Cloning of ten peroxidase (POD) genes from *Tamarix hispida* and characterization of their responses to abiotic stress[J]. Plant Mol Biol Rep, 2010, 28: 77-89
- [5] Li W, Wang D, Jin T, et al. The vacuolar Na^+/H^+ antiporter gene *SsNHX1* from the halophyte *Salsola soda* confers salt tolerance in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.) [J]. Plant Mol Biol Rep, 2011, 29: 278-290
- [6] Xu C, Zheng L, Gao C, et al. Overexpression of a vacuolar H^+ -ATPase c subunit gene mediates physiological changes leading to enhanced salt tolerance in transgenic tobacco[J]. Plant Mol Biol Rep, 2011, 29: 424-430
- [7] Hundertmark M, Hinch D K. LEA (late embryogenesis abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana* [J]. BMC Genomics, 2008, 9: 118
- [8] Dalal M, Tayal D, Chinnusamy V, et al. Abiotic stress and ABA-inducible group 4 LEA from *Brassica napus* plays a key role in salt and drought tolerance[J]. J Biotechnol, 2009, 139: 137-145
- [9] Ingram J, Bartels D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants[J]. Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1996, 47: 377-403
- [10] Qu G Z, Zang L. Co-transfer of *LEA* and *bZip* genes from *Tamarix* confers additive salt and osmotic stress tolerance in transgenic tobacco[J]. Plant Mol Biol Rep, 2012, 30(2): 512-518
- [11] Zhou S, Chen X, Zhang X, et al. Improved salt tolerance in tobacco plants by co-transformation of a betaine synthesis gene *BADH*, and a vacuolar Na^+/H^+ antiporter gene *SeNHX1* [J]. Biotechnol Lett, 2008, 30(2): 369-376
- [12] 姜奇彦, 孟强, 牛风娟, 等. 小麦 *TaLEA1* 基因的表达特征及抗逆功能验证[J]. 植物遗传资源学报, 2017, 18(2): 302-309
- [13] 赵咏梅, 杨建雄. 小麦耐逆基因 *TaLEA2*; 转化拟南芥的研究[J]. 西北植物学报, 2006, 26(1): 1-6
- [14] Ramanjulu S, Bartels D. Drought- and desiccation-induced modulation of gene expression in plant[J]. Plant Cell Environ, 2002, 25: 141-151
- [15] Hollung K, Espelund M, Jakobsen K S. Another *Lea* B19 gene (Group 1 *Lea*) from barley containing a single 20 amino acid hydrophilic motif[J]. Plant Mol Biol, 1994, 25: 559-564
- [16] Dure III L. A repeating 11-mer amino acid motif and plant desiccation[J]. Plant J, 1993, 3: 363-369
- [17] Ingram J, Bartels D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants[J]. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1996, 47: 377-403
- [18] Close T J. Dehydrins: a commonality in the response of plants to dehydration and low temperature[J]. Physiol Plant, 1997, 100: 291-296
- [19] Dure III L, Crouch M, Harada J, et al. Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants[J]. Plant Mol Biol, 1989, 12: 475-486
- [20] Kramer D, Breitenstein B, Kleinwächter M, et al. Stress metabolism in green coffee beans (*Coffea arabica* L.): expression of dehydrins and accumulation of GABA during drying[J]. Plant Cell Physiol, 2010, 51: 546-553
- [21] Straub P F, Shen Q, Ho T D. Structure and promoter analysis of an ABA- and stress-regulated barley gene *HVA1* [J]. Plant Mol Biol, 1994, 26: 617-630
- [22] Xu D, Duan X, Wang B, et al. Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, *HVA1*, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice [J]. Plant Physiol, 1996, 110: 249-257
- [23] Lal S, Gulyani V, Khurana P. Overexpression of *HVA1* gene from barley generates tolerance to salinity and water stress in transgenic mulberry (*Morus indica*) [J]. Transgenic Res, 2008, 17(4): 651-663
- [24] Bray E A. Molecular responses to water deficit[J]. Plant Physiol, 1993, 103: 1035-1040
- [25] 刘露露, 陈雷. 两个小麦 LEA 基因的特征及其对非生物胁迫的响应[J]. 中国农业科学, 2014, 4(19): 3736-3745
- [26] 孙海丹. LEA 蛋白质 11-氨基酸基序与植物抗旱性[J]. 东北师范大学学报, 2004, 36(3): 85-90
- [27] Yamaguchi-Shinozaki K, Kasuga M. Biological mechanisms of drought stress response[J]. JIRCAS Working Rep, 2002, 23: 1-8
- [28] Battaglia M, Olvera-Carrillo Y. The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins[J]. Plant Physiol, 2008, 148(1): 6-24
- [29] Chen Y S, Lo S F. A late embryogenesis abundant protein *HVA1* regulated by an inducible promoter enhances root growth and abiotic stress tolerance in rice without yield penalty[J]. Plant Biotechnol J, 2015, 13(1): 105-116
- [30] 杨小环, 王玉国. 种子引发对水分胁迫下大豆幼苗生理特性的影响[J]. 中国生态农业学报, 2009, 17(6): 1191-1195
- [31] 李楠, 赵琦, 黄静, 等. 六棱大麦 *hva1* 基因在烟草中遗传转化的研究[J]. 生物技术通报, 2007(3): 139-144