

过表达番茄GDP-L-半乳糖磷酸酶基因提高烟草抗MV诱导的氧化胁迫能力

王丽燕^{1,2}, 王玉¹, 孟夏¹, 孟庆伟^{1,*}

¹山东农业大学生命科学学院, 山东泰安271018; ²德州学院生物系, 山东德州253023

摘要: 为了探讨番茄GDP-L-半乳糖磷酸酶对烟草抗坏血酸(AsA)含量及抗氧化能力的影响, 从番茄叶片中分离了GDP-L-半乳糖磷酸酶基因(*LeGGP*), 并转入到烟草中。以野生型(WT)和转正义*LeGGP*烟草株系T₁-3和T₁-15为试材, 测定了甲基紫精(MV)处理下AsA、脱氢抗坏血酸(DHA)、H₂O₂、O₂⁻和叶绿素含量、抗坏血酸过氧化物酶(APX)活性、光合速率和叶绿素荧光参数等。Northern杂交分析表明*LeGGP*的表达受MV的诱导, 在MV处理下, 野生型烟草的离体叶圆片发生比转基因烟草更严重的光漂白, 转基因烟草的AsA含量及清除H₂O₂和O₂⁻的能力明显强于野生型, 过表达*LeGGP*提高了烟草的生长量。并且转基因烟草比野生型具有更高的净光合效率(P_n)和光系统II(PSII)最大光化学效率(F_v/F_m)。结果表明, *LeGGP*的过表达有助于提高烟草AsA含量及抗氧化胁迫能力。

关键词: 烟草; 番茄; 氧化胁迫; *LeGGP*; 转基因植株

Overexpression of Tomato GDP-L-Galactose Phosphorylase Gene Enhanced Tolerance of Transgenic Tobacco to Methyl Viologen-Mediated Oxidative Stress

WANG Li-Yan^{1,2}, WANG Yu¹, MENG Xia¹, MENG Qing-Wei^{1,*}

¹College of Life Sciences, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China; ²Department of Biology, Dezhou University, Dezhou, Shandong 253023, China

Abstract: In order to investigate the effect of tomato GDP-L-galactose phosphorylase (GGP) on ascorbate (AsA) content of transgenic tobacco and tolerance to oxidative stress, tomato GDP-L-galactose phosphorylase gene (*LeGGP*) was introduced into tobacco. WT, sense-transgenic lines T₁-3 and T₁-15 of tobacco were used to measure the contents of AsA, dehydroascorbate (DHA), hydrogen peroxide (H₂O₂), O₂⁻, and chlorophyll, activity of ascorbate peroxidase (APX), photosynthetic rate and chlorophyll fluorescence parameters under methyl viologen (MV) treatment. Northern blot analysis confirmed that the expression of *LeGGP* was induced by MV. The content of AsA, the capability for scavenging H₂O₂ and O₂⁻ of the transgenic tobacco plants were distinctly higher than those of WT under MV treatment. Overexpression of *LeGGP* in tobacco improved growth of seedlings. Under MV treatment, more serious bleaching was observed in the leave of WT plants. The net photosynthetic rate (P_n) and the maximal photochemistry efficiency of PSII (F_v/F_m) in the transgenic plants were higher than those of WT. These results indicated that overexpression of *LeGGP* increased AsA content and enhanced tolerance of transgenic tobacco plants to MV-induced oxidative stress.

Key words: tobacco; tomato; oxidative stress; *LeGGP*; transgenic line

植物在正常代谢过程中不可避免地会产生活性氧(reactive oxygen species, ROS) (Noctor和Foyer 1998), 一定水平的ROS是植物正常生理活动所必需的, 但ROS生成过多会造成细胞损伤, 引起植物衰老和死亡。干旱、高温、冷害、涝害、臭氧等各种逆境胁迫会引起植物体内ROS大量积累, 植物可以通过酶促和非酶促两种方式清除活性氧, 非酶促方式包括一些低分子量的抗氧化物质, 如抗坏血酸(AsA)、谷胱甘肽(GSH)、 α -生育酚(V_E)、类黄

酮等。其中, AsA是植物体最主要的抗氧化物质。

抗坏血酸可以直接清除植物体内包括单线态氧、超氧阴离子自由基及羟基自由基在内的活性

收稿 2012-03-12 修定 2012-04-07

资助 国家重点基础研究发展计划(2009CB118505)、国家自然科学基金(31071338和31171474)和作物生物学国家重点实验室开放课题基金(2011KF08)。

* 通讯作者(E-mail: qwmeng@sdau.edu.cn; Tel: 0538-8249606)。

氧(Padh 1990)。同时,抗坏血酸还能维持另一重要抗氧化剂——维生素E的还原态,并通过抗坏血酸-谷胱甘肽循环清除 H_2O_2 ,从而保护植物有机体及其正常代谢免于氧化胁迫造成的伤害。抗坏血酸还在植物细胞分裂(Tabata等2001)、细胞壁代谢(Smirnoff 1996)、细胞膨大及光合作用和光保护(Yabuta等2007)等过程中起着重要作用。除此之外,AsA对调控一些基因的表达具有重要作用(Pastori等2003)。

目前已知的植物抗坏血酸合成主要包括4条途径,即甘露糖/L-半乳糖途径、半乳糖醛酸途径、古洛糖途径及肌醇途径,其中甘露糖/L-半乳糖途径(又称为Smirnoff/Wheeler途径)是植物中抗坏血酸合成的主要途径。甘露糖/L-半乳糖途径从D-6-磷酸葡萄糖开始,经由GDP-甘露糖(GDP-Man)、GDP-L-半乳糖(GDP-L-Gal)、L-半乳糖-1-磷酸(L-Gal-1-P)、L-半乳糖(L-Gal)和L-半乳糖-1,4-内酯(L-galactone-1,4-lactone),最终转化为抗坏血酸(AsA)(Wheeler等1998)。GDP-L-半乳糖磷酸酶(GGP)一直是甘露糖/L-半乳糖途径中的未知酶,直到2007年,Linster等的研究才证实拟南芥VTC2及VTC5编码这个未知酶(Linster等2007),催化GDP-L-半乳糖转化成L-半乳糖-1-磷酸(Linster等2008)。

目前,人们对GGP的研究主要集中在GGP是否是AsA合成过程中的关键酶。光照是影响植物抗坏血酸合成的重要因素(Barth等2006; Smirnoff 2000),强光处理下拟南芥VTC2表达量增加与GDP-L-Gal磷酸酶活性升高的一致性,预示着GGP在抗坏血酸合成中可能具有重要作用(Dowdle等2007)。抑制L-Gal脱氢酶活性可以导致L-Gal的积累,同时强光照射可以进一步诱导L-Gal积累(Gatzek等2002),而Dowdle等(2007)的研究结果显示,强光处理条件下D-甘露糖抗坏血酸合成途径中仅有GGP及L-Gal脱氢酶活性显著升高,因此认为GGP可能是导致L-Gal积累的原因。茉莉酸甲酯可以提高抗坏血酸含量,与此同时拟南芥VTC2和VTC5的表达量也明显升高(Sasaki-Sekimoto等2005; Wolucka和Van Montagu 2003)。VTC5可以补偿vtc2-1中VTC2的缺失,从而有效维持AsA的含量(Gao等2011),除非提供外源的AsA或L-Gal(AsA合

成的前体),否则VTC2及VTC5双突变体不能正常生长(Dowdle等2007)。以上结果表明GDP-L-半乳糖磷酸酶可能是拟南芥抗坏血酸合成的关键酶。

目前对番茄GGP的研究较少,过表达GGP可以提高番茄果实抗坏血酸含量(Bulley等2012)。Gilbert等(2009)利用RNAi的方法抑制番茄抗坏血酸合成过程中GME(GDP-甘露糖-3,5-差向异构酶)的活性,明显促进了GGP的活性,因此认为GGP在番茄抗坏血酸合成过程中可能具有重要作用。逆境条件下番茄GGP的表达情况如何?番茄GGP基因的过表达是否可以有效地提高植物抗非生物胁迫的能力?这些问题都有待于进一步探讨。本研究从番茄叶片中克隆了GDP-L-半乳糖磷酸酶基因(*LeGGP*),并转化到烟草中,以甲基紫精(MV)模拟氧化胁迫,探讨过表达*LeGGP*烟草的抗氧化能力。

材料与方 法

1 植物材料的处理

以番茄(*Lycopersicon esculentum* Mill.)‘中蔬6号’和烟草(*Nicotiana tabacum* L.)‘NC89’为试材。种子浸种催芽生根后分别播于塑料盆中,以蛭石作基质,Hoagland营养液培养,放置于温室[温度(25±4)℃,光照强度约850 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,相对湿度80%左右]中生长。生长8周的番茄及转基因烟草叶片表面喷以100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MV,保持持续光照,取样后液氮冷冻,保存于-80℃备用。

2 测定项目与测定方法

2.1 番茄GGP基因的克隆、表达载体的构建及对烟草的遗传转化

根据已知的其他植物GGP基因及预测的番茄GGP基因(SGN-U312646)序列(Dowdle等2007),设计分别带有BamHI酶切位点引物G1(5'GGATCCTCCGACCTCCTCTTCCTT3')及带有SacI酶切位点引物G2(5'GAGCTCATGAACACCAGAGCTGGG3')。利用RT-PCR扩增番茄GGP基因全长,PCR条件是:94℃ 5 min; 94℃ 60 s, 53℃ 60 s, 72℃ 90 s, 35个循环; 72℃ 10 min。切胶回收PCR目的片段,与pMD18-T-simple载体在16℃过夜连接,将连接产物转化到大肠杆菌DH5 α 感受态细胞中,菌液PCR筛选阳性克隆,送上海生工生物工程有限公司进行测序,用DNAMAN软件对测序结果进行分

析。分别利用*Bam*HI和*Sac*I对PBI121 (经本实验室改造带有*Bam*HI和*Sac*I酶切位点)载体和pMD18-T-simple载体上的*LeGGP*基因进行双酶切, 回收目的片段, 连接构建PBI121-*LeGGP*载体(图1), 并转化到大肠杆菌DH5 α 感受态细胞中, 经酶切和测序

验证后, 用冷冻法转化导入农杆菌LBA4404感受态中。以‘NC89’烟草叶片作为转化材料, 用农杆菌介导的叶盘法进行转化, 浸染后的愈伤组织经卡那霉素筛选, 挑选新生抗性愈伤组织进行分化、生根、炼苗, 最后移栽到花盆中培养。



图1 表达载体构建

Fig.1 Construction of expression vectors

2.2 Northern杂交分析

番茄总RNA的提取采用Trizol (Invitrogen)抽提法, 具体步骤按照天根RNA提取试剂盒说明书进行。RNA (20 μ g)用甲醛变性凝胶电泳分离, 电泳完毕后将RNA转移至尼龙膜上, 交联固定RNA。以*LeGGP*基因3'端为探针(用 α [32 P]dATP标记)进行Northern杂交(42 $^{\circ}$ C, 36 h)。洗膜2次后于-70 $^{\circ}$ C下放射自显影, 观察杂交结果。

2.3 转基因烟草检测

取T₁代烟草相同叶位叶片, 用CTAB微量法提取转基因烟草叶片中的总DNA, 以此为模板, 进行PCR检测。烟草叶片总RNA的提取方法同上, 反转录后进行RT-PCR。

2.4 烟草幼苗生长实验

选取T₁代种子在含Kan抗生素的MS培养基上培养2周, 然后将幼苗转移到含不同浓度MV (5、10 μ mol \cdot L⁻¹)的MS培养基上, 光照培养箱内[12 h光照, 12 h黑暗, 光照强度200 μ mol \cdot m⁻² \cdot s⁻¹, 温度(25 \pm 3) $^{\circ}$ C]培养10 d, 拍照记录生长状况。

2.5 转基因烟草叶圆片抗氧化能力和叶绿素含量的测定

取烟草的同一叶位叶片用于试验。打取叶圆片, 置于含50、100 μ mol \cdot L⁻¹ MV (含有0.1% Tween20)的溶液中, 抽真空30 s, 连续光照(250 μ mol \cdot m⁻² \cdot s⁻¹) 24 h, 观察叶圆片颜色变化并拍照。叶绿素含量测定参照Hemavathi等(2010)的方法, 将MV处理后的叶圆片放入盛有10 mL 80%丙酮的试管中, 室温避光放置8~10 h, 至叶片颜色完全褪去, 用紫外分光光度计测定663 nm和645 nm的光吸收值, 计算叶绿素a和b的总量。每处理重复3次, 结果以平均值 \pm

标准误表示。

2.6 电解质外渗量、H₂O₂和O₂⁻含量测定

膜透性参照Sun等(2010)的方法测定, 用电解质外渗量表示。超氧阴离子自由基含量参照王爱国和罗广华(1990)的方法。H₂O₂含量的测定参照Ferguson等(1983)的方法。每处理重复3次, 结果以平均值 \pm 标准误表示。

2.7 野生型和转基因烟草叶片AsA含量测定

AsA含量测定参照Kampfenkel等(1995)的方法。0.5 g叶片加入2 mL 6% TCA研磨成匀浆, 4 $^{\circ}$ C, 13 000 \times g离心5 min, 上清液即用于AsA和氧化型抗坏血酸(DHA)的测定。AsA反应液包括0.2 mL提取液(空白以6% TCA代替)、0.6 mL 0.2 mol \cdot L⁻¹ PBS (pH 7.4)、0.2 mL ddH₂O、1 mL 6% TCA、0.8 mL 42% H₃PO₄、0.8 mL 4% 2,2'-二联吡啶和0.4 mL 3% FeCl₃。总AsA (AsA+DHA)的测定以0.2 mL 10 mmol \cdot L⁻¹ DTT和0.4 mL 0.2 mol \cdot L⁻¹ PBS (pH 7.4)代替以上0.6 mL 0.2 mol \cdot L⁻¹ PBS。反应液42 $^{\circ}$ C温浴1 h, 测定525 nm吸光值。DHA含量为总AsA含量与未加DTT时所测得AsA含量的差值。每处理重复3次, 结果以平均值 \pm 标准误表示。

2.8 APX活性测定

APX活性测定参照Mishra等(1993)的方法, 以每分钟氧化1 μ mol AsA的酶量为一个酶活单位。每处理重复3次, 结果以平均值 \pm 标准误表示。

2.9 光合气体交换参数的测定

采用英国PP Systems公司生产的CIRAS-2便携式光合作用系统测定净光合速率(P_n), 测定时光照强度为800 μ mol \cdot m⁻² \cdot s⁻¹, 叶温25 $^{\circ}$ C, 氧气含量21%, CO₂浓度360 μ L \cdot L⁻¹。每处理重复3次, 每重复

测定5株,结果以平均值±标准误表示。

2.10 叶绿素荧光参数测定

叶绿素荧光参数采用Hansatech公司生产的脉冲调制式便携荧光仪FMS2测定。处理过程中F_v/F_m在暗中适应15 min后测定。F_v/F_m=(F_m-F₀)/F_m,其中,F₀为初始荧光,F_m为最大荧光。每处理重复3次,每重复测定5株,结果以平均值±标准误表示。

实验结果

1 LeGGP基因及其编码蛋白序列分析

由测序结果可知,我们获得的GGP基因cDNA全长为1 495 bp,在第153个核苷酸处为起始密码子ATG,在1 464个核苷酸处为终止密码子TGA。其编码区为1 314 bp,由此推断该蛋白应包含437个氨基酸残基。利用DNAMAN软件将该基因编码的氨基酸序列与GenBank中其他植物氨基酸序列进行比对,结果显示番茄的GDP-L-半乳糖磷酸酶与马铃薯(JN000934)、猕猴桃、柑橘、蓖麻、拟南

芥以及烟草等植物的GDP-L-半乳糖磷酸酶高度同源(图2),DNAMAN软件聚类分析结果显示,这些植物的GGP与LeGGP同源性分别为97.49%、74.06%、72.15%、66.82%、71.30%和59.82%。如图2所示,所比对植物的氨基酸序列中有一个保守的HxHxQ基序(其中X代表疏水氨基酸),即组氨酸三联体HIT(histidine triad),这是GDP-L-半乳糖磷酸酶家族的共同特征(Brenner 2002)。酵母四磷酸二腺苷磷酸酶可以催化四磷酸二腺苷转化成ATP和ADP,也具有典型的保守HxHxQ基序(Plateau等1989)。以上结果表明我们已经成功地克隆到了GDP-L-半乳糖磷酸酶基因的序列,将该基因命名为LeGGP,并在GenBank中注册,注册号为JQ517313。

2 MV诱导番茄LeGGP的表达

如图3所示,Northern杂交分析表明,100 μmol·L⁻¹ MV处理条件下番茄LeGGP的表达量随着处理时间的延长而升高,在处理12 h时达到最高,此结果表明番茄LeGGP的表达受MV诱导。

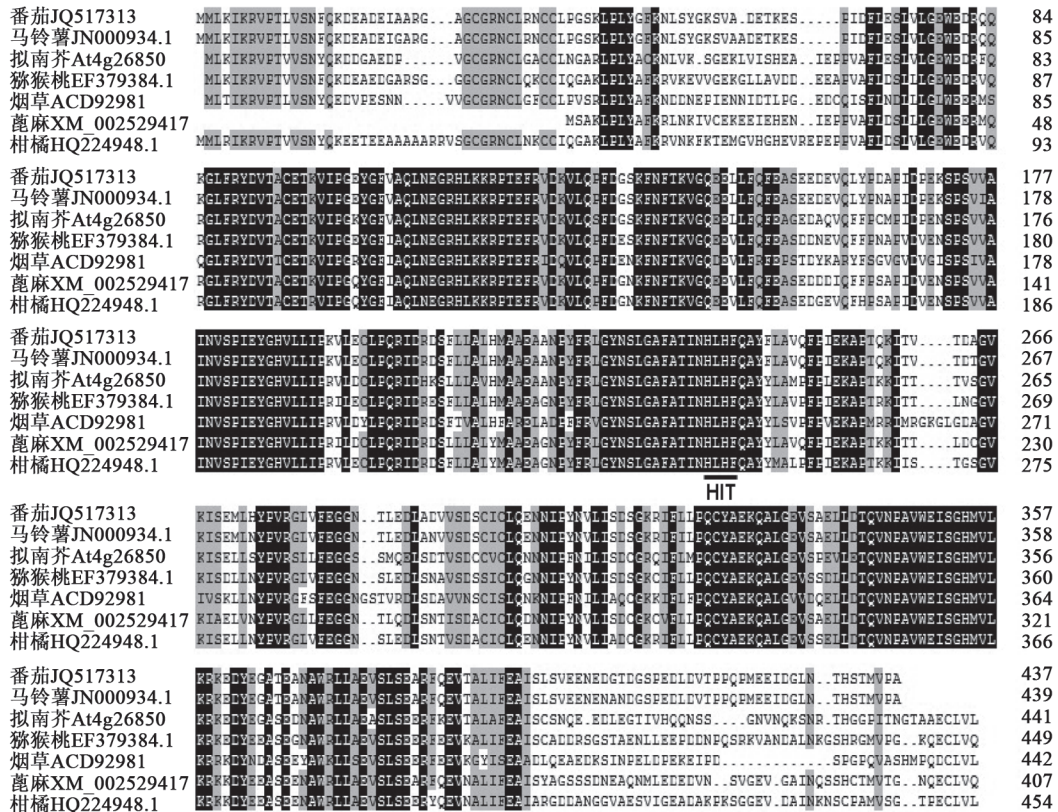


图2 LeGGP推演的氨基酸序列与其他植物GGP的氨基酸序列比对
Fig.2 Alignments of the deduced amino acid sequence of LeGGP and other GGP

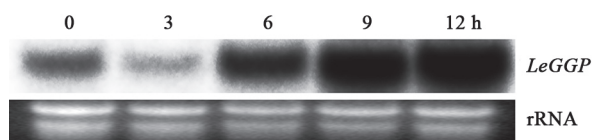


图3 MV处理下 $LeGGP$ 在番茄叶片中的表达
Fig.3 The expression of $LeGGP$ in tomato leaves under MV ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) treatment

3 转 $LeGGP$ 烟草的获得及表达分析

$LeGGP$ 转化烟草获得了大量的抗卡那霉素转基因植株,为了检测转基因是否成功,利用PCR检测抗性植株,得到1 400 bp左右的产物(图4-A),但野生型中未出现目的条带。 T_1 代植株与野生型无可见的表型差异,在 T_1 代中随机选择3个转基因株系(T_1 -1、 T_1 -3和 T_1 -15)进行半定量PCR检测,结果表明,番茄 $LeGGP$ 在烟草中过表达(图4-B),选取 T_1 -3和 T_1 -15两个株系进行生理功能研究。

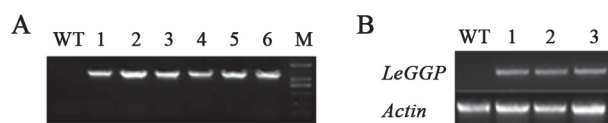


图4 转基因烟草的PCR验证

Fig.4 Identification of transgenic tobacco plants

A: PCR 测定结果; M: Marker; WT: 野生型烟草; 1~6: 转基因烟草。B: RT-PCR测定结果; WT: 野生型; 1~3: 不同的转基因株系 T_1 -1、 T_1 -3和 T_1 -15。

4 $LeGGP$ 过表达提高了烟草抗氧化能力

转基因株系的种子经卡那霉素筛选后转移到

含MV的MS培养基上,随着MV浓度的升高,野生型植株生长受到明显抑制,叶片出现明显的光漂白现象(图5),但转基因植株的生长变化不明显,10

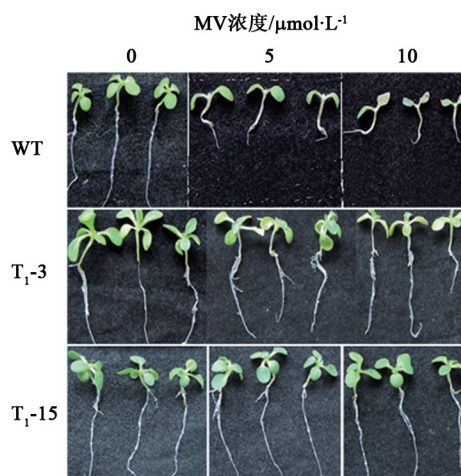


图5 MV处理对烟草幼苗生长的影响

Fig.5 The growth of transgenic tobacco plant and WT under MV treatment

$\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MV处理后仅表现出轻微的光漂白。在 25°C 连续光照条件下,用不同浓度MV (0、50、 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)处理野生型和转基因烟草叶圆片24 h,对照处理的所有叶圆片维持绿色,并且野生型和转基因植株的叶绿素含量差别不显著($P>0.05$)。MV处理24 h后,所有叶圆片表现出不同程度的失绿,MV浓度越高,失绿越严重(图6-A、B),但转 $LeGGP$ 烟草叶圆片失绿程度较轻,且 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

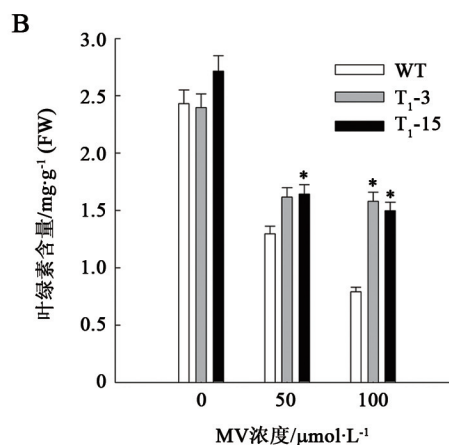
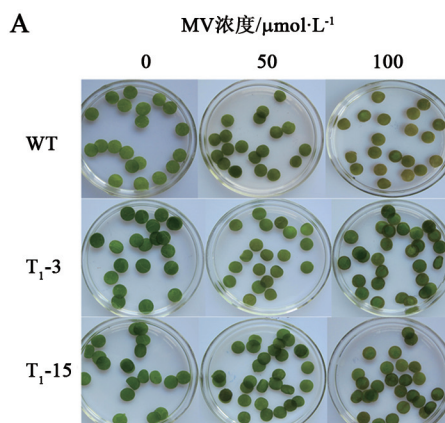


图6 MV处理下烟草叶圆片的失绿状况(A)和叶绿素含量(B)的变化

Fig.6 Changes of leaf disc bleaching (A) and chlorophyll content (B) in tobacco leaves under MV treatment

*表示相同处理浓度或时间不同植株间差异显著($P<0.05$),**表示相同处理浓度或时间不同植株间差异极显著($P<0.01$),下同。

MV处理后叶绿素含量明显高于野生型($P<0.05$)。以上结果表明 $LeGGP$ 过表达提高了烟草抵抗MV诱导的氧化胁迫能力。

5 MV处理下 H_2O_2 、 O_2^- 及相对电导率的变化

用 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MV喷施野生型和转基因烟草植株,持续光照24 h(光强为 $200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)。处理前野生型和转基因植株 H_2O_2 含量无明显差别,随着MV处理时间的延长,所有植株中 H_2O_2 的含量均增加,而转正义基因植株的增加较少(图7-A)。 O_2^- 及相对电导率的变化表现出同样的趋势,即随着MV处理时间的延长,叶片 O_2^- 含量及相对电导率升高,且野生型植株高于转基因植株, MV处理24 h后转基因株系的 O_2^- 含量及相对电导率都明显低于野生型($P<0.05$) (图7-B、C)。

6 MV处理下烟草抗坏血酸含量及APX活性的变化

MV处理后,野生型和转基因植株还原型AsA、DHA及总抗坏血酸含量均升高(图8-A、B、D),但转正义基因植株仍能维持较高的AsA还原状态, $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MV处理24 h后, WT、 T_1-3 和 T_1-15 中AsA含量分别为 0.68 、 0.95 、 $0.86 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW) (图8-A)。野生型及转正义基因植株AsA/DHA都随着处理时间的延长而降低,但转正义基因植株的AsA/DHA高于WT, $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MV处理24 h后, T_1-3 和 T_1-15 的AsA/DHA比值分别为WT的2.82倍和3倍(图8-C)。MV处理后APX活性出现不同程度的下降,转正义基因植株的APX活性明显高于野生型($P<0.05$) (图9)。AsA是维持APX活性所必需的,转正义基因植株相对较高的APX活性可能与其在氧化胁迫下能维持较高的AsA含量有关。

7 $LeGGP$ 过表达对氧化胁迫下 P_n 和 F_v/F_m 的影响

为了检测转 $LeGGP$ 基因在MV胁迫过程中对光合机构的保护作用,测定了野生型和转基因烟草的 P_n 和 F_v/F_m 。正常生长条件下野生型和转基因植株的 P_n 和 F_v/F_m 无明显差别,用 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MV处理后所有植株的 P_n 显著下降。24 h后WT、 T_1-3 和 T_1-15 的 P_n 分别下降了30.8%、12.3%和11.39% (图10-A)。MV处理后 F_v/F_m 也下降(图10-B),但是,转正义基因下降较少,这说明转正义基因烟草在MV处理引起的氧化胁迫下PSII反应中心受伤害较轻。

讨 论

AsA是植物细胞重要的抗氧化物质,还原型

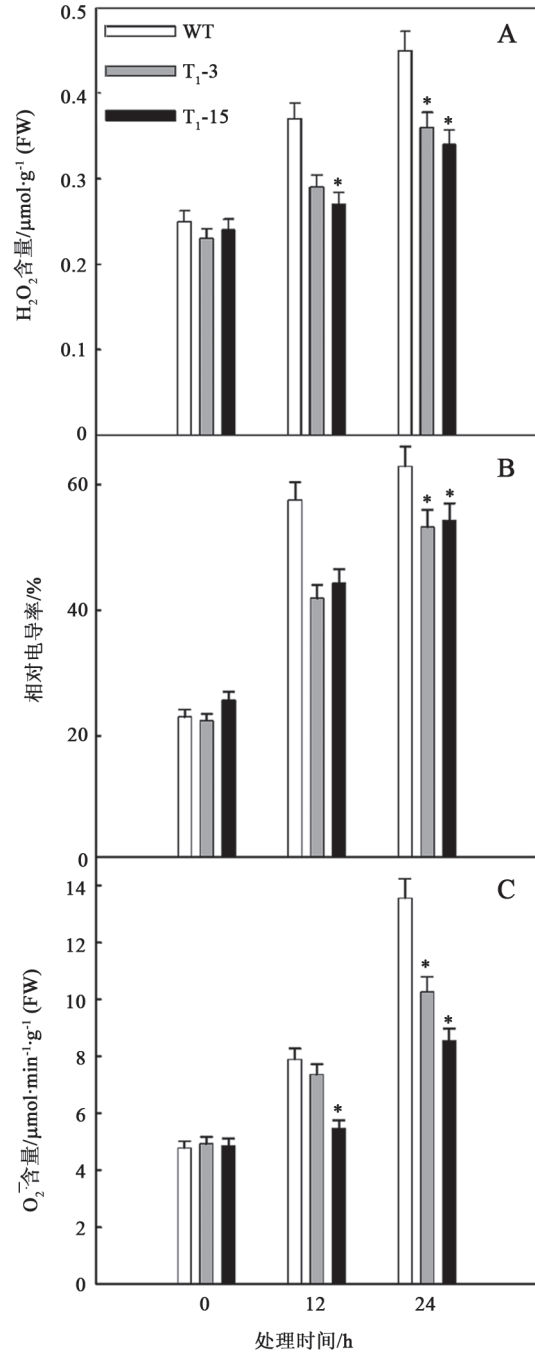


图7 MV处理下烟草叶片 H_2O_2 含量(A)、相对电导率(B)和 O_2^- (C)的变化

Fig.7 Changes of H_2O_2 content (A), relative electronic conductance (B) and O_2^- content (C) in tobacco leaves under MV treatment

抗坏血酸在 H_2O_2 存在下被细胞内的抗坏血酸过氧化物酶(APX)作用而形成单脱氢抗坏血酸(MDHA),进而通过非酶促反应形成氧化型(双脱氢)抗坏血酸(DHA)。抗坏血酸的生物合成(Wheeler等1998)

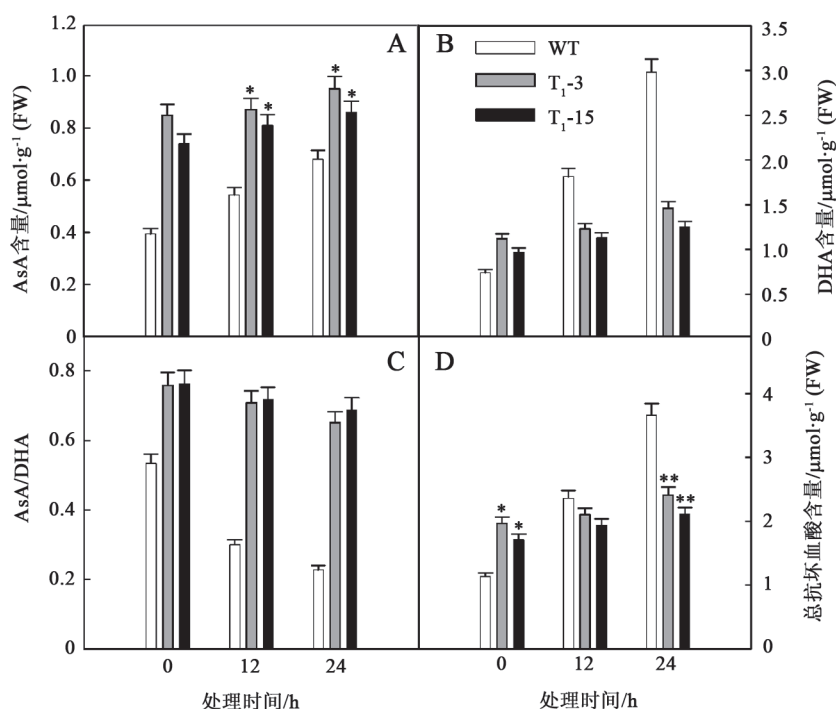


图8 MV处理对转基因和野生型烟草叶片AsA (A)、DHA (B)、AsA/DHA (C)和总抗坏血酸含量(D)的影响

Fig.8 Effect of MV treatment on AsA (A), DHA (B), AsA/DHA (C) and total AsA (D) in leaves of transgenic plants and WT tobacco

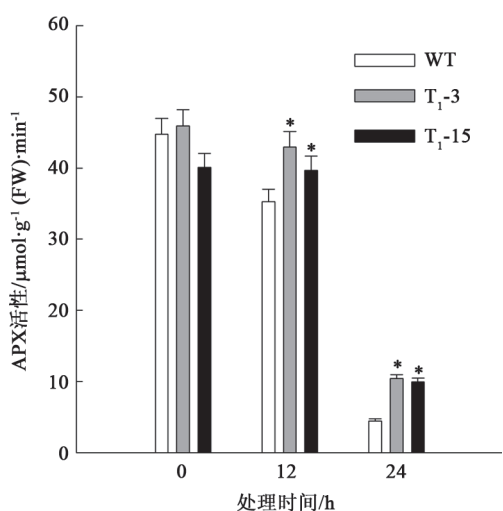


图9 MV处理下烟草叶片APX活性的变化

Fig.9 Changes of APX activities in tobacco leaves under MV treatment

及其再生(Stevens等2008)对清除 H_2O_2 是必需的,植物体内还原型抗坏血酸库的维持除了通过抗坏血酸的合成之外,由氧化型抗坏血酸再生出还原型抗坏血酸也是必不可少的。细胞质中的单、双脱

氢抗坏血酸分别在单、双脱氢抗坏血酸还原酶的作用下可再生成还原型AsA,而叶绿体中单脱氢抗坏血酸可以利用光还原的铁氧还蛋白(ferredoxin, Fd)以高速率直接被还原生成抗坏血酸,此过程可能是位于类囊体膜附近的主要途径(Miyake和Asada 1994)。MV作为光系统I (PSI)电子传递到 O_2 的有效人工次生电子受体,可以与Fd蛋白竞争来自于PSI的FeS簇的电子,抑制Fd蛋白的还原,对围绕于PSI的环式电子传递产生强烈的抑制作用,催化PSI处 O_2 发生光还原,加速 O_2^- 和 H_2O_2 的产生,是细胞内产生氧化胁迫的促进剂(林植芳等2005; Cornic等2000)。MV诱导后过量积累的 H_2O_2 ,在引起植物的氧化损伤的同时也使叶绿体内依赖于还原型Fd蛋白的MDHA再生出抗坏血酸的非酶促过程受到抑制,因此, MV处理条件下AsA的从头合成途径变得尤为重要。

有研究表明, GGP可能是植物抗坏血酸合成的关键酶(Gatzek等2002; Sasaki-Sekimoto等2005; Wolucka和Van Montagu 2003)。本实验结果表明, MV模拟的氧化胁迫处理可以诱导番茄LeGGP的

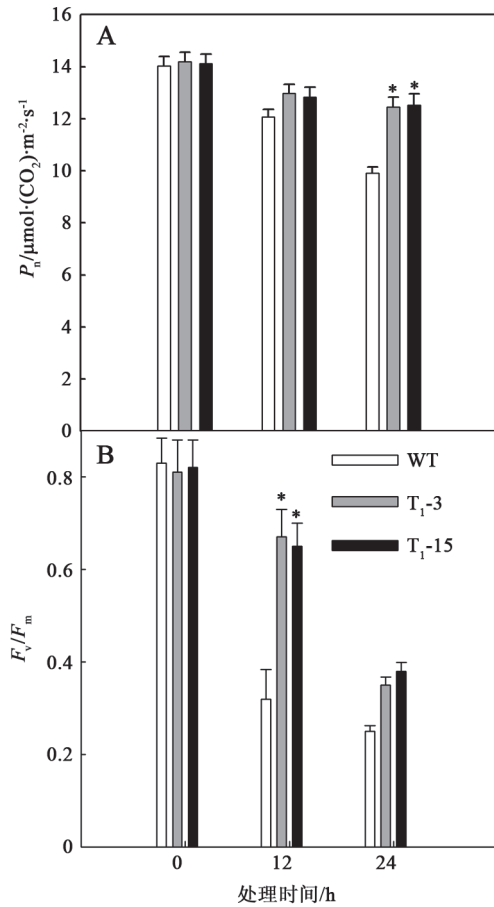


图10 MV处理下转基因和野生型烟草
 P_n (A)和 F_v/F_m (B)的变化

Fig.10 Changes of P_n (A) and F_v/F_m (B) in transgenic plants and WT tobacco under MV treatment

表达(图3)。虽然 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MV处理一定程度上阻碍了烟草抗坏血酸的再生, 但通过转基因手段促进了转基因烟草抗坏血酸合成关键酶GGP的过表达(图4-B), 由于AsA合成过程中GGP催化之前的代谢中间物质(D-6-磷酸葡萄糖, D-6-磷酸果糖, D-6-磷酸甘露糖, D-6-磷酸甘露糖, GDP-甘露糖)是植物体内多聚糖合成的底物, 在植物正常生长条件下应该维持较高的含量(Reuhs等2004; Seifert 2004), 因此GGP含量的提高必然会促进AsA含量的增加。有实验表明转拟南芥GGP基因可以有效提高番茄、烟草及草莓的抗坏血酸含量(Bulley等2012)。本实验结果也证实, 转 $LeGGP$ 提高了烟草总抗坏血酸含量和还原型抗坏血酸含量(图8-A、C)。 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MV处理24 h后, 转基因烟草和野生型植株氧化型抗坏血酸(DHA)含量均升高, 但野

生型烟草的DHA含量远高于转基因株系, 转正义基因植株仍可以维持较高的抗坏血酸还原状态(图8)。可见, 转 $LeGGP$ 可以提高烟草的AsA含量, 维持氧化胁迫下的还原状态。

MV氧化胁迫下, 植物叶圆片出现可见的损伤通常被用于分析植物的抗逆性(Yoshimura等2004)。本实验中的烟草叶圆片实验显示, 当分别用去离子水和2种不同浓度MV (50 和 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)处理后, 野生型植株叶片颜色变褐, 出现明显的坏死现象, 但是转正义基因植株只是在叶圆片边缘出现了部分坏死现象(图6-A), 转基因植株叶圆片具有高的叶绿素含量(图6-B)。随着MV处理浓度的升高, 野生型烟草幼苗的生长受到明显的抑制, 且叶片出现光漂白现象, 但转基因烟草的生长明显好于野生型(图5)。MV处理条件下转基因植株的 H_2O_2 、 O_2^- 及相对电导率明显低于野生型(图7-A~C)。 H_2O_2 的清除能力取决于抗坏血酸浓度以及APX的活性, AsA是维持APX活性的保护剂, 缺乏抗坏血酸会导致APX失活(Mano等1997), MV处理后, 转正义基因植株 H_2O_2 增加比较缓慢(图7-A), 并且APX仍可以维持较高活性(图9)。可见, 过表达 $LeGGP$ 基因提高了烟草还原型抗坏血酸含量, 有助于维持APX活性。

抗坏血酸是叶绿体中最主要的水溶性抗氧化物质, 类囊体腔内的抗坏血酸可以参与叶黄素循环, 为紫黄质脱环氧化酶(VDE)提供电子, 是光保护必不可少的组分(Smirnoff 2000), 抗坏血酸还可以作为PSI和PSII的次级电子供体发挥作用(Mano等2004)。MV胁迫刺激PSI O_2 的光还原作用, 使PSII功能和结构受到伤害, 从而抑制光合作用(Krause 1988)。 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MV处理条件下烟草 P_n 及 F_v/F_m 下降(图10-A、B), 转正义基因植株可以维持较高的 F_v/F_m , 这可能与抗坏血酸含量的增加有助于清除叶绿体内的ROS相关。

总之, $LeGGP$ 的过表达提高了烟草的抗坏血酸含量, 维持较高的APX活性, 降低了 H_2O_2 及 O_2^- 积累, 减轻对膜的伤害, 有助于提高烟草的抗氧化能力。

参考文献

林植芳, 彭长连, 林桂珠(2005). 光氧化条件下碳代谢中间产物与光合电子传递对PSII光化学活性的调节作用. 热带亚热带植物

- 学报, 13 (1): 1~7
- 王爱国, 罗广华(1990). 植物的超氧化物自由基与羟胺反应的定量关系. 植物生理学通讯, (6): 55~57
- Barth C, Tullio MD, Conklin PL (2006). The role of ascorbic acid in the control of flowering time and the onset of senescence. *J Exp Bot*, 57 (8): 1657~1665
- Brenner C (2002). Hint, Fhit, and GalT function, structure, evolution, and mechanism of three branches of the histidine triad superfamily of nucleotide hydrolases and transferases. *Biochemistry*, 41 (29): 9003~9014
- Bulley S, Wright M, Rommens C, Yan H, Rassam M, Lin-Wang K, Andre C, Brewster D, Karunairetnam S, Allan AC, Laing WA (2012). Enhancing ascorbate in fruits and tubers through over-expression of the L-galactose pathway gene GDP-L-galactose phosphorylase. *Plant Biotechnol J*, 10: 390~397
- Cornic G, Bukhov NG, Wiese C, Bligny R, Heber U (2000). Flexible coupling between light-dependent electron and vectorial proton transport in illuminated leaves of C_3 plants. Role of photosystem I-dependent proton pumping. *Planta*, 210: 468~477
- Dowdle J, Ishikawa T, Gatzek S, Rolinski S, Smirnov N (2007). Two genes in *Arabidopsis thaliana* encoding GDP-L-galactose phosphorylase are required for ascorbate biosynthesis and seedling viability. *Plant J*, 52: 673~685
- Ferguson IB, Watkins CB, Harman JE (1983). Inhibition by calcium of senescence of detached cucumber cotyledons. *Plant Physiol*, 71: 182~186
- Gao Y, Badejo AA, Shibata H, Sawa Y, Maruta T, Shigeoka S, Page M, Smirnov N, Ishikawa T (2011). Expression analysis of the *VTC2* and *VTC5* genes encoding GDP-L-galactose phosphorylase, an enzyme involved in ascorbate biosynthesis, in *Arabidopsis thaliana*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 75 (9): 1783~1788
- Gatzek S, Wheeler GL, Smirnov N (2002). Antisense suppression of L-galactose dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana* provides evidence for its role in ascorbate synthesis and reveals light modulated L-galactose synthesis. *Plant J*, 30 (4): 541~553
- Gilbert L, Alhaghdow M, Nunes-Nesi A, Quemener B, Guillon F, Bouchet B, Faurobert M, Gouble B, Page D, Garcia V et al (2009). GDP-D-mannose 3,5-epimerase (GME) plays a key role at the intersection of ascorbate and non-cellulosic cell-wall biosynthesis in tomato. *Plant J*, 60: 499~508
- Hemavathi, Upadhyaya CP, Akula N, Young KE, Chun SC, Kim DH, Park SW (2010). Enhanced ascorbic acid accumulation in transgenic potato confers tolerance to various abiotic stresses. *Biotechnol Lett*, 32: 321~330
- Kampfenkel K, Van Montagu M, Inzé D (1995). Extraction and determination of ascorbate and dehydroascorbate from plant tissue. *Ann Biochem*, 225: 165~167
- Krause GH (1988). Photoinhibition of photosynthesis. An evaluation of damaging and protective mechanisms. *Physiol Plant*, 74 (3): 566~574
- Linster CL, Adler LN, Webb K, Christensen KC, Brenner C, Clarke SG (2008). A second GDP-L-galactose phosphorylase in *Arabidopsis* en route to vitamin C: covalent intermediate and substrate requirements for the conserved reaction. *J Biol Chem*, 283 (27): 18483~18492
- Linster CL, Gomez TA, Christensen KC, Adler LN, Young BD, Brenner C, Clarke SG (2007). *Arabidopsis VTC2* encodes a GDP-L-galactose phosphorylase, the last unknown enzyme in the Smirnov-Wheeler pathway to ascorbic acid in plants. *J Biol Chem*, 282: 18879~18885
- Mano J, Hideg E, Asada K (2004). Ascorbate in thylakoid lumen functions as an alternative electron donor to photosystem II and photosystem I. *Arch Biochem Biophys*, 429: 71~80
- Mano J, Ushimaru T, Asada K (1997). Ascorbate in thylakoid lumen as an endogenous electron donor to photosystem II: protection of thylakoids from photoinhibition and regeneration of ascorbate in stroma by dehydroascorbate reductase. *Photosynth Res*, 53: 197~204
- Mishra NP, Mishra PK, Singhal GS (1993). Changes in the activities of anti-oxidant enzyme during exposure of intact wheat leaves to strong visible light at different temperatures in the presence of protein synthesis inhibitors. *Plant Physiol*, 102: 903~910
- Miyake C, Asada K (1994). Ferredoxin-dependent photoreduction of the monodehydroascorbate radicals in spinach thylakoids. *Plant Cell Physiol*, 35 (4): 539~549
- Noctor G, Foyer C (1998). Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 49: 249~279
- Padh H (1990). Cellular functions of ascorbic acid. *Biochem Cell Biol*, 68: 1166~1173
- Pastori GM, Kiddle G, Antoniw J, Bernard S, Veljovic-Jovanovic S, Verrier PJ, Noctor G, Foyer CH (2003). Leaf vitamin C contents modulate plant defense transcripts and regulate genes that control development through hormone signaling. *Plant Cell*, 15: 939~951
- Plateau P, Fromant M, Schmitter JM, Buhler JM, Blanquet S (1989). Isolation, characterization, and inactivation of the *APA1* gene encoding yeast diadenosine 5',5''-P¹,P⁴-tetrakisphosphate phosphorylase. *J Bacteriol*, 171 (12): 6437~6445
- Reuhs BL, Glenn J, Stephens SB, Kim JS, Christie DB, Glushka JG, Zablackis E, Albersheim P, Darvill AG, O'Neill MA (2004). L-Galactose replaces L-fucose in the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II synthesized by the L-fucose-deficient *mur1 Arabidopsis* mutant. *Planta*, 219: 147~157
- Sasaki-Sekimoto Y, Taki N, Obayashi T, Aono M, Matsumoto F, Sakurai N, Suzuki H, Hirai MY, Noji M, Saito K et al (2005). Coordinated activation of metabolic pathways for antioxidants and defence compounds by jasmonates and their roles in stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant J*, 44 (4): 653~668
- Seifert GJ (2004). Nucleotide sugar interconversions and cell wall biosynthesis: how to bring the inside to the outside. *Curr Opin Plant Biol*, 7: 277~284
- Smirnov N (1996). The function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Ann Bot*, 78: 661~669
- Smirnov N (2000). Ascorbate biosynthesis and function in photoprotection. *Phil Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 355: 1455~1464
- Stevens R, Page D, Gouble B, Garchery C, Zamir D, Causse M (2008). Tomato fruit ascorbic acid content is linked with monodehydroascorbate reductase activity and tolerance to chilling stress.

- Plant Cell Environ, 31: 1086~1096
- Sun YL, Li F, Sui N, Sun XL, Zhao SJ, Meng QW (2010). The increase in unsaturation of fatty acids of phosphatidylglycerol in thylakoid membrane enhanced salt tolerance in tomato. *Photosynthetica*, 48 (3): 400~408
- Tabata K, Oba K, Suzuki K, Esaka M (2001). Generation and properties of ascorbic acid-deficient transgenic tobacco cells expressing antisense RNA for L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase. *Plant J*, 27 (2): 139~148
- Wheeler GL, Jones MA, Smirnoff N (1998). The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature*, 393: 365~369
- Wolucka BA, Van Montagu M (2003). GDP-mannose 3',5'-epimerase forms GDP-L-gulose, a putative intermediate for the *de novo* biosynthesis of vitamin C in plants. *J Biol Chem*, 278 (48): 47483~47490
- Yabuta Y, Mieda T, Rapolu M, Nakamura A, Motoki T, Maruta T, Yoshimura K, Ishikawa T, Shigeoka S (2007). Light regulation of ascorbate biosynthesis is dependent on the photosynthetic electron transport chain but independent of sugars in *Arabidopsis*. *J Exp Bot*, 58 (10): 2661~2671
- Yoshimura K, Miyao K, Gaber A, Takeda T, Kanaboshi H, Miyasaka H (2004). Enhancement of stress tolerance in transgenic tobacco plants overexpressing *Chlamydomonas* glutathione peroxidase in chloroplasts or cytosol. *Plant J*, 37 (1): 21~33