

外源 *SOD* 和 *APX* 基因在转基因烟草中的表达与遗传

刘飞虎^{1,*} 梁雪妮² 周玮¹ 刘明求¹

云南大学¹生命科学学院, ²成人教育学院, 昆明 650091

摘要 分析转超氧化物歧化酶基因(*SOD*)或抗坏血酸过氧化物酶基因(*APX*)烟草及其自交和杂交后代的叶片中超氧化物歧化酶(*SOD*)和过氧化物酶(*POD*)活性的结果表明: 转基因烟草的*SOD*和*POD*活性在终花期最强, 不同叶位叶中*SOD*活性差异不明显, *POD*活性以下部叶为最高; 转基因烟草的*SOD*或*POD*活性显著高于近等基因的非转基因品系。杂交后代(F_1 、 F_2)的*SOD*活性能保持稳定, 略高于亲本; 自交后代(S_1 ~ S_3)与自交亲本的*SOD*和*POD*活性相当。

关键词 转基因烟草; 超氧化物歧化酶; 抗坏血酸过氧化物酶; 外源基因; 基因表达

Expression and Heredity of Exogenous *SOD* or *APX* Gene in Transgenic Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.)

LIU Fei-Hu^{1,*}, LIANG Xue-Ni², ZHOU Wei¹, LIU Ming-Qiu¹

¹College of Life Science, ²College of Adults Education, Yunnan University, Kunming 650091, China

Abstract In this experiment, superoxide dismutase (*SOD*) and/or ascorbate peroxidase (*APX*) activities in leaves of *SOD*- or *APX*-gene transformed tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) plants and their self-bred and hybridization progenies were analyzed. The transgenic tobacco had highest *SOD* and peroxidase (*POD*) activities at the end-bloom stage; no significant difference in *SOD* activity was observed in leaves at upper, middle and base parts of a plant, but the base leaves had the highest *POD* activity. The transgenic tobacco had *SOD* and *POD* activities remarkably higher than the non-transgenic tobacco. The *SOD* activities in hybrid progenies (F_1 and F_2) maintained steady and were a little more than parental plants. While the *SOD* or *POD* activities of self-bred progenies (S_1 – S_3) and their parents were similar.

Key words transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.); superoxide dismutase (*SOD*); ascorbate peroxidase (*APX*); exogenous gene; gene expression

在非生物逆境和一些生物逆境胁迫下, 植物体内产生过量的活性氧类物质对植物造成伤害。超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, *SOD*)、过氧化物酶(peroxidase, *POD*)、抗坏血酸过氧化物酶(ascorbate peroxidase, *APX*)和过氧化氢酶(catalase, *CAT*)均属于植物的保护酶系统, 它们清除植物体内过多的活性氧, 可以保护植物免受或减轻逆境胁迫的伤害。培育 *SOD* 基因高表达(*SOD* 活性显著增强)的转基因植物并提高其抗逆性的研究多有报道(Gupta 等 1993; McKersie 等 1993; Yu 等 1999; Yu 和 Rengel 1999; Kwon 等 2002; 曾淑华等 2005), 但转 *POD* (或 *APX*) 基因增强植物抗性的报道较少(Kornyeyev 等 2001)。外源基因在转基因植物中的表达水平及其遗传稳定性是基因工程育种者最关心的问题, 也是转基因植物安全性评价的一个方面。某些转基因作物外源基因表

达和遗传特性的研究较多(简玉瑜等 2001; Payton 等 2001; 王军辉等 2004), 而关于转 *SOD* 或 *POD* 基因烟草中外源基因表达稳定性的分析尚未见报道。本文报道转 *SOD* 和 *APX* 基因烟草(*Nicotiana tabacum* L.) 的外源 *SOD*、*POD* 表达水平及其在不同世代的遗传稳定性, 以期能为评价 *SOD* 和 *APX* 基因过量表达的转基因植物的利用价值提供参考。

材料与方 法

试验于 2001~2004 年进行, 烟草(*Nicotiana tabacum* L.) 由国外引进, 转基因烟草品系有: 转 Fe-*SOD* 基因叶绿体高表达品系(简称 Fe-H), 转

收稿 2006-06-06 修定 2006-09-18

资助 云南省人才基金(2000C0001G)。

✉-mail: plantbreed2004@yahoo.com.cn, Tel: 0871-5035256

Mn-SOD 基因叶绿体高表达品系(简称 Mn-H), 转反义 Mn-SOD 基因品系(低表达, 简称 Mn-L), 转 APX 基因叶绿体高表达品系(简称 APX-H), 受体亲本品系(非转基因对照, 简称 N-GMO), 以及转基因品系的杂交 F_1 、 F_2 和自交 S_1 、 S_2 、 S_3 。

2001 年, 种植转基因品系的部分种子进行杂交和自交, 获得 F_1 和 S_1 ; 2002~2003 年, 继续培育杂交和自交后代并进行预备试验; 2004 年, 将所有材料同时种植于土壤肥力一致的苗圃中, 杂交(自交)亲本、杂交后代、自交后代、N-GMO 分区种植, 设立保护行, 株行距为 40 cm×60 cm (植株生长偏小, 故较密), 按常规栽培管理。

分别于十四叶龄期、开花前期、盛花期(所有植株大量开花, 并有少量结实)和开花后期(花全凋谢, 已大量结实), 从每个试验材料中选择 10 株生长一致的植株, 分单株取中部叶片为样品(从顶部展开叶往下数, 十四叶龄期取第 8 叶, 其他时期取第 12 叶), 测定 SOD 和 POD 活性以及蛋白质含量。于盛花期对部分材料(Fe-H、Mn-H、APX-H)取第 2 叶、第 12 叶和第 17 叶(每个品系取 10 株), 测定不同叶位叶片的 SOD、POD 活性。

用刘祖祺和张石城(1994)介绍并略加改进的方法(中国科学院上海植物生理研究所和上海市植物生理学会 1999)测定 SOD、POD 活性和可溶性蛋白质含量。提取粗酶液时, 称取 0.5 g 左右叶片(去除主叶脉), 分 3 次共加入 5 mL 提取液[50 mmol·L⁻¹ pH 7.8 磷酸缓冲液, 内含 0.1 mmol·L⁻¹ EDTA、0.3% (W/V) Triton X-100、4% (W/V) 聚乙烯吡咯烷酮], 于冰浴中研磨, 匀浆后在 4℃ 下以 13000×g 离心 20 min, 上清液即为粗酶液, 在 0℃ 中保存; 随即测定 SOD 和 POD 活性以及可溶性蛋白质含量。采用氯化硝基四氮唑蓝(NBT)光还原法测定 SOD 活性, 愈创木酚法测定 POD 活性、考马斯亮蓝(G-250)法测定可溶性蛋白质含量。

结果与讨论

1 不同生育期转基因烟草的 SOD 和 POD 活性差异

从图 1 和图 2 可以看出: (1) 不同品系 SOD 活

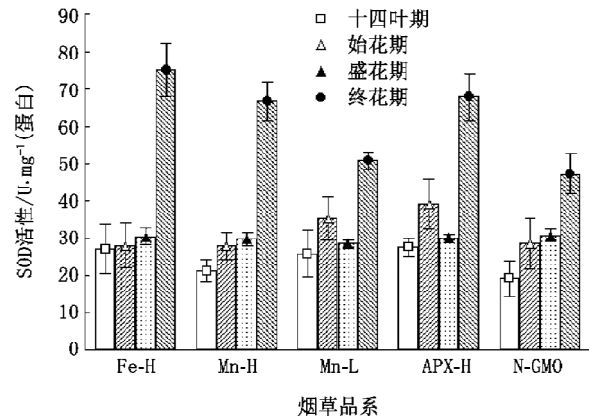


图1 不同生育期转基因烟草的 SOD 活性
Fig. 1 SOD activities of transgenic tobacco during different growth stages

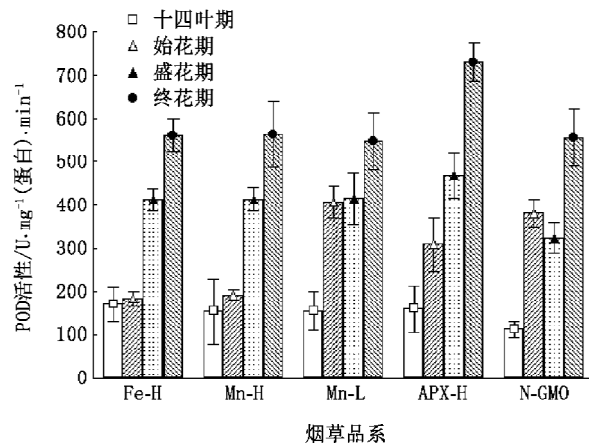


图2 不同生育期转基因烟草的 POD 活性
Fig. 2 POD activities of transgenic tobacco during different growth stages

性的差异主要表现在生育后期(终花期), 其他生育期则差异甚小。对于 POD 而言, 虽然也是终花期活性最强, 但不同品系 POD 活性的生育期差异有所不同, 有些品系在始花期, 所有品系在盛花期也有较高的 POD 活性。(2) APX-H 的 SOD 活性比非转基因的品系(对照)明显增强, 推测 APX 和 SOD 均为与逆境胁迫相关的酶(它们共同参与清除植物因遇逆境而产生的过量活性氧), 外源 APX 基因的表达还可能会激发内源 SOD 基因的超量表达, 因而转 APX 基因品系的 SOD 活性得以提高。此外, Mn-L 中的反义基因并不抑制植株中内源 SOD 基因的表达, 因此其 SOD 活性水平与 N-GMO

相当。一些研究证明,反义基因技术确能抑制内源基因的表达,但同时也有不少反义基因抑制作用不明显或完全无效的例子(涂长春和殷震1992;马峻等2002)。

2 转基因烟草植株间 SOD 和 POD 活性的差异

终花期取样测定的结果表明,同一烟草品系的不同单株之间(P1~P10)的SOD和POD活性都表现出较为明显的差异(图3、图4)。因此,我们在其他内容的分析中都取10株单株为样品,以尽量消除个体差异对实验结果的影响。来源于同一品系(一个单株的后代)的不同单株中,部分单株的SOD和POD活性差异较大,推测这种差异可能是生长环境不完全相同,因而不同植株的生理状态不同引起的。

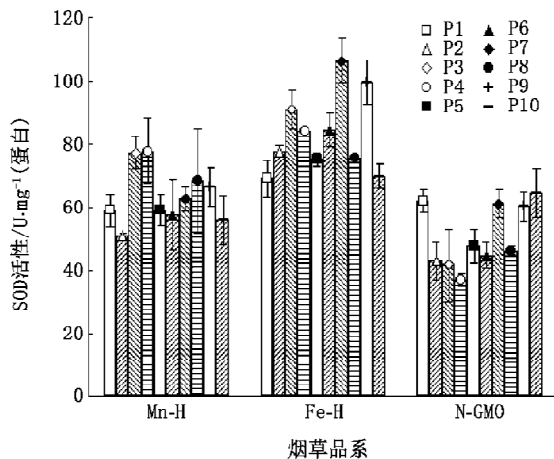


图3 终花期转基因烟草SOD活性的株间差异
Fig. 3 Plant differences of SOD activity of transgenic tobacco during end-blooming stage

3 转基因烟草叶位间的 SOD 和 POD 活性差异

盛花期测定的结果中,除个别品系如APX-H的下部叶SOD活性明显较低外,其它转基因烟草的SOD活性的叶位差异不明显(图5);POD活性则以下部叶片为最高,上部叶片最低,上部和中部叶片的POD活性差异不显著(图6)。烟草叶片POD活性之所以随着叶位的下降而升高,其原因可能是下部叶接近衰老、生理环境不良(如相对阴暗、潮湿等)导致与逆境相关的酶POD活性上升。基于这些结果,我们认为测定SOD活性时的叶位要

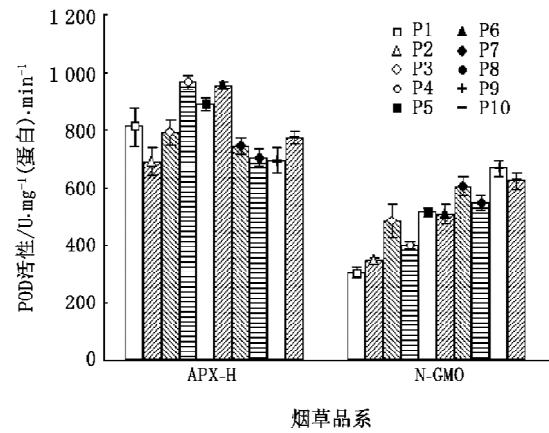


图4 终花期转基因烟草POD活性的株间差异
Fig. 4 Plant differences of POD activity of transgenic tobacco during end-blooming stage

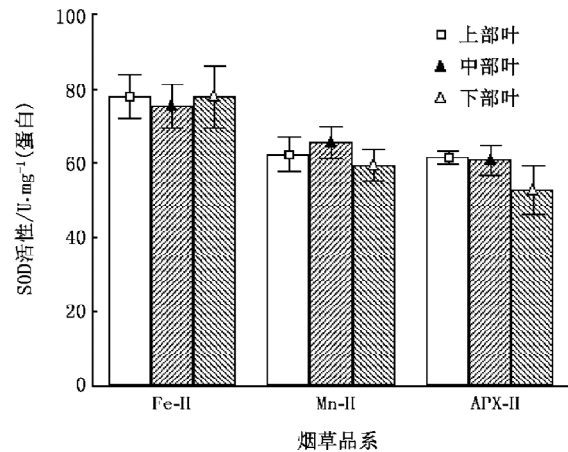


图5 盛花期转基因烟草不同叶位的SOD活性
Fig. 5 SOD activities in leaves on different parts of transgenic tobacco plant during full-blooming stage

求可以宽一些,但测定POD活性时的叶位应一致,否则即会降低可比性。为了兼顾POD和SOD两者活性的叶位差异,我们均采用中部叶片为样品。

4 外源 SOD 或 POD 基因表达稳定性和遗传特点

从图7~9可见:

(1)用转SOD基因的3个品系为亲本,配制6个杂交组合,分析F₁、F₂的SOD活性水平的结果(图7)表明:①高表达亲本(Fe-H和Mn-H)为母本的杂交后代SOD活性水平高,低表达亲本(Mn-L)为母本的杂交后代SOD活性水平亦低;②高表

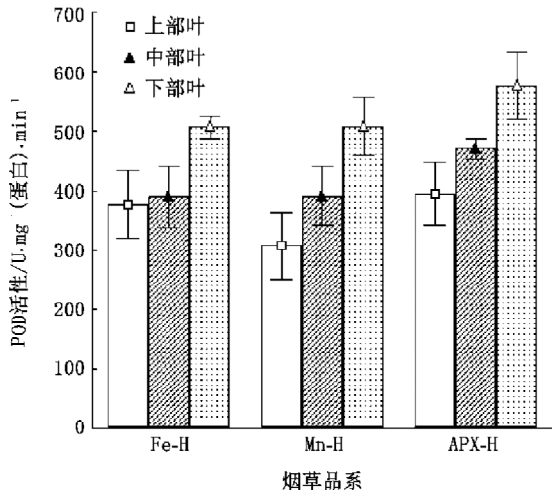


图6 盛花期转基因烟草不同叶位的POD活性
Fig. 6 POD activities in leaves on different parts of transgenic tobacco plant during full-blooming stage

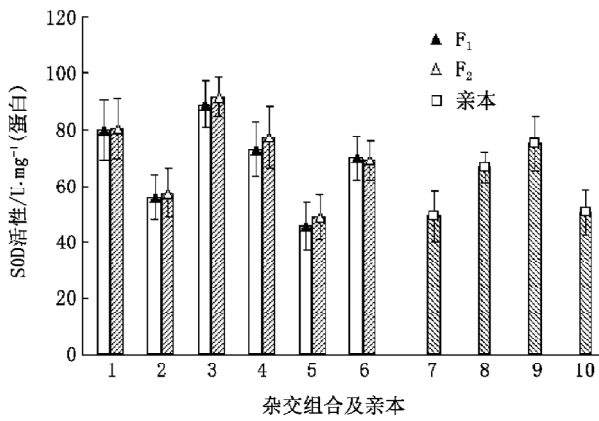


图7 终花期转基因烟草杂交后代的SOD活性
Fig. 7 SOD activities of hybrid progenies of transgenic tobacco during end-blooming stage
1: Fe-H×Mn-L; 2: Mn-L×Fe-H; 3: Fe-H×Mn-H; 4: Mn-H×Fe-H; 5: Mn-L×Mn-H; 6: Mn-H×Mn-L; 7: N-GMO; 8: Mn-H; 9: Fe-H; 10: Mn-L.

达杂种的SOD活性比高表达亲本的活性略有提高,其原因有待研究;③杂交后代可以保持外源SOD基因高表达的特性,就所研究的世代看,高表达特征可以稳定遗传。

(2) SOD或POD高表达品系的自交后代分析结果表明,从S₀(自交亲本)到S₃代,外源SOD和POD基因的表达是稳定的,表现在各自交世代之间、自交世代与其亲本之间的SOD和POD活性基本上稳定,世代间差异不显著,而且都稳定

高于非转基因品系(N-GMO)(图8、图9)。但Mn-H的SOD活性水平低于APX-H的,原因尚待研究。基于自交后代酶活性水平的稳定性分析,本文采用的转基因烟草中的外源SOD或APX基因表达水平高,而且这种高表达特性可以在后代中稳定遗传。

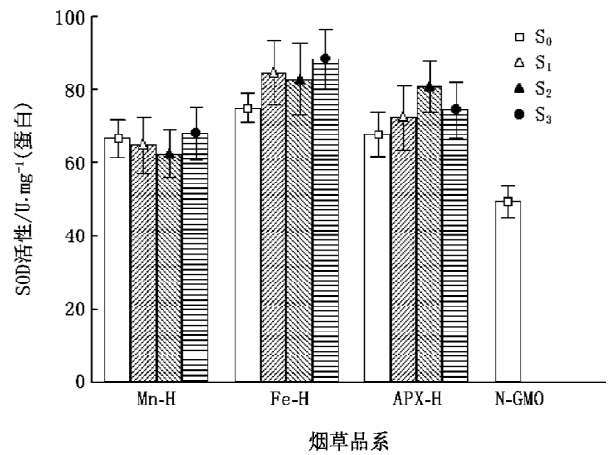


图8 终花期转基因烟草自交后代的SOD活性
Fig. 8 SOD activities of self-bred progenies of transgenic tobacco during end-blooming stage

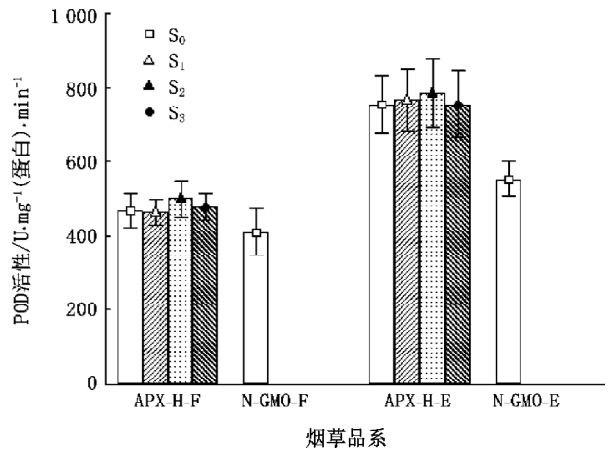


图9 盛花期(F)和终花期(E)转基因烟草自交后代的POD活性
Fig. 9 POD activities of self-bred progenies of transgenic tobacco during full-blooming (F) and end-blooming (E) stages

参考文献

简玉瑜, 陈远玲, 李静, 高丽丽, 董春(2001). 转基因水稻外源基因的遗传和表达初步研究. 华南农业大学学报, 22 (1): 56~59

- 刘祖祺, 张石城(1994). 植物抗性生理学. 北京: 中国农业出版社, 371~372
- 马峻, 王红, 苏雷, 季维智(2002). 双链RNA对基因表达的抑制及其应用. 自然科学进展, 12 (11): 1125~1131
- 涂长春, 殷震(1992). 反义RNA研究新进展. 生物化学与生物物理进展, 19 (4): 245~249
- 王军辉, 张建国, 胡建军, 张真, 张守攻(2004). 转基因欧洲黑杨中Bt基因表达特性的研究. 中国生物工程杂志, 24 (1): 49~52
- 曾淑华, 赵正雄, 覃鹏, 刘飞虎(2005). 淹水对转超氧化物歧化酶或过氧化物酶基因烟草某些生理生化指标的影响. 植物生理学通讯, 41: 603~606
- 中国科学院上海植物生理研究所, 上海市植物生理学会编(1999). 现代植物生理学实验指南. 北京: 科学出版社, 314~394
- Gupta AS, Webb RP, Holaday AS, Allen RD (1993). Overexpression of superoxide dismutase protects plants from oxidative stress (Induction of ascorbate peroxidase in superoxide dismutase-overexpressing plants). *Plant Physiol*, 103: 1067~1073
- Kornyevev D, Logan BA, Payton P, Allen RD, Holaday AS (2001). Enhanced photochemical light utilization and decreased chilling-induced photoinhibition of photosystem II in cotton overexpressing genes encoding chloroplast-targeted antioxidant enzymes. *Physiol Plant*, 113: 323~331
- Kwon SY, Jeong YJ, Lee HS, Kim JS, Cho KY, Allen RD, Kwak SS (2002). Enhanced tolerances of transgenic tobacco plants expressing both superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in chloroplasts against methyl viologen-mediated oxidative stress. *Plant Cell Environ*, 25: 873~882
- McKersie BD, Chen YR, de Beus M, Bowley SR, Bowler C, Inzé D, D'Halluin K, Botterman J (1993). Superoxide dismutase enhances tolerance of freezing stress in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L). *Plant Physiol*, 103: 1155~1163
- Payton P, Webb R, Kornyevev D, Allen R, Holaday AS (2001). Protecting cotton photosynthesis during moderate chilling at high light intensity by increasing chloroplastic antioxidant enzyme activity. *J Exp Bot*, 52: 2345~2354
- Yu Q, Osborne LD, Rengel Z (1999). Increased tolerance to Mn deficiency in transgenic tobacco overproducing superoxide dismutases. *Ann Bot*, 84: 543~547
- Yu Q, Rengel Z (1999). Waterlogging influences plant growth and activities of superoxide dismutases in narrow-leafed lupin and transgenic tobacco plants. *J Plant Physiol*, 155: 431~438