

## 沙冬青脱水素基因转化紫花苜蓿的耐寒性研究

聂利珍, 郭九峰, 刘红葵, 斯钦巴特尔, 孙 杰, 乔慧蕾, 刘永志\*

(内蒙古农牧业科学院, 呼和浩特 010031)

**摘 要:**以紫花苜蓿品种‘中苜2号’为野生型材料, 采用农杆菌介导法将沙冬青脱水素基因(dehydrin, *AmDHN*)导入紫花苜蓿基因组中并获得转基因植株, 通过PCR和Southern blot杂交鉴定转基因植株, 利用RT-PCR和qRT-PCR检测转基因植株中*AmDHN*基因及低温胁迫相关基因的表达量, 并测定低温胁迫下苜蓿叶片的脯氨酸(Pro)和丙二醛(MDA)含量, 从分子水平和生理指标两个层面研究转基因植株的抗寒特性, 为进一步获得抗寒性较强的转基因苜蓿新材料提供依据。结果显示: (1) *AmDHN*基因已整合在转基因苜蓿植株基因组中, 而且在不同的转基因株系中*AmDHN*的表达量也各不相同。(2) 低温(4℃)处理后转基因植株中冷胁迫相关基因*CBF2*、*CBF3*、*ProDH*和*CAS17*的表达量明显高于同期野生对照; *CBF2*、*CBF3*和*CAS17*表达量在冷处理5 h后都显著增加并达到最大值, 而*ProDH*表达量在冷处理7 d时最高, 它们的最高值分别是对照的2.5、4.1、6和3倍左右。(3) 苜蓿叶片的Pro和MDA含量均随低温处理时间延长而逐渐增加, 转*AmDHN*基因苜蓿叶片的Pro含量始终高于同期野生型植株, 而其MDA含量却始终低于同期野生型植株, 且两类植株间差异均在胁迫14 d时达到显著水平。因此, 推测转*AmDHN*基因苜蓿中积累的*AmDHN*蛋白可能对一些酶的活性及膜系统起冷冻保护作用, 从而使得转*AmDHN*基因紫花苜蓿的植株抗寒性提高, 同时*AmDHN*也可能通过调控与低温相关基因的表达间接调节植物的耐低温能力。

**关键词:** 紫花苜蓿; 转基因; 沙冬青脱水素基因; 胁迫相关基因; 低温胁迫

中图分类号: Q789

文献标志码: A

## Study on Cold-stress Tolerance of Transgenic Alfalfa (*Medicago sativa* L.) with *AmDHN* Gene

NIE Lizhen, GUO Jiufeng, LIU Hongkui, SIQIN Bateer, SUN Jie, QIAO Huilei, LIU Yongzhi\*

(Inner Mongolia Academy of Agricultural & Animal Husbandry Sciences, Huhhot 010031, China)

**Abstract:** Alfalfa varieties ‘Zhongmu No. 2’ was acted as the wild-type material. Agrobacterium-mediated method was used to introduce dehydrin gene(*AmDHN*) into alfalfa. PCR and southern blot methods were used to detect the presence of *AmDHN* in transgenic alfalfa plants. The expressions of *AmDHN* and cold-related genes were detected in transgenic plants of  $T_0$  generations through RT-PCR and qRT-PCR. The content of proline and MDA of two plants were detected. Cold resistance of the transgenic alfalfa plants was detected by molecular level and physiological characteristics, which will provide a basis for new transgenic alfalfa material with resistance to cold stress. The main results are summarized as follows: (1) Expression of *AmDHN* was determined at different levels in transgenic alfalfa plants. (2) After being treated with 4℃, expressions of cold-related genes(*CBF2*, *CBF3*, *ProDH* and *CAS17*) were dramatically higher than WT. Expressions of *CBF2*, *CBF3* and *CAS17* increased significantly after being treated 5 h, reached an ex-

收稿日期: 2014-03-26; 修改稿收到日期: 2014-07-16

基金项目: 内蒙古农牧业科学院科技创新项目(2011CXJJM01-4); 国家牧草产业体系(CARS-35)

作者简介: 聂利珍(1977—), 女, 在读博士研究生, 助理研究员, 主要从事植物抗逆基因工程的研究。E-mail: 13734717240@163.com;

\* 通信作者: 刘永志, 中国科学院博士后, 研究员, 主要从事草业科学研究工作。E-mail: liuyongzhi@vip.163.com

tremely significant level( $P<0.05$ ), as compared with WT plants. The level of *ProDH* transcripts reached the maximum at 7 d after treatment by 4 °C, their maximum were 2.5, 4.1, 6 and 3 times than WT, respectively. (3) The contents of both proline and MDA were increasing with extending treatment time. The content of proline of transgenic plants was significantly higher than that of WT. The content of MDA was significantly lower than that of WT, both goes up to an extremely significant level at 14 d after the treatment. These results suggested that transgenic plants may be more resistance to cold stress compared with WT. These imply that *AmDHN* proteins may protect the enzyme activity and membrane systems from freezing injury. Simultaneously, *AmDHN* may regulate indirectly cold tolerance of the plants through regulating the expressions of cold-related genes.

**Key words:** alfalfa(*Medicago sativa* L.); transgenic; *AmDHN*; stress-relative gene; cold stress

紫花苜蓿是世界上分布最广的优良牧草,同时也是在中国种植面积最大的人工牧草。中国苜蓿主要种植在西北地区,而西北地区的气候特点是干旱、少雨、严冬,这对苜蓿的正常生长发育非常不利,严重制约了苜蓿产业发展。深入开展苜蓿抗逆性研究,培育优良的抗逆品种,对于克服冬寒和干旱等自然条件,扩大种植范围,提高生产力,具有非常重要的意义<sup>[1-3]</sup>。近年来,国内外研究人员已分离克隆了许多抗逆基因,但是在生产上能应用的基因少之又少。因此,分离克隆抗逆性强的基因,提高农作物及牧草的生产能力势在必行。

干旱、盐碱、低温等是限制作物生产的主要环境因子。随着人口的增加、经济发展以及全球气候的变化,这些环境问题有日趋加重的趋势。低温是主要的胁迫因子之一,大部分植物都面临着低温胁迫的危害,植物在低温胁迫下会遭到不同程度的伤害,严重时甚至导致植株死亡。同时,植物在长期的进化过程中形成了对低温的适应能力,其通过调节自身的生理和分子变化过程形成了对低温胁迫的适应机制,从对信号的感知和传递到基因的表达调控,最终对低温胁迫做出响应。在这一过程中植物积累了大量的可溶性糖、脱水素、游离氨基酸等一系列物质,保护低温下细胞的结构稳定<sup>[4-5]</sup>,最终提高了植物抵抗低温的能力。

脱水素(dehydrin, DHN)存在于各种植物中,受干旱、低温和盐碱等胁迫因子诱导表达<sup>[6]</sup>。许多研究表明植物在低温下脱水素的表达量与低温抗性呈正相关<sup>[7]</sup>。虽然关于脱水素在植物体内的具体功能还不是很清楚,但是根据细胞脱水过程中它们的大量累积推测其可能参与胁迫条件下对细胞的保护功能<sup>[8]</sup>,它还可以保护生物大分子免受干旱、渗透胁迫、离子毒害等的破坏<sup>[9]</sup>,能够清除植物细胞中的活性氧自由基<sup>[10]</sup>。研究表明小麦脱水素基因*TaDHN-1*参与了小麦对干旱、高盐和低温胁迫的耐受调节过

程<sup>[11]</sup>。体外研究表明脱水素主要具有低温保护特性以及脂质和金属离子结合特性<sup>[12]</sup>,基于以上结果推测脱水素基因可能在参与植物抵御非生物胁迫中具有重要的作用。虽然植物中关于脱水素基因的研究比较多,但是关于沙冬青脱水素基因的研究尚鲜见报道。

沙冬青(*Ammopiptanthus mongolicus*)是戈壁荒漠唯一的常绿阔叶灌木,能生长于非常严寒的环境中,并保持绿色,具有非常强的耐低温能力。本研究以课题组得到的转沙冬青脱水素基因(*AmDHN*)的紫花苜蓿为材料,以非转基因的“中苜2号”为野生型对照,通过对转基因植株鉴定以及在低温胁迫下转基因植株中胁迫相关基因表达量、叶片脯氨酸含量和丙二醛含量的测定,考察转基因紫花苜蓿植株的耐低温能力,期望通过转基因技术提高紫花苜蓿的耐寒性,也为其它作物的耐低温研究提供理论依据和技术方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料与试剂

试验所用材料是紫花苜蓿(*Medicago sativa* L.)品种‘中苜2号’,种子由中国农业科学院草原研究所于林青研究员馈赠。农杆菌 LBA4404 和带有脱水素基因的植物表达载体(pBI-DHN)由本课题组构建,pBI121 植物表达载体由内蒙古农业大学李国婧教授馈赠。Southern blot 试剂购自 Roche 公司,PCR 和 qRT-PCR 引物由上海生工生物工程有限公司合成。qRT-PCR 试剂盒购自 Takara 公司 SYBR Premix Ex Taq(DRR420S),qRT-PCR 相关耗材购自 Bioplastics 公司,qRT-PCR 仪器为 Roche 480 Real-Time PCR Systems。

### 1.2 材料培养与处理

- (1) 无菌苗培养 详见聂利珍等<sup>[13]</sup>的方法。
- (2) 低温处理 转基因植株移植至装有蛭石的

花盆中,将花盆放入植物人工气候室进行培养,同时用同样的条件培养野生型植株作为对照,当植株长至4~5片真叶时,挑选长势良好、生长一致的转基因植株和对照植株进行低温处理。在4℃条件下处理0、5、12、24、72 h及3、7、14 d后,分别收集各处理时间的苜蓿叶片置于液氮中速冻,-70℃保存,用于荧光定量PCR测定;在4℃条件下处理0、3、7、14 d后,分别剪下植株叶片称量1g,用滤纸包好后液氮速冻,-70℃保存,用于脯氨酸和丙二醛含量的测定。

1.3 遗传转化及分子鉴定

(1)遗传转化 将pBI-DHN表达载体通过农杆菌介导法转入紫花苜蓿‘中苜2号’中,获得*Am-DHN*超表达转基因苜蓿,详见聂利珍等<sup>[13]</sup>方法。

(2)分子鉴定 利用*AmDHN*基因的特异引物进行鉴定。Southern blot:采用的植物材料为经PCR检测为阳性的抗性再生植株叶片。Southern杂交试剂盒为Roche公司的DIG DNA Labeling and Detection Kit,尼龙膜为Roche公司Nylon Membranes positively charged(11 209 272 001),探针制备根据Roche公司的地高辛探针标记及检测试剂盒说明书进行探针标记。DNA提取采用CTAB法,20 μg DNA经过*Bam*H I过夜酶切,电泳后将DNA转移至尼龙膜上,按试剂盒说明进行杂交、洗膜和检测等。

1.4 *AmDHN* 基因表达分析

(1)提取RNA 利用Trizol法提取RNA,RNA样品用DNAaseI消化,以除去基因组DNA的污染。将提取的苜蓿总RNA经分光光度计检测浓度,保证所得样品的OD<sub>260/280</sub>介于2.0~2.1之间,总RNA进行琼脂糖凝胶电泳,确保提出的总RNA完整性较好,且无基因组污染,满足后续的反转录和qRT-PCR分析的要求。

(2)RT-PCR 从每个样品中取0.5 μg总RNA反转录成cDNA,cDNA第一链合成试剂盒购自天根公司,操作根据cDNA第一链合成试剂盒说明进行。反转后的cDNA产物于-20℃保存。将cDNA进行PCR,PCR反应体系及程序设定与PCR扩增反应相同。

(3)实时定量RT-PCR分析 实时定量RT-PCR反应在96孔板中进行,10 μL反应体系:2×SYBR premix 5 μL,上下游引物(10 μmol/L)各1 μL,稀释5倍后的cDNA模板1 μL,H<sub>2</sub>O 2 μL。反应条件:95℃预变性2 min,95℃变性30 s,55℃退

表 1 定量 PCR 分析所用基因引物序列

Table 1 Sequences of the primers used to quantitative PCR analysis

引物名称 Primer name	引物序列 Sequence of the primer
<i>AmDHN</i>	5'-CATGCTAGCGCTGCCTTTTA-3' 5'-AGCATGCATGTGCCTTTTTA-3'
<i>MsCAS17</i>	5'-ACACTACTGGCTATGGAAG-3' 5'-CCTTCTTACTCAAAAACAG-3'
<i>MsActin</i>	5'-ACGAGCGTTTCAGATG-3' 5'-ACCTCCGATCCAGACA-3'
<i>MsCBF2</i>	5'-GAAACTTAGATAAAATGGGTG-3' 5'-GTAGCAGAGGTGGAAATAG-3'
<i>MsCBF3</i>	5'-CAACGAGGAGATGCGATTA-3' 5'-ATGCCATTGCAGCAACAT-3'
<i>MsProDH</i>	5'-ATCGCAATCTCAAAGGTT-3' 5'-TGTTAATGGCTCTGGTCTC-3'

火30 s,72℃延伸1 min,40个循环。反应结束后进行溶解曲线分析,溶解曲线根据仪器Roche 480标准程序进行。

1.5 低温胁迫相关基因的表达

采用荧光定量RT-PCR方法,以4℃处理0、5、12、24和72 h及3、7、14 d的cDNA为模板,*MsActin*作为内参基因,检测转基因苜蓿中内源低温胁迫相关基因*MsCBF2*、*MsCAS17*、*MsCBF3*、*MsProDH*的表达量,相对表达量用以下公式计算: $2^{-\Delta C_t} = 2^{-[C_t, t-C_t, r]}$ 。在定量PCR分析中所用基因引物序列见表1。

1.6 脯氨酸和丙二醛含量

脯氨酸(Pro)含量测定采用茚三酮法,具体操作按试剂盒说明书操作(南京建成公司)。丙二醛(MDA)含量测定采用TBA法,具体操作按试剂盒说明书操作(南京建成公司)。

1.7 数据处理

实时定量PCR数据计算和作图采用Microsoft Excel 2003。

2 结果与分析

2.1 *AmDHN* 基因遗传转化

试验所用的植物表达载体是pBI121,携带有35S启动子和卡那霉素抗性,从沙冬青中扩增了*AmDHN*基因全长603 bp(图1,A);连接T载体测序后,分别用*Sac*I和*Spe*I将*AmDHN*基因与表达载体pBI121双酶切(图1,B),然后连接转化DH5α,构建了重组载体pBI-DHN(图1,C);验证正确后,转入农杆菌LBA4404菌株中(图1,D);然后利用农杆菌介导法将*pBI-DHN*导入紫花苜蓿‘中苜2号’中,经过种子、胚状体和再生植株过程获得

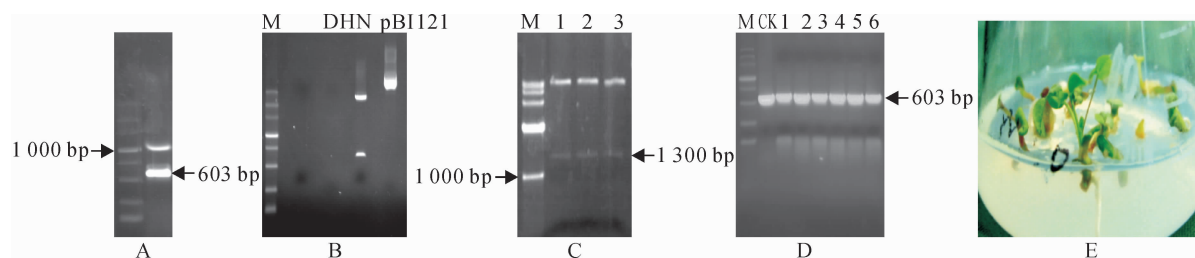


图 1 全长 *AmDHN* 基因克隆及再生植株获得

M, DNA marker; A. PCR 扩增全长 *AmDHN* 片段; B. *AmDHN* 和载体 pBI121 酶切; C. 重组载体 pBI-DHN 的酶切鉴定; D. PCR 鉴定重组载体 pBI-DHN; E. 抗性再生植株

Fig. 1 Amplification of *AmDHN* fragments and plasmids recombinant

A. Amplification of *AmDHN* fragments by PCR; B. *AmDHN* and pBI121 digested by restriction enzyme; C. Identification of the recombinant plasmid pBI-DHN by enzyme digestion; D. Identification of the recombinant pBI-DHN by PCR; E. Resistant plant

抗性再生植株(图 1, E)。

## 2.2 抗性再生植株的分子鉴定

**2.2.1 PCR 鉴定** 取抗性植株叶片提取基因组 DNA, 利用 *AmDHN* 特异引物, 通过 PCR 的方法鉴定获得的抗性植株。试验结果如下: 抗性再生植株中均扩增出一条约 603 bp 的特异片段(图 2), 说明 *AmDHN* 基因可能已整合在紫花苜蓿基因组中。

**2.2.2 Southern blot 杂交鉴定** 选取获得的经 PCR 检测呈阳性  $T_0$  代转化植株, 提取其基因组 DNA, 同时选用未转化的受体植株作阴性对照, 利用限制性内切酶 *Bam*H I 对 DNA 进行酶切, 并通过 Southern blot 方法检测 *AmDHN* 在植物基因组中的整合情况, 结果见图 3。从图中可以看出, 经杂交处理后, 抗性植株中 1、2、4、5 和 6 号植株出现较为明显的杂交信号, 而 3 号植株和阴性对照则无杂交信号产生, 说明 3 号植株是非转基因植株。这些试验结果足以说明, 目的基因 *AmDHN* 已经成功地与紫花苜蓿基因组发生了整合, 而且 5 个株系都是单拷贝插入, 插入的位点也不同。

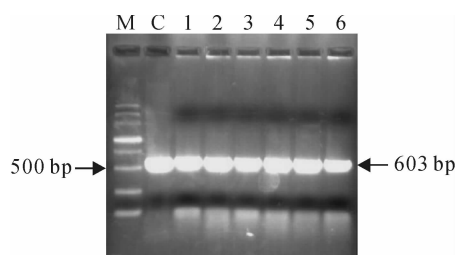


图 2 紫花苜蓿  $T_0$  代抗性植株的 PCR 检测

C. 阳性对照(沙冬青基因组 DNA); 1~6. 抗性植株

Fig. 2 PCR analysis of  $T_0$  resistant plants of *M. sativa*

C. Positive control(*A. mongolicus* genomic DNA);

1~6.  $T_0$  resistant plants

## 2.3 *AmDHN* 基因表达分析

**2.3.1 RT-PCR 分析** 选取 5 个转基因植株, 并以其幼嫩叶片为材料提取 RNA, 进行反转录。以 *AmDHN* P1/P2 为特异引物, 检测 *AmDHN* 基因的表达情况(图 4)。结果表明, 5 个转基因植株均能扩增到目的基因特异性片段 603 bp。由此可以得出: *AmDHN* 基因在  $T_0$  代转基因苜蓿中得到了正常表达。

**2.3.2 实时定量 RT-PCR 分析** 为了研究 *AmDHN* 在不同株系中的表达量, 进一步对获得的不同株系的转基因紫花苜蓿进行实时定量 RT-PCR 分析。结果表明, 所有的转基因株系中都能表达 *AmDHN* 基因, 但各植株的表达量也各不相同, 其中以株系 5 中的基因表达量最高, 且显著高于其余株系, 而其余株系间无显著差异(图 5)。

## 2.4 胁迫相关基因的表达量分析

为了研究转基因苜蓿的耐低温能力, 利用 qRT-

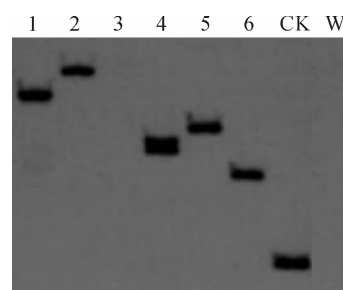


图 3 紫花苜蓿  $T_0$  代抗性植株的 Southern blot 检测

CK. 阳性对照(脱水素基因 PCR 产物); W. 阴性对照(非转基因株系); 1~6. 抗性植株

Fig. 3 Southern blot analysis of  $T_0$  resistant plants of *M. sativa*

CK. Positive control(*AmDHN* PCR product); W. Negative control(non-transgenic); 1~6.  $T_0$  resistant plants

PCR 方法分析了 4 ℃ 低温胁迫下苜蓿内源低温胁迫相关基因 *CBF2*、*CBF3*、*ProDH* 和 *CAS17* 的表达量(图 6)。结果显示,苜蓿内源低温胁迫相关基因 *CBF2*、*CBF3* 的表达量表现相似(图 6、A、B),即在不进行低温处理时,两类苜蓿株系内 *CBF2* 和

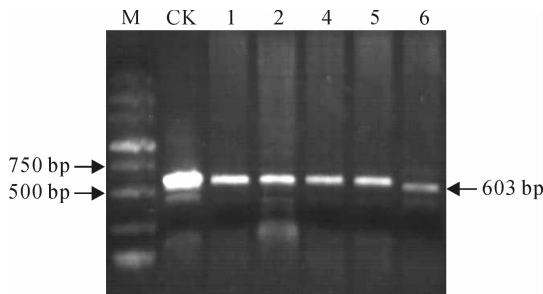


图 4 RT-PCR 分析 T<sub>0</sub> 代转基因植株 *AmDHN* 表达量  
CK. 阳性对照(沙冬青 cDNA);1,2,4~6;转基因苜蓿 T<sub>0</sub> 代植株

Fig. 4 RT-PCR analysis of *AmDHN* expression  
in transgenic plants of *M. sativa*  
CK. Positive control(*A. mongolicus* cDNA);  
1,2,4—6. T<sub>0</sub> transgenic plants

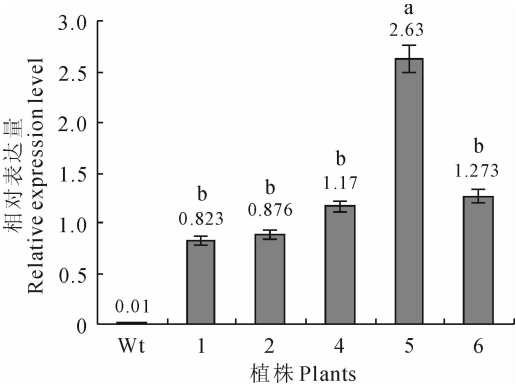


图 5 qRT-PCR 分析转基因苜蓿植株中  
*AmDHN* 基因的表达水平  
Wt. 野生型株系(非转基因株系);1,2,4~6. 不同转基因  
株系;不同小写字母表示不同的转基因株系间  
在 0.05 水平上存在显著性差异

Fig. 5 *AmDHN* expression level in the transgenic  
lines as determined by qRT-PCR  
Wt. Wild-type plant( non-transgenic),1,2,4—6. Transgenic lines;  
the different letters indicate the significant difference  
among different transgenic plants at 0.05 level

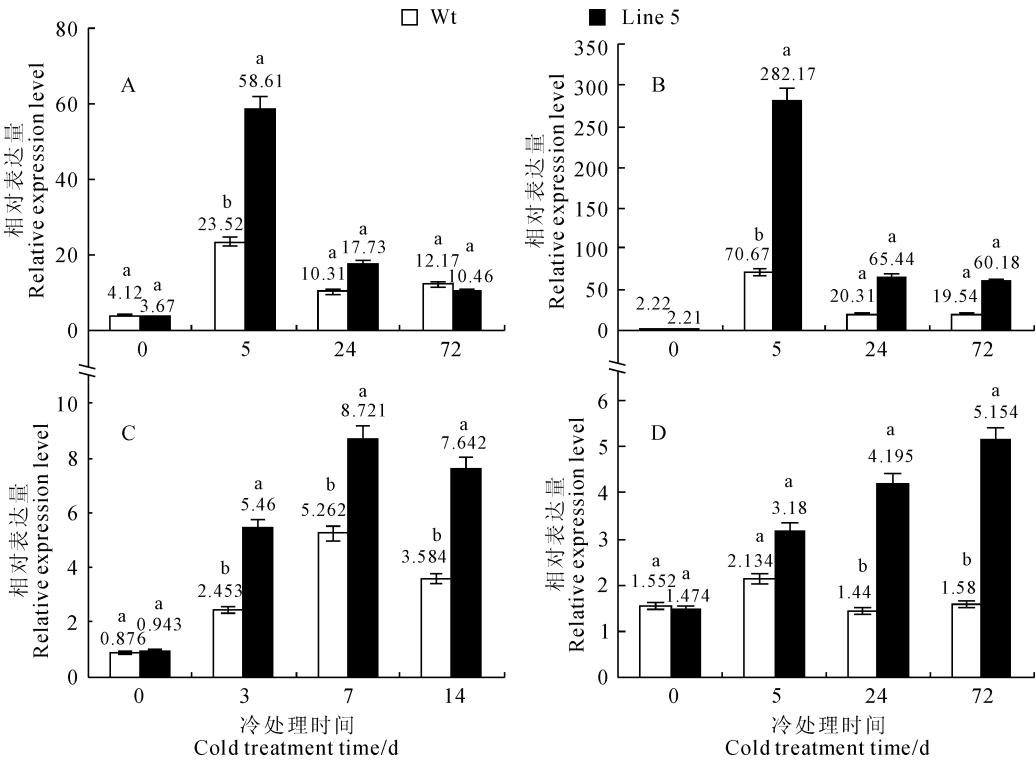


图 6 低温处理后转基因苜蓿中胁迫相关基因的表达模式分析  
Wt. 非转基因株系;Line 5. 转基因株系;A. 基因 *CBF2*;B. 基因 *CBF3*;C. 基因 *ProDH*;D. 基因 *CAS17*;  
不同小写字母表示转基因和非转基因株系间在 0.05 水平上存在显著性差异;下同

Fig. 6 Expression profile analysis of stress-relative gene in the transgenic plants in response to cold stress  
Wt. Wild-type plant;Line 5. Transgenic plant;A. Gene *CBF2*;B. Gene *CBF3*;C. Gene *ProDH*;D. Gene *CAS17*;

The different letters indicate the significant difference between transgenic and non-transgenic plants at 0.05 level. The same as below

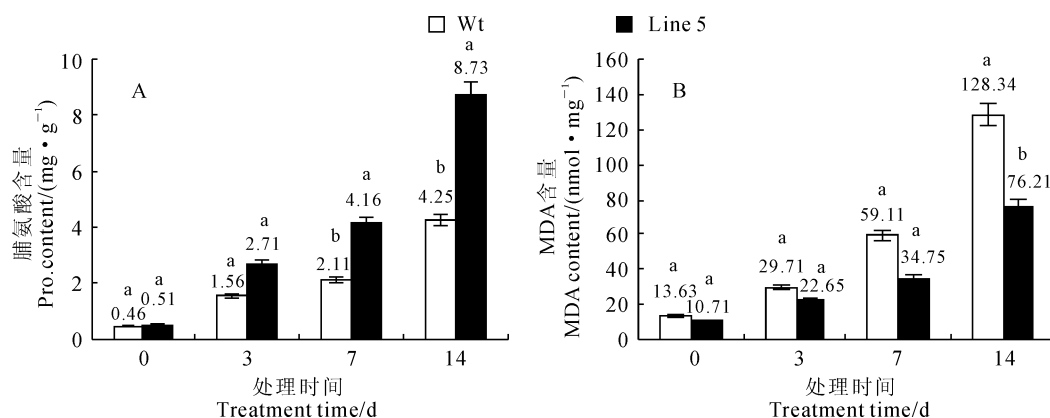


图7 低温处理后转基因苜蓿叶片中脯氨酸和丙二醛含量的变化

Fig. 7 Proline and MDA content in the transgenic plants in response to cold stress

*CBF3* 几乎不表达;低温处理 5 h 时, *CBF2* 和 *CBF3* 均迅速表达,转基因株系中的表达量显著高于对照,此时 *CBF2* 表达量约是对照的 2.5 倍, *CBF3* 表达量约是对照的 4 倍;低温处理 24 h 后,各株系两基因表达量开始迅速大幅降低,且转基因株系与对照无显著差异。同时,在不进行低温处理时,苜蓿植株内 *ProDH* 也能够正常表达,只是表达量较低,且植株间无显著性差异;随低温胁迫时间的延长,两类苜蓿植株 *ProDH* 的表达量明显增加,且表现出先增后降的趋势,并均在低温处理 7 d 时达到最大值,此时转基因株系的表达量显著高于对照,约是对照的 1.6 倍;低温胁迫 14 d 后, *ProDH* 的表达量均开始下降,但对照下降幅度较大,转基因株系仍显著高于对照,约是对照的 2.1 倍(图 6,C)。另外,无低温处理时, *CAS17* 在转基因株系和对照中都有少量表达;随低温处理时间延长, *CAS17* 的表达量在转基因株系持续增加,而在对照株系中先增后减;处理 24 h 和 72 h 时,转基因株系表达量分别约是对照的 2.9 倍和 3.3 倍,且均达到显著性水平(图 6,D)。以上结果说明转基因苜蓿的耐低温能力明显比对照强。

## 2.5 低温对苜蓿叶片内脯氨酸和丙二醛含量的影响

图 7 显示,野生对照和转基因紫花苜蓿叶片脯氨酸(Pro)和丙二醛(MDA)含量均随着低温胁迫时间的延长而呈现一致的逐渐增加的趋势;在胁迫过程中,转基因植株叶片的 Pro 含量始终高于同期野生对照,而其 MDA 含量始终低于同期野生对照,且在处理 14 d 时均达到显著水平;随着低温处理时间的延长,野生对照与转基因紫花苜蓿叶片 Pro 和 MDA 含量差异逐渐加大。其中,低温处理 14 d 时,转基因苜蓿叶片中的 Pro 和 MDA 含量分别是胁迫

前的 17.1 倍和 7.1 倍,对照叶片则分别是低温胁迫前的 9.2 倍和 9.4 倍;此时转基因苜蓿叶片中的 Pro 含量比野生对照显著增加 105.4%,其 MDA 含量则比野生对照显著降低 40.6%。可见,在低温胁迫条件下,野生对照和转基因紫花苜蓿叶片都会做出积极渗透调节响应,也均受到不同程度的氧化伤害,但转基因植株响应更敏感、受到的伤害更小。

## 3 讨论

脱水素属于 LEA (Late embryogenesis abundant, 胚胎发育晚期丰富) 蛋白 D11 家族,在植物中普遍存在。最早在胚胎发育后期的棉花子叶中检测到 LEA 蛋白<sup>[14]</sup>。研究初期发现 LEA 蛋白是在种子发育后期伴随着种子成熟过程而产生的,而在胚胎发育早期和幼苗期没有表达。随着研究的不断深入发现脱水素受 ABA 诱导表达,并且在植物生理胁迫造成的细胞缺水时诱导表达。Bravo 等<sup>[15]</sup>研究表明大麦的脱水素蛋白 DHN5 和 P-80 在体外能够保护冻融过程中 LDH (lactate dehydrogenase) 的活性。过表达柞柳 LEA 可提高转基因越橘对低温的抗性<sup>[16]</sup>。马铃薯 DHN24 转入黄瓜后增加了黄瓜的抗寒性<sup>[17]</sup>。沙冬青 *AmDHN* 受干旱、渗透胁迫及 ABA 诱导表达<sup>[7]</sup>。因此,推测脱水素基因参与了植物的抗逆过程。

在自然界中遭受环境胁迫,如干旱、低温和盐等胁迫时,植物体通过自身的防御网络来调控相关的代谢途径,产生渗透调节物质以降低或消除胁迫的伤害。已有的研究发现,植物体内的游离脯氨酸可作为渗透调节剂和冰冻保护剂对受低温胁迫的植物抗寒性有非常重要的作用,并且随着低温胁迫时间的延长其含量增加,证实了植物的抗寒性与游离脯

氨酸含量密切相关<sup>[18]</sup>。本研究表明,低温处理后,转基因苜蓿叶片中的脯氨酸含量显著高于非转基因苜蓿,其胁迫相关基因 *ProDH* 的表达量也明显增加。*ProDH* 是 Pro 降解的关键酶,主要参与 Pro 的降解,低温处理过程中 *ProDH* 的表达量随低温处理时间延长而增加,由于 *ProDH* 受底物 Pro 诱导表达<sup>[19]</sup>,因此转基因苜蓿中 *ProDH* 表达的上调可能源于低温胁迫后 Pro 含量的增加。同时,低温处理后,转基因苜蓿中 CAS17 的表达量也明显增加。CAS 基因表达量的增加可能形成大量的 CAS 蛋白,CAS 属于脱水素家族,它可能参与了低温过程中保护细胞的结构和胞内蛋白的稳定性,从而提高植物的抗冻性<sup>[20]</sup>。所以,我们推测低温处理后转基因苜蓿 CAS17 基因表达量增加,说明细胞内 CAS 蛋白的积累增加,一方面 CAS 蛋白可能作为低温保护物质直接保护冷冻过程中细胞的结构和大分子的活性,另一方面可能调控了渗透物质如 Pro 的合成,使苜蓿更好地对低温做出响应,从而提高苜蓿对低温的抗性<sup>[21]</sup>。

植物体内活性氧含量在低温胁迫下会大幅增加,破坏生物膜系统,造成植物体内渗透调节失衡,其体内活性氧自由基的积累超出一定限度时,就会引起膜质过氧化,其产物 MDA 就会大量积累。MDA 含量高低反映了脂质的氧化程度,是膜系统受损害的重要指标之一<sup>[22]</sup>。在低温胁迫过程中,本研究中转基因苜蓿叶片的 MDA 含量显著低于野生

型对照,说明转基因苜蓿在低温胁迫下细胞膜受损害较轻,表现出较好的耐低温能力。另外,低温处理后,转基因苜蓿 *CBF2* 和 *CBF3* 的表达量也明显增加。在正常条件下,转基因和非转基因苜蓿的冷胁迫相关基因的表达量相似,而在低温处理之后 *CBF* 基因都上调表达,但转基因株系相对于非转基因植株上调的幅度更大。这些结果与前人的研究结果是一致的<sup>[12]</sup>。拟南芥中抗寒性的增强一般都伴随着耐寒相关基因表达量的提高,如超表达 *CBF1* 后,*COR15a*、*COR47* 和 *COR78* 的表达量都增加,转基因拟南芥的抗低温能力提高<sup>[22-25]</sup>;过表达小麦 *TaSnRK2.8* 后,拟南芥 *CBF2* 和 *CBF3* 的表达量增加,转基因拟南芥的耐低温能力提高<sup>[26]</sup>。另据 Zhang 等<sup>[27]</sup> 研究发现,苜蓿中 *MtCAS31* 的表达与低温抗冻性密切相关,过表达 *MtCAS31* 拟南芥中 *CBF2* 和 *CBF3* 的表达量增加,提高了拟南芥对冷害的抗性。

转基因苜蓿具有较强的耐低温能力,这可能是由于转基因苜蓿中积累的 *AmDHN* 可能对一些酶的活性及膜系统起冷冻保护作用,从而使得转基因植物抗寒性提高,同时 *AmDHN* 也可能通过调控与低温相关基因的表达间接调节植物的耐低温能力。本研究发现在苜蓿中超表达 *AmDHN* 基因提高了低温对 *CBF2* 和 *CBF3* 基因的诱导作用。但是,关于 *AmDHN* 基因和 *CBF* 基因表达的相互关系到目前为止不是很清楚,还有待于今后进一步的验证。

## 参考文献:

- [1] YU L Q(于林青),WANG H(汪 慧),ZHANG X J(张旭婧),*et al.* Morphological characteristics and variation of three species of *Medicago*[J]. *Grassland and Turf*(草原与草坪),2008,**128**(3):29—33(in Chinese).
- [2] WANG Y(王 勇),LIU X Y(刘学义),Alfalfa research status,problems and countermeasures[J]. *Inner Mongolia Agricultural Science and Technology*(内蒙古农业科技),2004,(6):6—7(in Chinese).
- [3] ZHANG L J(张丽君),BAI ZH X(白占雄),GUAN W B(关文斌),*et al.* Geographic distributions of cultivated alfalfa in China[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*(华北农学报),2005,**20**(S1):99—102(in Chinese).
- [4] CHEN T H,MURATA N. Glycinebetaine:an effective protectant against abiotic stress in plants[J]. *Trends in Plant Science*,2008,13:499—505.
- [5] WANNER L A,JUNTILA O. Cold-induced freezing tolerance in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*,1999,120:391—399.
- [6] CLOSE T J. Dehydrins:emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins[J]. *Physiol. Plant*,1996,97:795—803.
- [7] SUN J,NIE L Z,SUN G Q,*et al.* Cloning and characterization of dihydrin gene from *Ammopi panthus mongolicus*[J]. *Molecular Biology Reports*,2013,**40**(3):2 281—2 291.
- [8] INGRAM J,BARTELS D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants[J]. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*,1996,47:377—403.
- [9] BRINI F,SAIBI W,AMARA I,*et al.* Wheat dehydrin DHN-5 exerts a heat-protective effect on beta-glucosidase and glucose oxidase activities[J]. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*,2010,74:1 050—1 054.

- [10] HARA M, FUJINAGA M, KUBOI T. Radical scavenging activity and oxidative modification of citrus dehydrin[J]. *Plant Physiol. Biochem.*, 2004, 42: 657—662.
- [11] ZHANG N(张 宁), SUN M SH(孙敏善), LIU L L(刘露露), *et al.* Characterization of a dehydrin gene *TaDHN-1* and its response to abiotic stresses in wheat[J]. *Scientia Agriculture Sinica* (中国农业科学), 2013, 46(4): 849—858(in Chinese).
- [12] RORAT T, SZABALA B M, GRYGOROWICZ W J, *et al.* Expression of SK3-type dehydrin in transporting organs is associated with cold acclimation in *Solanum* species[J]. *Planta*, 2006, 224: 205—221.
- [13] NIE L ZH(聂利珍), GUO J F(郭九峰), SUN J(孙 杰), *et al.* Research on transformation of DHN gene from *Ammopiptanthus mongolicus* into alfalfa(*Medicago sativa* L.)[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica* (华北农学报), 2012, 27(3): 96—101(in Chinese).
- [14] DURE L 3RD, GREENWAY S C, GALAU G A. Developmental biochemistry of cottonseed embryogenesis and germination: changing messenger ribonucleic acid populations as shown by *in vitro* and *in vivo* protein synthesis[J]. *Biochemistry*, 1981, 20: 4 162—4 168.
- [15] BRAVO L A, GALLARDO J, NAVARRETE A, *et al.* Cryoprotective activity of a cold-induced dehydrin purified from barley[J]. *Physiologia Plantarum*, 2003, 118: 262—269.
- [16] ZHAO X, ZHAN L P, ZOU X Z. Improvement of cold tolerance of the half-high bush Northland Blueberry by transformation with the *LEA* gene from *Tamarix androssowii*[J]. *Plant Growth Regul*, 2010, 63(1): 13—22.
- [17] YIN Z M, RORAT T, SZABALA B M, *et al.* Expression of a *Solanum sogarandinum* SK3-type dehydrin enhances cold tolerance in transgenic cucumber seedlings[J]. *Plant Science*, 2006, 170: 1 164—1 172.
- [18] 何若韞, 张晓松, 玄英淑. 大白菜叶中游离脯氨酸含量的变化及其与耐寒性的关系[M]//植物耐冻性与抗冻技术. 北京: 学术书刊出版社, 1990: 157—160.
- [19] KAPLAN F, KOPKA J, SUNG D Y, *et al.* Transcript and metabolite profiling during cold acclimation of *Arabidopsis* reveals an intricate relationship of cold-regulated gene expression with modifications in metabolite content[J]. *Plant Journal*, 2007, 50: 967—981.
- [20] HARA M. The multifunctionality of dehydrins: An overview[J]. *Plant Signal Behav*, 2010; 5.
- [21] ZHANG Y J, YANG J S, GUO S J, *et al.* Over-expression of the *Arabidopsis* CBF1 gene improves resistance of tomato leaves to low temperature under low irradiance[J]. *Plant Biol.*, 2011, 13: 362—367.
- [22] TAO Y(陶 雅), SUN Q ZH(孙启忠). Dynamic variation of soluble sugar, total nitrogen and malondialdehyde in different alfalfa varieties and their effect on alfalfa's cold resistance[J]. *Journal of Agricultural Science and Technology* (中国农业科技导报), 2008, 10(S1): 56—60(in Chinese).
- [23] JAGLO-OTTOSEN K R, GILMOUR S J, ZARKA D G, *et al.* *Arabidopsis* CBF1 overexpression induces *COR* genes and enhances freezing tolerance[J]. *Science*, 1998, 280: 104—106.
- [24] CHINNUSAMY V, OHTA M, KANRAR S, *et al.* ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis* [J]. *Genes Dev.*, 2003, 17: 1 043—1 054.
- [25] NAVARRO M, AYAX C, MARTINEZ Y, *et al.* Two *EgucBF1* genes overexpressed in *Eucalyptus* display a different impact on stress tolerance and plant development[J]. *Plant Biotechnol. J.*, 2011, 9: 50—63.
- [26] ZHANG H, MAO X, WANG C, *et al.* Overexpression of a common wheat gene *TaSnRK2.8* enhances tolerance to drought, salt and low temperature in *Arabidopsis*[J]. *PLoS One*, 2010, 5(12): e16041.
- [27] ZHANG L L, ZHAO M G, TIAN Q Y, *et al.* Comparative studies on tolerance of *Medicago truncatula* and *Medicago falcata* to freezing [J]. *Planta*, 2011, 234: 445—457.