

转 *PEPC* 基因水稻的抗逆性研究

李万昌¹, 师学珍¹, 张文国², 王 静¹, 王 丹¹, 姬生栋¹

(1. 河南师范大学 生命科学院, 河南 新乡 453007; 2. 封丘县农业局, 河南 封丘 453300)

摘要: 为了研究转 C_4 光合基因水稻的抗逆性, 以稳定的转磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(*PEPC*)基因水稻和未转基因水稻(对照)为供试材料, 研究其在干旱、高温、高光等逆境条件下的光合速率及抗氧化酶(SOD、POD)活性变化。结果表明: 在干旱和高温、高光条件下, 转 *PEPC* 基因水稻和对照光合速率较正常水分条件下均下降, 但对照分别下降 39.1% 和 30.4%, 转 *PEPC* 基因水稻只下降 8.0% 和 12.0%, 说明转 *PEPC* 基因水稻具有较稳定的光合速率; 超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)产生速率均增加, 对照增加的速度远快于转 *PEPC* 基因水稻, 转 *PEPC* 基因水稻分别增加 2.25 倍和 0.45 倍, 对照却相应增加 3.73 倍和 2.10 倍; 对照中 SOD、POD 活性几乎没有变化, 而转 *PEPC* 基因水稻中 SOD、POD 活性增强, 比正常条件下分别增加 0.34 倍和 1.20 倍, 说明转 *PEPC* 基因水稻清除 $O_2^{\cdot-}$ 能力增强, 从而可有效减轻膜脂过氧化程度。

关键词: 水稻; *PEPC* 基因; 抗逆性; 酶活

中图分类号: S511.032 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2014)02-0028-03

Studies on Stress Resistance of *PEPC* Transgenic Rice

LI Wan-chang¹, SHI Xue-zhen¹, ZHANG Wen-guo², WANG Jing¹,
WANG Dan¹, JI Sheng-dong¹

(1. College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China;
2. Fengqiu County Bureau of Agriculture, Fengqiu 453300, China)

Abstract: In order to elucidate the mechanism of photoprotection in *PEPC* transgenic plants, the net photosynthetic rate(Pn), the endogenous superoxide anion($O_2^{\cdot-}$) generation rate, and the variation of superoxide dismutase(SOD) and peroxidase (POD) activities in leaves were measured under the stress conditions of drought, high temperature and high light intensity. The results showed that the *PEPC* transgenic plants exhibited higher Pn and activities of SOD and POD than the untransformed ones, less generation rate of $O_2^{\cdot-}$. It was suggested that the photo-oxidation tolerance of *PEPC* transgenic rice was higher than the untransformed rice.

Key words: rice; *PEPC* gene; stress resistance; enzyme activity

水稻生长过程中常受到高光、高温和干旱等逆境条件的影响, 以至于造成产量下降。而 C_4 植物具有浓缩 CO_2 的机制, 特别在高光、高温和干旱条件下具有较高的光合效率、水分效率和氮素利用效率以及较高的生物产量。因此, 将 C_4 植物光合基因转入 C_3 植物以提高其抗逆能力的研究备受关注^[1]。

早期人们曾尝试用常规杂交的方法将 C_4 植物性状转移到 C_3 植物中^[2], 但未获得成功。近年来, 随着分子生物学技术的发展, 用农杆菌转化系统将磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(*PEPC*)基因导入水稻, 获得了一些高表达的转基因水稻植株^[3-4]。为了研究转 C_4 植物光合基因水稻的抗逆性, 本研究以野生型和

收稿日期: 2013-04-07

基金项目: 河南省科技攻关项目(102102310318)

作者简介: 李万昌(1974-), 男, 河南汝州人, 副教授, 博士, 主要从事水稻遗传育种研究。E-mail: li_wan_chang@163.com.

高表达转 *PEPC* 基因水稻为材料,对转基因水稻在干旱、高温、高光逆境条件下的光合特性进行研究,以期转 C_4 光合基因水稻的分子育种工程提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 植物材料

以导入玉米 *PEPC* 基因的新稻 18 为材料。进行水、旱栽培,水作(正常水分)栽培为全生育期灌水,旱作(干旱处理)栽培为全生育期不灌水。所有材料均为盆栽,种植于河南师范大学育种基地。

1.2 测定项目与方法

1.2.1 气体交换参数 于水稻开花期,晴天 10:00 和 14:00,采用 LI-6400 便携式光合仪测定正常水分和干旱条件下转 *PEPC* 基因水稻株系及新稻 18(对照)的光合速率(P_n),参照周宝元等^[5]的方法进行。

14:00 光强最高,气温也最高。因此,在 14:00 时分别测定正常水分条件下的转 *PEPC* 基因水稻株系和对照的光合速率,以分析其对高温、高光的耐性。

1.2.2 超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)产生速率 于水稻开花期,晴天 10:00 和 14:00,按王爱国等^[6]的方法测定正常水分和干旱条件下转 *PEPC* 基因水稻株系及对照的 $O_2^{\cdot-}$ 产生速率;分别取正常水分条件下转 *PEPC* 基因水稻株系及对照的剑叶,按 Kochba 等^[7]的方法测定过氧化物酶(POD)活性,参照 Giannopolitis 等^[8]的方法测定超氧化物歧化酶(SOD)活性。

2 结果与分析

2.1 转 *PEPC* 基因水稻 P_n 变化动态

在正常水分条件下,转 *PEPC* 基因的水稻株系与对照相比,其 P_n 略高于对照,差异不明显;在干旱处理条件下(10:00),转基因株系和对照的光合速率与正常水分条件下相比均有所下降,但对照下降更明显,下降了 39.1%,而转基因株系仍维持较高的光合速率,下降了 8.0%(图 1)。与 10:00 时相比,14:00 时转 *PEPC* 基因水稻株系及对照的光合速率均下降,对照下降了 30.4%,而转基因株系下降了 12.0%(图 1)。可见,在干旱、高光、高温条件下,2 种水稻的光合能力均受到抑制,但与对照相比,转 *PEPC* 基因水稻在逆境条件下具

有较稳定的光合能力。

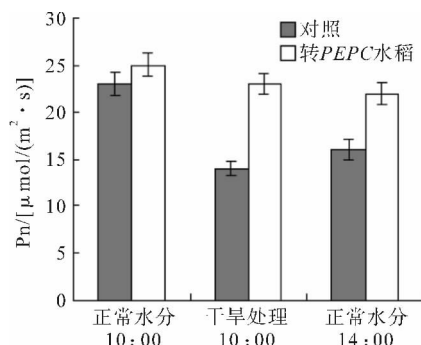


图 1 对照和转基因水稻的 P_n

2.2 转 *PEPC* 基因水稻 $O_2^{\cdot-}$ 产生速率变化动态

在正常水分条件下,转 *PEPC* 基因水稻株系与对照相比,10:00 时其 $O_2^{\cdot-}$ 产生速率差异不明显,14:00 时对照 $O_2^{\cdot-}$ 产生速率是转 *PEPC* 基因水稻株系的 2.31 倍;但在干旱条件下,对照 $O_2^{\cdot-}$ 产生速率快速增加,达 3.73 倍,远大于转基因株系增加速度(2.25 倍)(图 2)。在正常水分条件下,14:00 时与 10:00 时相比, $O_2^{\cdot-}$ 产生速率均增加,其中转基因株系增加了 0.45 倍,而对照增加了 2.10 倍。可见,在干旱、高光、高温条件下,水稻叶内产生较多的 $O_2^{\cdot-}$,但与野生型相比,转 *PEPC* 基因水稻 $O_2^{\cdot-}$ 产生的较少,光氧化伤害较轻。

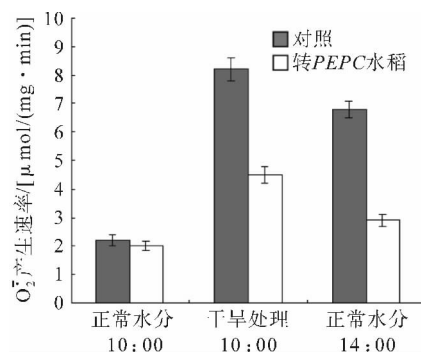


图 2 对照和转基因水稻的 $O_2^{\cdot-}$ 产生速率

2.3 转 *PEPC* 基因水稻抗氧化酶活性变化动态

$O_2^{\cdot-}$ 在植物体内的清除由保护酶和抗氧化物质来完成。SOD 为保护酶中最关键的酶,它可将毒性较强的 $O_2^{\cdot-}$ 转化为 H_2O_2 ,随后由 POD 将 H_2O_2 分解为 H_2O 和 O_2 。在正常水分条件下,转基因水稻与对照相比,10:00 时 2 种抗氧化酶活性没有明显差异,14:00 时 2 种抗氧化酶活性均明显增加,SOD 和 POD 活性分别增加 0.39 倍和 1.20 倍。在干旱条件下,转基因株系的抗氧化酶活性增加的速率明显高于对照(表 1)。14:00 时与 10:00 相比,转 *PEPC* 基因水稻株系的 2 种抗氧化酶活性均增加,

SOD 和 POD 活性分别增加 0.34 倍和 1.20 倍,而对照几乎没有变化(表 1)。可见,在干旱、高光、高温的逆境条件下,转基因水稻叶片抗氧化酶保护系统较野生型增强。

表 1 抗氧化酶活性比较 U/mg

材料	10:00 时 正常处理		10:00 时 干旱处理		14:00 时 正常处理	
	SOD	POD	SOD	POD	SOD	POD
对照	30	49	35	61	31	50
转 <i>PEPC</i> 水稻	32	50	42	76	43	110

3 结论与讨论

植物在干旱、高光、高温等逆境条件下,光抑制加剧,使叶绿素降解,甚至破坏光系统结构,造成光合器官的光化学效率和光合速率降低^[9-10]。在本研究中,转 *PEPC* 基因水稻和对照在干旱、高光、高温条件下都发生了不同程度的光抑制,但是转 *PEPC* 基因水稻的光抑制程度较低,特别是在干旱、高光、高温的胁迫下,转基因水稻的光合速率仍维持较高的水平。周宝元等^[5]研究也表明,*PEPC* 过表达可以减轻干旱胁迫对水稻光合的抑制作用,这与本研究结果一致。

已有研究表明,光抑制的伤害多与活性氧的产生有关^[11]。过剩的光能可在 PS I 或 PS II 上将电子传给 O_2 使之成为 O_2^- 。过多的 O_2^- 导致膜脂过氧化,破坏光合机构^[12]。在干旱、高光、高温的胁迫下,转 *PEPC* 基因水稻与对照相比具有较高的 SOD 和 POD 活性,能有效地清除活性氧,减小活性氧对细胞的伤害。丁在松等^[13]研究发现,干旱胁迫下 *PEPC* 过表达增强水稻的耐强光能力;李霞等^[14]研究也发现,转 *PEPC* 基因水稻对光氧化逆境有较强的耐性。

参考文献:

[1] Matsuoka M, Furbank R T, Fukayama H, *et al.* Molecular engineering of C_4 photosynthesis [J]. *Annu Rev Physiol Plant Mol Biol*, 2001, 52: 297-314.

[2] Brown R H, Bouton J H. Physiology and genetics of interspecific hybrids between photosynthetic types [J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1993, 44: 435-456.

[3] Agrie S, Tsuchida H, Ku M S B. High level expression of C_4 enzymes in transgenic rice plant [M]. Dordrecht (Netherland): Kluwer Academic Publishers, 1998.

[4] Ku M S B, Agarie S, Mika N. High level expression of maize phosphoenolpyruvate carboxylase in transgenic rice plants [J]. *Nature Biotech*, 1999, 17: 76-80.

[5] 周宝元, 丁在松, 赵明. *PEPC* 过表达可以减轻干旱胁迫对水稻光合的抑制作用 [J]. *作物学报*, 2011, 37(1): 112-118.

[6] 王爱国, 罗广华. 植物的超氧化物自由基与羟胺反应的定量关系 [J]. *植物生理学通讯*, 1990(6): 55-57.

[7] Kochba J, Lave E S, Spiegel-Roy P. Differences in peroxidase activity and isoenzymes in embryogenic and non-embryogenic "shamouti" orange ovular callus lines [J]. *Plant Cell Physiol*, 1977, 18: 463-467.

[8] Giannopolitis S, Ries S K. Superoxide dismutase. I. Occurrence in higher plants [J]. *Plant Physiol*, 1977, 59: 309-314.

[9] 赵丽英, 邓西平, 山仑. 渗透胁迫对小麦幼苗叶绿素荧光参数的影响 [J]. *应用生态学报*, 2005, 16(7): 1261-1264.

[10] 蒋明义, 杨文英, 徐江, 等. 渗透胁迫诱导水稻幼苗的氧化伤害 [J]. *作物学报*, 1994, 20(6): 733-736.

[11] Salin M L. Toxin oxygen species and protective systems of the chloroplast [J]. *Physiol Plant*, 1988, 72: 681-689.

[12] Niyogi K K. Photoprotection revisited: Genetic and molecular approaches [J]. *Annu Rev Plant Physiol Mol Biol*, 1999, 50: 333-359.

[13] 丁在松, 周宝元, 孙雪芳, 等. 干旱胁迫下 *PEPC* 过表达增强水稻的耐强光能力 [J]. *作物学报*, 2012, 38(2): 285-292.

[14] 李霞, 焦德茂, 戴传超. 转 *PEPC* 基因水稻对光氧化逆境的响应 [J]. *作物学报*, 2005, 31(4): 408-413.