

DOI:10.11686/cyxb2024099

<http://cyxb.magtech.com.cn>

贺龙义, 谭萌萌, 车海涛, 等. 细叶百合 *LpDREB9* 基因克隆及耐旱性分析. 草业学报, 2025, 34(1): 161—173.

HE Long-yi, TAN Meng-meng, CHE Hai-tao, *et al.* Cloning and analysis of drought tolerance function of the *LpDREB9* in *Lilium pumilum*. Acta Prataculturae Sinica, 2025, 34(1): 161—173.

细叶百合 *LpDREB9* 基因克隆及耐旱性分析

贺龙义, 谭萌萌, 车海涛, 张红鹰, 朱雨欣, 张彦妮*

(东北林业大学园林学院, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要: AP2/ERF 转录因子是植物特有的一类转录因子, 其中 DREB 亚家族蛋白被广泛报道可以提高植物对非生物胁迫的抵抗能力。为了开发细叶百合 DREB 家族的功能基因资源, 验证 DREB 转录因子与耐旱调控相关性, 本研究以细叶百合根部 cDNA 为模板, 克隆得到 *LpDREB9* 基因, 对其进行生物信息学分析、亚细胞定位, 并通过该基因转化模式植物烟草, 开展 *LpDREB9* 转录因子耐旱机制方面的研究。结果表明: *LpDREB9* 基因的开放阅读框(ORF)为 462 bp, 编码 153 个氨基酸, 蛋白的相对分子量为 17.054 kDa, 脂肪系数为 73.46, pI 值为 4.89, 为不稳定且具亲水性的蛋白。亚细胞定位结果表明 *LpDREB9* 蛋白定位于细胞核, 同源比对结果表明 *LpDREB9* 蛋白与岷江百合的同源基因进化关系最为密切。另外通过对野生烟草种子(WT)和转基因 *LpDREB9* 烟草种子、幼苗进行脱落酸(abscisic acid, ABA)和干旱胁迫以及对成苗进行自然干旱胁迫及复水后的表型和生理指标的测定, 发现 *LpDREB9* 基因增强了转基因烟草的耐旱性, 并且随着干旱胁迫时间的增加, *LpDREB9* 转基因烟草中超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化物酶(peroxidase, POD)和过氧化氢酶(catalase, CAT)活性、叶绿素以及脯氨酸(proline, Pro)含量明显高于 WT ($P < 0.05$), 而丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量则显著低于 WT ($P < 0.05$), 表明转基因烟草中的膜脂过氧化反应程度较低, 活性氧清除能力相对较高, 从而提高了其耐旱性。因此, *LpDREB9* 基因在增强转基因烟草耐旱机制方面具有关键作用, 这为进一步从分子水平探究细叶百合的抗逆性奠定了基础。

关键词: 细叶百合; 转录因子; *LpDREB9*; 生物信息学分析; 表型; 耐旱性

Cloning and analysis of drought tolerance function of the *LpDREB9* in *Lilium pumilum*

HE Long-yi, TAN Meng-meng, CHE Hai-tao, ZHANG Hong-ying, ZHU Yu-xin, ZHANG Yan-ni*

College of Landscape Architecture, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

Abstract: The AP2/ERF transcription factors are plant-specific transcription factors. Among them, those in the DREB subfamily have been widely reported to improve plant resistance to abiotic stresses. To explore the roles of DREB family members in *Lilium pumilum*, we identified correlations between the transcript levels of *DREB* transcription factor genes and drought tolerance. We isolated the cDNA of the *LpDREB9* gene from the roots of *L. pumilum*, and then conducted bioinformatics and subcellular localization analyses. This gene was then introduced into the model plant *Nicotiana tabacum* to elucidate its role in drought tolerance. The open reading frame (ORF) of *LpDREB9* gene was 462 bp, encoding a protein of 153 amino acids with a relative molecular weight of 17.054 kDa,

收稿日期: 2024-03-26; 改回日期: 2024-05-08

基金项目: 黑龙江省自然科学基金项目(LH2019C004)资助。

作者简介: 贺龙义(2001—), 男, 河南洛阳人, 在读硕士。E-mail: loongyihe@nefu.edu.cn

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: tdcqtgzy@126.com

the fat index of 73.46, and a pI value of 4.89. It was an unstable and hydrophilic protein. Subsequent analysis revealed the nuclear localization of the LpDREB9 protein. In an alignment analysis, the *LpDREB9* gene showed the closest evolutionary relationship with its homologs in *Lilium regale*. Seeds and seedlings of wild-type (WT) tobacco and transgenic tobacco expressing *LpDREB9* were exposed to abscisic acid and drought stress. Phenotypic and physiological parameters of the seedlings after natural drought stress and subsequent rehydration were determined. The results indicated that the *LpDREB9* gene enhanced drought tolerance in transgenic tobacco plants, particularly under prolonged drought stress. The activities of superoxide dismutase, peroxidase, and catalase, as well as chlorophyll and proline levels, were significantly higher in the *LpDREB9* transgenic tobacco than in WT ($P < 0.05$). The malondialdehyde content was markedly lower in transgenic tobacco plants than in WT ($P < 0.05$), indicative of a lower level of membrane lipid peroxidation. These findings underscore the heightened capacity to scavenge reactive oxygen species in transgenic tobacco expressing *LpDREB9*, leading to enhanced drought tolerance. Hence, the *LpDREB9* gene plays a pivotal role in augmenting the drought tolerance of transgenic tobacco. These findings provide the basis for further research on stress resistance at the molecular level in *L. pumilum*.

Key words: *Lilium pumilum*; transcription factor; *LpDREB9*; bioinformatics analysis; phenotypes; drought resistance

植物在生长发育过程中会受到多种环境胁迫的影响,如干旱、盐碱和极端温度等非生物胁迫^[1]。为了抵制这些非生物胁迫所造成的负面影响,植物进化出了复杂的生化和分子机制来提高其抗逆性。最常见的反应是激活一系列应激相关基因的表达,尤其是转录因子^[2]。转录因子(transcription factor, TF)作为基因表达的中枢调节因子,在调节植物基本功能方面发挥着重要的作用。因此挖掘植物抗逆相关转录因子,研究其作用机制并加以利用,对利用分子技术进行植物育种具有重要意义。

脱水响应元件结合蛋白(dehydration responsive element binding protein, DREB)作为一种植物特异性转录因子,它通过特异性结合脱水响应元件/C-重复序列(DRE/CRT)顺式元件控制下游基因的表达,从而增强植物对非生物胁迫的耐受性^[3]。目前,越来越多物种中的DREB类转录因子被鉴定并进行功能分析,例如在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)^[4]、水稻(*Oryza sativa*)^[5]、小麦(*Triticum aestivum*)^[6]、玉米(*Zea mays*)^[7]、番茄(*Solanum lycopersicum*)^[8]等物种中都鉴定到了不同数量的DREB基因。同时其功能的多样性也被逐渐发掘。在干旱胁迫下,过表达高粱(*Sorghum bicolor*)DREB2的转基因水稻产量明显高于野生型^[9]。棉花(*Gossypium hirsutum*)DREB基因在小麦中过表达增强了植株对干旱、热和冷胁迫的耐受性^[10]。过表达*SlDREB2*基因增强了棉花的耐旱性。此外,与野生型棉花相比,转基因棉花中胁迫诱导基因(如*GhDREB1B*和*GhDREB1A*)和抗氧化基因的表达水平更高,表明*SlDREB2*过表达可通过诱导植物生物量、气体交换特性、光合能力、活性氧(reactive oxygen species, ROS)清除、抗氧化酶活性、渗透调节和胁迫相关基因的表达来增强棉花的耐旱性^[11]。

细叶百合(*Lilium pumilum*)又名山丹,为百合科百合属多年生草本。其花型美观,颜色鲜艳,观赏价值高,鳞茎可食,是观赏兼食用的优质材料。它生命力顽强,对土壤要求不严,极耐寒,耐盐碱,耐干旱,是百合抗性育种的重要亲本^[12]。近年来,从细叶百合中挖掘了一些抗逆基因,发现它们能在不同程度上响应非生物胁迫,如*LpNAC13*基因的过表达能够提高转基因烟草(*Nicotiana tabacum*)的抗盐碱能力,但减弱了转基因烟草的耐旱能力^[13]; *LpNAC5*和*LpNAC21*基因能响应低温、盐等非生物胁迫^[14]。细叶百合*LpPEX7*基因在拟南芥中过表达,可以提高转基因拟南芥的抗盐碱能力^[15]。然而,在细叶百合中,仍有许多有价值的转录因子尚未进行研究,DREB作为一类潜在的提高植物抗性的候选基因,在植物对干旱、高盐及低温胁迫的分子反应中具有重要的调控作用。本项目组之前通过对盐胁迫下细叶百合转录组数据和12个DREB基因在非生物胁迫下表达模式的分析,发现细叶百合*LpDREB9*基因与耐旱性相关,且在非生物胁迫下差异表达明显^[16]。但该基因具体对植物的抗性提高有

何作用是值得研究的问题。因此,本研究从细叶百合中克隆了 *LpDREB9* 基因,并利用农杆菌介导法将其转入烟草获得过表达 *LpDREB9* 的转基因烟草植株,通过比较野生型和转基因烟草在脱落酸(abscisic acid, ABA)和干旱胁迫下种子的发芽率、幼苗的根长和鲜重以及成苗在自然干旱胁迫及复水后的表型和生理指标,发现 *LpDREB9* 基因在烟草中的过表达增强了转基因烟草的耐旱性。这为进一步研究 DREB 转录因子介导的干旱胁迫调控分子机制奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料和时间

细叶百合植株。植物表达载体 GV1300(PCAMBIA1300::GFP)质粒、野生型(wild type, WT)烟草种子和本氏烟草种子。试验于2021年3月在黑龙江省哈尔滨市东北林业大学进行。

1.2 *LpDREB9* 基因的克隆

利用 NCBI ORF Finder 查找 *LpDREB9* 基因完整的开放阅读框(open reading frame, ORF),用 Primer 5.0 设计特异性引物 (*LpDREB9*-F: GGAAACGCCCTCCTATCGG, *LpDREB9*-R: CACGGGAAGTTGCCCATCTG),以细叶百合根部 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,产物用 1.5% 的凝胶电泳检测,利用 OMEGA(D2500)Get Extraction Kit 试剂盒对产物进行回收及纯化,与 pEASY-Blunt 克隆载体(全式金)连接,重组质粒转化大肠杆菌 DH5 α ,挑取单菌落进行 PCR 验证,对阳性菌落进行摇菌,取验证呈阳性的菌液测序。得到测序结果后,用 DNAMAN(LynnonBiosoft,美国)软件将测序结果与数据库的序列进行比对,将序列正确的菌液进行提取质粒备用。

1.3 生物信息学分析

使用 ProtParam(<https://web.expasy.org/protparam/>)对 DREB 蛋白的相对分子质量、理论等电点和不稳定系数等进行分析;使用 ProtScale(<https://web.expasy.org/protscale/>)对 DREB 蛋白进行亲/疏水性预测;使用 ProtComp(<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=protcomppl&group=programs&subgroup=proloc>)对 *DREB* 编码的蛋白进行亚细胞定位预测;使用 NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)的 Blastp 功能对 *LpDREB9* 蛋白进行氨基酸序列及保守结构域分析,并进一步使用 MEGA 11.0 进行多重序列比对和构建系统进化树^[17]。

1.4 载体构建和过表达 *LpDREB9* 转基因植株的获得

根据植物表达载体 GV1300 的图谱和序列,通过诺唯赞在线引物设计工具(<https://www.vazyme.com>)设计获得无缝克隆引物序列,如下:

TY-*LpDREB9*-F: 5'-TTGATACATATGCCCGTCGACATGAGGGGCTGGGGT-3'

TY-*LpDREB9*-R: 5'-CCCTTGCTCACCATGGATCC CGGGAAGTTGCCCAT-3'

以含目的基因的质粒为模板,通过聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)为目的基因添加载体同源臂。用 *Sal* I 和 *Bam* H I 双酶切 GV1300-GFP 空载体得到 GV1300 线性化载体然后与添加同源序列 *LpDREB9* 基因目的片段连接,形成重组质粒,命名为 GV300-*LpDREB9*-GFP。将重组质粒使用冻融法^[18]转化 EHA105(唯地,上海),将 PCR 扩增验证正确的菌液保存用于遗传转化。然后,采用农杆菌介导的叶盘转化法^[18]侵染烟草,使用 25 mg·L⁻¹ 潮霉素(hygromycin, Hyg)进行转基因植株芽筛选。待筛选出的抗性芽长出 3~4 片真叶后,参照康为 DNA 提取试剂盒(CW2528S,江苏泰州)说明书提取 WT 和转基因烟草的 DNA,用 GV1300 通用引物进行 PCR 验证。之后参照 OMEGA 公司 RNA 提取试剂盒(R6827,北京)说明书提取 WT 和 DNA 检测阳性植株的 RNA,用 GV1300 通用引物进行 PCR 进一步验证 *LpDREB9* 基因在转基因烟草中的表达情况。然后将两次验证的阳性烟草移栽至营养土中,收取 T₀ 代种子点播至含有 25 mg·L⁻¹ Hyg 的 1/2 MS 培养基[主要成分为:硝酸钾(KNO₃)、硝酸铵(NH₄NO₃)、磷酸二氢钾(KH₂PO₄)、硫酸镁(MgSO₄)、氯化钙(CaCl₂)、碘化钾(KI)等]中,获得阳性幼苗继续培养,如此反复至获得 T₂ 代转基因植株用于后续生理生化指标测定。

1.5 亚细胞定位

采用瞬时过表达本氏烟草的方法进行亚细胞定位。将GV1300-*LpDREB9*表达载体重组质粒和GV1300空载体分别转入农杆菌EHA105。制备并活化农杆菌菌液,之后利用注射渗透法^[18]转化本氏烟草,培养2~3 d后使用激光共聚焦显微镜(Zeiss,德国)观察接种烟草叶片的荧光信号并拍照,试验进行3次生物学重复。

1.6 转基因烟草的胁迫处理

1.6.1 ABA胁迫转基因烟草的种子和幼苗 将种子消毒后,置于含0、1、2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA的1/2 MS培养基中。每个培养皿中播种3个转基因株系(Tr 9-2、Tr 9-3和Tr 9-5)和WT株系,每个株系播种20粒种子,每个处理重复3次,之后将培养皿放置于组织培养室中培养(温度20 $^{\circ}\text{C}$ 、16 h光照/8 h黑暗),以胚根大于种子长度1/2为发芽标准,14 d后观察种子萌发情况并统计发芽率,计算公式为:发芽率(%)=第14天正常发芽种子数/供试种子数 $\times 100$ ^[18]。

将消毒的转基因烟草株系和WT烟草种子,置于筛选培养基(1/2 MS培养基+25 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Hyg)和1/2 MS培养基中。在组织培养室中培养一周后,每个株系选取3株长势一致的烟草幼苗移至含0、1、2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA的1/2 MS培养基中垂直培养。每个处理重复3次。14 d后,用直尺测定每株幼苗的根长和用万分之一天平测定每株幼苗的鲜重^[18],测定时进行3次生物学重复,测定结果以平均值表示。

1.6.2 种子和幼苗的干旱胁迫处理 使用不同浓度的甘露醇(0、100、200、300 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)对转基因和WT烟草各20粒种子或3株幼苗进行干旱胁迫处理,每个处理重复3次。之后观察种子萌发情况并统计发芽率,在幼苗垂直培养14 d后记录根长和鲜重,测定时进行3次生物学重复。

1.6.3 成苗的干旱胁迫处理及生理指标的测定 转基因和WT烟草株系种子消毒后,分别播种于筛选培养基(1/2 MS培养基+25 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Hyg)和1/2 MS培养基中,之后在培养室(25 $^{\circ}\text{C}$ 、16 h光照/8 h黑暗)培养3周,从中选择长势一致的幼苗移至花盆(草炭土:珍珠岩:蛭石=3:1:1)中培养4周,用于后续干旱胁迫处理。

成苗的干旱胁迫方法如下:*LpDREB9*转基因和WT烟草株系浇透水,待托盘内水被吸干后停止浇水进行自然干旱,对照组烟草正常浇水,持续观察记录生长状况。预试验发现转基因植株在第7天出现萎蔫,在第14天萎蔫程度明显加重,因此在处理的第0、7、14天剪取转基因和WT烟草相同部位的叶片,锡纸包装后保存于-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中用于后续测量各生理指标,每组重复3次。干旱胁迫处理14 d后复水5 d,测定烟草的株高和鲜重。

于干旱胁迫的第0、7、14天,对转基因及WT烟草相同部位的叶片进行3次生物学重复取样。参照苏州格锐思生物科技有限公司试剂盒(G0103F和G0105F,苏州)说明书测定超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)活性,参照王学奎^[19]的方法,测定过氧化物酶(peroxidase, POD)活性和丙二醛(malondialdehyde, MDA)、脯氨酸(proline, Pro)以及叶片总叶绿素(chlorophyll, Chl)含量,以上指标测定均进行3次生物学重复。

1.7 数据处理

应用Excel 2019处理试验数据,SPSS 25.0进行数据分析,Origin 2023b进行绘图。

2 结果与分析

2.1 目的基因的克隆

以细叶百合根尖cDNA为模板克隆目的片段,获得一个长度为600 bp左右的扩增片段,与特异性引物扩增的产物理论长度541 bp一致(图1A)。然后将扩增产物胶回收转入大肠杆菌中,选取清晰明亮验证正确的菌液进行测序。测序结果显示:*LpDREB9*基因的开放阅读框为462 bp,编码153个氨基酸(图1B)。结果与转录组数据一致,即成功克隆了*LpDREB9*基因的编码区序列,可以进一步构建植物表达载体。

2.2 *LpDREB9*蛋白的生物信息学分析

对*LpDREB9*蛋白的理化性质进行预测(表1)可知,*LpDREB9*蛋白相对分子质量为17.054 kDa,其中*LpDREB9*蛋白的等电点(isoelectric point, pI)值小于7,为酸性蛋白质,并且不稳定系数为43.6,为不稳定蛋白,蛋

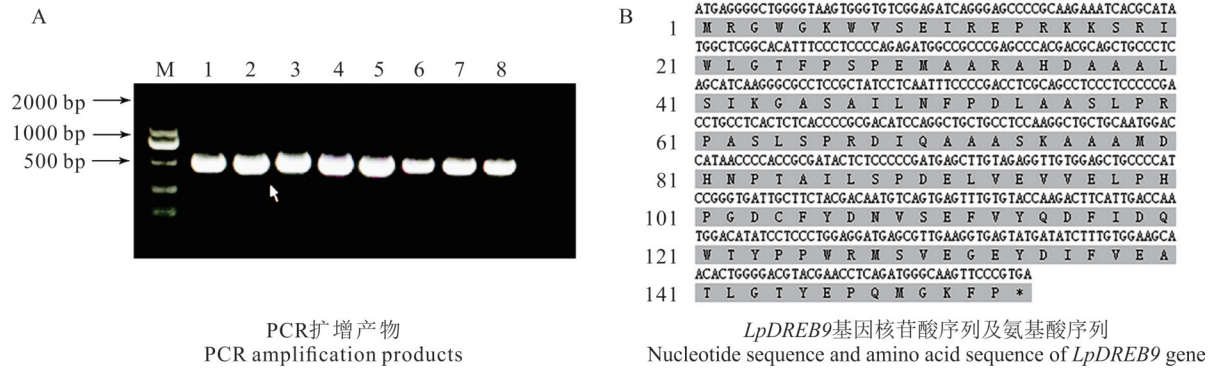


图 1 *LpDREB9* 基因克隆

Fig. 1 *LpDREB9* gene cloning

M: DL2000 marker; 1~8: *LpDREB9* 基因的 PCR 扩增产物 PCR amplification product of *LpDREB9* gene; 灰色标注为氨基酸序列 Gray marked as amino acid sequence. 下同 The same below.

表 1 细叶百合 *LpDREB9* 转录因子理化性质分析

Table 1 Physicochemical properties analysis of *LpDREB9* transcription factor in *L. pumilum*

基因名称 Gene	开放阅读框长度 Open reading frame length (bp)	氨基酸数量 Number of ami- no acids (aa)	相对分子量 Relative molecu- lar weight (kDa)	不稳定系数 Instability coefficient	脂肪指数 Fat index	蛋白质等电点 Protein isoelec- tric point	亲水指数 Hydropathy index	亚细胞定位 Subcellular localization
<i>LpDREB9</i>	462	153	17.054	43.6	73.46	4.89	-0.293	细胞核 Nucleus

白质的亲水指数为-0.293,为亲水蛋白。脂肪系数是蛋白质脂肪侧链占蛋白质的相对含量,由蛋白质中丙氨酸(alanine, Ala)、缬氨酸(valine, Val)、异亮氨酸(isoleucine, Ile)和亮氨酸(leucine, Leu)的含量决定。而 *LpDREB9* 蛋白脂肪系数为 73.46,说明 *LpDREB9* 蛋白中脂肪族氨基酸含量高。亚细胞定位预测分析表明, *LpDREB9* 基因定位于细胞核。

利用 NCBI 网站 Blastp 功能对 *LpDREB9* 编码蛋白序列进行比对,选取 7 个同源性较高的序列,通过 DNAMAN 7 进行同源性分析(图 2A),细叶百合的 *LpDREB9* 基因与岷江百合(*Lilium regale*)的同源性最高,为 83.81%,进化关系最近(图 2B)。

2.3 过表达 *LpDREB9* 转基因烟草的获得

利用冻融法将构建好的 GV1300-*LpDREB9*-GFP 植物表达载体(图 3A)转入农杆菌中,然后利用叶盘法转化烟草。选取生长良好的转基因烟草提取 DNA 和 RNA,用 GV1300 通用引物进行 PCR 验证,共鉴定出 6 株转基因烟草(图 3B)。之后将野生型烟草和转基因烟草种子播种在筛选培养基(1/2 MS 培养基+25 mg·L⁻¹ Hyg)和 1/2 MS 培养基上,发现筛选培养基上野生型烟草种子正常萌发但逐渐黄化死亡,而转基因烟草生长状态良好。最终选取长势健壮的 Tr 9-2、Tr 9-3 和 Tr 9-5 3 个转基因烟草株系进行后续的生理试验(图 3C)。同时亚细胞结果表明(图 3D), *LpDREB9* 基因定位在细胞核,与预测结果分析一致。

2.4 过表达 *LpDREB9* 提高了转基因烟草种子和幼苗对 ABA 的敏感性

无 ABA 胁迫下,WT 和转基因株系的发芽率无显著差异($P>0.05$)。然而,在 1 和 2 μmol·L⁻¹ ABA 处理期间,转基因株系的发芽率均显著低于 WT 植物($P<0.05$)。这表明 *LpDREB9* 增强了烟草种子对 ABA 的敏感性。将在 1/2 MS 培养基上培养 7 d 的转基因烟草苗和 WT 烟草苗转移到含有 0、1、2 μmol·L⁻¹ ABA 的 1/2 MS 胁迫培养基中垂直培养 14 d 后,发现在 0 μmol·L⁻¹ ABA 的培养基中,WT 植株和转基因株系的根长和鲜重无显著差异($P>0.05$);而在 1 和 2 μmol·L⁻¹ ABA 处理时转基因植株幼苗的根长和鲜重均显著小于 WT($P<0.05$,图 4A~E)。

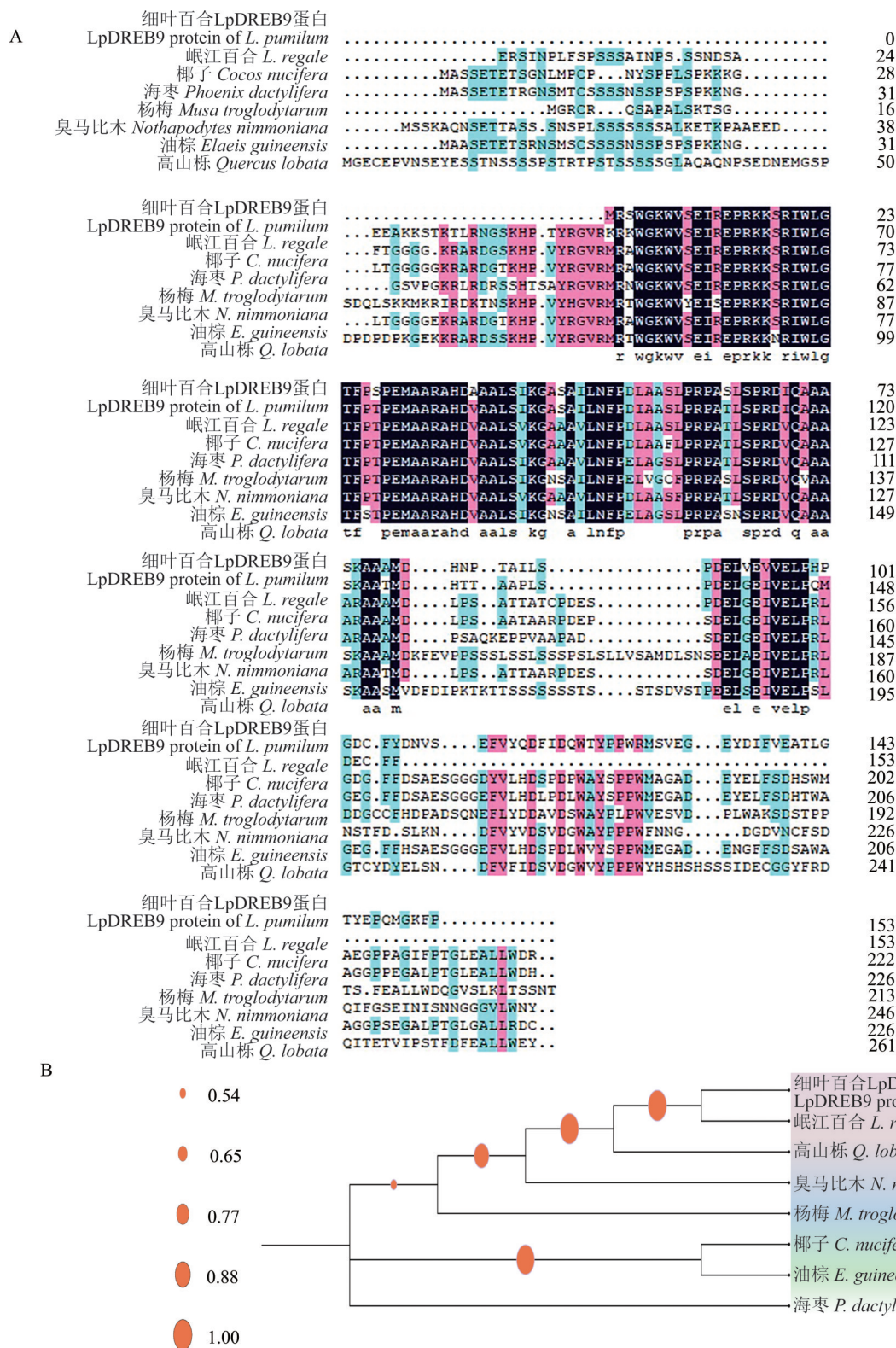


图2 细叶百合 LpDREB9 蛋白序列分析(A)和蛋白进化分析(B)

Fig. 2 Protein sequence analysis (A) and protein evolution analysis (B) of LpDREB9 in *L. pumilum*

2.5 过表达 LpDREB9 对转基因烟草种子耐旱性的影响

随着甘露醇浓度的增加,WT 和转基因烟草种子的发芽率都有所下降(图 5A,B)。当甘露醇浓度为 100 mmol·L⁻¹时,WT 烟草种子的发芽率受到显著抑制,但转基因烟草株系的种子发芽率与对照组相比未有显著变

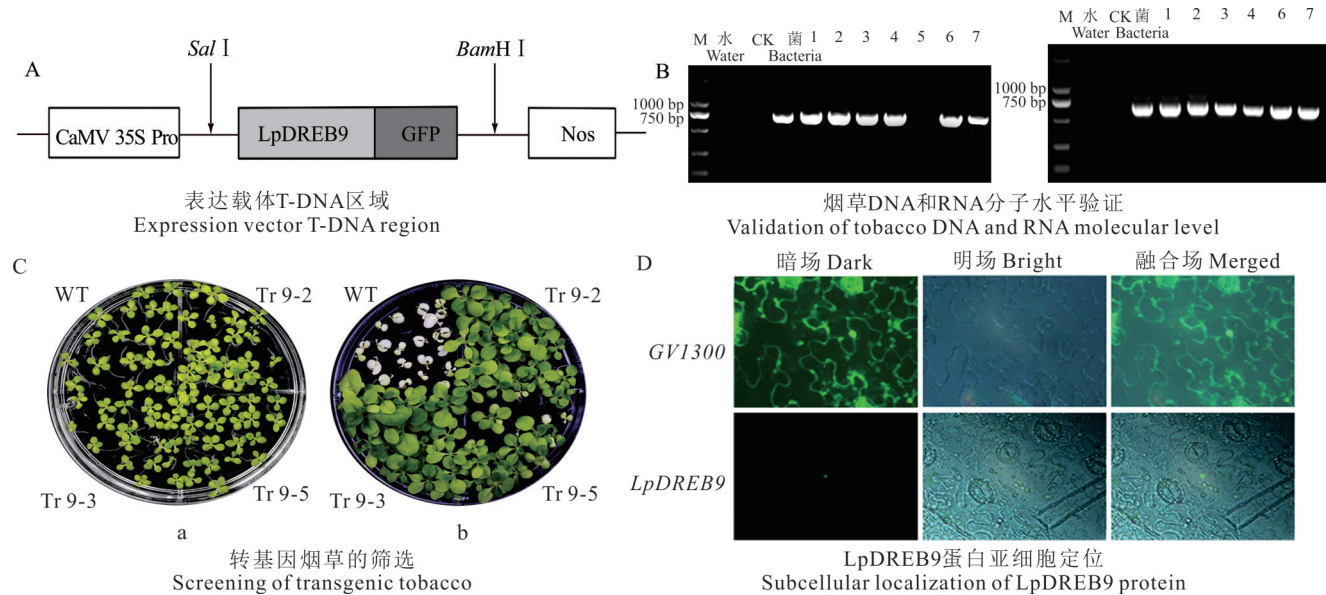


图 3 *LpDREB9* 转基因烟草的获得及 *LpDREB9* 蛋白亚细胞定位

Fig. 3 Acquisition of *LpDREB9* transgenic tobacco and subcellular localization of *LpDREB9* protein

CaMV 35S Pro: 花椰菜花叶病毒的 35S 启动子 35S promoter of cauliflower mosaic virus; GFP: 绿色荧光蛋白 Green fluorescent protein; Nos: 终止子 Terminator; 菌: 质粒 DNA Plasmid DNA; 水: 无菌蒸馏水 Sterile distilled water; CK: 野生型烟草 Wild type (WT) tobacco; 1~7: *LpDREB9* 转基因烟草抗性株系的扩增产物 Amplification products of *LpDREB9* transgenic tobacco resistant lines; a: 1/2 MS 培养基 1/2 MS medium; b: 筛选培养基 (1/2 MS 培养基 + 25 mg·L⁻¹ Hyg) Screening medium (1/2 MS medium + 25 mg·L⁻¹ Hyg). WT: 野生型烟草 WT tobacco; Tr 9-2, Tr 9-3, Tr 9-5: 分别为 *LpDREB9* 转基因烟草抗性株系 *LpDREB9* transgenic tobacco resistant line, respectively. 下同 The same below.

化。当甘露醇浓度为 200、300 mmol·L⁻¹ 时,所有烟草发芽情况均受到明显抑制(图 5A),且 Tr 9-2、Tr 9-3 和 Tr 9-5 的发芽率降低至 69.88%、71.62%、73.29% 和 54.84%、49.83%、46.60%,但仍比 WT 植株的发芽率高 0.44、0.48、0.51 和 0.84、0.67、0.56 倍(图 5B)。表明过表达 *LpDREB9* 基因在一定程度上增强了转基因烟草种子的耐旱性。

2.6 过表达 *LpDREB9* 对转基因烟草幼苗耐旱性的影响

LpDREB9 转基因和 WT 烟草幼苗的根长和鲜重,随着甘露醇浓度的增加呈下降的趋势(图 6A~C)。当甘露醇浓度为 100、200 和 300 mmol·L⁻¹ 时,转基因株系的根长和鲜重均显著高于 WT ($P < 0.05$)。此时,Tr 9-2、Tr 9-3 和 Tr 9-5 株系的根长是野生型的 1.27~1.61 倍,鲜重为野生型的 1.59~2.03 倍。表明过表达 *LpDREB9* 基因在一定程度上增强了转基因烟草幼苗的耐旱性。

2.7 过表达 *LpDREB9* 对转基因烟草成苗耐旱性的影响

随着干旱胁迫时间的延长,WT 和转基因烟草的生长均受到抑制(图 7A~D)。干旱胁迫处理 14 d 时,WT 和 *LpDREB9* 转基因烟草叶片失水萎蔫皱缩,但 WT 株系萎蔫程度更严重,部分叶片黄化,甚至干枯脱落。复水 7 d 后,*LpDREB9* 过表达株系恢复比 WT 快。复水后 *LpDREB9* 转基因烟草的株高和鲜重显著高于 WT。其中,Tr 9-2、Tr 9-3、Tr 9-5 3 个品系的株高分别是 WT 的 1.50、1.49、1.41 倍,鲜重分别是 WT 的 1.47、1.57、1.50 倍。这些结果初步表明,过表达 *LpDREB9* 基因增强了烟草的耐旱性。

2.8 超氧化物歧化酶、过氧化物酶和过氧化氢酶活性分析

在正常条件下,WT 株系和转基因株系的 SOD、POD 和 CAT 活性没有显著差异(图 8A~C)。随着干旱胁迫时间的延长,3 种抗氧化酶的活性逐渐增加。但是在干旱胁迫下,*LpDREB9* 转基因株系的 SOD、POD 和 CAT 活性显著高于 WT 株系。这些结果表明,*LpDREB9* 提高了烟草在干旱胁迫下的抗氧化防御能力从而提高了其耐旱性。

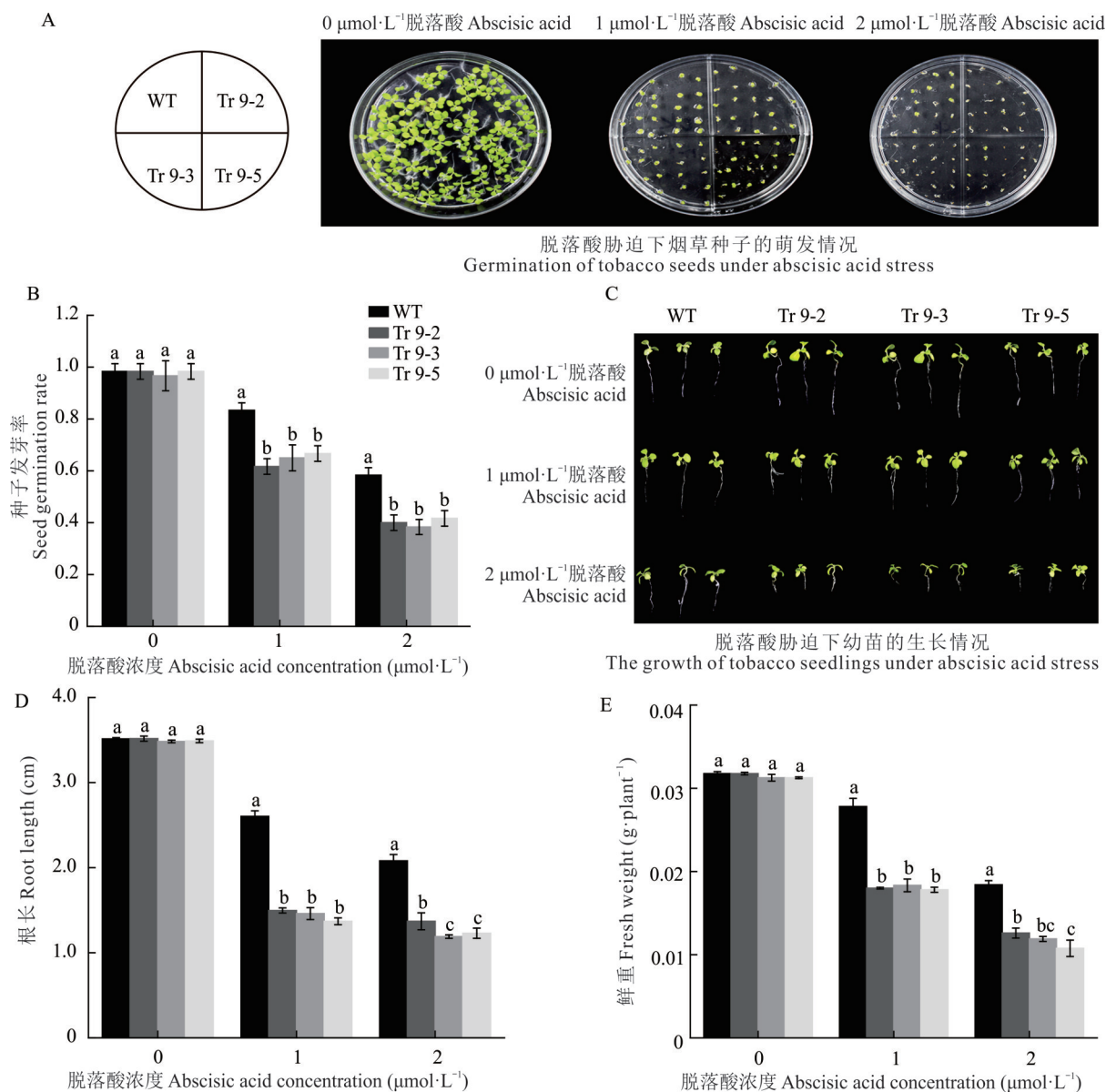


图4 *LpDREB9*植株对ABA的敏感性分析

Fig. 4 Sensitivity analysis of *LpDREB9* plants to ABA

不同小写字母表示相同浓度间差异显著 ($P < 0.05$, Duncan)。下同。Different lowercase letters indicate significant differences among the same concentration ($P < 0.05$, Duncan). The same below.

2.9 丙二醛、脯氨酸和叶片总叶绿素含量分析

干旱胁迫处理的第7和14天, WT烟草的MDA含量分别上升为 32.9 和 $65.9 \text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1}$, 是 Tr 9-2、Tr 9-3、Tr 9-5株系的1.45、1.36、1.26倍和1.55、1.61、1.44倍(图9A)。干旱胁迫处理14 d时, Tr 9-2、Tr 9-3、Tr 9-5株系和WT烟草的Pro含量达到最高, 并且3个转基因株系的Pro含量分别是WT的1.98、1.79、1.92倍(图9B)。干旱胁迫处理0 d时, WT和*LpDREB9*转基因烟草叶绿素含量无显著差异; 随着胁迫时间的增长, 叶绿素含量都逐渐降低, 但转基因烟草叶绿素含量显著高于WT(图9C)。说明过表达*LpDREB9*基因减缓了叶绿素含量的下降, 增强了光合同化能力从而增强转基因烟草的耐旱性。

3 讨论

干旱是影响植物生长、发育和产量最主要的非生物胁迫之一^[20]。而转录因子对植物响应干旱胁迫能够起到显著的调节作用。作为植物特有的一类转录因子, DREB在响应和应对干旱胁迫时发挥着重要作用。例如:

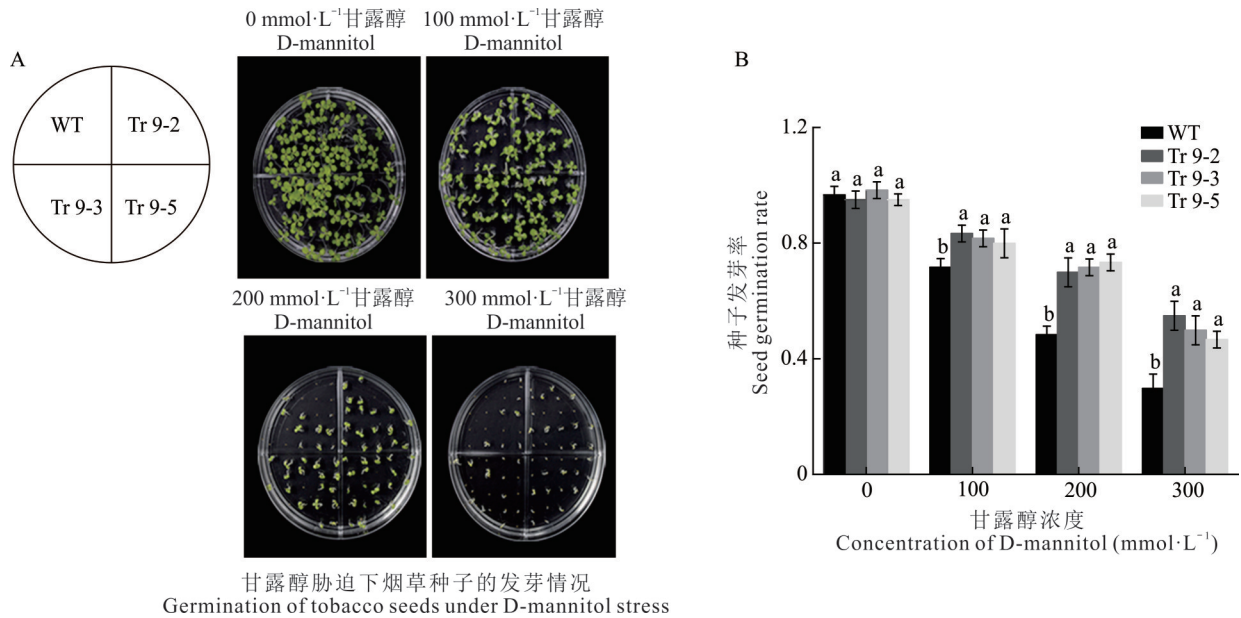


图 5 甘露醇处理下转基因烟草种子的抗性分析

Fig. 5 Resistance analysis of transgenic tobacco seeds under D-mannitol treatment

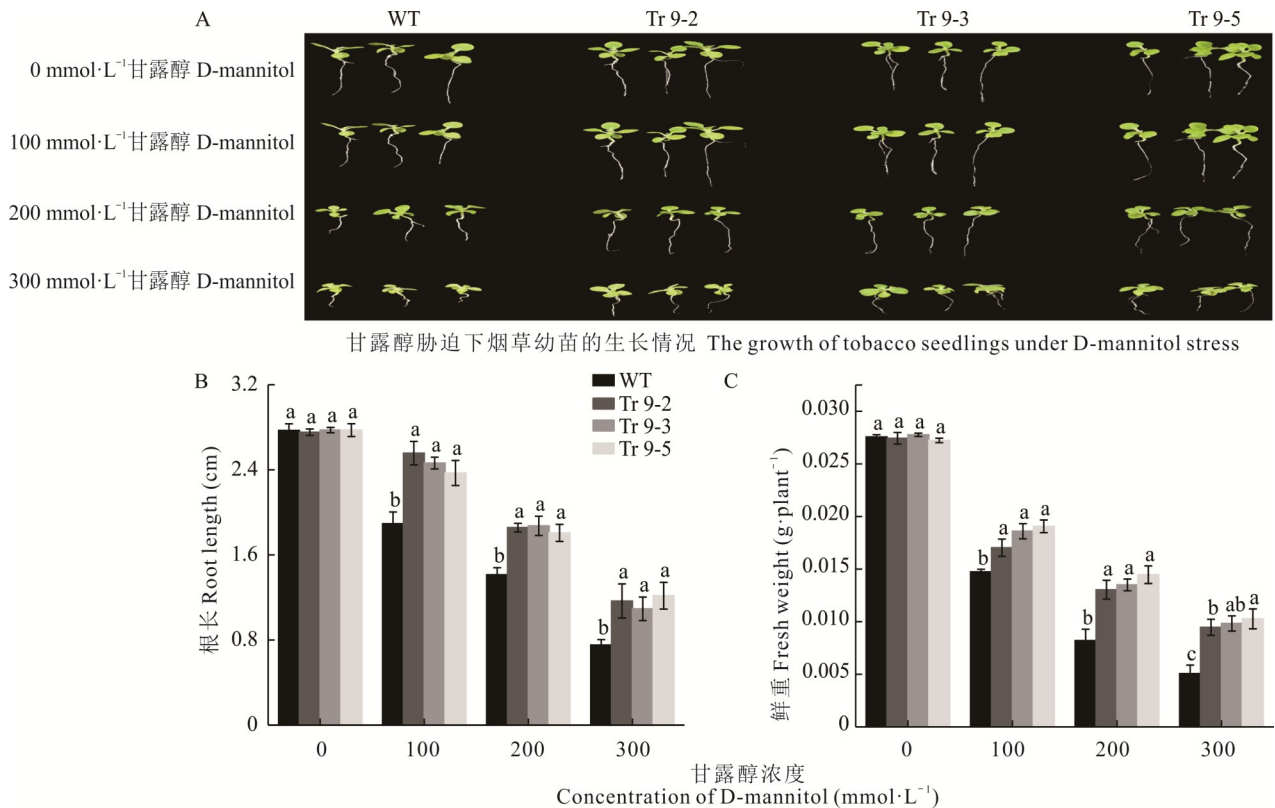


图 6 甘露醇处理下转基因烟草幼苗的抗性分析

Fig. 6 Resistance analysis of transgenic tobacco seedlings under D-mannitol treatment

AtDREB1 可以增强拟南芥耐旱能力, *AtDREB2* 提高了拟南芥在冷胁迫下的存活率^[21]。棉花 *DREB* 基因在小麦中表达时增强了其对干旱、热和冷胁迫的耐受性^[11]。

干旱胁迫下植物体内许多激素含量发生变化。其中 ABA 作为一种逆境激素, 与植物的干旱胁迫有密切关系。根据其对 ABA 的反应, 干旱反应基因可分为两类: 依赖 ABA 的基因和不依赖 ABA 的基因^[22]。ABA 依赖途径中, 胁迫基因表达依赖内源 ABA 的积累和外源 ABA 的添加; 而非 ABA 依赖途径中, 胁迫基因的表达并非仅

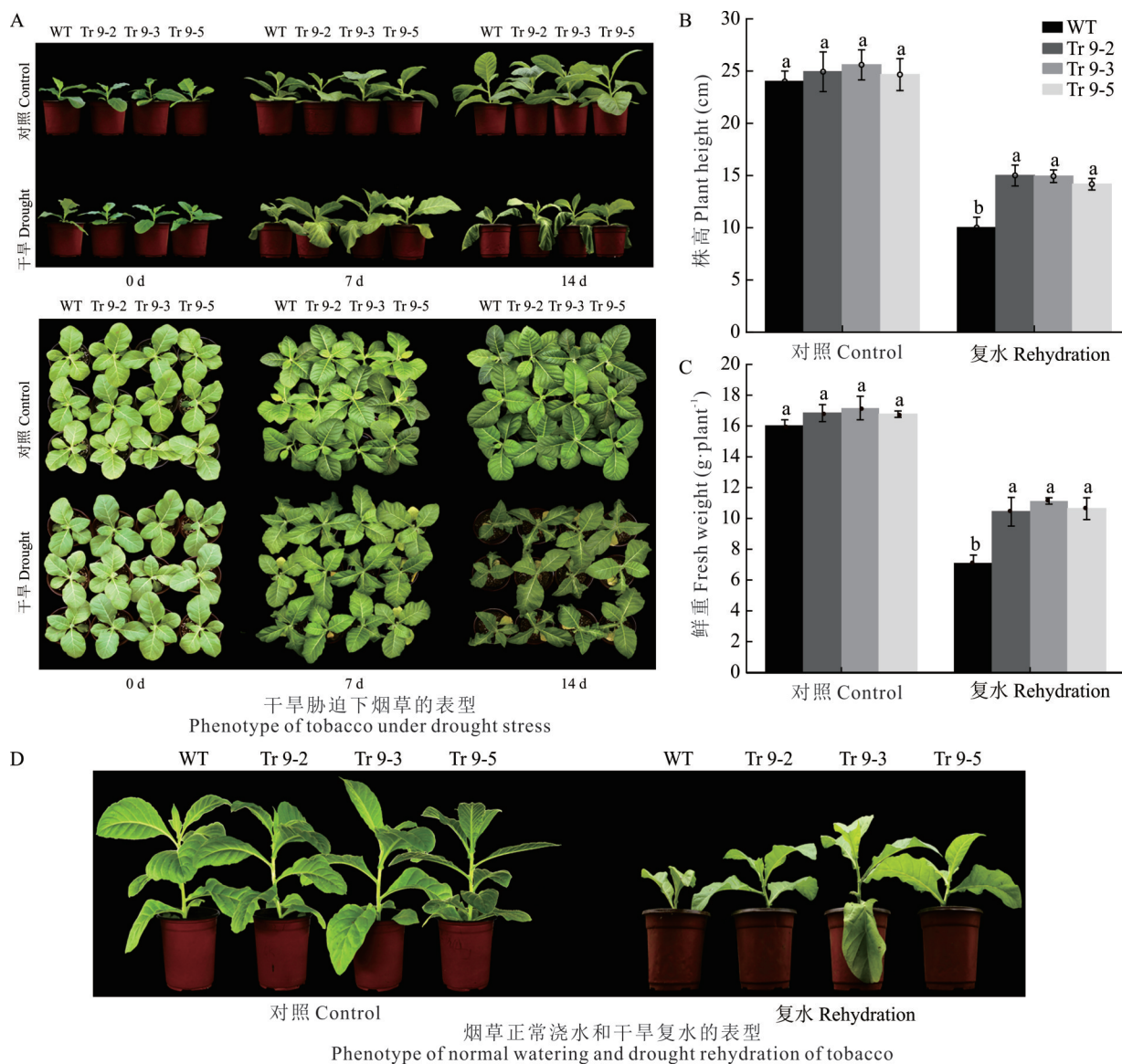


图7 干旱胁迫下烟草成苗的抗性分析

Fig. 7 Resistance analysis of tobacco seedling formation under drought stress

不同小写字母表示相同处理间差异显著 ($P < 0.05$, Duncan)。Different lowercase letters indicate significant differences among the same treatment ($P < 0.05$, Duncan).

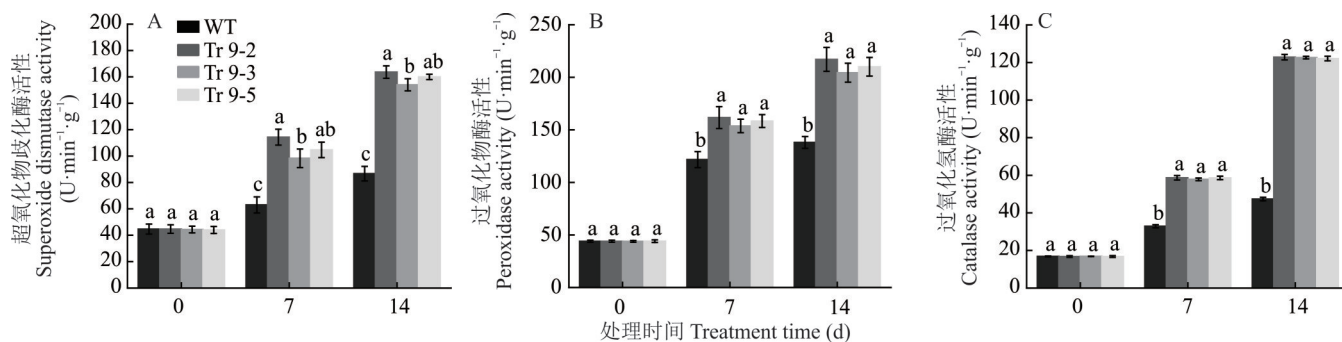


图8 烟草成苗干旱胁迫下不同天数的抗氧化酶活性变化

Fig. 8 The changes of antioxidant enzyme activity in different days under drought stress of tobacco seedlings

不同小写字母表示相同处理天数间差异显著 ($P < 0.05$, Duncan)。下同。Different lowercase letters indicate significant differences among the same treatment day ($P < 0.05$, Duncan). The same below.

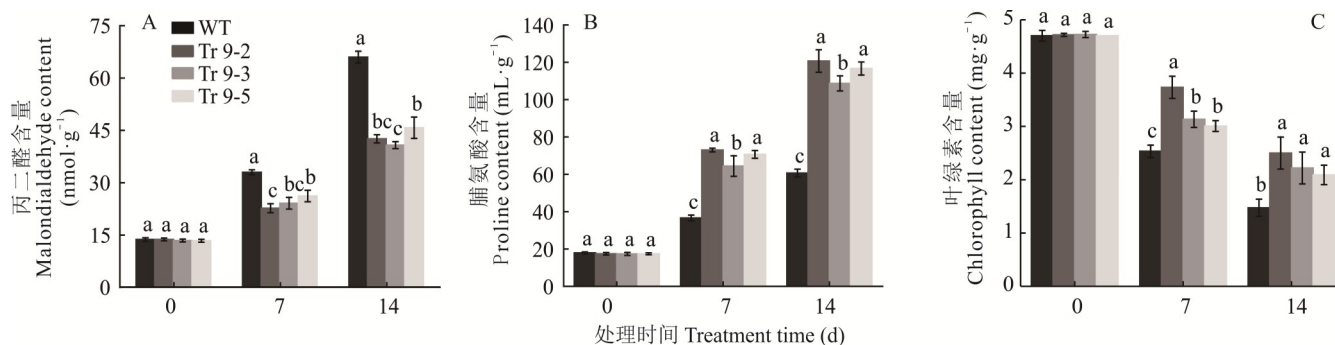


图9 烟草成苗干旱胁迫不同天数下丙二醛、脯氨酸和叶绿素含量变化

Fig. 9 Changes of malondialdehyde, proline and chlorophyll content in tobacco seedlings under drought stress in different days

受ABA调控,还受到其他逆境胁迫因子诱导。烟草中过表达蓖麻(*Ricinus communis*)*RcDREB1*提高了植株对ABA的敏感性,同时显示出更高的耐旱性^[23];水稻*OsDREB2A*基因增强了水稻的耐受性和对ABA的敏感性,而*OsDREB2A*基因表达属于ABA依赖途径,与水稻内源*OsDREB2A*表达完全不同^[24]。在本研究中得到类似结果,在不同浓度ABA胁迫处理下,转基因烟草种子的发芽率、幼苗的根长及鲜重都显著低于WT;而干旱胁迫下,*LpDREB9*烟草种子的发芽率及鲜重都显著高于WT,同时转基因株系幼苗的根系生长状况优于WT植株,说明过表达*LpDREB9*基因可以增强植物对ABA的敏感性和耐旱性,初步验证*LpDREB9*基因可能通过ABA依赖途径发挥作用,且可能是通过正向调控提高植物耐旱性。

植物的干旱适应性是指植物适应干旱胁迫和复水的综合能力,包括耐旱能力和恢复能力。因此,快速、高效地从缺水胁迫中恢复是决定植物干旱适应性的关键因素^[25]。在本研究中,对烟草的成苗进行了干旱胁迫处理以及在之后对干旱胁迫下失水萎蔫皱缩的烟草植株进行了复水处理,发现随着干旱时间的延长,所有烟草都出现失水皱缩现象,但是*LpDREB9*植株的受损程度小于WT植株;并且转基因烟草复水后的恢复力要优于WT烟草。由此得出,*LpDREB9*植株在干旱胁迫时不但有更强的耐旱能力并且能够在水分恢复时更好的恢复其生长和产量,进一步说明了*LpDREB9*基因提高了转基因植株的耐旱能力。

活性氧(ROS)是高活性分子,可作为信号分子触发各种胁迫反应,包括气孔关闭、基因表达变化和抗氧化系统的激活^[26]。在植物中,干旱胁迫通常会导致ROS过度积累使细胞膜受到伤害^[27],而超氧化物歧化酶、过氧化物酶和过氧化氢酶是清除植物中活性氧的3种主要的酶^[28]。本研究发现与WT植株相比,*LpDREB9*转基因烟草在干旱胁迫下的抗氧化酶活性高于WT,说明*LpDREB9*基因能更好地保护超氧阴离子以维持稳态。

丙二醛的产生与植物受害程度密切相关,过量ROS的产生会导致脂质过氧化产生MDA,并加重膜损伤^[29]。在干旱胁迫下,脯氨酸可以稳定植物细胞中的大分子物质、细胞液和液泡间的渗透平衡^[30-31]。植物叶片叶绿素含量直接关系着光同化过程,是衡量作物耐旱性的重要生理指标之一^[32]。本研究发现在干旱胁迫下,与WT烟草相比,*LpDREB9*转基因烟草株系的叶绿素含量更高、长势更好,且在胁迫中的萎蔫度更低,同时显示在干旱胁迫下,转基因株系MDA含量显著低于WT,脯氨酸积累量高于WT,说明转基因*LpDREB9*烟草有更好的缓解膜系统伤害和维持渗透调节的能力,该结果与花生(*Arachis hypogaea*)^[33]中的研究相似。

4 结论

本试验克隆了细叶百合的*LpDREB9*基因并将其转入烟草进行过表达,初步揭示了*LpDREB9*基因在干旱胁迫应答中的作用。转基因烟草在ABA或干旱胁迫条件下表现出较强的耐旱性,种子的发芽率、幼苗的生长以及成苗干旱胁迫后的表型和复水后的恢复能力都显著优于野生型(WT)烟草。生理试验结果显示,转基因烟草体内抗氧化酶、脯氨酸和叶绿素含量均较高,而丙二醛含量较低。进一步说明*LpDREB9*过表达株系可以通过提高抗氧化酶活性和降低膜脂过氧化反应程度来增强植株的耐旱性。综上所述,该研究为百合耐旱育种提供了一个候选基因,为进一步研究细叶百合DREB转录因子调控的耐旱机制奠定了基础。

参考文献 References:

- [1] Zhu J K. Abiotic stress signaling and responses in plants. *Cell*, 2016, 167(2): 313—324.
- [2] Liang Y, Li X, Yang R, *et al.* *BaDBL1*, a unique *DREB* gene from desiccation tolerant moss *Bryum argenteum*, confers osmotic and salt stress tolerances in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Science*, 2021, 313(2021): 111047.
- [3] Chai M, Cheng H, Yan M, *et al.* Identification and expression analysis of the DREB transcription factor family in pineapple [*Ananas comosus* (L.) Merr.]. *PeerJ*, 2020, 8(6): e9006.
- [4] Yoh S, Qiang L, Dubouzet J G, *et al.* DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of *Arabidopsis* DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2002, 290(3): 998—1009.
- [5] Yang H H, Sun Y G, Wang H X, *et al.* Genome-wide identification and functional analysis of the *ERF2* gene family in response to disease resistance against *Stemphylium lycopersici* in tomato. *BMC Plant Biology*, 2021, 21(1): 72.
- [6] Most A S, Mohammed N, Kouji S, *et al.* Gene structures, classification and expression models of the AP2/EREBP transcription factor family in rice. *Plant and Cell Physiology*, 2021, 52(2): 344—360.
- [7] Liu S, Wang X, Wang H, *et al.* Genome-wide analysis of *ZmDREB* genes and their association with natural variation in drought tolerance at seedling stage of *Zea mays* L. *PLoS Genetics*, 2013, 9(9): e1003790.
- [8] Lucas S, Durmaz E, Akpınar B A, *et al.* The drought response displayed by a DRE-binding protein from *Triticum dicoccoides*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2011, 49(3): 346—351.
- [9] Zhao P, Wang D, Wang R, *et al.* Genome-wide analysis of the potato *Hsp20* gene family: identification, genomic organization and expression profiles in response to heat stress. *BMC Genomics*, 2018, 19(1): 1—13.
- [10] Bihani P, Char B, Bhargava S. Transgenic expression of sorghum *DREB2* in rice improves tolerance and yield under water limitation. *The Journal of Agricultural Science*, 2011, 149(1): 95—101.
- [11] Rabara R C, Tripathi P, Rushton P J. The potential of transcription factor-based genetic engineering in improving crop tolerance to drought. *Omics: A Journal of Integrative Biology*, 2014, 18(10): 601—614.
- [12] Song Y, Lin W H, Jing Y B, *et al.* Cloning and expression analysis of *Catalase* gene in *Lilium pumilum*. *Bulletin of Botanical Research*, 2023, 43(5): 756—767.
宋煜, 林文昊, 荆一博, 等. 细叶百合 *Catalase* 基因的克隆及表达分析. *植物研究*, 2023, 43(5): 756—767.
- [13] Wang Y, Cao S, Guan C, *et al.* Overexpressing the NAC transcription factor *LpNAC13* from *Lilium pumilum* in tobacco negatively regulates the drought response and positively regulates the salt response. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2020, 149: 96—110.
- [14] Guan C J. Cloning of three NAC transcription factors from *Lilium pumilum* and genetic transformation to tobacco. Harbin: Northeast Forestry University, 2018.
关春景. 细叶百合 3 个 NAC 转录因子的克隆及其对烟草的遗传转化. 哈尔滨: 东北林业大学, 2018.
- [15] He H, Zhu G Q, Chen S Y, *et al.* Cloning of *LpPEX7* gene from *Lilium pumilum* and its expression characteristics under salt stress. *Bulletin of Botanical Research*, 2020, 40(2): 274—283.
何好, 朱国庆, 陈诗雅, 等. 细叶百合 *LpPEX7* 基因克隆及盐胁迫下的表达特性分析. *植物研究*, 2020, 40(2): 274—283.
- [16] Tan M M, Sun S Y, Wang J W, *et al.* Bioinformatics and stress expression analysis of DREB transcription factor in *Lilium pumilum*. *Journal of Northwest Forestry University*, 2023, 38(1): 95—101, 198.
谭萌萌, 孙绍营, 王静文, 等. 细叶百合 DREB 转录因子生物信息学及胁迫应答表达分析. *西北林学院学报*, 2023, 38(1): 95—101, 198.
- [17] Inge C D, Vanessa V, Olivier A V, *et al.* The membrane-bound NAC transcription factor ANAC013 functions in mitochondrial retrograde regulation of the oxidative stress response in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 2013, 25(9): 3472—3490.
- [18] Sun S Y. Transcriptome analysis of *Lilium pumilum* under salt stress and verification of salt-tolerance function of *LpNAC14*. Harbin: Northeast Forestry University, 2022.
孙绍营. 盐胁迫下细叶百合转录组分析及 *LpNAC14* 抗盐功能验证. 哈尔滨: 东北林业大学, 2022.
- [19] Wang X K. Principles and techniques of plant physiological and biochemical experiments. Beijing: Higher Education Press, 2006.
王学奎. 植物生理生化实验原理和技术. 北京: 高等教育出版社, 2006.
- [20] Thirumalaikumar V P, Devkar V, Mehterov N, *et al.* NAC transcription factor JUNGBRUNNEN1 enhances drought tolerance in tomato. *Plant Biotechnology Journal*, 2018, 16(2): 354—366.

- [21] Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, *et al.* Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 1998, 10(8): 1391–1406.
- [22] Hussain Q, Asim M, Zhang R, *et al.* Transcription factors interact with ABA through gene expression and signaling pathways to mitigate drought and salinity stress. *Biomolecules*, 2021, 11(8): 1159.
- [23] Rego D C F T, Santos P M, Cabral B G, *et al.* Expression of a *DREB5-A* subgroup transcription factor gene from *Ricinus communis* (*RcDREB1*) enhanced growth, drought tolerance and pollen viability in tobacco. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 2021, 146(3): 1–12.
- [24] Chen M, Zhao Y J, Zhuo C L, *et al.* Overexpression of a NF-YC transcription factor from bermudagrass confers tolerance to drought and salinity in transgenic rice. *Plant Biotechnology Journal*, 2015, 13(4): 482–491.
- [25] Aditi G, Andrés R, Caño-Delgado A I. The physiology of plant responses to drought. *Science*, 2020, 368(6488): 266–269.
- [26] Ron M, Zandalinas S I, Yosef F, *et al.* Reactive oxygen species signalling in plant stress responses. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2022, 23(10): 663–679.
- [27] Lanceras J C. Quantitative trait loci associated with drought tolerance at reproductive stage in rice. *Plant Physiology*, 2004, 135(1): 384–399.
- [28] Liu B, Cao S J, Wang Y, *et al.* Overexpression of *LpNAC6* gene in *Lilium pumilum* enhancing salt tolerance in transgenic tobacco. *Journal of Beijing Forestry University*, 2020, 42(4): 69–79.
刘彬, 曹尚杰, 王营, 等. 过表达细叶百合 *LpNAC6* 基因增强烟草的耐盐性. *北京林业大学学报*, 2020, 42(4): 69–79.
- [29] Chen T, Shabala S, Niu Y. Molecular mechanisms of salinity tolerance in rice. *The Crop Journal*, 2021, 9(3): 506–520.
- [30] Zhu J, Lee B H, Dellinger M, *et al.* A cellulose synthase-like protein is required for osmotic stress tolerance in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 2010, 63(1): 128–140.
- [31] Zhu Q, Zhang J, Gao X, *et al.* The *Arabidopsis* AP2/ERF transcription factor RAP2.6 participates in ABA, salt and osmotic stress responses. *Gene*, 2010, 457(1): 1–12.
- [32] Bapela T, Shimelis H, Tsilo T J, *et al.* Genetic improvement of wheat for drought tolerance: progress, challenges and opportunities. *Plants*, 2022, 11(10): 1331.
- [33] Shinde S S, Kachare D P, Satbhai R D, *et al.* Water stress induced proline accumulation and antioxidative enzymes in groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Legume Research*, 2018, 41(1): 67–72.