

邱爽, 张军, 何佳琦, 等. 大豆 *GmGolS2-1* 基因高温胁迫诱导表达及转基因烟草鉴定[J]. 江苏农业学报, 2021, 37(1): 38-43.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2021.01.005

大豆 *GmGolS2-1* 基因高温胁迫诱导表达及转基因烟草鉴定

邱爽¹, 张军², 何佳琦¹, 李铭杨¹, 周雨明³, 邬长乐¹, 袁洪森¹, 刘嘉仪¹, 翟莹¹
(1. 齐齐哈尔大学生命科学与农林学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006; 2. 黑龙江省农业科学院畜牧兽医分院, 黑龙江 齐齐哈尔 161005; 3. 吉林中智九方咨询有限公司, 吉林 长春 130000)

摘要: 肌醇半乳糖苷合成酶(*GolS*)是棉籽糖系列寡糖(RFO)生物合成途径中的关键酶,在植物应对非生物胁迫过程中发挥重要作用。实时荧光定量 RT-PCR 结果显示,高温胁迫可以诱导 *GmGolS2-1* 在大豆幼苗中的表达。将 *GmGolS2-1* 基因构建到植物表达载体 pRI101 上并通过叶盘法转化烟草,经卡那霉素抗性筛选,PCR 及 qRT-PCR 检测共获得 6 株阳性转基因烟草植株(OE1~OE6)。对野生型烟草植株和 *GmGolS2-1* 转基因烟草植株进行高温胁迫处理,结果显示野生型烟草的电解质渗透率和丙二醛含量均高于转基因烟草。由此推测 *GmGolS2-1* 可以提高转基因烟草的耐热性。

关键词: 大豆; 肌醇半乳糖苷;*GolS* 基因; 高温胁迫; 转基因烟草

中图分类号: S565.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2021)01-0038-06

Expression of soybean *GmGolS2-1* induced by heat stress and identification of *GmGolS2-1* transgenic tobacco

QIU Shuang¹, ZHANG Jun², HE Jia-qi¹, LI Ming-yang¹, ZHOU Yu-ming³, WU Chang-le¹,
YUAN Hong-miao¹, LIU Jia-yi¹, ZHAI Ying¹

(1. College of Life Science and Agro-Forestry, Qiqihar University, Qiqihar 161006, China; 2. Branch of Animal Husbandry and Veterinary of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Qiqihar 161005, China; 3. Jilin Zhongzhi Jiufang Consulting Co., Ltd., Changchun 130000, China)

Abstract: Galactinol synthase (*GolS*) is the key enzyme in the biosynthetic pathway of raffinose family oligosaccharides (RFOs), which plays an important role in the response to abiotic stresses of plants. The results of real-time fluorescence quantitative RT-PCR showed that the expression of *GmGolS2-1* could be induced by high temperature stress in soybean seedlings. The *GmGolS2-1* gene was constructed into expression vector pRI101 in plants and was transformed into tobacco using leaf disc method. Six positive transgenic tobacco plants (OE1-OE6) were obtained by kanamycin resistance screening, PCR and qRT-PCR. The wild-type and *GmGolS2-1* transgenic tobacco plants were treated with heat stress. The results showed that the electrolyte leakage and malondialdehyde content of wild-type tobacco were both higher than that of transgenic tobacco. These data indicate that *GmGolS2-1* can increase the tolerance to heat stress of transgenic tobacco.

收稿日期: 2020-06-29

基金项目: 黑龙江省普通本科高等学校青年创新人才培养计划项目(UNPYSCT-2017153); 黑龙江省省属高等学校基本科研业务费科研项目(植物性食品加工技术特色学科专项)(YSTSXK201878); 黑龙江省省属高等学校基本科研业务费科研项目(135209264); 齐齐哈尔大学研究生创新科研项目(YJSCX2019050)

作者简介: 邱爽(1995-), 男, 山东济宁人, 硕士研究生, 主要从事大豆分子育种研究。(E-mail) qs187143@163.com

通讯作者: 翟莹 (Tel) 15845640163; (E-mail) fairy39809079@126.com

bacco using leaf disc method. Six positive transgenic tobacco plants (OE1-OE6) were obtained by kanamycin resistance screening, PCR and qRT-PCR. The wild-type and *GmGolS2-1* transgenic tobacco plants were treated with heat stress. The results showed that the electrolyte leakage and malondialdehyde content of wild-type tobacco were both higher than that of transgenic tobacco. These data indicate that *GmGolS2-1* can increase the tolerance to heat stress of transgenic tobacco.

Key words: soybean; galactinol; *GolS* gene; heat stress; transgenic tobacco

植物在遭受不良环境条件后,可以诱导合成大量渗透调节物质来增加植物细胞的渗透压,提高植物抵抗胁迫的能力,从而维持植物自身的代谢和生长发育。其中棉子糖系列寡糖(Raffinose family oligosaccharides, RFO)就是这些渗透调节物质的典型代表。它们是高等植物中含量仅次于蔗糖的一类可溶性糖,在逆境胁迫条件下可以维持细胞膨压,保持细胞稳定性,降低植物氧化性损伤,维持光合作用正常进行^[1-3]。肌醇半乳糖苷合成酶(Galactinol synthase, *GolS*)是RFO生物合成途径中的关键酶,它所催化的UDP-半乳糖和肌醇合成肌醇半乳糖苷的反应既是RFO代谢通路中的第一步,也是限速步骤^[4]。

GolS 基因在植物中以多基因家族形式存在,不同 *GolS* 基因在抵御非生物胁迫过程中的作用也各不相同。拟南芥中含有 7 个 *GolS* 基因,其中 *AtGolS1* 和 *AtGolS2* 可以被干旱和高盐胁迫诱导上调表达,*AtGolS3* 可以被低温胁迫诱导上调表达^[5]。*AtGolS1* 和 *AtGolS2* 过表达转基因植株中肌醇半乳糖苷和棉籽糖含量均增加,对氧化胁迫的耐受能力增强^[6]。越来越多的研究结果显示,*GolS* 基因在应对高温胁迫过程中同样发挥重要作用。*AtGolS1* 是热激因子 HSF3 的调控靶基因,在高温胁迫下可以促进棉籽糖的合成^[7]。葡萄 *VvGOLS1* 基因能够被高温处理上调表达^[8]。高温和氧化胁迫可以诱导鹰嘴豆 *CaGolS1* 的表达,将其在拟南芥中过表达可以降低活性氧的积累从而提高转基因植株的耐热性^[9]。

大豆作为一种重要的经济作物,其 *GolS* 基因的功能鉴定对于大豆 RFO 代谢途径及大豆抗逆机制的研究都具有重要意义。但到目前为止,有关大豆中 *GolS* 基因与高温胁迫反应之间的关系的研究尚未见报道。本研究对大豆 *GmGolS2-1* 基因在高温胁迫下的表达量进行检测,并将其转化烟草进行耐热性鉴定。

1 材料与方法

1.1 植物材料及高温胁迫处理

试验材料为齐齐哈尔地区广泛种植的大豆抗逆品种北豆 9 号。在 Hoagland 营养液中水培大豆幼苗,待大豆幼苗第一片三出复叶完全展开时进行高温胁迫处理:将大豆幼苗置于 42 °C 培养箱中,分

别在胁迫处理的 0 h、1 h、2 h、5 h 和 10 h,剪取 0.1 g 第一片三出复叶并迅速置于液氮中,于 -80 °C 超低温冰箱中保存,用于后续总 RNA 的提取。

1.2 实时荧光定量 RT-PCR

使用 RNAiso Plus 试剂(TaKaRa 公司产品)提取各样本的总 RNA,通过琼脂糖凝胶电泳和 OD_{260}/OD_{280} 值检测提取 RNA 的质量。使用 cDNA 反转录试剂盒(Novoprotein 公司产品)合成第一链 cDNA。利用 Primer 5 软件设计 *GmGolS2-1* (GenBank 登录号:NM001354866)实时荧光定量 RT-PCR 引物。上游引物序列:5'-GCGGTGATGGATTGTTTCTG-3';下游引物序列:5'-GTGGGCTTGGTGAGTTGGA-3'。使用大豆组成型表达基因 β -Tubulin (GenBank 登录号:GMU12286)作为内参基因,上游引物序列:5'-GGAAGGCT TTCTTGCAATTGGTA-3';下游引物序列:5'-AGTGGCATCCTGCTACTGC-3'^[10]。在 BIO-RAD CFX96 Real-Time PCR 仪设置反应程序如下:95 °C 预变性 30 s;95 °C 5 s,58 °C 30 s,共循环 40 次。实时荧光定量 RT-PCR 反应体系如下:2×TB Green Premix *Ex Taq* II (TaKaRa 公司产品) 10.0 μl、cDNA 2.0 μl、上下游引物各 0.8 μl,补充水至总体积 20.0 μl。所有处理 3 次重复,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因的相对表达量。

1.3 植物表达载体的构建

使用限制性内切酶 *Nde* I 和 *Eco*R I 双酶切 pMD18-T-*GmGolS2-1* 重组质粒(本实验室前期构建)和植物表达载体 pRI101,分别切胶回收酶切片段后利用 Ligation kit 2.0 (TaKaRa 公司产品)进行连接。连接产物转化大肠杆菌 DH5 α ,提取质粒进行双酶切验证。将验证后的重组载体质粒 pRI101-*GmGolS2-1* 转化农杆菌 EHA105。

1.4 烟草遗传转化及筛选

通过农杆菌侵染叶盘法将重组载体 pRI101-*GmGolS2-1* 转化烟草 NC89^[11]。在含有 50 mg/L 卡那霉素的 MS 培养基上筛选烟草抗性苗。待烟草抗性苗生根后提取 DNA 作为模板,以 pRI101-*GmGolS2-1* 重组质粒作为阳性对照,野生型烟草叶片 DNA 作为阴性对照,对转基因抗性苗进行 PCR 检测。提取转基因及野生型烟草叶片 RNA 并进行反转录。使用烟草组成型表达基因 α -Tubulin (GenBank 登录号:AB052822)作为内参基因(上游引物序列:5'-ATGAGAGAGTGCATATCGAT-3';下游引物

序列: 5'-TTCCTGAAGAAGGTGTTGAA-3')^[10], 目的基因引物同方法 1.2 实时荧光定量 RT-PCR 中引物, 对转基因烟草中的 *GmGolS2-1* 基因的表达式进行检测, 实时荧光定量 RT-PCR 方法同 1.2, 每个株系 3 次重复。

1.5 转基因烟草耐热性检测

将营养钵中土培 56 d 的 T₁ 代转基因烟草植株置于 42 °C 培养箱中进行高温处理。在处理 48 h 时进行相对电解质渗透率和丙二醛含量的检测。电解质渗透率测定: 取 0.1 g 烟草叶片剪碎, 加入 5 ml 去离子水浸泡 1 h, 测定电导率 D_1 , 之后置于沸水中 10 min, 冷却后测定电导率 D_2 。相对电解质渗透率计算公式: $D_1/D_2 \times 100\%$ 。丙二醛含量的测定参照 Shao 等^[12] 的方法进行。每个处理 3 次重复。

1.6 数据处理

数据的差异显著性分析采用 Student's *t* 检验。

2 结果与分析

2.1 高温胁迫下 *GmGolS2-1* 的表达分析

为了检测 *GmGolS2-1* 在大豆中是否能够响应高温胁迫, 利用实时荧光定量 RT-PCR 对其高温胁迫下的表达动态进行分析。结果 (图 1) 显示, *GmGolS2-1* 的表达量随着高温处理时间延长逐渐升高, 在处理 10 h 时达到最大值, 是对照 (0 h) 的 139 倍。表明 *GmGolS2-1* 在大豆幼苗中能够响应高温胁迫, 可能在大豆应对高温胁迫过程中发挥作用。

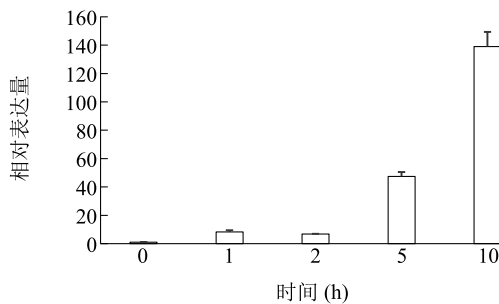


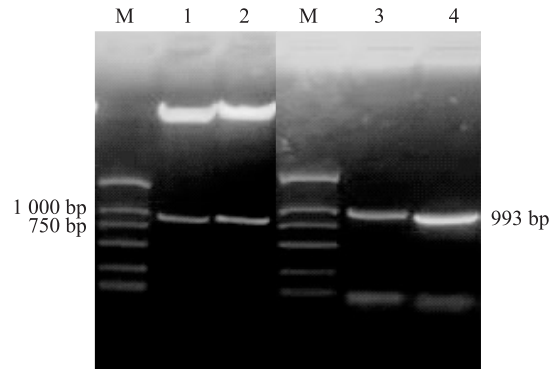
图 1 高温胁迫处理下 *GmGolS2-1* 基因在大豆幼苗中相对表达量

Fig.1 Relative expression of *GmGolS2-1* in soybean seedlings under heat stress

2.2 *GmGolS2-1* 植物表达载体构建

利用引物两端的限制性内切酶位点, 构建 *GmGolS2-1* 植物表达载体。如图 2 所示, 质粒双酶

切鉴定结果表明 *GmGolS2-1* 已经整合进植物表达载体 pRI101 中。农杆菌菌液 PCR 鉴定结果 (图 2) 显示已获得含有重组载体 pRI101-*GmGolS2-1* 的转基因工程菌。



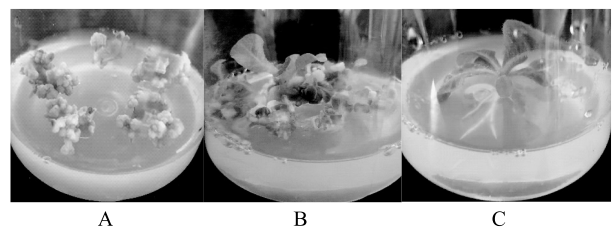
M: DL 2000 相对分子质量标记物; 1~2: pRI101-*GmGolS2-1* 质粒双酶切; 3~4: 农杆菌菌液 PCR。

图 2 植物表达载体 pRI101-*GmGolS2-1* 构建及农杆菌转化

Fig.2 Construction of plant expression vector of pRI101-*GmGolS2-1* and *Agrobacterium tumefaciens* transformation

2.3 *GmGolS2-1* 转基因烟草的筛选及鉴定

烟草遗传转化如图 3 所示, 在卡那霉素抗性培养基上筛选烟草愈伤组织 (图 3A), 待抗性芽长至 1 cm 时 (图 3B) 将其移入生根培养基中, 待根系生长正常后 (图 3C) 再移入土中正常培养。



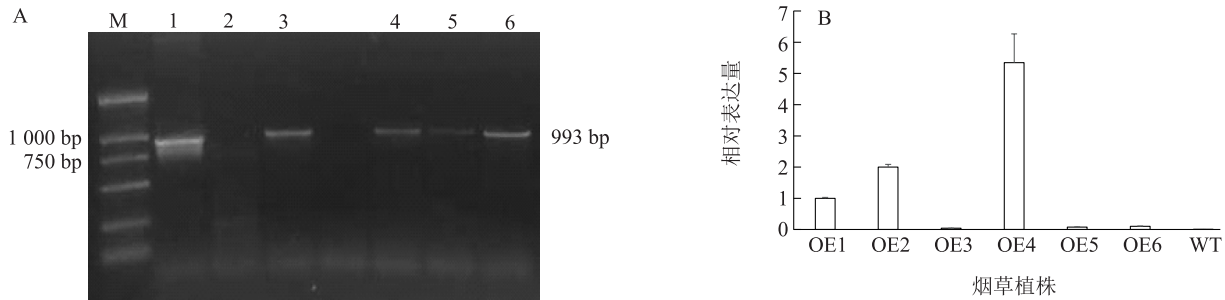
A: 烟草愈伤组织; B: 抗性芽长 1 cm 分化幼苗; C: 根系生长正常分化幼苗。

图 3 *GmGolS2-1* 转基因烟草的筛选

Fig.3 Screening of *GmGolS2-1* transgenic tobacco

PCR 检测结果显示, 共获得 6 株阳性转基因烟草植株, 分别命名为 OE1~OE6 (图 4A)。对转基因烟草植株中 *GmGolS2-1* 基因的表达量进行检测, 野生型烟草中没有 *GmGolS2-1* 基因的表达, OE4 植株中 *GmGolS2-1* 基因的表达量最高, 其次是 OE2 植

株,因此后续选择 OE4 和 OE2 植株进行耐高温胁迫鉴定(图 4B)。



M:DL 2000 相对分子质量标记物;1:pRI101-*GmGolS2-1* 阳性质粒;2:野生型烟草;3~6:部分阳性转基因烟草植株;OE1~OE6:转基因烟草植株;WT:野生型烟草植株。

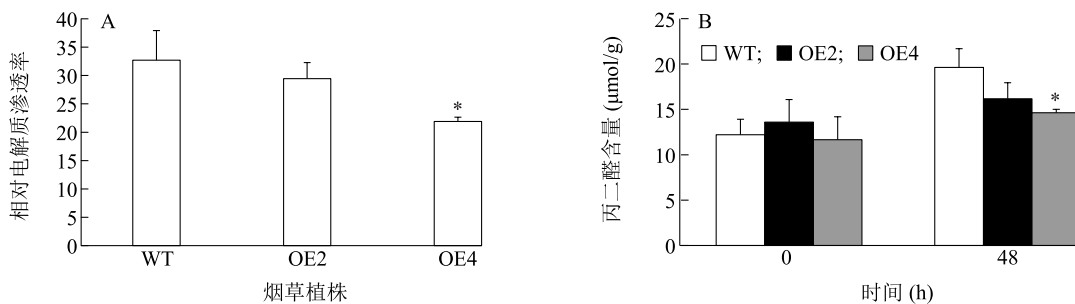
图 4 *GmGolS2-1* 转基因烟草 PCR 检测(A) 和 *GmGolS2-1* 在转基因烟草植株中的表达量(B)

Fig.4 PCR detection of *GmGolS2-1* transgenic tobacco (A) and the expression levels of *GmGolS2-1* in transgenic tobacco (B)

2.4 转基因烟草耐热性鉴定

高温胁迫处理后,OE2 和 OE4 转基因烟草植株中的相对电解质渗透率均低于野生型烟草,且 OE4 达到显著程度(图 5A)。丙二醛含量检测结果(图 5B)显示,OE2 和 OE4 转基因烟草植株与野生型烟草植株在未处理(0 h)时的丙二醛含量没有显

著差异;高温胁迫处理 48 h 后,丙二醛含量均升高,但 OE2 和 OE4 转基因烟草植株中的丙二醛含量均低于野生型烟草植株,且 OE4 达到显著程度。以上结果表明,*GmGolS2-1* 在烟草中的持续过表达可以减少高温胁迫对烟草细胞质膜完整性的破坏,提高转基因烟草的耐热性。



OE2, OE6:转基因烟草植株;WT:野生型烟草植株; * 表示差异显著 ($P < 0.05$)。

图 5 *GmGolS2-1* 转基因烟草植株在高温胁迫下的电解质渗透率(A) 和丙二醛含量(B)

Fig.5 Electrolyte leakage (A) and malondialdehyde content (B) in *GmGolS2-1* transgenic tobacco under heat stress

3 讨论

作物在生长发育过程中常常遭受各种逆境胁迫,其中高温可以对作物的生长发育造成不可逆转的影响,且高温常常伴随着干旱及各种病害的发生,是导致作物减产质量降低的主要因素之一。当植物遭受高温胁迫时,相关转录因子可以激活胁迫相关基因的表达。*GolS* 是 RFO 生物合成起始的关键限

速酶,它通过催化 UDP-半乳糖和肌醇反应合成肌醇半乳糖苷,再以此为供体,在棉籽糖合成酶和水苏糖合成酶的作用下将蔗糖合成棉籽糖和水苏糖等寡糖^[13]。这些可溶性糖不仅可以作为细胞中的渗透调节物质,还可以作为植物适应环境的信号物质^[14]。因此,*GolS* 基因对植物抵抗逆境胁迫意义重大。

GolS 属于多基因家族,仅在拟南芥中就发现了

10 个编码 *GolS* 的基因^[15]。我们在大豆基因组中共获得 6 个 *GolS* 基因碱基序列,它们对非生物胁迫的应答模式并不相同。基因表达量检测结果显示,*GmGolS2-1* 是一个典型的高温胁迫诱导表达基因。基因的表达模式往往与基因功能密切相关,由此推测 *GmGolS2-1* 可能在大豆耐热生理中起重要作用。前人也有过类似报道,例如鹰嘴豆 *CaGolS1* 可以应答高温胁迫,将其在拟南芥中过表达可以提高转基因植株的耐热性^[9]。但到目前为止,有关 *GolS* 基因与高温胁迫反应之间的关系的的研究相比其与其他非生物胁迫反应还比较少,耐热机制也不甚明了。Wang 等^[16]认为,丹参中的 3 个 *GolS* 基因能够被高温胁迫诱导表达,可能是这些基因上游的启动子序列中含有 HSF 转录因子结合的顺式作用元件,转基因试验结果也验证了此观点。

植物在遭受外界逆境胁迫后通常会在形态上出现一系列的变化,如叶片萎蔫、叶色褪绿、幼苗死亡等^[17-18]。但是单纯的形态学观察常常会产生极大的误差,因此可以通过检测某些与抗逆相关的生理指标来鉴定不同植株的抗逆能力。高温胁迫会导致植物脱水,影响植物体内自由基产生和消除的平衡,进而导致过氧化作用,破坏细胞膜的完整性,对细胞造成伤害^[19]。电解质渗透率增大是植物遭受逆境胁迫后细胞膜通透性增大的最直观体现,细胞膜通透性增大会导致细胞中物质大量流失,进而影响细胞正常的生理功能并最终影响植物的正常生长发育^[20]。丙二醛是植物膜脂过氧化的产物,其含量可作为判断植物受损伤程度的一项重要生理指标^[21]。因此,电解质渗透率和丙二醛含量可以在一定程度上反应植株的抗逆能力。*TaGolS3* 转基因拟南芥和水稻在锌离子胁迫下活性氧清除相关基因的表达量升高,其电解质渗透率和丙二醛含量均低于野生型对照,由此提高了转基因植株对重金属胁迫的抗性^[22]。本研究中,*GmGolS2-1* 转基因烟草植株在高温处理下叶片电解质渗透率及丙二醛含量均低于野生型对照组,证明 *GmGolS2-1* 基因可以降低高温胁迫对烟草叶片造成的伤害,提高转基因烟草的耐热性。

参考文献:

- [1] BARTELS D, SUNKAR R. Drought and salt tolerance in plants [J]. Critical Reviews in Plant Sciences, 2005, 24(1): 23-58.
- [2] NISHIZAWA Y A, YABUTA Y, SHIGEOKA S. Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage[J]. Plant Physiology, 2008, 147(3): 1251-1263.
- [3] KNAUPP M, MISHRA K B, NEDBAL L, et al. Evidence for a role of raffinose in stabilizing photosystem II during freeze-thaw cycles[J]. Planta, 2011, 234(3): 477-486.
- [4] ELSAYED A I, RAFUDEEN M S, GOLLDACK D. Physiological aspects of raffinose family oligosaccharides in plants: protection against abiotic stress[J]. Plant Biology, 2014, 16(1): 1-8.
- [5] TAJI T, OHSUMI C, IUCHI S, et al. Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Journal, 2002, 29(4): 417-426.
- [6] NISHIZAWA Y A, YABUTA Y, SHIGEOKA S. The contribution of carbohydrates including raffinose family oligosaccharides and sugar alcohols to protection of plant cells from oxidative damage [J]. Plant Signal Behavior, 2008, 3(11): 1016-1018.
- [7] PANIKULANGARA T J. Galactinol synthase1. A novel heat shock factor target gene responsible for heat-induced synthesis of raffinose family oligosaccharides in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology, 2004, 136(2): 3148-3158.
- [8] PILLET J, EGERT A, PIERI P, et al. VvGOLS1 and VvHsfA2 are involved in the heat stress responses in grapevine berries[J]. Plant & Cell Physiology, 2012, 53(10): 1776-1792.
- [9] PRAFULL S, NITIN U K, MANOJ M. Stress-inducible galactinol synthase of chickpea (*CaGolS*) is implicated in heat and oxidative stress tolerance through reducing stress-induced excessive reactive oxygen species accumulation[J]. Plant Cell Physiol, 2018, 59(1): 155-166.
- [10] ZHAI Y, SHAO S L, SHA W, et al. Overexpression of soybean *GmERF9* enhances the tolerance to drought and cold in the transgenic tobacco[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2017, 128(3): 607-618.
- [11] HOEKEMA A, HIRSCH P R, HOOYKAAS J J, et al. A binary plant vector strategy based on separation of *vir*- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid [J]. Nature, 1983, 303(5913): 179-180.
- [12] SHAO H B, LIANG Z S, SHAO M A. Osmotic regulation of 10 wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes at soil water deficits[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2006, 47(2): 132-139.
- [13] PETERBAUER T, RICHTER A. Biochemistry and physiology of raffinose family oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seeds [J]. Seed Science Research, 2001, 11(3): 185-197.
- [14] SHEEN J, ZHOU L, JIANG J C. Sugar as signaling molecules [J]. Current Opinion in Plant Biology, 1999, 2(5): 410-418.
- [15] 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]. The Plant Journal, 2007, 50(6): 967-981.

- [16] WANG D H, YAO W, SONG Y, et al. Molecular characterization and expression of three galactinol synthase genes that confer stress tolerance in *Salvia miltiorrhiza* [J]. Journal of Plant Physiology, 2012, 169(18): 1838-1848.
- [17] 夏瑞祥,肖 宁,洪义欢,等. 东乡野生稻苗期耐冷性的 QTL 定位[J]. 中国农业科学, 2010, 43(3): 443-451.
- [18] 王代鑫,徐 升,程 哲,等. 吉林省中晚熟水稻品种耐冷性鉴定结果与分析[J]. 中国稻米, 2020, 26(3): 48-53.
- [19] CAKMAK I, HORSTW J. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycinemax*) [J]. Physiologia Plantarum, 1991, 83(3): 463-468.
- [20] 周 旋,申 璐,金 媛,等. 外源水杨酸对盐胁迫下茶树生长及主要生理特性的影响[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2015, 43(7): 161-167.
- [21] 高向阳,杨根平,许志强,等. 水分胁迫下钙对大豆膜脂过氧化保护酶系统的影响[J]. 华南农业大学学报, 1999, 20(2): 7-12.
- [22] WANG Y, LIU H, WANG S, et al. Overexpression of a common wheat gene *GALACTINOL SYNTHASE3* enhances tolerance to zinc in *Arabidopsis* and rice through the modulation of reactive oxygen species production [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2016, 34: 794-806.

(责任编辑:陈海霞)