

# 小麦 *TaLEA1* 基因的表达特征及抗逆功能验证

姜奇彦<sup>1</sup>, 孟强<sup>2</sup>, 牛凤娟<sup>1</sup>, 孙现军<sup>1</sup>, 胡正<sup>1</sup>, 张辉<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081; <sup>2</sup>山东师范大学生命科学学院, 济南 250014)

**摘要:**我国土壤盐碱化日益严重, 对我国的粮食安全造成了严重威胁, 因此耐盐基因挖掘对作物耐盐育种非常重要。许多研究表明胚胎发育晚期丰富蛋白(LEA)在植物应对非生物胁迫中发挥积极作用。本研究以小麦 *TaLEA1* 基因为研究对象, 分析了其表达蛋白的理化性质及基因表达模式, 并通过在拟南芥中过表达, 分析 *TaLEA1* 基因的抗逆功能。结果表明, *TaLEA1* 基因的表达蛋白属于第3组 LEA 蛋白, 是稳定的亲水蛋白, 富含  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -转角等结构。*TaLEA1* 基因在小麦根、茎、叶、花、种子等不同组织中均有表达, 盐胁迫条件诱导其高表达。在拟南芥中过表达 *TaLEA1* 基因, 显著提高了盐胁迫下转基因拟南芥的种子萌发率、根长及盐和早胁迫下的叶绿素含量。本研究结果为 LEA 基因抗逆机理的研究和耐盐基因的挖掘提供了重要信息。

**关键词:**小麦; *TaLEA1*; 表达分析; 耐盐; 功能分析

## Expression Analysis of Wheat *TaLEA1* Gene and Its Functional Analysis in *Arabidopsis*

JIANG Qi-yan<sup>1</sup>, MENG Qiang<sup>2</sup>, NIU Feng-juan<sup>1</sup>, SUN Xian-jun<sup>1</sup>, HU Zheng<sup>1</sup>, ZHANG Hui<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Institute of Crop Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081;

<sup>2</sup>College of Life Science, Shandong Normal University, Ji'nan 250014)

**Abstract:** The degree of soil salinization in China is becoming more serious in cultivated land, which poses a major threat to China's food security in future. Identifying novel salt-tolerant genes and understanding their functions in salt stress adaptation will provide us the basis for effective engineering strategies to improve crop stress tolerance. Many studies have shown that late embryogenesis abundant protein (LEA) plays a positive role in the process of plant responses to abiotic stress. In this study, we isolated *TaLEA1* gene and analyzed its expression pattern, physical and chemical properties of LEA1 protein as well as its function by overexpressing in *Arabidopsis* Heynh. The results showed that *TaLEA1* belonged to the third group LEA proteins based on amino acid sequence analysis. LEA1 was stably hydrophilic protein and rich in  $\alpha$ -helix and  $\beta$ -turn, which provided structure foundation for its response to stress. *TaLEA1* expressions were detected in wheat root, stem, leaf, flower and seed, and high salt stress could induce *TaLEA1* expression. Overexpression of *TaLEA1* confers salt and drought tolerance in *Arabidopsis thaliana* with higher seed germination rate, longer root length and higher chlorophyll content than the wild-type. The results and achievements in this study will provide the gene associated with salt tolerance with great potential for wheat improvement and the theoretically basis for deciphering the salt tolerance mechanism of the candidate gene.

**Key words:** wheat; *TaLEA1*; expression analysis; salt tolerance; functional analysis

土壤盐碱化是一个全世界都面临的问题, 严重限制世界农业生产发展, 而我国土壤盐碱化更是日

收稿日期: 2016-05-26 修回日期: 2016-06-21 网络出版日期: 2016-12-07

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20161207.1611.002.html>

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31601302); 转基因植物新材料的育种价值评估(2016ZX08010-005); 中国农业科学院科技创新工程/作物种质资源鉴定与发掘团队

第一作者主要从事抗逆种质资源鉴定评价及抗逆机理研究。E-mail: jiangqiyang@caas.cn

通信作者: 张辉, 主要从事抗逆种质资源鉴定评价及抗逆机理研究。E-mail: zhanghui06@caas.cn

趋严重<sup>[1]</sup>。盐胁迫不可逆地影响植物的生长和产量,因此挖掘耐盐基因,解析耐盐机理,培育耐盐作物对我国粮食安全具有重要意义。越来越多的研究表明,胚胎发育晚期丰富表达蛋白(LEA, late embryogenesis abundant protein)在植物应对非生物胁迫,尤其是脱水胁迫时发挥积极的作用<sup>[2-3]</sup>。根据 LEA 蛋白氨基酸序列同源性和保守序列,将 LEA 蛋白分为 6 组。第 3 组 LEA 蛋白同源序列区域包括 11 个氨基酸基元序列(TAQAAKEKAGE)构成的串联重复序列,这些基元序列能够形成  $\alpha$ -螺旋结构,为其发挥抗逆功能提供结构基础<sup>[4]</sup>。LEA 蛋白的重要理化特性,如甘氨酸的含量高,亲水指数大等<sup>[5]</sup>,使其即使在煮沸状态时,仍能够维持在水溶状态,呈现出高亲水性以及热稳定性,植物受到水分胁迫造成细胞组分晶体化,进而破坏细胞内结构有序化时,LEA 蛋白能够捕获水分到细胞内,减小细胞受损伤程度<sup>[6]</sup>。

过量表达 LEA 类基因可以提高拟南芥、水稻、小麦、烟草、柑桔、草莓、酵母和大肠杆菌等的抗寒、抗旱或耐盐能力<sup>[7]</sup>。1999 年, G. A. Swire-Clark 等<sup>[8]</sup>将小麦 LEA1 蛋白 *Em* 基因转入酵母,发现酵母在高盐(1 mol/L NaCl 或 KCl)胁迫条件下的生长曲线好于对照组。2002 年, Z. Cheng 等<sup>[9]</sup>将小麦中 LEA1 蛋白 *PMA1959* 和 *PMA80* 基因转化水稻,在干旱胁迫复水或高盐(200 mM)胁迫复水后,第二代转基因植株耐逆能力明显提高。2006 年,赵咏梅等<sup>[10]</sup>在小麦中克隆获得目的基因 *TaLEA2* 并将其转化拟南芥,结果发现,该基因能提高转基因拟南芥的抗盐性。在酵母、拟南芥和水稻中过表达 *OsLEA3-2* 基因能够提高植株对盐和渗透胁迫的耐受性,并且转基因水稻旱处理后存活率和产量明显高于野生型<sup>[11]</sup>。2014 年,陈娇等<sup>[12]</sup>首次在甘薯中克隆获得了 *Ib-LEA2* 基因,将其在大肠杆菌中过表达,发现能够提高大肠杆菌对 NaCl 的耐受性。这些研究说明 LEA 蛋白在提高植物耐盐能力中发挥重要作用。

本课题组通过蛋白质组学方法找到盐胁迫下差异表达蛋白 Q8GV49(LEA1 protein),在 NCBI 上找到其对应的完整 cds 序列, GenBank 登陆号 AY148490.1,即 *TaLEA1* 基因。*TaLEA1* 是由俞嘉宁<sup>[13]</sup>以小麦第 3 组 LEA 蛋白基因的保守序列设计引物克隆获得的新基因。研究表明,旱胁迫下小麦品种抗旱性的高低与 *TaLEA1* 基因的表达量呈正相关。高盐、低温和外源激素 ABA 也可诱导 *TaLEA1* 基因的表达。L. M. Han 等<sup>[14]</sup>将 *TaLEA1* 基因转入

丹参,转基因丹参在含 1% NaCl 和 8% PEG6000 培养基中的生长状态优于野生型,但只是对 T<sub>0</sub>转基因株系进行了表型上简单的抗逆性鉴定。这些研究表明 *TaLEA1* 基因在植物抗逆过程中可能发挥重要作用,但其功能及抗逆机理仍需进一步验证。本研究以小麦 *TaLEA1* 为研究对象,在氨基酸序列、理化性质分析及表达模式分析的基础上,在拟南芥中过表达 *TaLEA1* 基因,进一步验证 *TaLEA1* 在高盐胁迫下的生物学反应,为 LEA 基因抗逆机理的研究和耐盐基因的挖掘提供重要的信息。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料和菌种

小麦材料为济麦 19,拟南芥生态型为 Col-0 型,大肠杆菌菌株为 DH5 $\alpha$ ,农杆菌菌株为 GV3101。以上材料和菌种均保存于中国农业科学院作物科学研究所抗逆课题组。

### 1.2 *TaLEA1* 基因克隆及表达分析

根据 *TaLEA1* 基因序列设计引物 LEA1-gene(表 1),以小麦品种济麦 19 根部 RNA 反转录获得的 cDNA 为模板进行 *TaLEA1* 基因的 cds 扩增,并以小麦品种济麦 19 的 DNA 为模板进行 *TaLEA1* 基因组序列的扩增。

根据 *TaLEA1* 的 cds 序列设计引物 LEA1-RT(表 1),分析 *TaLEA1* 基因在小麦正常及 350 mM NaCl 盐胁迫处理不同时间(2 h、6 h、12 h、24 h、48 h),以及不同组织(根、茎、叶、花、种子)中的表达模式,小麦 *Tublin* 基因为内参(表 1)。

荧光定量 PCR 及半定量 PCR 分析方法参考文献[15]、[16]。采用 TRIzol 法(Invitrogen)提取 RNA, RNase-free DNase I (Fementas) 去除 DNA 污染。按说明书步骤以 SuperScript<sup>TM</sup> II RNase H-reverse transcriptase(Invitrogen)进行反转录,获得第 1 链 cDNA。以 cDNA 为模板,进行内参基因及目的基因 Real-time PCR 反应,引物如表 1。反应步骤参考 Thermo Scientific 公司 Maxima SYBR Green/R0X qPCR Master Mix 试剂盒。反应条件:50  $^{\circ}$ C 2 min, 95  $^{\circ}$ C 10 min; 95  $^{\circ}$ C 10 s, 60  $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环(PCR); 95  $^{\circ}$ C 15 s, 55  $^{\circ}$ C 15 s, 95  $^{\circ}$ C 15 s。半定量 RNA 提取及 cDNA 获得步骤同上,半定量 RT-PCR 反应条件:94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94  $^{\circ}$ C 变性 30 S, 55  $^{\circ}$ C 退火 30 S, 72  $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 35 个循环;最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。将 PCR 产物于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像分析。

表1 实验所用引物列表

Table 1 The primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列-正向引物(5'-3') Primer sequence-Forward(5'-3')	引物序列-反向引物(5'-3') Primer sequence-Reverse(5'-3')
LEA1-gene	CCAAGAAACCAAAATGCC	TCACGAAAGAGTGGAACA
LEA1-RT	AGGACCAGACCCGACGAC	GCCCATGCCACCGTGT
Tublin	GAGGCTCTGTGTGCTGCTTTGT	GCCCAGTTGTTACCCGACCAGA
UBQ3	CGGAAAGACCATTACTCTGCA	CAAGTGTGCGACCATCCTCAA
LEA1-Vec	gaagatctATGGCCTCCAACCAAGAACC	cacgtgCTAGTGATTCTGCTGGTGGTG

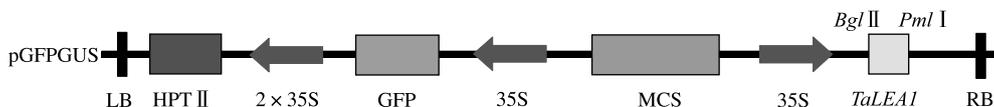
### 1.3 *TaLEA1* 基因序列分析

克隆获得的基因序列,通过 ProtParam 软件对小麦 LEA1 蛋白的氨基酸序列进行理化性质分析;利用 SOPMA 进行小麦 LEA1 蛋白质的二级结构预测;通过 EditSeq 软件,将基因序列翻译为氨基酸序列,利用 MEGA5.1 程序提供的 Jotun Hein 法将小麦 LEA1 的氨基酸序列与其他 LEA 蛋白质的氨基酸序列进行比对,进化树分析采用 MEGA5.1 提供的 N-J 法。

### 1.4 *TaLEA1* 基因植物表达载体构建

根据 *TaLEA1* 基因序列和 pGFPGUSplus 载体酶

切位点,设计引物 LEA1-Vec(序列见表1,上下游引物5'端分别增加一个 *Bgl*II 和 *Pml*I 酶切位点),从含有 *TaLEA1* 基因的质粒中扩增 *TaLEA1* 基因的 cds 序列,目的片段回收后连接至 pEASY-Blunt 克隆载体,转化大肠杆菌并提质粒,质粒经测序验证正确后经 *Bgl*II 和 *Pml*I 酶切,并连接至 pGFPGUSplus 植物表达载体中替换载体上的 *GUS* 基因,由 35S 启动表达(图1)。通过潮霉素抗性筛选,得到含有 *TaLEA1* 基因的阳性转化质粒 35S::*TaLEA1*-pGFPGUSplus,并转化拟南芥,分析 *TaLEA1* 基因功能。

图1 35S::*TaLEA1*-pGFPGUSplus 植物表达载体构建示意图Fig.1 Vector construction of 35S::*TaLEA1*-pGFPGUSplus

### 1.5 *TaLEA1* 基因转化拟南芥

将阳性转化质粒 35S::*TaLEA1*-pGFPGUSplus 转入农杆菌 GV3101,并采用浸花法转化拟南芥,成熟后收获种子。 $T_1$  种子种植在含 50 mg/L 潮霉素的 MS 固体培养基上,筛选阳性植株,提取阳性苗叶片 DNA,PCR 检测目的基因,单株收获  $T_2$  种子,并在含潮霉素的 MS 固体培养基上筛选有 3:1 性状分离的株系,移栽单株收获  $T_3$  种子,并在含潮霉素的 MS 固体培养基上筛选纯合株系,以拟南芥 *AtUBQ3* 基因作为内参,用 LEA1-RT 引物(表1)对纯合株系进行 RT-PCR 检测目的基因后,进行转基因拟南芥抗逆性分析。

### 1.6 转 *TaLEA1* 基因拟南芥抗逆性分析

转基因拟南芥耐盐性分析包括萌发率、根长的统计分析,幼苗盐胁迫处理下的表型分析,以及叶片叶绿素含量的测定。

萌发率试验:在含有 150 mmol/L NaCl 的 MS 平

板中点种野生型(WT, wild-type)和转基因拟南芥植物种子,分析种子萌发对 NaCl 的敏感性。播种后,4 °C 春化 3 d 后置于温室(22 °C)正常培养。当种子幼根已经穿出种皮即认为萌发,每天统计种子的萌发率,并依据下列公式计算相对萌发率。

$$\text{相对萌发率}(\%) = \frac{\text{盐处理萌发率}}{\text{对照萌发率}} \times 100\%$$

根长试验:转基因和 WT 种子种植在 MS 平板中萌发 5 d 后,将幼苗小心转移至含有 100 mmol/L NaCl 的新的 MS 平板中,竖直培养 7 d 后,测量幼苗的根长,并依据下列公式计算耐盐指数。

$$\text{耐盐指数} = \frac{\text{盐处理根长}}{\text{对照根长}}$$

苗期盐胁迫分析:转基因和 WT 种子在 MS 平板中萌发并生长 10 d 后移苗至营养土与蛭石(1:1)混合土中,每盆移栽 5 株,正常培养浇水 45 d 后,在

托盘底部浇灌 350 mmol/L NaCl,待土壤吸收盐溶液饱和后,去除盐溶液,盐胁迫 8 d 后观察植物表型,并测定植株叶绿素含量。

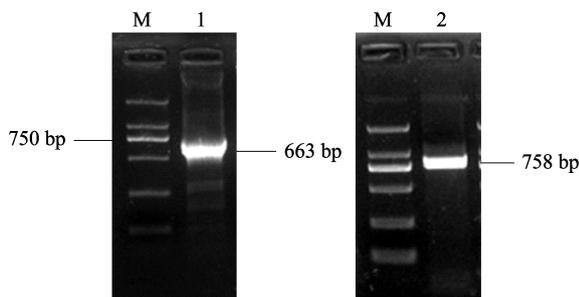
叶绿素含量的测定:采用 80% 丙酮萃取叶绿素,使用 DU800 分光光度计 (Fullerton, CA, USA) 测量 663 nm 和 645 nm 的吸光率。叶绿素含量计算公式  $Chl = (0.0802 \times A_{663} + 0.202 \times A_{645}) / W$ , 单位为 mg/g, 其中  $A_{663}$ 、 $A_{645}$  分别是叶绿素溶液在波长 663 nm 和 645 nm 处的吸光值。每个株系测定 5 个植株, W 为植株重量,独立试验重复 3 次。

苗期早胁迫分析:将野生型以及转基因拟南芥种子直接撒播在混合土(营养土:蛭石=2:1)中,培养室中正常条件培养,拟南芥幼苗长至 4 叶时,将其单株移至新的混合土(营养土:蛭石=2:1)中,正常条件培养 45 d 后(拟南芥幼苗长至莲座期)停止供水,早胁迫 15 d 后恢复供水,复水 4 d 后统计野生型及转基因拟南芥存活率,试验重复 3 次。

## 2 结果与分析

### 2.1 *TaLEA1* 基因克隆及序列分析

在小麦根中克隆得到 *TaLEA1* 的 cds 序列(图 2a)以及 DNA 序列(图 2b),序列分析发现其完整开放阅读框为 663 bp,编码由 221 个氨基酸构成的蛋白质,预测其分子量和等电点(pI)分别为 22.7 kD 和 9.02。基因组起始密码子到终止密码子间序列为 758 bp,包含 2 个外显子,大小分别为 58 bp 和 605 bp,1 个内含子,大小为 95 bp。



M:DL2000 marker;1: *TaLEA1* 的 cDNA PCR 扩增产物;

2: *TaLEA1* 的 DNA PCR 扩增产物

M:Marker DL2000,1:cDNA PCR product of *TaLEA1*,

2:DNA PCR product of *TaLEA1*

图 2 *TaLEA1* 基因的 PCR 扩增

Fig.2 Amplification of cDNA and

DNA sequence of *TaLEA1* gene by PCR

### 2.2 小麦 LEA1 蛋白的氨基酸分析

通过 ProtParam 软件对小麦 LEA1 蛋白的氨基

酸序列进行理化性质分析(表 2),其极性氨基酸(亲水氨基酸)所占比例为 71.3%,不稳定指数为 21.62,结果表明该蛋白为稳定的亲水性蛋白。经过 SOPMA 软件预测小麦 LEA1 蛋白的二级结构,发现该蛋白具有 70.45% 的  $\alpha$ -螺旋(Hh, alpha helix)、4.55% 的  $\beta$ -转角(Tt, beta turn)、1.82% 的  $\beta$ -片层(Ee, extended strand)以及 23.18% 的无规则卷曲(Cc, random coil)等结构,其中  $\alpha$ -螺旋是其主要的蛋白二级结构,具有典型的 LEA 蛋白结构域。

表 2 小麦 LEA1 的氨基酸理化性质分析

Table 2 The analysis of physical and chemical properties of amino acid of LEA1 protein

理化性质 Physical and chemical properties	分析值 Value
氨基酸数 Number of amino acids	221
理论等电点 Theoretical pI	9.0
酸性氨基酸比例(%) Proportion of acidic amino acids	13.6
碱性氨基酸比例(%) Proportion of basic amino acids	16.3
极性氨基酸比例(%) Proportion of polar amino acids	71.3
疏水性平均值 Grand average of hydropathicity	-1.108
不稳定指数 Instability index	21.62

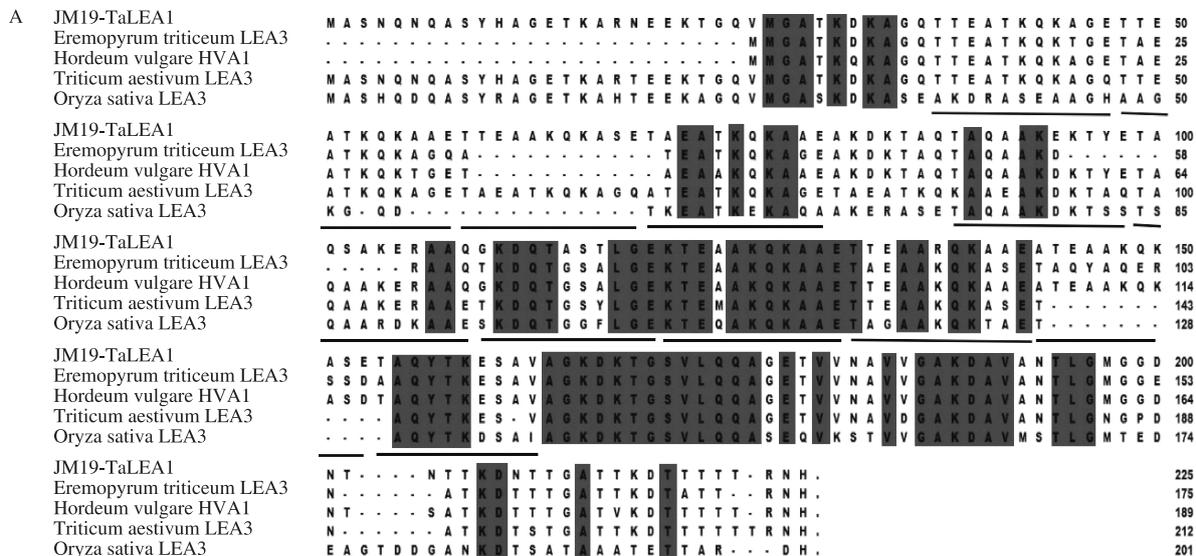
*TaLEA1* 的氨基酸序列分析(图 3),发现其具有 11 个由 11-氨基酸(TAQAAKEKAGE)构成的基元序列,这些基元序列也说明小麦 LEA1 蛋白属于第 3 组 LEA 蛋白。进化树分析发现,它与大麦的 HVA1、中国春的 LEA3、早麦草的 LEA3 和水稻的 LEA3 聚在同一分支,其中与大麦的 HVA1 同源关系最近。

### 2.3 *TaLEA1* 基因的表达模式

通过半定量及荧光定量 PCR 的方法,研究 *TaLEA1* 基因在盐胁迫下表达模式。发现盐胁迫处理 2 h、6 h、12 h、24 h、48 h 后, *TaLEA1* 基因在小麦根中的表达量均高于处理前(0 h),盐胁迫处理不同时间 *TaLEA1* 基因表达量呈先升高后下降趋势,在 12 h 时表达量最高(图 4a)。在小麦不同组织根、茎、叶、花、种子中均有表达,呈组成型表达模式(图 4b)。

### 2.4 过表达 *TaLEA1* 增强拟南芥的耐盐和抗旱能力

荧光定量及半定量 PCR 表明 *TaLEA1* 基因在野生型拟南芥中没有表达,在 3 个纯合的 T<sub>3</sub> 转基因株系中有表达(图 5a)。150 mmol/L NaCl 胁迫条件下,3 个转基因株系的相对萌发率高于野生型(图 5b),说明过表达 *TaLEA1* 基因可以提高转基因株系的相对萌发率,提高转基因植物种子萌发期的耐盐能力。为了分析过表达 *TaLEA1* 基因是否影响转基因



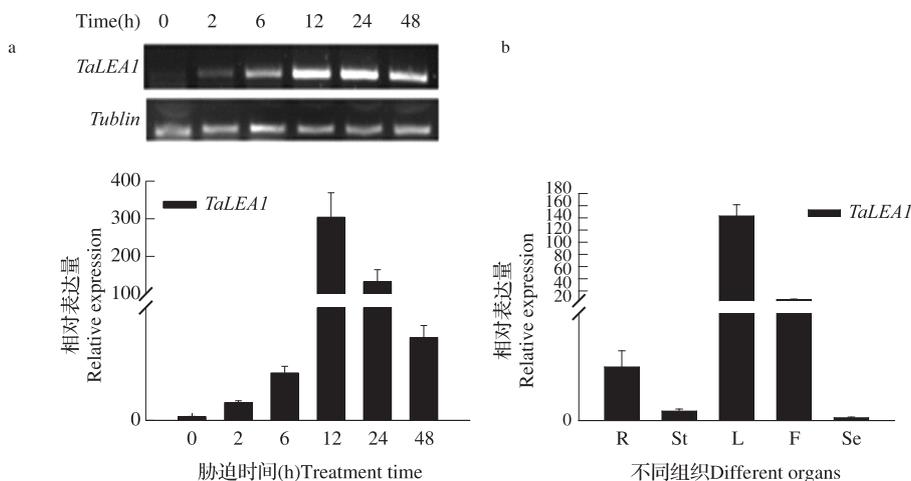
A; TaLEA1 与其他植物 LEAs 氨基酸序列比对, 下划线表示 11-氨基酸基元序列; B; TaLEA1 与其他植物 LEAs 进化树分析

A; Sequence alignment of TaLEA1 with other LEAs, the underline shows 11-amino-acid repeating motif,

B; Phylogenetic tree of TaLEA1 and other plant LEAs

图3 TaLEA1 与 LEA 家族氨基酸序列及进化树分析

Fig. 3 Sequence alignment and phylogenetic tree of TaLEA1 and other plant LEAs



a; 半定量及荧光定量 PCR 分析小麦根中 TaLEA1 基因在正常和 2% 盐胁迫 2 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h 后表达量;

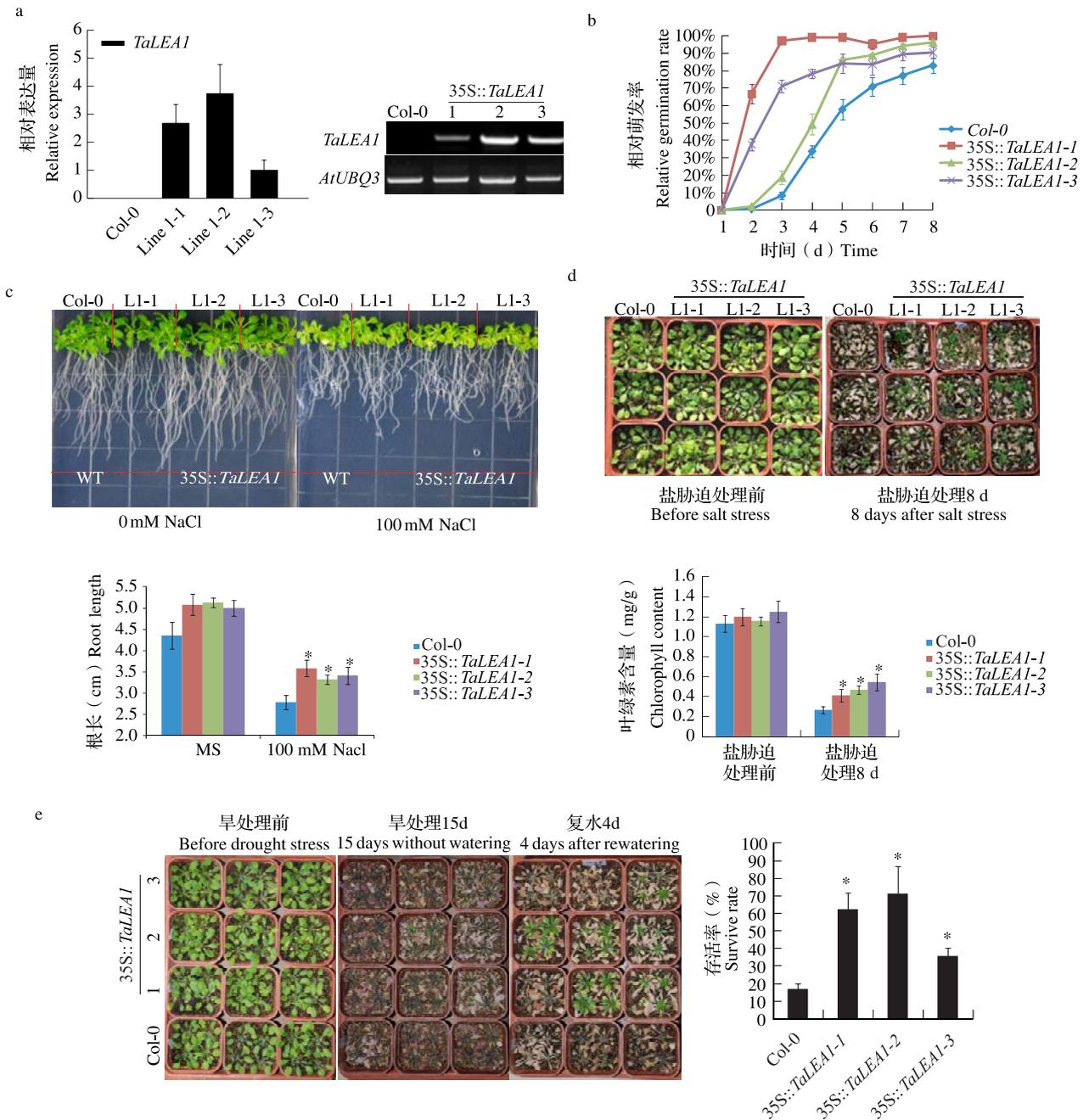
b; 荧光定量 PCR 检测 TaLEA1 基因在小麦根 (R)、茎 (St)、叶 (L)、花 (F)、种子 (Se) 中表达量

a; Expression analysis of TaLEA1 under control and 2 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h of 2% NaCl stress in root of wheat by RT-PCR and qRT-PCR,

b; Expression analysis of TaLEA1 in root, stem, leaf, flower and seed of wheat by qRT-PCR

图4 TaLEA1 基因表达分析

Fig. 4 The expression analysis of TaLEA1 gene



a: 荧光定量(左)及半定量(右)检测 35S::*TaLEA1* 中 *TaLEA1* 基因的表达;

b: 野生型及转基因株系相对发芽率;c: 野生型及转基因株系根系表型(上)及根长比较(下);

d: 正常及盐胁迫条件下转基因株系及野生型表型(上)及叶绿素含量测定(下);

e: 正常及早胁迫条件下野生型及转基因株系表型(左)及复水后幼苗存活率(右)

a: Detection of *TaLEA1* mRNA in 35S::*TaLEA1* using real-time PCR (left) and semi-quantitative RT-PCR (right),

b: Relative germination rate of wild type and 35S::*TaLEA1*, c: The phenotype (up) and root length (down) of wild-type and 35S::*TaLEA1*

under normal and salt condition, d: The phenotype (up) and chlorophyll content (down) of wild-type and 35S::*TaLEA1* under normal

and salt condition, e: The phenotype (left) and survive rate (right) of wild-type and 35S::*TaLEA1* under normal and drought condition

图5 过表达 *TaLEA1* 基因提高转基因拟南芥耐盐和抗旱能力

Fig. 5 Overexpression of *TaLEA1* in *Arabidopsis Heynh. confer salt and drought tolerance of transgenic plants*

因拟南芥幼苗根生长对盐胁迫的敏感性,将转基因和野生型拟南芥生长 5 d 的幼苗转移至 MS 平板和包含 100 mmol/L NaCl 的 MS 平板上,以不含 NaCl 的 MS 培养基为对照,7 d 后测量根长,采用耐盐指数评价耐盐性,消除正常条件下野生型和转基因植物根长存在的差异。3 个转基因株系由根长计算获得的耐盐指数分别为 0.70、0.65、0.68,野生型对照耐盐指数为 0.64,转基因植株的苗期耐盐性高于野生型。生长 45 d 的拟南芥,350 mmol/L NaCl 胁迫处理 8 d 后发现和转基因拟南芥相比,野生型失绿严重(图 5d)。3 个转基因株系的叶绿素含量分别为 0.41、0.47、0.54,野生型对照叶绿素含量为 0.27(图 5d),说明转 *TaLEA1* 基因植株苗期的耐盐性高于野生型。

同样,将野生型和转基因拟南芥在土壤中正常条件下培养 45 d 后停止供水,15 d 后复水,复水 4 d 后,大部分野生型拟南芥不能恢复且最终死亡,仅有 16% 存活率,转基因拟南芥叶片重新伸展,复绿,存活率高,35S::*TaLEA1* 转基因株系复水后存活率为 66%、73%、33%(图 5e),说明过表达 *TaLEA1* 基因可以提高转基因株系的抗旱能力。

### 3 讨论

*TaLEA1* 的氨基酸序列分析发现其具有 11 个 11-氨基酸基元序列,符合第 3 组 LEA 蛋白的氨基酸序列特点,同时 *TaLEA1* 与大麦的 *HVA1* 同源关系最近,大麦的 *HVA1* 即属于第 3 组 LEA 蛋白<sup>[17]</sup>。理化性质分析发现 *TaLEA1* 为稳定的亲水蛋白,并具有 11 个 11-氨基酸基元序列,70.45% 的  $\alpha$ -螺旋、4.55% 的  $\beta$ -转角,这些结构特点对其发挥抗逆功能具有非常重要的作用<sup>[4]</sup>。盐胁迫下 *TaLEA1* 表达量提高,且在植物不同组织中均有表达,说明 *TaLEA1* 基因可能在植物应答高盐胁迫过程中发挥重要作用。过表达 *TaLEA1* 基因显著提高了转基因拟南芥的耐盐性,主要体现在一方面提高了转基因拟南芥种子萌发率。盐胁迫会导致外界溶液的渗透势快速上升,从而引发种子吸水的速度减慢和吸水量的降低,细胞内自由水的含量降低,进一步降低代谢速率,种子萌发受抑制<sup>[18]</sup>。而 *TaLEA1* 基因在拟南芥中过表达显著提高了转基因拟南芥的萌发率,缓解了盐胁迫对植物的伤害。这可能与 LEA1 蛋白的高亲水性及 *TaLEA1* 的氨基酸序列 11 个基元序列(TAQAAKEKAGE)形成兼性  $\alpha$ -螺旋结构有关,它能够避免盐胁迫导致的细胞内的高浓度的离子积累所

引起的损伤,减弱细胞组织内的过度失水<sup>[19]</sup>。另一方面,*TaLEA1* 基因能够促进盐胁迫下植株根系生长。同样,在水稻中,ABA 胁迫下,LEA 蛋白家族的 *HVA1* 过量表达,明显促进水稻初生根和侧生根扩展,提高转基因水稻耐盐性<sup>[17]</sup>。另外,高盐胁迫下,*HVA1* 的同源基因 *LEA3* 在稻秧根中高表达,减缓高盐胁迫对水稻根的伤害<sup>[20]</sup>。*TaLEA1* 基因可能通过促进植物根系生长,提高植物营养物质的吸收,并提高细胞质膜的抗氧化的能力,减轻质膜损伤,提高幼苗的  $\text{Na}^+$  和  $\text{K}^+$  吸收能力,促进离子均衡,从而提高植物耐盐能力。

*TaLEA1* 基因过表达显著提高了转基因拟南芥苗期的耐盐、抗旱能力,验证了 *TaLEA1* 基因在植物抵御逆境过程中的抗逆功能。很多研究者也通过转基因的方式提高了转基因株系的抗逆性,验证了其他 LEA 基因的抗逆功能。D. Xu 等<sup>[21]</sup> 将大麦的 LEA 基因 *HVA1* 导入水稻后,发现转基因水稻植株的抗旱和耐盐能力大大提高,该基因的抗旱、耐盐功能在烟草<sup>[22]</sup> 和桑树<sup>[23]</sup> 中也得到了实验证实;张妍等<sup>[24]</sup> 将大麦 *LEA3* 基因转入水稻也获得了抗旱、耐盐的转基因水稻植株。L. Wang 等<sup>[25]</sup> 将小麦的 *TaLEA3* 基因转入了多年生的草本植物后,发现转基因植株在干旱环境下的叶片含水量、平均生长速度等均明显高于对照;Z. Cheng 等<sup>[9]</sup> 将小麦的第 1 组 LEA 基因 *PMA1959* 和第 2 组 LEA 基因 *PMA80* 导入水稻后,也获得了抗旱、耐盐能力显著增强的转基因水稻材料。另外,将来自怪柳和大豆的 LEA 基因导入烟草后,转基因植株也获得了较好的抗旱和耐盐碱能力<sup>[26-27]</sup>。关于 *TaLEA1* 基因,L. M. Han 等<sup>[14]</sup> 将其转入丹参,转基因丹参在含 1% NaCl 和 8% PEG6000 培养基中的生长状态优于野生型,但因为只是对  $T_0$  转基因株系进行了表型上简单的抗逆性鉴定,因此只是初步阐明 *TaLEA1* 基因可能在植物耐盐和抗旱过程中发挥作用,本研究系统研究了过表达 *TaLEA1* 对纯合转基因拟南芥的影响,验证了 *TaLEA1* 基因的抗逆功能,为 LEA 基因抗逆机理的研究和耐盐基因的挖掘提供重要的信息。

在拟南芥基因组中,已发现 51 个编码 LEA 蛋白的基因<sup>[28]</sup>。通过实时定量检测这 51 个 LEA 基因在拟南芥不同组织中的表达特性,正常条件下中 22 个 LEA 基因呈组成型表达;在干旱、冷和盐胁迫条件下,其中 12 个 LEA 基因可被强烈诱导表达(上调倍数 3 倍以上)。在激素处理条件下,许多 LEA 基因的表达只受 ABA 的诱导,而对 GA3 却不敏感;而

有些 *LEA* 基因的表达既不受非生物胁迫诱导也不受 ABA 的诱导。转入的小麦 *TaLEA1* 基因是否会对拟南芥自身存在的 *LEA* 基因产生影响,或者拟南芥自身存在的 *LEA* 基因是否会促进或抑制外源 *TaLEA1* 基因抗逆功能的发挥并不清楚,因此小麦 *TaLEA1* 基因抗逆功能还需要转入其他作物进一步验证,为其在作物抗逆育种中的应用提供理论基础。

#### 参考文献

- [1] 姜国良,刘云. 盐碱土壤修复材料对作物生长影响研究[J]. 青岛海洋大学学报,2003,33(4):547-550
- [2] Dure III L, Crouch M. Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants [J]. Plant Mol Biol 1989,12(5):475-486
- [3] Tunnacliffe A, Wise M J. The continuing conundrum of the LEA proteins [J]. Sci Nat,2007,94(10):791-812
- [4] 孙海丹. LEA 蛋白质 11-氨基酸基序与植物抗旱性[J]. 东北师范大学学报,2004,36(3):85-90
- [5] Garay-Arroyo A, Colmenero-Flores J M. Highly hydrophilic proteins in prokaryotes and eukaryotes are common during conditions of water deficit [J]. J Biol Chem,2000,275(8):5668-5674
- [6] Kalembe E M, Pukacka S. Possible roles of LEA proteins and sHSPs in seed protection; a short review [J]. Biol Lett,2007,44(1):3-16
- [7] Manfre A J, Lanni L M, Marcotte W R. The *Arabidopsis* group 1 LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT protein ATEM6 is required for normal seed development [J]. Plant Physiol,2006,140(1):140-149
- [8] Swire-Clark G A, Marcotte Jr W R. The wheat LEA protein Em functions as an osmoprotective molecule in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Plant Mol Biol,1999,39(1):117-128
- [9] Cheng Z, Targolli J. Wheat LEA genes, *PMA80* and *PMA1959*, enhance dehydration tolerance of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Mol Breeding,2002,10(1-2):71-82
- [10] 赵咏梅,杨建雄. 小麦耐逆基因 *TaLEA2*: 转化拟南芥的研究 [J]. 西北植物学报,2006,26(1):1-6
- [11] Duan J, Cai W. *OsLEA3-2*, an abiotic stress induced gene of rice plays a key role in salt and drought tolerance [J]. PLoS One, 2012,7(9):e45117
- [12] 陈娇,姜玉松,张义正,等. 甘薯 LEA2 基因的克隆与表达分析 [J]. 应用与环境生物学报,2014(2):204-210
- [13] 俞嘉宁. 小麦耐旱、耐盐相关基因的克隆、分析与功能研究 [D]. 杨陵:西北农林科技大学,2003
- [14] Han L M, Yu J N, Ju W F. Salt and drought tolerance of transgenic *Salvia miltiorrhiza* Bunge with the *TaLEA1* gene [J]. J Plant Physiol Mol Biol,2007,33(2):109-114
- [15] 郭婷,王茅雁,董博,等. 蒙古沙冬青 *AmDREB2C* 基因的克隆及表达分析 [J]. 植物遗传资源学报,2015,16(2):108-114
- [16] 陈雅琼,孙亭亭,陈蕾,等. 烟草 *BRANCHED1-Like* 基因的克隆及表达分析 [J]. 植物遗传资源学报,2015,16(6):1321-1329
- [17] Chen Y S, Lo S F. A late embryogenesis abundant protein *HVA1* regulated by an inducible promoter enhances root growth and abiotic stress tolerance in rice without yield penalty [J]. Plant Biotechnol J,2015,13(1):105-116
- [18] 刘杰,张美丽. 人工模拟盐、碱环境对向日葵种子萌发及幼苗生长的影响 [J]. 作物学报,2008,34(10):1818-1825
- [19] Battaglia M, Olvera-Carrillo Y. The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins [J]. Plant Physiol,2008,148(1):6-24
- [20] Moons A, De Keyser A. A group 3 LEA cDNA of rice, responsive to abscisic acid, but not to jasmonic acid, shows variety-specific differences in salt stress response [J]. Gene, 1997, 191(2):197-204
- [21] Xu D, Duan X, Wang B, et al. Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, *HVA1*, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice [J]. Plant Physiol, 1996,110(1):249-257
- [22] 李楠,赵琦,黄静,等. 六棱大麦 *hva1* 基因在烟草中遗传转化的研究 [J]. 生物技术通报,2007(3):139-144
- [23] Lal S, Gulyani V, Khurana P. Overexpression of *HVA1* gene from barley generates tolerance to salinity and water stress in transgenic mulberry (*Morus indica*) [J]. Transgenic Res, 2008, 17(4):651-663
- [24] 张妍,王瑛,梁玉玲,等. 转 *LEA-3* 基因水稻的抗性分析 [J]. 河北农业大学学报,2005(5):33-36
- [25] Wang L, Li X, Chen S, et al. Enhanced drought tolerance in transgenic *Leymus chinensis* plants with constitutively expressed wheat *TaLEA3* [J]. Biotechnol Lett,2009,31(2):313-319
- [26] 刘甜甜,于影,赵鑫,等. 转 *LEA* 基因烟草的  $\text{NaHCO}_3$  抗性分析 [J]. 分子植物育种,2006,4(2):216-222
- [27] 蔡丹,郑易之,兰英. 大豆 LEA 蛋白 Em 的表达可提高大肠杆菌和烟草耐盐性 [J]. 深圳大学学报,2006,23(3):230-236
- [28] Hundertmark M, Hincha D K. LEA (Late Embryogenesis Abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana* [J]. BMC Genomics,2008,9(9):1-22