

花生维生素 C 合成相关基因 *AhPMM* 及其抗逆作用的验证

林顺钰¹, 张恒¹, 马涛¹, 于凯悦¹, 王亚¹, 赵春梅², 朱虹¹, 王晶珊¹, 乔利仙¹, 隋炯明^{1*}

1 青岛农业大学农学院 山东省花生产业协同创新中心 山东省旱作重点实验室, 山东 青岛 266109

2 青岛农业大学生命科学学院, 山东 青岛 266109

林顺钰, 张恒, 马涛, 于凯悦, 王亚, 赵春梅, 朱虹, 王晶珊, 乔利仙, 隋炯明. 花生维生素 C 合成相关基因 *AhPMM* 及其抗逆作用的验证[J]. 生物工程学报, 2024, 40(4): 1089-1101.

LIN Shunyu, ZHANG Heng, MA Tao, YU Kaiyue, WANG Ya, ZHAO Chunmei, ZHU Hong, WANG Jingshan, QIAO Lixian, SUI Jiongming. Verification of the peanut vitamin C synthesis-related gene *AhPMM* and its role in stress resistance[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(4): 1089-1101.

摘要: 维生素 C 在植物抗氧化作用、光合作用、生长发育和代谢过程中发挥重要作用。本研究从花生中克隆了维生素 C 合成相关基因 *AhPMM*, 该基因对低温、氯化钠(NaCl)、聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)和脱落酸(abscisic acid, ABA)等处理均有明显的响应。构建了 *AhPMM* 过表达载体, 并利用花粉管注射法转入花生品种莒南小红种, 对 T₃ 代拟转基因花生植株进行 PCR 检验, 结果显示转基因阳性率为 42.3%。利用 HPLC 测定转基因植株叶片还原性维生素 C (reducing vitamin C, AsA)和总维生素 C 含量, 结果表明部分株系还原性维生素 C 含量显著增加, 最高可比对照增加 1.90 倍; 总维生素 C 含量最高可比对照增加 1.63 倍。对转基因种子进行了氯化钠和脱落酸耐性试验, 结果表明与未转基因对照相比, 转基因种子对氯化钠耐性明显增强, 对脱落酸敏感性减弱; 转基因植株比未转基因对照的耐盐性明显增强。上述结果表明 *AhPMM* 基因既可提高花生维生素 C 含量, 又可增加转基因花生种子和植株的耐盐性。本研究可为花生耐盐分子育种提供基因源。

关键词: 花生; *PMM* 基因; 维生素 C (抗坏血酸); 耐盐

资助项目: 国家自然科学基金(31872875); 中央引导地方科技发展专项(22-1-3-1-zyyd-nsh); 山东省自然科学基金(ZR2020QC120)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31872875), the Central Government Guides Local Science and Technology Development Special Projects, China (22-1-3-1-zyyd-nsh), and the Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2020QC120).

*Corresponding author. E-mail: suijiongming@163.com

Received: 2023-06-12; Accepted: 2023-09-13

Verification of the peanut vitamin C synthesis-related gene *AhPMM* and its role in stress resistance

LIN Shunyu¹, ZHANG Heng¹, MA Tao¹, YU Kaiyue¹, WANG Ya¹, ZHAO Chunmei², ZHU Hong¹, WANG Jingshan¹, QIAO Lixian¹, SUI Jiongming^{1*}

1 Dry-land Farming Technology Laboratory of Shandong Province, Peanut Industry Collaborative Innovation Center of Shandong Province, College of Agronomy, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, Shandong, China

2 College of Life Sciences, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, Shandong, China

Abstract: Vitamin C plays an important role in plant antioxidation, photosynthesis, growth and development, and metabolism. In this study, a gene *AhPMM*, which is involved in vitamin C synthesis and responds significantly to low temperature, NaCl, polyethylene glycol (PEG) and abscisic acid (ABA) treatments, was cloned from peanut. An *AhPMM* overexpression vector was constructed, and transferred to a peanut variety Junanxiaohong using the pollen tube injection method. PCR test on the T₃ generation transgenic peanut plants showed a transgenics positive rate of 42.3%. HPLC was used to determine the content of reducing vitamin C (AsA) and total vitamin C in the leaves of transgenic plants. The results showed that the content of AsA in some lines increased significantly, up to 1.90 times higher than that of the control, and the total vitamin content increased by up to 1.63 times compared to that of the control. NaCl and ABA tolerance tests were carried out on transgenic seeds. The results showed that the salt tolerance of transgenic seeds was significantly enhanced and the sensitivity to ABA was weakened compared to that of the non-transgenic control. Moreover, the salt tolerance of the transgenic plants was also significantly enhanced compared to that of the non-transgenic control. The above results showed that *AhPMM* gene not only increased the vitamin C content of peanut, but also increased the salt tolerance of transgenic peanut seeds and plants. This study may provide a genetic source for the molecular breeding of peanut for enhanced salt tolerance.

Keywords: peanut; *PMM* gene; vitamin C (ascorbic acid, AsA); salt resistance

花生(*Arachis hypogaea* L.)是重要的油料和经济类作物。我国有盐碱地面积近 15 亿 hm², 其中可开发利用达 5 亿 hm², 科学合理地开发利用这些盐碱地, 对拓展后备耕地资源意义重大^[1]。盐害是农业生产上重要的逆境危害, 农作物长期遭受盐害会引起植株生长缓慢甚至死亡, 导致产量和品质严重下降。同时, 随着全球气温升高, 盐碱等自然灾害越来越严重, 盐害可能将长期威胁着我国农作物生产及安全。

研究表明, 现有农作物品种在长期遭受盐害后会比正常情况下减产 30%以上, 但由于植物耐盐等性状是受多基因控制的复杂的数量性状, 易受环境影响, 而常规育种技术效率低、周期长, 短期内难以选育耐盐高产品种。因此挖掘并克隆耐盐相关基因, 建立耐盐分子标记辅助育种技术, 培育耐盐新品种是有效利用盐渍化土壤的重要途径^[2]。

花生是比较耐瘠薄、耐低度盐碱的作物, 但

是随着土壤盐分的增加会影响花生的产量和品质。因此加强花生耐盐合成相关基因的研究,挖掘相关基因,创制耐盐新材料,进而培育耐盐新品种,有望充分利用我国广阔的盐渍地,而又不与粮食争地。维生素 C (vitamin C, VC), 分为 L 型和 D 型两种,对生物体的代谢活动发挥着重要作用。植物体产生的维生素 C,不仅可以为人类所用,对生物体抵御氧化作用,进行正常的光合作用及生长代谢等生理功能也具有重要作用。Conklin 等^[3]通过向水稻外源添加抗坏血酸或谷胱甘肽(glutathione, GSH)来刺激还原性维生素 C (reducing vitamin C, AsA)-GSH 循环,缓解 H₂O₂ 毒害。VC 水平与植株抵御逆境胁迫能力成正比,在体内 VC 水平提高时,其代谢酶活力增强,更好地清除胁迫产生的活性氧,使得维生素 C 在植株提高抵御盐碱等各种逆境能力的机制中起到了显著影响。刘晓莹等^[4]发现不同物种间的维生素 C 含量的合成规律存在差异,植物的维生素 C 合成代谢受多类基因调控。如: Conklin 等^[5]在拟南芥 *vtc1* 突变体中转入 *VTC1* 基因,使其维生素 C 含量水平得到恢复。Laing 等^[6]将猕猴桃的 *GGP* 基因导入烟草中,使其瞬时超表达,结果 *GGP* 酶活性增加约 50 倍,维生素 C 水平增加约 3 倍。Liu 等^[7]发现在猕猴桃中过表达 *GGP3* 转基因株系的叶片 AsA 含量比野生型高 2.0–6.4 倍,并且研究发现过表达 *MYBS1* 有效地增加了 AsA 的积累^[8]。

磷酸甘露糖变位酶(mannose mutase phosphate, PMM)是很多物种的 AsA 生物合成过程中一个关键酶,其催化 6-P-甘露糖向 1-P-甘露糖的转化。本研究利用花生基因组筛选出维生素 C 合成相关候选基因 *AhPMM*, 在花生中进行过量表达,证实了 *AhPMM* 基因可提高转基因花生的维生素 C 含量和抗逆性,可为花生抗逆育种提供基因源。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

本试验所用花生品种莒南小红种,由青岛农业大学花生分子育种实验室保存。

1.2 菌株、载体和试剂

pROKII 载体由花生分子育种实验室提供。克隆载体 pMD18-T Simple Vector、RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒、qRT-PCR 试剂盒、限制性内切酶(*Kpn* I, *Sac* I)、DNA 连接酶、大肠杆菌 DH5 α 和农杆菌 EHA105 等购自 TaKaRa 公司。PCR 引物合成以及基因测序均由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

1.3 花生植株的胁迫处理及 RNA 提取

选取成熟饱满的莒南小红种种子催芽,待花生幼苗生长 6 周时,分别对幼苗进行以下 4 种胁迫处理:将花生放到 4 °C 培养箱中,0、12、24 和 48 h 时取叶片液氮保存;用 20% PEG 处理花生,0、3、6、9、24、48 和 72 h 时取叶片液氮保存;用 300 mmol/L NaCl 处理花生,0、6、12、24 和 48 h 时取叶片液氮保存;用 100 μ mol/L ABA 处理花生,0、6、12、24、48 和 72 h 时取叶片液氮保存,每个处理包括 3 个重复。叶片研磨成粉末,用 TRIzol 试剂盒提取 RNA,抽提后的总 RNA 用 DNase I 处理,并进行纯化。用反转录试剂盒按给定方法将各材料的 RNA 分别合成 cDNA。

1.4 花生 *AhPMM* 基因的筛选和克隆

在花生野生种基因组数据库 <http://www.peanutbase.org/> 网站筛选出 *AhPMM* 基因,并获得其全长编码序列。根据其序列设计特异引物(*AhPMM* 上游引物: 5'-AAATGGCTGCCCCG GAAACCTGG-3'; *AhPMM* 下游引物: 5'-TGGTGGTTCTCAA TGGAAACATTGCT-3')。

以莒南小红种的 cDNA 为模板进行 PCR 扩

增。PCR反应体系为:cDNA模板2 μL 、10 $\mu\text{mol/L}$ 上下游引物各1 μL 、2.5 mmol/L dNTP Mixture 2 μL 、5 U/ μL *Taq* DNA聚合酶0.25 μL 和10 \times PCR buffer 2.5 μL ,加灭菌双蒸水至总体积为25 μL 。PCR扩增程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 59 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 42 s, 39个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。反应产物用1.0%琼脂糖凝胶电泳检测。将扩增产物胶回收,连接pMD18-T Simple Vector转化到大肠杆菌并测序。

1.5 不同处理下 *AhPMM* 基因的表达分析

根据 *AhPMM* 基因序列设计一对特异性引物(表1),以花生 *AhActin* 为内参基因。qRT-PCR反应体系为:cDNA模板2 μL ,上下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各0.5 μL ,SYBR Green qPCR Master Mix 10 μL ,加灭菌双蒸水至总体积20 μL 。扩增程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 40个循环; 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 1 s。

1.6 *AhPMM* 基因的过表达载体构建及花生的遗传转化

在 *AhPMM* 基因上游引物的5'端引入 *Kpn* I酶切位点,下游引物的5'端引入 *Sac* I酶切位点,用于植物表达载体的构建。将约1 μg 重组质粒转到农杆菌感受态细胞EHA105,28 $^{\circ}\text{C}$ 培养。菌液接种到含卡那霉素和利福平的YEB中扩大培养至 $OD_{600}=0.6-0.8$,菌液离心后,加入新鲜

的YEB培养基重新悬浮。在花生盛花期进行花粉管注射,具体参考范乾程等^[9]的方法。

1.7 转基因植株的分子鉴定

培养3周后取拟转基因植株的叶片,提取DNA及RNA用反转录试剂盒按说明书方法将各材料的RNA分别合成cDNA,根据过表达载体上CaMV 35S启动子,设计PCR检测用引物(P1: 5'-GCTCCTACAAATGCCATCA-3'; P2: 5'-GATAGTGGGATTGTGCGTCA-3')。

PCR反应体系为:DNA模板100 ng、10 $\mu\text{mol/L}$ 上下游引物各1 μL 、2.5 mmol/L dNTP Mixture 2 μL 、5 U/ μL *Taq* DNA聚合酶0.25 μL 和10 \times PCR buffer 2.5 μL ,加灭菌双蒸水至总体积为25 μL 。PCR扩增程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 59 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 42 s, 39个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。反应产物用1.0%琼脂糖凝胶电泳检测。

同时利用特异性引物(表1),以花生 *AhActin* 为内参基因进行转基因花生中 *AhPMM* 基因表达量分析,qRT-PCR反应体系为:cDNA模板2 μL ,上下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各0.5 μL ,SYBR Green qPCR Master Mix 10 μL ,加灭菌双蒸水至总体积20 μL 。扩增程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 40个循环; 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 1 s。

1.8 转基因花生维生素C含量的测定

1.8.1 样品处理

AsA分析:取未转基因对照和转基因植株成熟叶片0.5 g,在液氮下研磨,加0.1%草酸适量,转移至棕色容量瓶中,避光浸泡1 h,间或混匀,超声处理25 min,冷却后定容至10 mL。12 000 r/min离心10 min,过0.22 μm 滤膜,进样分析。

AsA+DHA(总维生素C)分析:取上述离心后上清液1 mL,分别加入25 μL DTT(25 mmol/L)和25 μL K_2HPO_4 (160 mmol/L),避光15 min将

表1 PCR扩增引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Prime sequence (5'→3')
<i>AhPMM</i> -F	AAATGGCTGCCCGGAAACCTGG
<i>AhPMM</i> -R	TGGTGGTTCTCAATGGAAACATTGCT
<i>AhActin</i> -F	GTGGCCGTACAACCTGGTATYGT
<i>AhActin</i> -R	ATGGATGGCTGGAAGAGAACT

DHA 完全还原成 AsA, 12 000 r/min 离心 15 min, 过 0.22 μm 滤膜, 进样分析。

1.8.2 HPLC 条件

采用 Agilent 生产的 1100 型色谱仪, 流动相为甲醇:0.1%草酸=5:95 (体积比); 波长: 245 nm; 样品进样量: 20 μL ; 柱温: 25 $^{\circ}\text{C}$; 速度: 1.0 mL/min。

0.1%草酸作溶剂, 分别配制 10、30、50、70 和 90 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 VC 标准溶液, 进样前用 0.22 μm 滤膜过滤, 取 1 mL 上机分析, 根据仪器输出数据在 Excel 中绘制标准曲线。

1.9 转基因花生种子的 NaCl 和 ABA 耐受性检测

1.9.1 转基因花生种子的 NaCl 耐受性检测

选取莒南小红种(对照)和经 PCR 检测的 T_3 代转基因花生种子, 加 1% NaCl 浸泡 4 h, 倒掉多余 NaCl 溶液至适量, 黑暗条件下进行培养, 每天重新更换一次 1% NaCl 溶液, 5 d 后拍照并记录。统计标准参照胡晓辉等^[10]的方法。

1.9.2 转基因花生种子的 ABA 敏感性检测

选取莒南小红种(对照)和 T_3 代转基因花生种子, 加入 100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ ABA 溶液, 每天重新更换 ABA 溶液, 处理 1 周后统计发芽率。

1.10 转基因花生植株的抗逆分析

培养 4 周的 T_3 代转基因花生植株及莒南小红种对照植株, 浇灌 300 mmol/L 的 NaCl 溶液, 连续处理 2 周后进行耐盐性分析。

2 结果与分析

2.1 花生 *AhPMM* 基因的扩增

提取叶片 DNA 和 cDNA, 经 PCR 扩增和 qRT-PCR 扩增, 分别得到约 3 000 bp (图 1A) 和约 750 bp 的清晰条带(图 1B)。目的片段经过胶回收和酶切连接到 pMD18-T Simple Vector, 构建重组载体 pMD18-T-*AhPMM*。

经测序分析后发现, *AhPMM* 基因 DNA 序列为 3 280 bp, 有 10 个内含子; cDNA 长 744 bp, 编码 247 个氨基酸残基(图 2A)。将花生与苜蓿、番茄、烟草、毛果杨和水稻等 *PMM* 基因的氨基酸序列进行比对分析(图 2B), 发现花生与其他物种的同源性为 81.7%–92.3%, 其中与大豆的同源性最高, 达 92.3%。由此可见 *PMM* 保守性较高, 亲缘关系与豆科作物大豆较近, 在系统进化树上属同一分支(图 2C)。

2.2 不同处理下 *AhPMM* 基因的表达分析

由图 3 可以看出, *AhPMM* 基因表达量在盐胁迫处理 6 h 略有下降, 为对照的 82%, 之后逐渐上升, 24 h 时达到最高, 随后迅速降低。*AhPMM* 相对表达量在模拟干旱(20% PEG 处理)条件下, 处理 9 h 达到最高, 为处理前 1.85 倍, 然后先降低再升高, 处理 48 h 达到最低。在施加 ABA 后, *AhPMM* 基因的表达逐渐升高, 到 24 h 达到最高, 为处理前 2.33 倍, 72 h 最低, 为对照的 24%。4 $^{\circ}\text{C}$ 低温下, *AhPMM* 基因表达先降低再迅速提高, 48 h 时达到最高, 为处理前 7.06 倍。

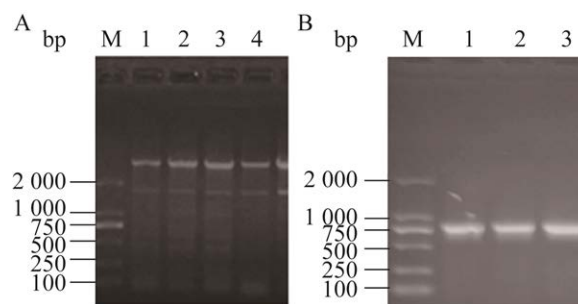


图 1 *AhPMM* 基因的 PCR 和 qRT-PCR 扩增结果
A: PCR 扩增结果. B: qRT-PCR 扩增结果

Figure 1 PCR and qRT-PCR amplification of *AhPMM* gene. A: PCR amplification. M: DL2000 DNA Marker; 1–4: PCR amplification of *AhPMM* gene. B: qRT-PCR amplification. M: DL2000 DNA Marker; 1–3: qRT-PCR amplification of *AhPMM* gene.

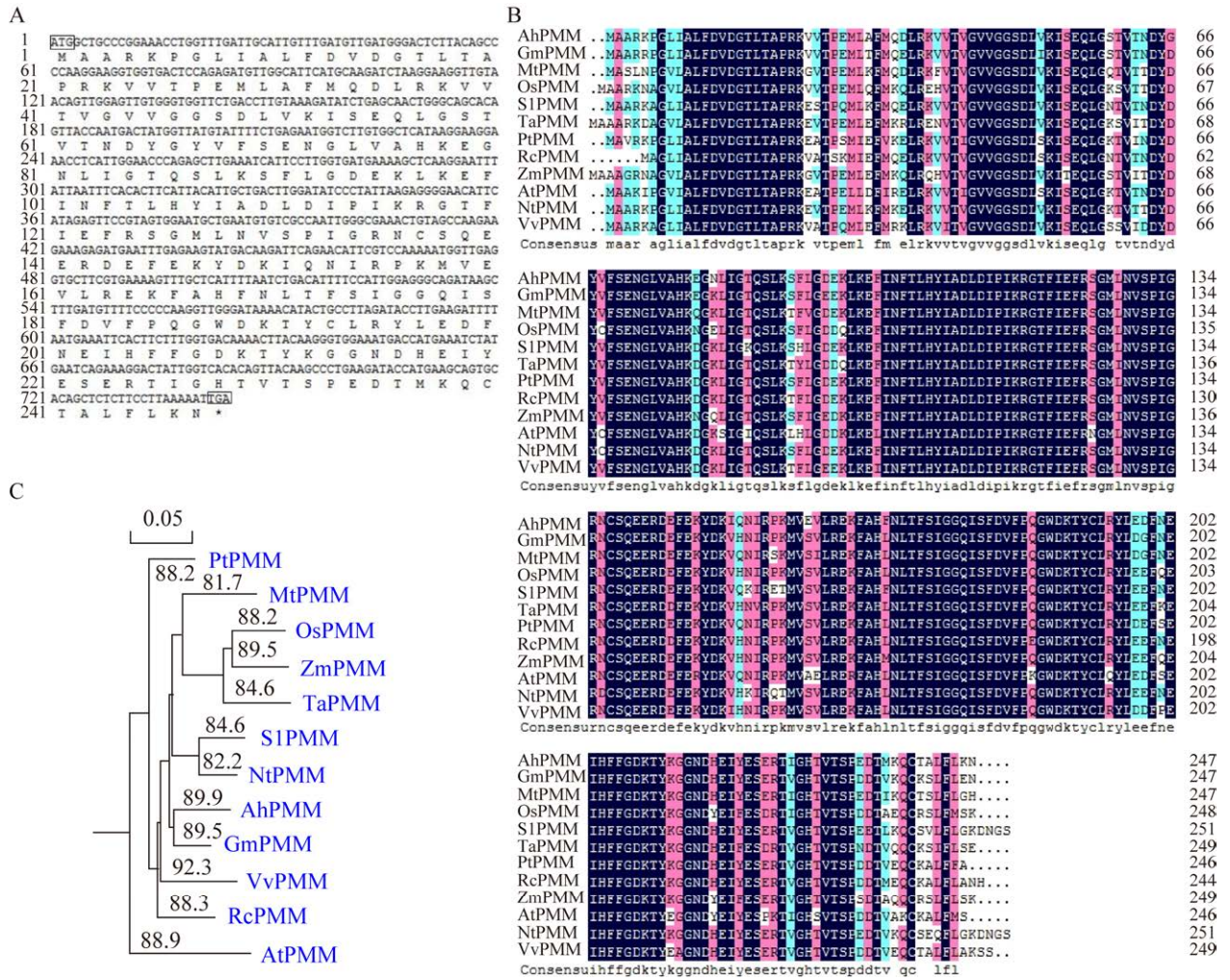


图2 花生 *AhPMM* 基因 cDNA 及氨基酸序列、同源比对和进化树分析 A: cDNA 及氨基酸序列. B: 同源比对. C: 进化树分析

Figure 2 cDNA and amino acid sequences of *AhPMM*, homologous alignment, and phylogenetic tree analysis. A: cDNA and amino acid sequences. B: Homologous alignment. C: Phylogenetic tree analysis.

2.3 *AhPMM* 过表达载体的构建和转基因花生植株的 PCR 鉴定及相对表达量分析

将 pMD18-*AhPMM* 进行双酶切(*Kpn* I 和 *Sac* I), 将目标片段 *AhPMM* 连接到植物表达载体 pROKII 中, 并进行 PCR、酶切(图 4)及测序鉴定, 构建成功的该重组载体命名为 pROKII-*AhPMM*。

用携带重组质粒 pROKII-*AhPMM* 的农杆菌菌液注射花生龙骨瓣, 直到雄蕊被浸透, 农杆菌菌液可随着花粉管通道直接进入胚囊。对 T_3 代拟转基因

因花生植株进行 PCR 检验, 结果显示 26 株中有 11 株检测出预期条带, PCR 阳性率为 42.3% (图 5)。

对 PCR 检验出的 T_3 代阳性植株进行 *AhPMM* 基因相对表达量分析, 以未转基因花生为对照, 结果显示, 大多数花生中导入 *AhPMM* 基因后, *AhPMM* 表达水平增加, 也有少数 *AhPMM* 表达水平很低。发现 1、3、6、7 和 11 号株系较高, 其中 11 号株系最高, 为对照的 3.6 倍 (图 6)。

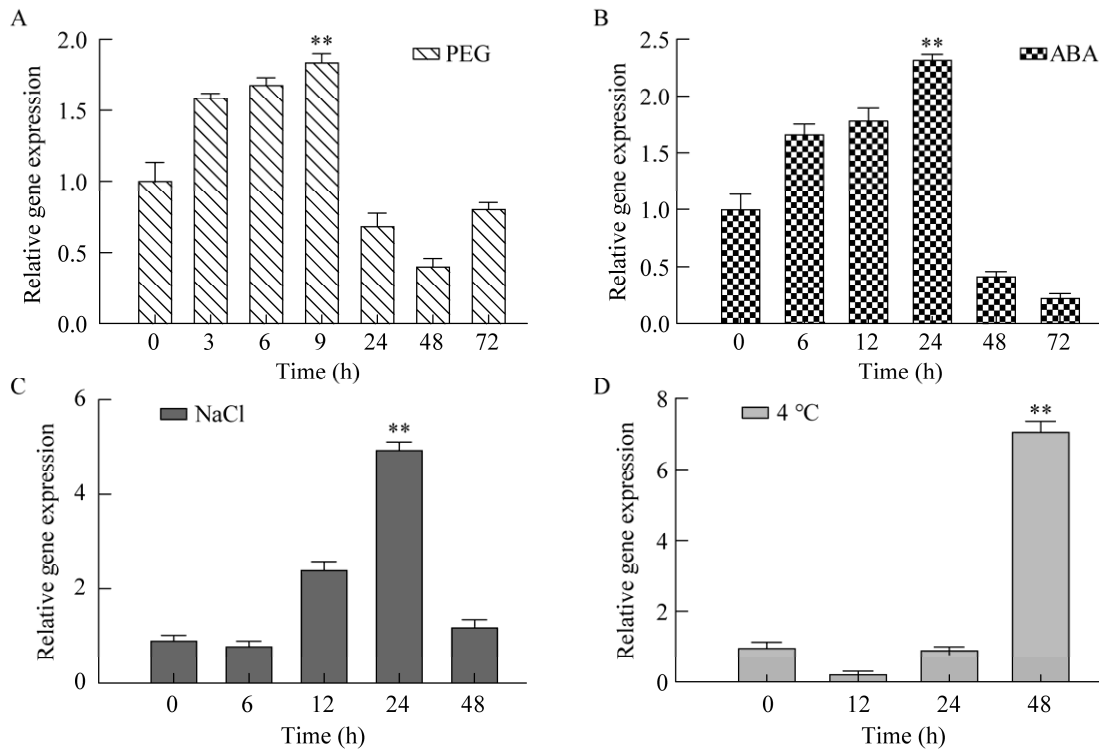


图 3 *AhPMM* 基因在各种胁迫下的相对表达量

Figure 3 Relative expression of *AhPMM* gene under different stress conditions. A: PEG. B: NaCl. C: ABA. D: 4 °C. **: $P < 0.01$.

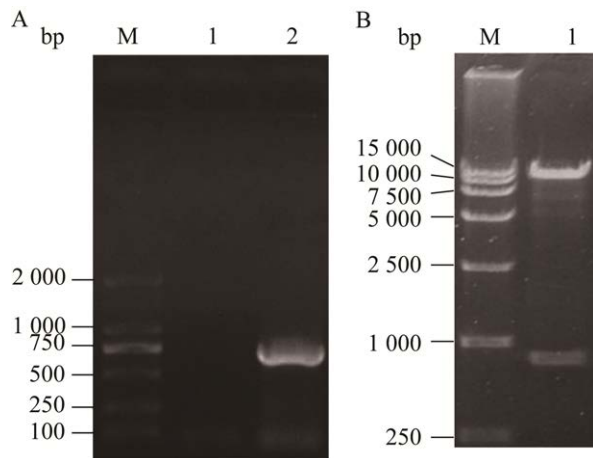


图 4 pROKII-*AhPMM* 植物表达载体的鉴定
A: PCR 扩增. B: 酶切鉴定

Figure 4 Identification of plant expression vector pROKII-*AhPMM*. A: PCR amplification. M: DL2000 DNA Marker; 1: Control; 2: PCR amplification of pROKII-*AhPMM*. B: Enzyme digestion. M: DL15000 DNA Marker; 1: Enzyme digestion of ProkII-*AhPMM*.

2.4 转基因花生维生素 C 含量的测定

利用高效液相色谱测定 T_3 代转基因和莒南小红种对照植株叶片的还原态维生素 C 和总维生素 C 含量(图 7)。对照的还原态维生素 C 为 $2.83 \mu\text{mol/g}$ 鲜重, 过表达 *AhPMM* 基因后, 转基因植株叶片的还原态维生素 C 水平发生了不同程度变化, 其中 1 号和 11 号株系的还原态维生素 C 含量分别为 $5.38 \mu\text{mol/g}$ 鲜重和 $5.35 \mu\text{mol/g}$ 鲜重, 是对照的 1.90 倍和 1.89 倍。1、5、7 和 11 号株系的总维生素 C 含量均极显著提高, 最高为对照的 1.63 倍。与对照相比, 1、5、11 号株系的 AsA:(AsA+DHA)值显著提高(图 8)。结果表明, *AhPMM* 基因相对表达量高的花生植株叶片, 无论是总维生素 C 含量还是还原态维生素 C 水平都较对照植株都得到显著提高。

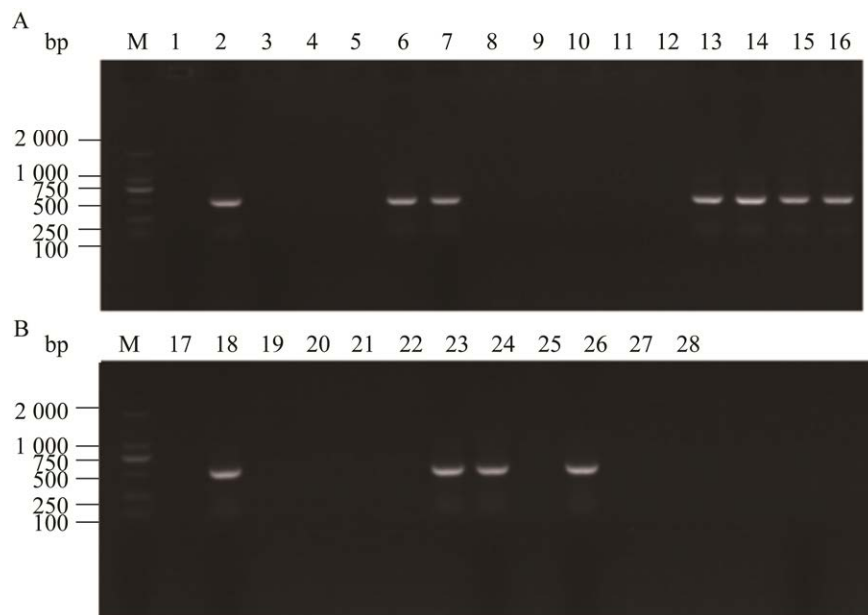


图5 过表达 *AhPMM* 基因的转基因植株的 PCR 鉴定

Figure 5 PCR identification of positive plants. M: DL2000 DNA Marker; 1, 17: Negative controls; 2-16, 18-28: Transformed plants.

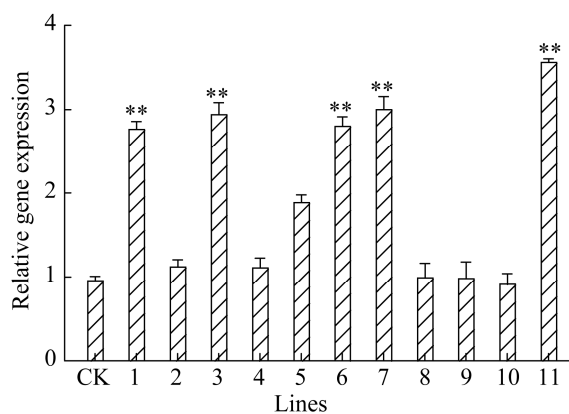


图6 T_3 代转基因植株中 *AhPMM* 基因的相对表达量

Figure 6 Relative expression of *AhPMM* gene of T_3 -generation transgenic plants. **: $P < 0.01$.

2.5 转基因种子的 NaCl 耐性检测

将经 PCR 检测的 T_3 代转基因种子和未转基因对照种子放于 1% NaCl 溶液中, 5 d 后统计发芽率。结果表明: 1、5、7 和 11 号株系的种子在 1% 盐溶液中都有较高的发芽率, 分别为

40.0%、50.0%、40.0% 和 45.0%, 而对照仅为 10.0% (图 9、图 10), 这表明 *AhPMM* 基因可以增强转基因花生种子的耐盐性, 在 1% 盐溶液处理后有较高的发芽率。

2.6 转基因花生种子对 ABA 的敏感性检测

选取部分 T_3 代转基因株系的种子和未转基因对照种子放于 100 $\mu\text{mol/L}$ ABA 溶液中进行发芽试验, 每天测定种子的胚根长度。由图 11 可以看出, 在各时间段, 转基因株系种子的胚根长度都长于对照。1 周后, 对照胚根长度仅为 2.7 mm, 而 1、5、7 和 11 号株系种子的胚根长度为 5.0–7.4 mm, 最长为对照的 2.67 倍, 说明过量表达 *AhPMM* 基因后, 相比于对照植株转基因花生种子对 ABA 敏感性减弱。

2.7 转基因花生植株的耐盐性分析

为进一步分析过表达 *AhPMM* 基因后转基因花生植株的耐盐能力, 选取培养 4 周后的 T_3 代转基因花生 1、11 号株系和非转基因对照

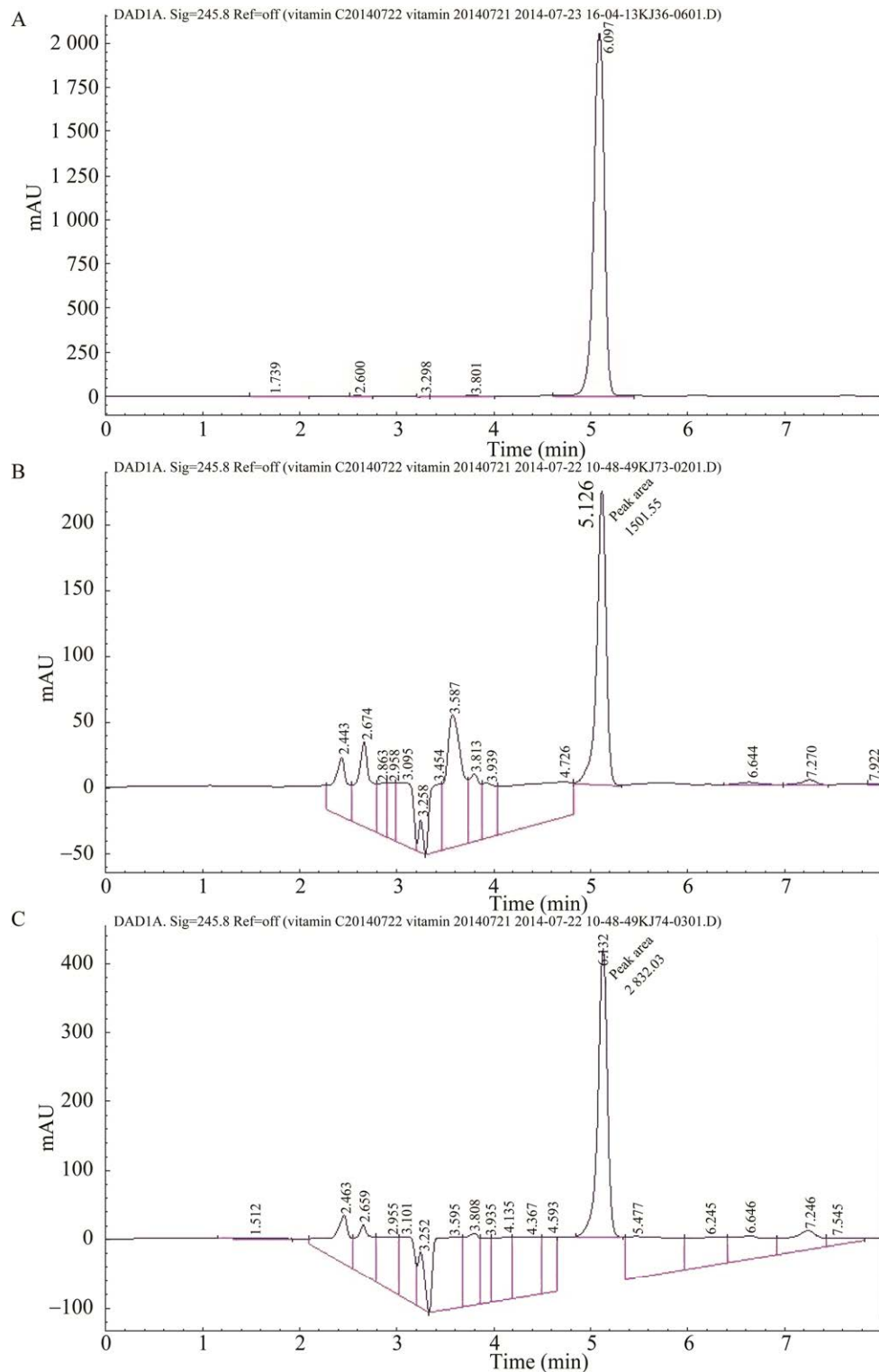


图7 T_3 代转基因植株和对照维生素C含量的HPLC分析 A: AsA标准品的HPLC分析. B: 对照叶片AsA的HPLC分析. C: 转基因植株叶片AsA的HPLC分析

Figure 7 HPLC analysis for AsA of T_3 -generation transgenic plant and control. A: HPLC analysis of AsA standard sample. B: HPLC analysis of non-transgenic leaf. C: HPLC analysis of leaf from transgenic plant.

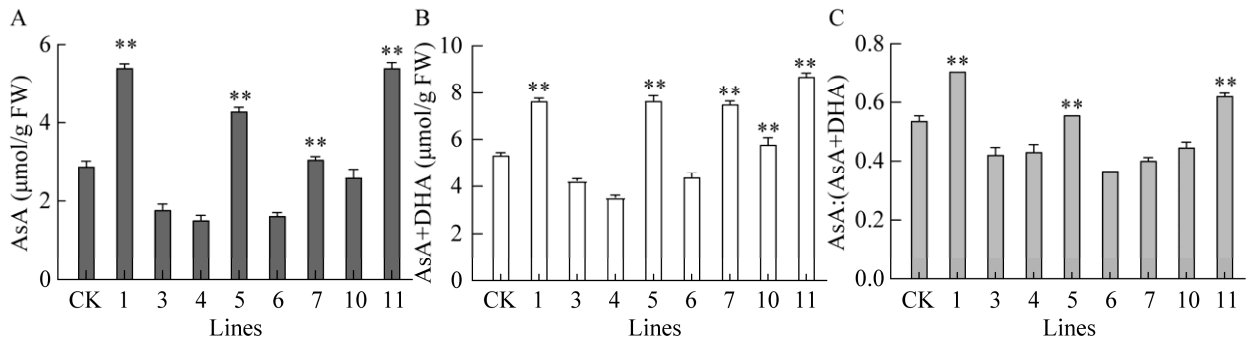


图 8 T_3 代转基因植株和对照的维生素 C 各成分的含量及比值 A: AsA. B: AsA+DHA. C: AsA:(AsA+DHA)

Figure 8 The contents and ratio of Vc with different ingredients of T_3 -generation transgenic plants and control. A: AsA. B: AsA+DHA. C: AsA:(AsA+DHA). **: $P<0.01$.



图 9 T_3 代转基因花生种子在 1% 盐溶液中的发芽情况 A: 对照. B: 11 号株系种子. C: 1 号株系种子
Figure 9 Germination of T_3 -generation transgenic seeds in 1% NaCl solution. A: Control. B: T_3 -generation transgenic seeds of line 11. C: T_3 -generation transgenic seeds of line 1.

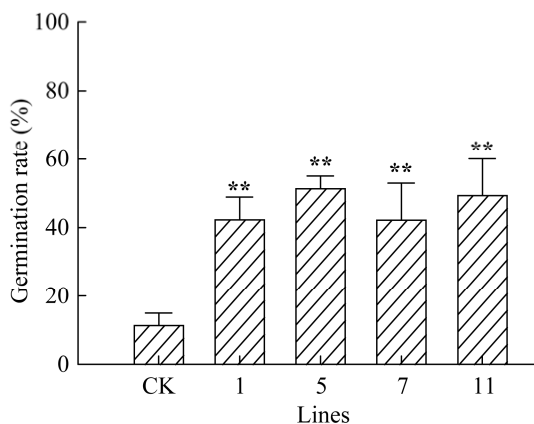


图 10 T_3 代转基因花生种子在 1% 盐溶液中的发芽率

Figure 10 Germination rates of T_3 -generation transgenic seeds in 1% NaCl solution. **: $P<0.01$.

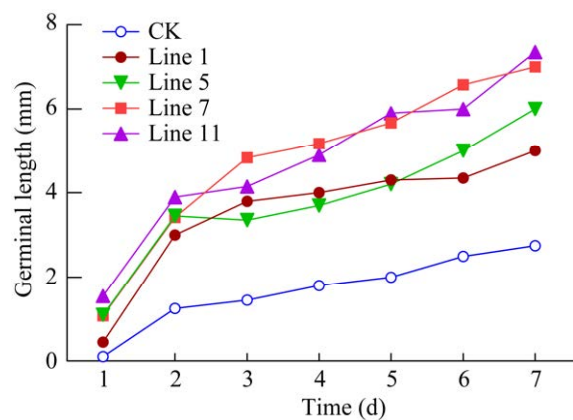


图 11 T_3 代转基因种子和未转基因对照种子在 100 $\mu\text{mol/L}$ ABA 溶液中的胚根长度

Figure 11 The average radical lengths of T_3 -generation transgenic seeds in 100 $\mu\text{mol/L}$ ABA solution.

植株, 每 2 天浇灌同样体积的 300 mmol/L NaCl 溶液, 2 周后观察植株生长状况。结果表明: 在正常条件下, 转基因植株与非转基因植株均能正常生长; 而经 300 mmol/L NaCl 处理 2 周之后, 非转基因花生植株出现严重萎蔫无法正常生长, 过表达 *AhPMM* 基因的株系生长虽然受到一定胁迫, 但仍能生长, 并且生长情况优于非转基因植株, 这表明 *AhPMM* 基因能在一定程度上提高花生植株的耐盐性(图 12)。

3 讨论

本研究在花生中克隆得到了 *AhPMM* 基因 (GenBank 登录号: KM077277.1) 的 cDNA 及 DNA 序列, 该基因的 cDNA 和 DNA 序列大小分别为 744 bp 和 3 280 bp。通过系统进化树分析发现花生与大豆 *PMM* 氨基酸序列同源性最高, 达 92.3%, 由此可见 *PMM* 保守性较高, 其亲缘性和同为油料作物大豆较近。通过软件对 *PMM* 氨基酸功能进行预测, 发现其是一个稳定的亲水性蛋白, 并且有多个丝氨酸等磷酸化结合的位点, 因为这一特

性与生物体信号机制密切相关, 推测 *PMM* 蛋白通过这些磷酸化位点磷酸化后, 其蛋白质活性会激活或抑制, 可能参与植物体的应答反应。

维生素 C 能够清除体内的活性氧, 使细胞免受活性氧的损伤, 它还能够对细胞的分裂及生长进行调控^[11]。一般来说, 植物抵御非生物胁迫的能力会随着其维生素 C 水平提高而增强, 维生素 C 积累的遗传调控非常复杂^[12], 而 *AhPMM* 基因是维生素 C 合成途径中的一个重要酶类, 推测它是一个与逆境相关的基因。本研究分别用 NaCl、ABA、低温和 PEG 模拟不同的干旱条件处理花生植株, 比较不同时间段 *AhPMM* 基因的表达水平, 发现逆境时 *AhPMM* 基因都会上调表达, 只是过程略有不同。在 PEG 和 ABA 处理后, *AhPMM* 基因表达量上升, 表现为先上升后下降, 最高分别达到处理前的 1.85 倍和 2.33 倍, 这可能与 *AhPMM* 参与 PEG 和 ABA 的逆境调控有关。而在 NaCl 和 4 °C 处理后, *AhPMM* 基因表达模式有所不同, 其表达量是先下降后上升, 最高分别达到处理前的 4.96 倍和 7.06 倍, 这些不同响应模式可能和不同信号通路有关。

植物体内 AsA 水平有限, 因此采用分子生物学手段增加花生的 AsA, 对于增强其抵抗逆境能力和改良其品质具有重要意义。现今随着维生素 C 研究逐步深入, AsA 生成过程中相关基因相继得到克隆和分离, 并且在部分生物中实现过量表达, 结果 AsA 水平及植物抗胁迫能力都得到了不同程度增强。Chen 等^[13]发现过表达 *SINFYA10* 的转基因番茄株系的叶片和果实中 AsA 浓度降低, 同时对氧化应激的敏感性增强。Qian 等^[14]在拟南芥中克隆得到 *PMM* 基因并使其在体内超表达, 结果显示使该酶活性提高超过 10 倍, AsA 总含量提高 25%–33%。本试验分析了转基因花生 *AhPMM* 基因的相对表达情况及其维生素 C 水平, 发现大多数转基因花生中导

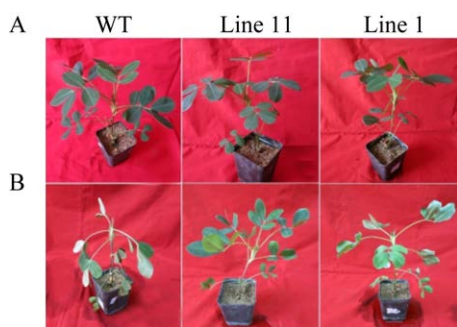


图 12 NaCl 处理前后对照和 T_3 代转基因植株的生长状况 A: 胁迫处理前. B: 胁迫处理后. WT: 对照苗; Line1、Line11: *AhPMM* T_3 代转基因株系 1、11

Figure 12 Growth of non-transgenic control and T_3 -generation transgenic peanut plants before and after salt stress treatments. A: Without salt stress. B: Under salt stress. WT: Control; Line1, Line11: T_3 -generation transgenic peanut plants.

入的 *AhPMM* 基因能够表达,且不同花生植株内 *AhPMM* 相对表达量也有很大差异,挑选 *AhPMM* 基因相对表达量高的 1、3、4、5、6、7、10 和 11 号的转基因植株进行总维生素 C 含量测定,结果表明总维生素 C 含量有不同程度增加,最高为对照的 1.63 倍,其中 *AhPMM* 基因相对表达量高的 1、11 号转基因株系不论是总维生素 C 还是 AsA 含量都显著高于其他株系。*AhPMM* 基因表达水平和 AsA 含量高低基本一致,说明在花生内过表达 *AhPMM* 基因能够有效地增加花生维生素 C 水平。

为分析 *AhPMM* 基因对花生抗逆性的影响,本研究分别对转基因花生种子及植株进行抗逆分析。用 NaCl 处理后,过表达 *AhPMM* 的转基因花生种子的发芽率与未转基因对照相比有显著提高,最高为 50%,而转基因对照仅为 10%。过量表达 *AhPMM* 基因后,转基因种子对 ABA 敏感性减弱。经 NaCl 胁迫处理后,过表达株系幼苗的生长情况也明显好于未转基因对照。Conklin 等^[3]研究也发现水稻的 AsA 含量和抗逆性密切相关。

综上所述,*AhPMM* 基因既与花生维生素 C 合成相关,又与植株抗逆相关,过表达 *AhPMM* 基因后不仅能够提高花生植株叶片中维生素 C 的含量,并且能提高花生种子以及花生植株的耐盐性。综上,本研究表明 *AhPMM* 基因过表达花生株系的各存在状态维生素 C 水平显著提高,且抵御盐胁迫能力显著增强,本研究能为 *AhPMM* 基因提高维生素 C 水平提供证据,为花生耐盐分子育种提供基因源,对于花生耐盐品种培育具有重要意义。

REFERENCES

- [1] 贾敬敦, 张富. 依靠科技创新推进我国盐碱地资源可持续利用[J]. 中国农业科技导报, 2014, 16(5): 1-7. JIA JD, ZHANG F. Sustainable utilization of saline-alkali land resources through scientific and technological innovation in China[J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2014, 16(5): 1-7 (in Chinese).
- [2] 胡兴旺, 金杭霞, 朱丹华. 植物抗旱耐盐机理的研究进展[J]. 中国农学通报, 2015, 31(24): 137-142. HU XW, JIN HX, ZHU DH. Research progress of drought and salt resistant mechanism of plant[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2015, 31(24): 137-142 (in Chinese).
- [3] CONKLIN PL, PALLANCA JE, LAST RL, SMIRNOFF N. L-ascorbic acid metabolism in the ascorbate-deficient *Arabidopsis* mutant vtc1[J]. Plant Physiology, 1997, 115(3): 1277-1285.
- [4] 刘晓莹, 解潇冬, 成畅, 汪文杰, 吕海燕, 李大卫, 钟彩虹. 猕猴桃维生素 C 的合成规律及关键基因鉴定研究[J]. 植物科学学报, 2022, 40(5): 657-668. LIU XY, XIE XD, CHENG C, WANG WJ, LÜ HY, LI DW, ZHONG CH. Synthesis patterns of vitamin C in *Actinidia* and identification of key genes[J]. Plant Science Journal, 2022, 40(5): 657-668 (in Chinese).
- [5] CONKLIN PL, NORRIS SR, WHEELER GL, WILLIAMS EH, SMIRNOFF N, LAST RL. Genetic evidence for the role of GDP-mannose in plant ascorbic acid (vitamin C) biosynthesis[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999, 96(7): 4198-4203.
- [6] LAING WA, WRIGHT MA, COONEY J, BULLEY SM. The missing step of the L-galactose pathway of ascorbate biosynthesis in plants, an L-galactose guanyltransferase, increases leaf ascorbate content[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007, 104(22): 9534-9539.
- [7] LIU XY, XIE XD, ZHONG CH, LI DW. Comparative transcriptome analysis revealed the key genes regulating ascorbic acid synthesis in *Actinidia*[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(23): 12894.
- [8] LIU XY, WU RM, BULLEY SM, ZHONG CH, LI DW. Kiwifruit MYBS1-like and GBF₃ transcription factors influence L-ascorbic acid biosynthesis by activating transcription of GDP-L-galactose phosphorylase 3[J]. New Phytologist, 2022, 234(5): 1782-1800.
- [9] 范乾程, 谭玲玲, 王亚, 乔利仙, 王晶珊, 隋炯明. 花粉管通道法验证花生 *Oleosin* 基因启动子的特异性表达[J]. 中国粮油学报, 2013, 28(12): 52-56. FAN QC, TAN LL, WANG Y, QIAO LX, WANG JS, SUI JM. Identification of specific expression of

- promoter of oleosin gene *via* pollen-tube pathway method[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2013, 28(12): 52-56 (in Chinese).
- [10] 胡晓辉, 孙令强, 苗华荣, 石运庆, 陈静. 不同盐浓度对花生品种耐盐性鉴定指标的影响[J]. 山东农业科学, 2011, 43(11): 35-37.
HU XH, SUN LQ, MIAO HR, SHI YQ, CHEN J. Effects of different NaCl concentrations on indicators for evaluating salt tolerance of peanut varieties[J]. Shandong Agricultural Sciences, 2011, 43(11): 35-37 (in Chinese).
- [11] 肖媛, 史小利, 刘银霞, 张生克, 勾丽莉. 维生素 C 的生物合成研究现状及进展[J]. 低碳世界, 2018(4): 353-354.
XIAO Y, SHI XL, LIU YX, ZHANG SK, GOU LL. Research status and progress of vitamin C biosynthesis[J]. Low Carbon World, 2018(4): 353-354 (in Chinese).
- [12] 李广贵, 林国都, 胡玉乾, 张怀山, 白静, 安华明, 鲁敏. 刺梨 *GGP* 和 *DHAR* 基因序列多态性及其与果实维生素 C 含量的关联分析[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(8): 63-69.
LI GG, LIN GD, HU YQ, ZHANG HS, BAI J, AN HM, LU M. Sequence polymorphism of *GGP* and *DHAR* genes in *Rosa roxburghii* and their association with vitamin C content in fruit[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2020, 48(8): 63-69 (in Chinese).
- [13] CHEN WF, HU TX, YE J, WANG B, LIU GZ, WANG Y, YUAN L, LI JM, LI FM, YE ZB, ZHANG YY. A CCAAT-binding factor, SINFYA10, negatively regulates ascorbate accumulation by modulating the D-mannose/L-galactose pathway in tomato[J]. Horticulture Research, 2020, 7: 200.
- [14] QIAN WQ, YU CM, QIN HJ, LIU X, ZHANG AM, ELISABETH JOHANSEN I, WANG DW. Molecular and functional analysis of phosphomannomutase (PMM) from higher plants and genetic evidence for the involvement of PMM in ascorbic acid biosynthesis in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana*[J]. The Plant Journal, 2007, 49(3): 399-413.

(本文责编 郝丽芳)