

农业生物技术

转番茄 *GGPS2* 基因烟草的构建及弱光耐受性分析

李翠萍¹, 董卫华¹, 张兴国²

1 新乡医学院 生物化学与分子生物学教研室, 河南 新乡 453003

2 西南大学园艺园林学院 南方山地园艺学教育部重点实验室, 重庆 400715

李翠萍, 董卫华, 张兴国. 转番茄 *GGPS2* 基因烟草的构建及弱光耐受性分析. 生物工程学报, 2015, 31(5): 692-701.

Li CP, Dong WH, Zhang XG. Construction of transgenic tobacco expressing tomato *GGPS2* gene and analysis of its low light tolerance. Chin J Biotech, 2015, 31(5): 692-701.

摘要: 为探讨弱光处理对转番茄 *Solanum lycopersicon* L. *GGPS2* 基因烟草的类胡萝卜素、叶绿素合成及耐弱光性的影响, 将 *SlaGGPS2* 基因和绿色荧光蛋白报告基因 (*GFP*) 经农杆菌介导转入烟草 *Nicotiana tabacum* L. cv. Wisconsin 38。PCR 检测证明抗卡那霉素烟草含有 *nptII*、*SlaGGPS2* 基因, 且无农杆菌污染; 荧光检测发现, 抗卡那霉素烟草的根尖呈现特有的荧光, 由此说明获得了整合 *SlaGGPS2* 和 *GFP* 等外源基因的转基因烟草。弱光处理后, 发现转 *SlaGGPS2* 基因烟草的类胡萝卜素含量、叶绿素总量、光合速率、单位叶面积重、总干重、根冠干重均比野生烟草高, 达到了差异显著水平。证实 *SlaGGPS2* 基因增加了弱光下烟草的类胡萝卜素含量、叶绿素总量, 增强了光合速率, 促进了生物量积累及其向根部的分配, 提高了烟草弱光下的耐受性, 推测可用于其他作物的耐弱光性改良。

关键词: 烟草, 番茄 *GGPS2* 基因, 类胡萝卜素, 叶绿素, 光合速率, 弱光耐受性

Received: October 1, 2014; **Accepted:** December 15, 2014

Supported by: the Doctoral Fund of Xinxiang Medical College (No. 505026).

Corresponding author: Cuiping Li. Tel: +86-373-3029127; E-mail: lcp831220@163.com

新乡医学院博士科研启动资金 (No. 505026) 资助。

网络出版时间: 2014-03-25

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20150325.1106.001.html>

Construction of transgenic tobacco expressing tomato *GGPS2* gene and analysis of its low light tolerance

Cuiping Li¹, Weihua Dong¹, and Xingguo Zhang²

¹ Department of Biochemistry and Molecular Biology, Xinxiang Medical College, Xinxiang 453003, Henan, China

² Key Laboratory of Horticulture Science for Southern Mountainous Regions, College of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: To explore the influence of low light on the synthesis of carotenoids, chlorophyll and the adaptability of transgenic plants with tomato *Solanum lycopersicon* L. *GGPS2* gene, we constructed a vector containing a *GGPS2* gene with green fluorescent protein (*GFP*) as report gene under the control of a cauliflower mosaic virus 35S promoter and introduced it into tobacco *Nicotiana tabacum* L. cv. Wisconsin 38 by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. PCR analysis of the DNA from kanamycin resistant tobacco indicated that the transgenic tobacco containing the *nptII* gene, *SlaGGPS2* gene and without contamination of *Agrobacterium*. We also detected the root tip of kanamycin resistant tobacco showing characteristic fluorescence. The contents of carotenoid, chlorophyll and photosynthesis of transgenic tobacco increased in comparison with wild tobacco after low light treatment. In addition, leaf mass per unit area, total dry weight, ratio of root to shoot in transgenic tobacco were all higher than that of the wild tobacco, which proved that the transgenic tobacco could increase the accumulation of biomass and promote it transport to root. The transgenic tobacco with *SlaGGPS2* gene can increase the contents of carotenoid, chlorophyll, enhance the photosynthetic rate, promote the biomass accumulation and its distribution to root. Hence, the transgenic tobacco with *SlaGGPS2* gene had increased low light tolerance and the *SlaGGPS2* gene maybe can be used in other crops.

Keywords: tobacco, the *GGPS2* gene from tomato, carotenoids, chlorophyll, photosynthesis, low light resistant

弱光是作物设施栽培、秋冬季农业生产和连绵阴雨期生长的主要障碍之一^[1-3]。通过常规育种方法,可获得耐弱光的新材料或新品种,但存在资源匮乏、改良困难、选择周期长等局限性。发掘色素合成相关基因,可为作物耐弱光性的改良奠定基础,对解决设施和寡日照地区的作物生产具有重要意义。在植物中,牻牛儿基牻牛儿焦磷酸(GGPP)参与叶绿素、类胡萝卜素、维生素E、赤霉素等产物的合成^[4-7],对光合作用、生长发育、产品和品质等有重要影响^[8-9]。该产物由牻牛儿基牻牛儿焦磷酸合成酶(Geranylgeranyl pyrophosphate synthase, GGPS)催化合成^[10-11]。植物中编码GGPS的基

因最早在甜椒中得到克隆^[10],且以多基因家族的形式存在^[12]。拟南芥中有5个GGPS基因,其中*AtGGPS1*和*AtGGPS3*定位于质体,*AtGGPS2*和*AtGGPS4*分布于线粒体,*AtGGPS6*存在于内质网,分别负责不同亚细胞结构中GGPP的合成^[12]。番茄中有2个GGPS基因,*GGPS1*的mRNA主要出现在叶组织中,而*GGPS2*在成熟果实和花器官中丰量表达^[13]。*LeGGPS2*基因能使大肠杆菌合成GGPP,从而协助八氢番茄红素基因(*PSY*)和欧文氏菌的八氢番茄红素脱饱和酶基因(*crtI*)合成番茄红素^[14];三孢布拉氏霉菌的*IPI*、*GGPS*基因能使大肠杆菌合成的 β -类胡萝卜素含量增加^[15];黄龙丹GGPS基因、

蜜柑 *GGPS* 基因分别使烟草、猕猴桃类胡萝卜素的含量增加^[16-17]。*GGPS* 基因若能促进类胡萝卜素的合成,将会对植物光合作用产生影响,但能否促进叶绿素合成,增强植物耐弱光性的研究,尚未见报道。本研究拟将 *CaMV 35S* 启动子控制下的番茄 *GGPS2* 基因整合进烟草基因组,探讨该基因对烟草的叶绿素和类胡萝卜素合成及对光合作用、生长发育的影响,以期明确该基因是否能提高烟草的弱光耐受性,为其他作物耐弱光性改良奠定基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

番茄品种 *Solanum lycopersicon* L. cv Ailsa Craig 由重庆大学陈国平教授惠赠,烟草 *Nicotiana tabacum* L. cv. Wisconsin 38 无菌苗由实验室保存。大肠杆菌 *Escherichia coli* 菌株 XL1-blue、根癌农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* 菌株 EHA105、Plant RNAzol 试剂购自北京鼎国生物技术有限责任公司。载体 pET32a(+) 购自 Novagen 公司,pVCT2024 由本实验室构建。SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒、柱式质粒小抽提量试剂盒购自上海生工生物工程服务有限公司,并委托该公司合成引物和测序。限制性内切酶、PrimStar HS DNA 聚合酶、*Taq* DNA 聚合酶、DNA marker 购自 TaKaRa 公司。其他所需试剂均为国产分析纯。

1.2 植物表达载体的构建

SlaGGPS2 基因的 cDNA 序列克隆自英国番茄成熟果实组织,含该基因的双元表达载体由课题组构建^[18],命名为 pVCT2295。

1.3 烟草的遗传转化

将带有 35S-*SlaGGPS2*-Tnos 基因表达盒和

绿色荧光蛋白报告基因的植物双元表达载体转化至根癌农杆菌 EHA105 中,利用叶圆盘法转化烟草^[19]。不定芽诱导和选择培养基均为 MS 附加 2.5 mg/L 的 6-BA、0.2 mg/L 的 NAA、150 mg/L 的卡那霉素、300 mg/L 的羧苄青霉素、3%蔗糖和 0.65%琼脂。生根培养基为 MS 附加 150 mg/L 的卡那霉素、300 mg/L 的羧苄青霉素、3%蔗糖和 0.65%琼脂。

1.4 转基因植株的鉴定

1.4.1 PCR 鉴定

采用 CTAB 法提取野生型及抗卡那霉素烟草叶片基因组 DNA。以野生烟草 gDNA 为阴性对照,稀释 20×pVCT2295 DNA 为阳性对照,分别用引物对 P1 和 P2、P1 和 P3、P4 和 P5 进行 PCR 扩增,以排除农杆菌污染造成的假阳性、检测卡那霉素抗性基因和 *SlaGGPS2* 目的基因,序列见表 1。

1.4.2 GFP 蛋白的荧光检测

分别将野生型、转基因烟草组培苗根部的培养基清洗干净,尽量不破坏根尖。取 1 cm 左右的根尖部位,制成临时切片,用荧光显微镜 (D5000B, Leica 公司) 分别于白光和 470 nm 蓝光下观察。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

Primer name	Sequences (5'-3')
P1	GAATTCAGGGAGTCACGTTATGACC
P2	CCCGGCAGCTTAGTTGCCGT
P3	CATGAGCGAAACCCTATAGGAACC
P4	CGGGATCCATATGAGATCTATGAACCTT GT
P5	GCTAGCTTAATTTTGACGATTAGCAATG

1.5 转基因烟草的耐弱光性检测

1.5.1 弱光处理方法

将转基因与野生型烟草组培苗同期繁殖, 采用随机排列的方式栽种于人工气候室。盆栽土壤为腐殖质土、粘土、沙土按 1:1:1 比例混匀。测定烟草的光响应曲线, 确定光补偿点为 $20\text{--}25 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 后, 挑取形态正常、生长良好和整齐一致的 3 个转基因烟草株系 (TG1、TG2、TG3) 和野生烟草 (WT) 进行弱光处理。每株系处理 3 株, 试验重复 3 次。

用 T5 植物生长灯控制光照强度, 每天 14 h 光照/10 h 黑暗, 环境温度为 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 。将烟草苗修剪为三叶一心, 以免叶片数不同导致光合能力和生长的差异而影响后期测量。分别于 $25\text{--}30 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 弱光照处理 50 d, $50\text{--}60 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 弱光照继续处理 30 d、60 d 后, 测定叶绿素 a、b 含量, 类胡萝卜素含量等相关生理指标。

1.5.2 光合速率测定

$25\text{--}30 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 光照处理 50 d、 $50\text{--}60 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 光照继续处理 30 d 后, 选取野生烟草与转基因烟草的第 5 叶位功能叶, 于 9:00–11:00 使用 LI-6400 便携式光合仪 (LI-COR, 美国) 在实际生长条件下测定净光合速率。测定过程中使用开放气路, 光照强度为 $60 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, 温度为 $28 \text{ }^\circ\text{C}$ 。测定前, 应多次匹配, 当数据的读数稳定时, 进行记录, 求 3 次测定的平均值。

1.5.3 类胡萝卜素和叶绿素含量的测定

用 6 mm 的打孔器在烟草自上而下的第 5 叶位 (第 8 叶位、第 11 叶位) 功能叶主脉两侧中部位置对称取 15 个叶圆片, 浸泡在 15 mL 80% 的丙酮溶液中, 封口, 避光放置于摇床上, 于 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 、125 r/min 振荡至叶片变白^[20]。当叶片

变白时, 以 UV-1800 型分光光度计分别测定波长 470 nm、646 nm 和 663 nm 下的吸光度, 计算叶绿素 a (C_a)、叶绿素 b (C_b)、总叶绿素 (C_T) 及类胡萝卜素 (C_c) 的质量浓度, 计算公式为:

$$C_a = (12.21 \cdot A_{663} - 2.81 \cdot A_{646});$$

$$C_b = (20.13 \cdot A_{646} - 5.03 \cdot A_{663});$$

$$C_T = C_a + C_b;$$

$$C_c = (1000 \cdot A_{470} - 3.27 \cdot C_a - 104 \cdot C_b) / 229.$$

然后根据 $C \cdot V/S$ 计算各色素单位面积含量。

其中 A 为吸光度; C 为质量浓度; V 为测定液体总体积; S 为样品的面积。

1.5.4 生长指标的测定

叶数、株高、茎围、单位叶面积重按烟草农艺性状调查标准方法 (YC/T 142-1998) 测定^[21], 分别剪取根、茎、叶称量鲜重, 然后 $105 \text{ }^\circ\text{C}$ 杀青 20 min, $70 \text{ }^\circ\text{C}$ 烘干后称量干重。于 $25\text{--}30 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 光照处理 50 d, $50\text{--}60 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 光照继续处理 90 d 后测定烟草的株高、茎粗、植株鲜重、干重等生长指标。

1.5.5 数据处理方法

用 Excel 进行数据处理, 计算平均值和作图。采用 SPSS19.0 软件进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 得到整合有 *SlaGGPS2* 等基因的烟草植株

含有 *SlaGGPS2* 等基因的双元载体 (图 1A) 经农杆菌介导转化烟草叶片组织, 共得到 33 株 Kan 抗性植株 (图 1B–E)。PCR 检测鉴定出 9 株烟草同时具有 Kan 抗性基因和目的基因 (图 1F–G), 且检测的 DNA 样本无农杆菌污染 (图 1H)。荧光检测显示, Kan 抗性烟草的根尖表达有 GFP 蛋白, 呈现其特有的绿色荧光 (图 1I–L)。证实获得整合 *nptII*、*SlaGGPS2* 和 *GFP* 等外源基因的转基因烟草 9 株。

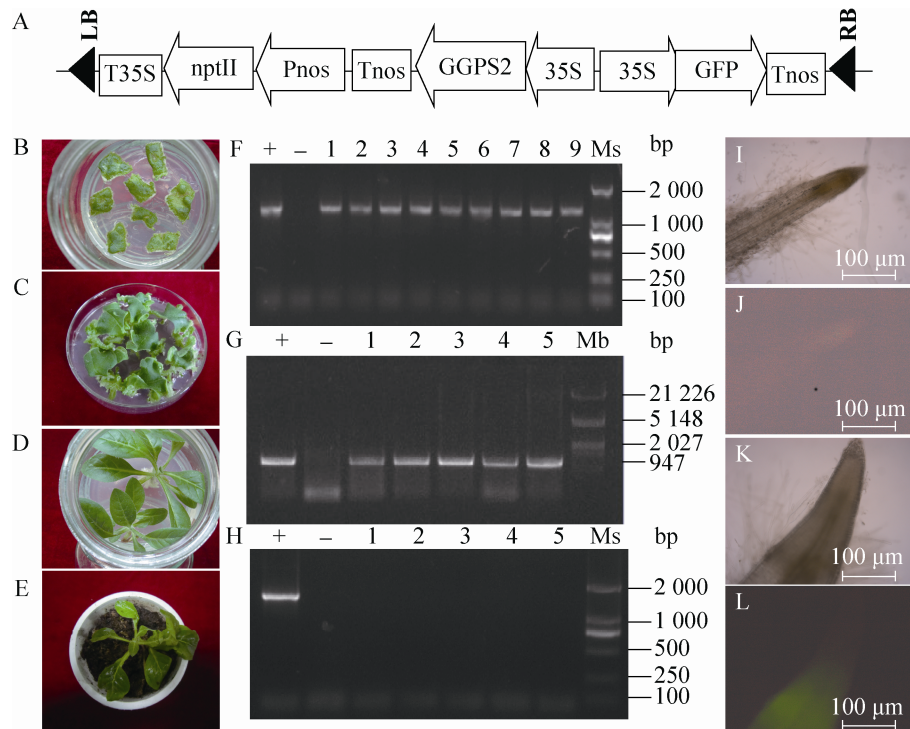


图 1 *SlaGGPS2* 基因转烟草植株的鉴定

Fig. 1 Identification of transgenic tobacco with *SlaGGPS2* gene. (A) The structure of T-DNA in binary vector containing *SlaGGPS2* gene. (B) The infected tobacco leaves. (C) antibiotic buds. (D) Rooted resistant tobacco. (E) Tobacco after transplanting. (F–H) The PCR products of *nptII* gene, *SlaGGPS2* gene, the left border of T-DNA. (I–J) The root tip of wild tobacco in white and blue light respectively. (K–L) The root tip of transgenic tobacco in white and blue light respectively. Ms: DL2000 DNA marker; Mb: λ DNA/*EcoR* I + *Hind* III marker; 1–9: the transgenic plants; –: non-transgenic plants as negative control; +: binary vector as positive control; bar=100 μ m.

2.2 转 *SlaGGPS2* 基因能增强弱光下烟草的光合性能和生物量积累

2.2.1 不同弱光处理对转 *SlaGGPS2* 基因烟草光合性能的影响

25–30 μ mol/($m^2 \cdot s$) 弱光照处理 50 d 后, 转基因烟草株系 TG1 和 TG2 第 5 功能叶的类胡萝卜素含量分别比野生烟草增加 13%、4%, 叶绿素总量分别比野生烟草增加 19%、12%, 而株系 TG3 的类胡萝卜素含量与野生烟草相当, 叶绿素总量比野生烟草增加 12%, 均未达到差异显著水平; 所有转基因烟草株系第 5 功能叶的光

合速率较野生烟草增加 25%–35.5%, 均达到差异显著水平 ($P < 0.05$) (表 2)。

50–60 μ mol/($m^2 \cdot s$) 弱光照处理 30 d 后, 转基因烟草株系 TG1 和 TG2 第 5 功能叶的类胡萝卜素含量分别比野生烟草增加 18%、16%, 叶绿素总量分别比野生烟草增加 23%、25%, 达到差异显著水平 ($P < 0.05$); 而株系 TG3 的类胡萝卜素含量比野生烟草低 3%, 叶绿素总量比野生烟草低 4%, 所有转基因烟草株系第 5 功能叶的光合速率较野生烟草增加 1.8%–11.7%, 未达到差异显著水平 (表 2)。

2.2.2 弱光处理对转 *SlaGGPS2* 基因烟草不同部位叶片光合性能的影响

50–60 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 弱光照处理 60 d 后, 转基因烟草株系 TG1 和 TG2 第 5 功能叶的类胡萝卜素含量分别比野生烟草增加 6%、5%, 叶绿素

总量分别比野生烟草增加 5%、3%, 而株系 TG3 的类胡萝卜素含量、叶绿素总量分别比野生烟草降低 4%、8%; 所有转基因烟草第 5 功能叶的光合速率较野生烟草增加 2%–8%, 均未达到差异显著水平 (表 3)。

表 2 不同弱光处理对转 *SlaGGPS2* 基因烟草色素含量和光合速率的影响

Table 2 Effects of different low light treatments on pigment contents and photosynthetic rate of transgenic tobacco with *SlaGGPS2* gene

Lines	Light intensity ($\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$)	Processing time (d)	Carotenoid content ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Chlorophyll content ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Photosynthetic rate ($\mu\text{mol CO}_2/(\text{m}^2\cdot\text{s})$)
WT	25–30	50	4.4±0.3	28.4±1.9	2.6±0.7
TG1			4.9±0.6	33.7±5.2	3.5±1.2*
TG2			4.6±0.5	31.8±4.5	3.4±0.4*
TG3			4.4±1.0	31.8±5.6	3.2±1.2*
WT	50–60	30	4.3±0.4	25.2±3.0	1.7±0.6
TG1			5.1±0.4*	31.1±4.2*	1.9±0.5
TG2			5.0±0.8*	31.5±6.6*	1.9±0.4
TG3			4.2±0.2	24.1±1.2	1.7±0.6

WT: wild tobacco; TG1, TG2, TG3: different lines of transgenic tobacco; values are $\bar{x} \pm s$ ($n=3$); ** and * indicate 1%, 5% significant level respectively.

表 3 弱光处理对转 *SlaGGPS2* 基因烟草不同部位叶片色素含量和光合速率的影响

Table 3 Effects of low light treatment on pigment contents and photosynthetic rate of different location of leaves in transgenic tobacco with *SlaGGPS2* gene

Lines	Different location of leaves (from top to bottom)	Carotenoid content ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Chlorophyll content ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Photosynthetic rate ($\mu\text{mol CO}_2/(\text{m}^2\cdot\text{s})$)
WT	5	5.5±0.3	35.0±2.9	1.2±0.6
TG1		5.8±0.1	36.7±1.8	1.3±0.4
TG2		5.8±1.0	35.9±3.1	1.3±0.6
TG3		5.3±0.4	32.1±3.3	1.2±0.7
WT	8	5.2±0.5	33.9±3.0	ND
TG1		6.2±0.3	38.5±2.3	ND
TG2		5.4±0.4	37.0±2.3	ND
TG3		4.7±0.5	29.5±3.5	ND
WT	11	3.9±0.6	24.3±3.4	ND
TG1		4.8±0.3	29.3±2.1	ND
TG2		4.6±0.1	29.1±2.1	ND
TG3		4.4±0.7	26.3±3.2	ND

WT: wild tobacco; TG1, TG2, TG3: different lines of transgenic tobacco; ND: not detected; values are $\bar{x} \pm s$ ($n=3$).

转基因烟草株系 TG1 和 TG2 第 8 功能叶的类胡萝卜素含量分别比野生烟草增加 18%、4%，叶绿素总量分别比野生烟草增加 14%、9%，而株系 TG3 的类胡萝卜素含量、叶绿素总量分别比野生烟草降低 10%、13%，均未达到差异显著水平 (表 3)。

所有转基因烟草株系第 11 功能叶的类胡萝卜素含量比野生烟草增加 13%–23%，叶绿素总量比野生烟草增加 8%–21%，差异均不显著 (表 3)。

2.2.3 弱光处理对转 *SlaGGPS2* 基因烟草生物量积累的影响

25–30 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 光照处理 50 d，50–60 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 光照处理 90 d 后，相比野生烟草，转基因烟草株系 TG1、TG2 的叶片数目分别增加 12%、6% (图 2A)，株高分别增加 14%、3% (图 2C)，而转基因烟草株系 TG3 的叶片数目减少 7%，株高降低 5% (图 2A，2C)，转基因烟草茎比野生烟草粗 6%–11%，均未达到差异显著性水平 (图 2B)。

转基因烟草的单位叶面积比野生烟草重 14%–26%，达到差异显著性水平 ($P<0.05$)；叶鲜重比野生烟草低 5%–20%，其中株系 TG3 达到差异显著性水平 ($P<0.05$)；除株系 TG3 外茎鲜重比野生烟草高 2%–16%，差异不显著；根鲜重比野生烟草增加 55%–95%，达到差异极显著水平 ($P<0.01$)；株系 TG1 总鲜重的增加达到差异显著性水平 ($P<0.05$)；烘干后称重，发现相比野生烟草，转基因烟草株系 TG1 和 TG2 的叶干重分别增加 8%、5%，TG3 的叶干重减少 1%，差异均不显著；转基因烟草的茎干重、根干重、总干重分别比野生烟草增加 16%–47%、39%–67%、9%–26%，达到差异显著性水平 ($P<0.05$)，表明转基因烟草的生物量积累比野生烟草多。

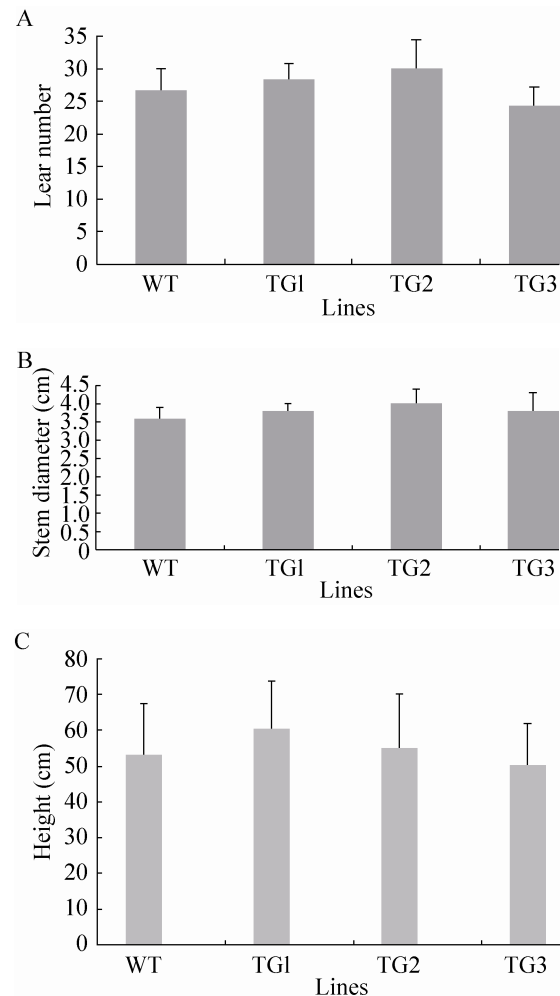


图 2 弱光对转基因烟草叶片数目 (A)、茎粗 (B)、株高 (C) 的影响

Fig. 2 The leaf number (A), stem diameter (B), height (C) of transgenic tobacco under low light.

相比野生烟草，转基因烟草的干鲜比增加 17%–28%，达到差异极显著性水平 ($P<0.01$)，表明转基因烟草的自由水含量比野生烟草低，造成其叶鲜重偏低、总鲜重不高；转基因烟草的根冠干重比增加 28%–37%，达到差异极显著性水平 ($P<0.01$)，表明其积累的生物量更多向根部运输，培养了发达的根系，是烟草壮苗的基础和标志 (表 4)。

表 4 弱光下转 *SlaGGPS2* 基因烟草的生物量积累Table 4 The biomass of transgenic tobacco with *SlaGGPS2* gene under low light

Lines	LMA (mg/cm ²)	FW of leave (g)	FW of stem (g)	FW of root (g)	FW (g)	DW of leave (g)	DW of stem (g)	DW of root (g)	DW (g)	DW/FW (%)	Ration of root to shoot DW (%)
WT	13.4±1.8	90.0± 4.6	36.3± 3.0	8.6± 0.5	134.9± 2.7	7.6± 0.2	3.2± 0.2	1.8± 0.1	12.6± 0.2	9.3± 0.1	17.0±1.3
TG1	16.9±3.8*	85.1± 4.3	42.1± 2.0	16.8± 0.1**	147.0± 3.6*	8.2± 0.3	4.7± 0.1**	3.0± 0.2**	15.9± 0.2**	10.8± 0.3**	23.3±1.7**
TG2	16.7±2.8*	83.4± 3.5	37.0± 2.7	14.2± 0.6**	134.6± 2.7	8.0± 0.4	4.4± 0.1**	2.7± 0.1**	15.1± 0.4**	11.2± 0.1**	21.8±0.4*
TG3	15.3±1.6*	72.2± 2.5*	28.8± 0.7*	13.3± 0.2**	114.3± 3.2**	7.5± 0.2	3.7± 0.1*	2.5± 0.1**	13.7± 0.3*	11.9± 0.1**	22.3±0.6*

WT: wild tobacco; TG1, TG2, TG3: different lines of transgenic tobacco; LMA: leaf mass per unit area; FW: fresh weight; DW: dry weight; values are $\bar{x} \pm s$ ($n=3$); ** and * indicate 1%, 5% significant level respectively.

3 讨论

弱光是影响作物设施生产的重要因素之一，不仅会限制农作物的种植范围，也会造成农作物减产和品质下降，严重时甚至绝收，因为光照是植物进行光合作用的基础，其强度变化会影响叶绿体光合膜上的色素、色素蛋白复合体的形成、含量及分布，进而影响植物的生长与发育^[23-24]。因此，有效捕获低光照强度下的光能，增强植物光合利用率将是提高植物耐弱光的重要措施之一。*GGPS* 基因编码合成的 GGPP 是类异戊二烯代谢体系的分支，可通过不同的代谢途径分别合成叶绿素和类胡萝卜素，将该基因转入作物中有望提高耐弱光性。

本研究将构建的带有 35S-*SlaGGPS2*-Tnos 基因表达盒和绿色荧光蛋白报告基因的植物双元表达载体 (图 1A) 通过农杆菌介导法整合入烟草叶片基因组，结果发现转基因烟草株系 TG1 和 TG2 第 5 功能叶的叶绿素含量、类胡萝卜素含量较野生烟草增加，光合速率增强，尤其是 25–30 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 弱光照处理 50 d 后，光合速率增加 25%–35.5%，达到差异极显著性水平 ($P<0.01$) (表 2)。当 50–60 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 弱光

照处理 30 d 后，转基因烟草株系 TG1 和 TG2 第 5 功能叶的类胡萝卜素含量较野生烟草分别增加 18%、16%，叶绿素总量分别增加 23%、25%，达到差异显著水平 ($P<0.05$) (表 3)。表明 *GGPS* 基因转烟草后得到表达并发挥了促进类胡萝卜素和叶绿素合成的功能。株系 TG3 的叶绿素总量、类胡萝卜素含量与野生烟草差异不显著，可能由于基因插入的位置效应造成。Ji 等^[16]将黄龙丹 *GGPS* 基因转入烟草，发现转基因烟草类胡萝卜素含量比野生烟草增加小于 20%，该基因对类胡萝卜素含量的影响不及 *PSY*、*ZDS* 基因，但并未对转基因烟草进行耐弱光性分析。Lintig 等^[22]认为在光形态建成中，叶绿素总量和类胡萝卜素含量是同步增长的，本研究中发现类胡萝卜素与叶绿素含量变化趋势一致，同时对不同部位叶片的类胡萝卜素、叶绿素含量进行分析，发现随着叶片位置的下降，类胡萝卜素、叶绿素含量呈下降趋势，但转基因烟草比野生烟草下降趋势减缓，差异均不显著 (表 3)，可能与 GGPP 还参与赤霉素、脱落酸等激素的合成相关。本研究中转基因烟草株系 TG1 和 TG2 经 25–30 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 光照处理 50 d 后，在叶绿素指标上不及 50–60 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$

光照处理 30 d 后的结果 (表 2 和表 3), 表明 *SlaGGPS* 基因可能只在较强弱光下发挥作用, 而在接近光补偿点的弱光下, 其功能有限。因此, 导入更多与叶绿素或类胡萝卜素合成相关基因对增强烟草的耐弱光性有重要的研究意义^[25]。另外, 在后续研究中通过对转基因烟草 T1 代植株的 PCR 鉴定, 结果表明含目的基因与不含目的基因植株的比例接近 3 : 1, 推测 *SlaGGPS* 基因应该为单拷贝插入。

光合作用为植物提供物质代谢和能量转化的最初来源, 是决定作物产量的重要因素。弱光影响光合作用的因素包括光合速率、色素含量、细胞器结构、光合酶活性、光合产物的运输与分配等。本研究将色素合成相关基因导入烟草, 发现弱光处理后, 光合速率增强, 单位叶面积增重、总干重增加, 可见转基因烟草积累了更多的生物量; 同时发现根鲜重、根干重、根冠干重量比增加, 证明转基因烟草增加了生物量向根部的分配, 培养了发达的根系。由于鲜比的增加可见, 转基因烟草的自由水含量少, 可能与其耐弱光性增强有关。

番茄 *SlaGGPS* 基因能使弱光下转基因烟草叶片的类胡萝卜素含量、叶绿素含量增加, 光合速率增强, 干物质累积增多, 因而推测在用于其他作物的耐弱光改良上可能发挥作用。

REFERENCES

- [1] Barkey KO, Wells R. Response of soybean photosynthesis and chloroplast membrane function to canopy development and mutual shading. *Plant Physiol*, 1991, 97(1): 245–252.
- [2] Chen QJ, Zhang FM, Wang YJ, et al. Studies of physiologic characteristics of reaction of cucumber to low temperature and poor light. *Sci Agric Sin*, 2003, 36(1): 77–81 (in Chinese).
- [3] 陈青君, 张福墁, 王永健, 等. 黄瓜对低温弱光反应的生理特征研究. *中国农业科学*, 2003, 36(1): 77–81.
- [4] Ai XZ, Guo YK, Ma XZ, et al. Photosynthetic characteristics and ultrastructure of chloroplast of cucumber under low light intensity in solar green house. *Sci Agric Sin*, 2004, 37(2): 268–273 (in Chinese).
- [5] 艾希珍, 郭延奎, 马兴庄, 等. 弱光条件下日光温室黄瓜需光特性及叶绿体超微结构. *中国农业科学*, 2004, 37(2): 268–273.
- [6] Bartley GE, Scolnik PA. Plant carotenoids: pigments for photoprotection, visual attraction, and human health. *Plant Cell*, 1995, 7(7): 1027–1038.
- [7] Koornneef M, Léon-Kloosterziel KM, Schwartz SH, et al. The genetic and molecular dissection of abscisic acid biosynthesis and signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Physiol Biochem*, 1998, 36(1): 83–89.
- [8] Andrew LP. Gibberellins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol Biochem*, 1998, 36: 115–124.
- [9] Wettstein DV, Gough S, Kannangara CG. Chlorophyll biosynthesis. *Plant Cell*, 1995, 7(7): 1039–1057.
- [10] Bramley PM. Regulation of carotenoid formation during tomato fruit ripening and development. *J Exp Bot*, 2002, 531(377): 2107–2113.
- [11] Oster U, Rudiger W. The G4 gene of *Arabidopsis thaliana* encode a chlorophyll synthase of etiolated plants. *Bot Acta*, 1997, 110(5): 420–423.
- [12] Kuntz M, Romer S, Suire C. Identification of a cDNA for the plastid-located geranylgeranyl pyrophosphate synthase from *Capsicum annuum*: correlative increase in enzyme activity and transcript level during fruit ripening. *Plant J*, 1992, 2(1): 25–34.
- [13] Wu ZM, Zhang X, Wan JM. Molecular regulation of chlorophyll biosynthesis. *Plant Physiol Comm*, 2008, 44(6): 1064–1070 (in Chinese).
- [14] 吴自明, 张欣, 万建民. 叶绿素生物合成的分子调控. *植物生理学通报*, 2008, 44(6): 1064–1070.
- [15] Okada K, Saito T, Nakagawa T, et al. Five

- geranylgeranyl diphosphate synthases expressed in different organs are localized into three subcellular compartments in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2000, 122(4): 1045–1056.
- [13] Ament K, Van Schie CC, Bouwmeester HJ, et al. Induction of a leaf specific geranylgeranyl pyrophosphate synthase and emission of (E,E)-4,8,12-trimethyltrideca-1,3,7,11-tetraene in tomato are dependent on both jasmonic acid and salicylic acid signaling pathways. *Planta*, 2006, 224(5): 1197–1208.
- [14] Chen JY, Pu ZQ, Xiao YW, et al. Lycopene synthesis via tri-cistronic expression of *LeGGPS2*, *LePSY1* and *CrtI* in *Escherichia coli*. *Chin J Biotech*, 2012, 28(8): 823–833 (in Chinese).
陈吉裕, 蒲志群, 肖雅文, 等. 大肠杆菌共表达 *LeGGPS2*, *LePSY1* 和 *CrtI* 基因合成番茄红素. *生物工程学报*, 2012, 28(7): 823–833.
- [15] Sun J, Sun XX, Tang PW, et al. Molecular cloning and functional expression of two key carotene synthetic genes derived from *Blakeslea trispora* into *E. coli* for increased β -carotene production. *Biotechnol Lett*, 2012, 34(11): 2077–2082.
- [16] Ji J, Wang G, Wang JH. Functional analysis of multiple carotenogenic genes from *Lycium barbarum* and *Gentiana lutea* L. for their effects on β -carotene production in transgenic tobacco. *Biotechnol Lett*, 2009, 31(2): 305–312.
- [17] Kim M, Kim SC, Song KJ, et al. Transformation of carotenoid biosynthetic genes using a micro-cross section method in kiwifruit. *Plant Cell Rep*, 2010, 29(12): 1339–1349.
- [18] Li CP, Xia BB, Zhai JP, et al. Cloning and expression vector construction of the *GGPS2* gene from tomato. *J Southwest Univ: Nat Sci Ed*, 2010, 32(10): 65–68 (in Chinese).
李翠萍, 夏蓓蓓, 翟军鹏, 等. 番茄 *GGPS2* 基因的克隆与表达载体的构建. *西南大学学报: 自然科学版*, 2010, 32(10): 65–68.
- [19] Horsch RB, Fry JE, Hoffman NL, et al. A simple and general method of transferring genes into plants. *Science*, 1985, 227(4691): 1229–1231.
- [20] Xu DQ. Several problems in measurement and application of chlorophyll content. *Plant Physiol Comm*, 2009, 45(9): 896–898 (in Chinese).
许大全. 叶绿素含量的测定及其应用中的几个问题. *植物生理学通讯*, 2009, 45(9): 896–898.
- [21] State tobacco monopoly administration. Investigation Methods of Agronomical Character of Tobacco (YC/T 142). Beijing: China Standard Press, 1998 (in Chinese).
国家烟草专卖局. 烟草农艺性状调查方法 (YC/T 142). 北京: 中国标准出版社, 1998.
- [22] Lintig JV, Welsch R, Bonk M, et al. Light-dependent regulation of carotenoid biosynthesis occurs at the level of phytoene synthase expression and is mediated by phytochrome in *Sinapis alba* and *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant J*, 1997, 12(3): 625–634.
- [23] Pattanayak GK, Biswal AK, Reddy VS, et al. Light-dependent regulation of chlorophyll b biosynthesis in chlorophyllide a oxygenase overexpressing tobacco plants. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 326(2): 466–471.
- [24] Tanaka R, Koshino Y, Sawa S, et al. Overexpression of chlorophyllide a oxygenase enlarges the antenna size of photosystem II in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 2001, 26(4): 365–373.
- [25] Li CP, Pan Y, Chu FT, et al. Construction of co-expression vector containing *AtCAO* and *AtHEMA1* genes from *Arabidopsis* and transformation into tobacco. *China Biotechnol*, 2013, 33(4): 54–60 (in Chinese).
李翠萍, 潘宇, 储福堂, 等. 拟南芥 *AtCAO* 和 *AtHEMA1* 基因共表达载体的构建及转烟草研究. *中国生物工程杂志*, 2013, 33(4): 54–60.

(本文责编 郝丽芳)