

转 *LeNCED1* 基因对白三叶 ABA 含量及水分利用效率的影响*

王昌耀^{1#}, 闫尔俊^{2#}, 常 凯¹, 宗亚倩¹, 鲁洪智¹, 周 凯¹, 姜 华^{1**}

(1. 云南农业大学 动物科学技术学院, 云南 昆明 650201; 2. 中共武定县委党校, 云南 武定 651600)

摘要:【目的】研究 *LeNCED1* 基因对白三叶水分利用效率的影响, 为白三叶的节水抗旱提供一定的理论指导。【方法】分别以 7 株含转 *SAG₁₃-LeNCED1* 基因白三叶和非转基因白三叶的老叶和嫩叶为材料, 研究其 ABA 的含量、光合特性、叶绿素含量及水分利用效率。【结果】转 *SAG₁₃-LeNCED1* 基因显著提高了白三叶老叶的 ABA 含量 ($P<0.05$), 却显著降低了白三叶老叶的叶绿素 b、胞间 CO_2 浓度、蒸腾速率和气孔导度 ($P<0.05$)。转 *LeNCED1* 基因显著降低了白三叶嫩叶叶绿素 a、叶绿素 b、净光合速率和蒸腾速率 ($P<0.05$), 却显著提高了白三叶嫩叶的胞间 CO_2 浓度和气孔导度 ($P<0.05$)。【结论】转入 *LeNCED1* 基因能显著提高白三叶的长期水分利用效率 ($P<0.05$)。

关键词: 白三叶; *LeNCED1* 基因; 脱落酸; 水分利用效率

中图分类号: S 541.201

文献标志码: A

文章编号: 1004-390X (2020) 06-1029-05

Effect of *LeNCED1* Gene on the ABA Content and Water Use Efficiency in White Clover

WANG Changyao¹, YAN Erjun², CHANG Kai¹, ZONG Yaqian¹,
LU Hongzhi¹, ZHOU Kai¹, JIANG Hua¹

(1. College of Animal Science and Technology of Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;

2. Party School of Wuding County Committee of the Communist Party of China, Wuding 651500, China)

Abstract: [Purpose] The effect of the *LeNCED1* gene on the water use efficiency of white clover was studied to provide a certain theoretical guidance for its water saving and drought resistance.

[Method] We studied the ABA content, photosynthetic characteristics, pigment and water use efficiency of the old and young leaves in the transgenic (*LeNCED1*) plants with the *SAG₁₃* promoter and non-transgenic white clover. [Result] The *LeNCED1* gene could significantly increase the ABA content in the old leaves of white clover ($P<0.05$), but reduced significantly chlorophyll b, intercellular CO_2 concentration, transpiration rate and stomatal conductance in the old leaves of white clover ($P<0.05$). What's more, the *LeNCED1* gene decreased the content of chlorophyll a, chlorophyll b, net photosynthesis rate and transpiration rate in young leaves of white clover ($P<0.05$), but significantly increased the intercellular CO_2 concentration and stomatal conductance of young leaves of white

收稿日期: 2019-07-30

修回日期: 2020-04-15

网络首发时间: 2020-11-09 14:31:04

*基金项目: 云南省重点研发计划课题 (2018BB0002-02); 云南省技术创新人才 (2018HB075)。

作者简介: #对文本贡献等同, 为并列第一作者。王昌耀 (1994—), 男, 山东枣庄人, 在读硕士研究生, 主要从事草种资源保护与利用研究。E-mail: 894964416@qq.com; 闫尔俊 (1962—), 男, 云南楚雄人, 高级讲师, 主要从事区域农业经济发展研究和教学工作。E-mail: ynwdyej1366@126.com

**通信作者 Corresponding author: 姜华 (1976—), 女, 吉林梅河口人, 博士, 教授, 主要从事牧草种质资源与遗传育种研究。E-mail: jianghua15@163.com

网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/53.1044.s.20201106.0920.001.html>



clover ($P<0.05$). [Conclusion] The long-term water use efficiency of white clover was improved by transferring *LeNCED1*.

Keywords: *Trifolium repens* L.; *LeNCED1* gene; abscisic acid; water use efficiency

白三叶 (*Trifolium repens* L.) 是一种多年生的优质豆科牧草, 具有固氮能力强、草产量高、品质优良和营养丰富等特点, 同时也是园林中常见的植物, 具有茎叶茂密、再生速度快等特点, 是温带地区草坪建植的主要草种, 具有一定的经济、观赏和牧用价值^[1]。但白三叶喜湿冷, 调控蒸腾的能力较弱, 对于干旱耐性较低, 干旱胁迫时易发病, 严重影响草品质和外观表现^[2], 而且白三叶一般在土层浅薄且贫瘠的土地上种植, 受季节性干旱影响较大, 是需要人为干预比较多的牧草, 所以白三叶对抗逆性的依赖更强^[3]。因此研究白三叶的抗旱性具有一定的实际应用价值。研究发现: 植物体在受到干旱胁迫时, 植物体会诱导生成脱落酸 (abscisic acid, ABA), 促使植物气孔关闭或抑制气孔开放, 使其尽可能地降低蒸腾失水, 以抵御水分胁迫^[4]。

脱落酸作为一种重要的植物激素, 不仅参与了植物各阶段生长的调控过程, 而且还在应对各种环境胁迫中发挥着重要作用。在高等植物脱落酸的生物合成过程中, 9-顺式-环氧类胡萝卜素双加氧酶 (nine-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, NCED) 是主要的限速酶之一, 而编码该酶的 *NCED* 基因以多基因家族的形式存在。植物中 *NCED* 基因表达量的变化与脱落酸含量有直接关系^[5]。植物中过量表达 9-顺式环氧类胡萝卜素双加氧酶, 会导致脱落酸积累轻度增加、气孔闭合和水分利用效率提高, 但对长期生物量影响较小^[6]。

本研究以 7 株转 *LeNCED1* 基因的白三叶和 7 株未转基因的白三叶为对照, 旨在阐明转 *LeNCED1* 基因对白三叶脱落酸的形成、水分利用效率、叶绿素含量和光合特性指标的影响, 为在现代生态农业中具有十分重要作用的白三叶提供可靠的节水抗旱依据。

1 材料与方法

1.1 材料

本试验所用的 Prestige 白三叶来源于新西兰。课题组前期已经将含有 *SAG₁₃* 启动子的 *LeNCED1* 基因转入到白三叶中, 经过鉴定获得

了 7 株转基因白三叶, 同时采用相同的组培方法获得了 7 株未转基因的白三叶作为对照。

1.2 测定指标与方法

白三叶用水量和生物量的测定: 将白三叶扦插到直径 10 cm、高 8.5 cm 的花盆里, 放入光照 14 h、黑暗 10 h、空气湿度为 75%、温度为 22 ℃ 的人工气候箱中进行培育 20 d 后, 每隔 2 d 将花盆放在水中充分吸水, 取出直至没有水滴流出后, 用电子秤上称量吸水前后花盆的质量, 计算出需水量。直至试验结束前收获整株植物, 计算出白三叶总需水量, 测定鲜质量和干质量, 同时计算出长期水分利用效率 (WUE): $WUE = \text{干物质} / \text{总用水量}$ 。

白三叶叶片光合特性的测定: 采用 Lci-SD 型光合仪, 设定固定 800 lx 光强下测定植株顶端完全展开第 1 或 2 叶位嫩叶片和第 5 或 6 叶位老叶片的净光合速率、蒸腾速率、胞间 CO_2 浓度和气孔导度等光合指标。

白三叶 ABA 含量的测定采用植物激素的酶联免疫吸附测定法^[7]; 叶绿素含量的测定采用丙酮乙醇混合浸提法^[8]。

1.3 数据处理

数据整理和作图用 Microsoft Excel 2010 和 Sigmaplot 10.0 完成, 用 SPSS 20.0 软件进行单因素分析, 采用 Duncan 分析法进行差异显著性比较。

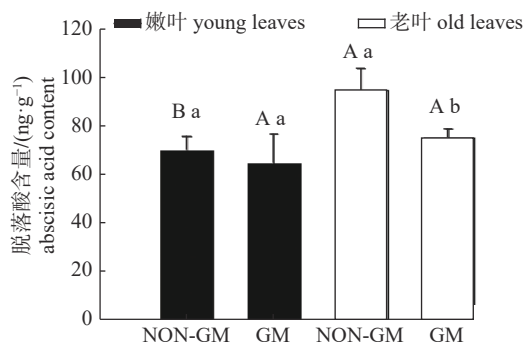
2 结果与分析

2.1 转基因与非转基因白三叶脱落酸含量的比较

由图 1 可知: 转基因白三叶嫩叶 ABA 的含量与非转基因白三叶嫩叶 ABA 的含量差异不显著 ($P>0.05$); 而转基因白三叶老叶 ABA 的含量显著高于非转基因白三叶老叶 ABA 的含量 ($P<0.05$)。转基因白三叶老叶 ABA 含量显著高于其嫩叶 ABA 含量 ($P<0.05$), 非转基因白三叶的嫩叶片与老叶片的 ABA 含量差异不显著 ($P>0.05$)。

2.2 转基因与非转基因白三叶叶绿素含量的比较

由图 2 可知: 非转基因白三叶嫩叶叶绿素 a 和叶绿素 b 显著高于转基因白三叶 ($P<0.05$), 而转基因白三叶嫩叶类胡萝卜素与非转基因白三叶嫩



注:不同小写字母表示同一叶位不同材料差异显著水平为 $P<0.05$;不同大写字母表示同一材料不同叶位差异显著水平为 $P<0.05$;GM 为转基因, NON-GM 为非转基因;下同。

Note: Different small letters indicate the significant difference at the 0.05 level of different material leaves at the same sites; different capital letters indicate the significant difference at the 0.05 level of the same material leaves at different sites; GM is transgene, and NON-GM is non-transgene; the same as belows.

图1 转基因与非转基因白三叶脱落酸含量对比

Fig. 1 Comparison of ABA content between transgenic and non-transgenic white clover

叶类胡萝卜素差异不显著 ($P>0.05$)。非转基因白三叶老叶叶绿素 b 显著高于转基因白三叶叶绿素 b ($P<0.05$), 而转基因白三叶老叶叶绿素 a 和类胡萝卜素均与非转基因白三叶老叶差异不显著 ($P>0.05$)。转基因白三叶和非转基因白三叶嫩叶的叶绿素 a、叶绿素 b 显著高于老叶 ($P<0.05$), 而转基因白三叶与非转基因白三叶嫩叶与老叶的类胡萝卜素差异不显著 ($P>0.05$)。

2.3 转基因与非转基因白三叶光合指标的比较

由图3可知:转基因白三叶嫩叶的净光合速率显著低于非转基因白三叶 ($P<0.05$), 而转基因白三叶老叶的净光合速率与非转基因白三叶老叶的净光合速率差异不显著 ($P>0.05$)。转基因白三叶和非转基因白三叶的嫩叶的净光合速率均显著高于其老叶 ($P<0.05$)。非转基因白三叶老叶的胞间 CO_2 浓度显著高于转基因白三叶 ($P<0.05$), 且转基因白三叶老叶的胞间 CO_2 浓度显著高于其嫩叶 ($P<0.05$), 而转基因白三叶嫩叶的胞间 CO_2 浓度显著高于非转基因白三叶 ($P<0.05$), 非转基因白三叶老叶的胞间 CO_2 浓度显著高于其嫩叶 ($P<0.05$)。转基因白三叶老叶的蒸腾速率显著高于其嫩叶 ($P<0.05$), 非转基因白三叶老叶和嫩叶的蒸腾速率显著高于转基因白三叶 ($P<0.05$), 非转基因白三叶老叶的蒸腾速率显著高于其嫩叶 ($P<0.05$)。非转基因白三叶老叶的气孔导度显著高于转基因白三叶 ($P<0.05$), 而转基因白三叶嫩

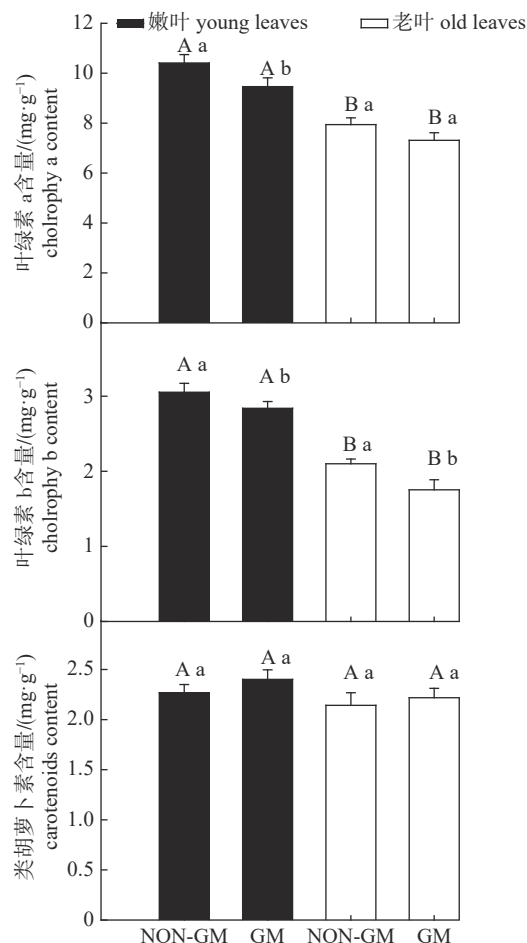


图2 转基因与非转基因白三叶叶绿素含量对比

Fig. 2 Comparison of chlorophyll content between transgenic and non-transgenic white clover

叶的气孔导度显著高于非转基因白三叶 ($P<0.05$), 非转基因白三叶老叶的气孔导度显著高于其嫩叶 ($P<0.05$)。

2.4 转基因与非转基因白三叶长期水分利用效率的比较

由表1可知:转基因白三叶干物质质量显著高于非转基因白三叶 ($P<0.05$); 转基因白三叶总需水量显著高于非转基因白三叶 ($P<0.05$); 转基因白三叶长期 WUE 显著高于非转基因白三叶 ($P<0.05$)。

2.5 转基因白三叶各指标相关性分析

转基因白三叶老叶的脱落酸含量与叶绿素转 *LeNCED1* 基因对白三叶 ABA 含量及水分利用效率的影响、光合指标、干物质质量、总需水量和长期水分利用效率的相关性分析得出:脱落酸含量与气孔导度、胞间 CO_2 浓度和蒸腾速率等指标呈显著负相关 ($P<0.05$), 而与总需水量和长期水

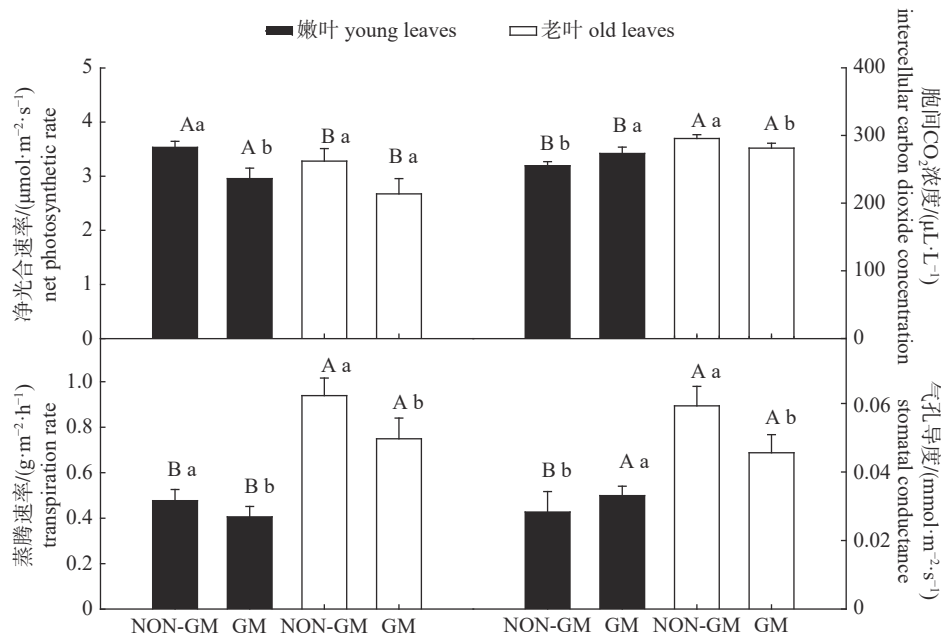


图 3 转基因与非转基因白三叶光合特性对比

Fig. 3 Comparison of photosynthetic characteristics between transgenic and non-transgenic white clover

表 1 转基因白三叶和非转基因白三叶干物质、总需水量和长期水分利用效率 (WUE) 的比较

Tab. 1 Comparison of dry matter, total water requirement and long-term water use efficiency (WUE) of transgenic white clover and non-transgenic white clover

材料	干物质量/g amount of dry matter	总需水量/g total water demand	WUE
转基因 GM	5.15±2.34 a	3 655.23±944.77 a	0.525±0.107 a
非转基因 NON-GM	2.35±1.90 b	2 205.05±894.95 b	0.295±0.132 b

注：同列中不同小写字母差异显著水平 $P<0.05$ 。
Notes: The difference between the different lowercase letters in the same columns is significant $P<0.05$.

分利用效率呈显著正相关 ($P<0.05$)。脱落酸含量与叶绿素 a 虽呈负相关,但相关性不显著 ($P>0.05$)。

3 讨论

脱落酸与植物生长发育调控、气孔开闭以及对逆境适应和抵御之间关系密切,是一种非常重要的激素调节物质^[9-10]。研究表明: *NCED* 通过调控 ABA 合成在植物的抗逆抗旱中起着重要的作用^[11]。在烟草中表达柑橘 *NCED* 基因,可以增加正常和干旱模式下的 ABA 含量^[12]。 *LeNCED1* 是番茄中调控 ABA 生物合成的关键基因^[13],水分胁迫能诱导番茄叶片和根中 *LeNCED1* 基因表达^[14],在烟草和番茄中过量表达 *LeNCED1* 能提高转基因植物的 ABA 含量^[15]。本研究转 *SAG₁₃-LeNCE-*

DI 基因的白三叶与非转基因白三叶嫩叶中的 ABA 含量无显著差异,但是转基因白三叶老叶中的 ABA 含量显著高于非转基因白三叶老叶中 ABA 含量。这主要是因为本研究使用了 *SAG₁₃* 启动子, *SAG* 是指在衰老期间表达呈上升趋势的基因, I 型 *SAG* 特指仅在衰老过程中表达的基因, II 型 *SAG* 是指在衰老前有表达,在接收到衰老诱导后上升表达的基因。本试验使用的启动子属于 I 型 *SAG*。孔祥强等^[15]研究表明: 转录 *SAG* 因子的棉花对其早期光合作用基因大多下调表达,叶绿体和叶绿素降解基因大多上调表达,减弱了叶片的光合作用,使植物在初生阶段出现失绿情况。本研究结果也得到了相似的结论,转基因白三叶嫩叶的叶绿素 a 和叶绿素 b 含量均显著低于非转基因嫩叶,转 *SAG₁₃-LeNCED1* 基因导致白三叶嫩叶叶片出现失绿的现象。转基因与非转基因老叶中除叶绿素 b 的含量外,叶绿素 a 和类胡萝卜素的含量差异都不显著。同时,转 *SAG₁₃-LeNCED1* 基因导致白三叶嫩叶的净光合速率均出现显著下降的趋势。研究表明: ABA 能诱导气孔关闭,降低叶片的蒸腾作用,但会降低胞间 CO_2 浓度,影响光合作用效率^[16]。本研究表明: 转 *SAG₁₃-LeNCED1* 基因能显著降低老叶的气孔导度、胞间 CO_2 浓度和蒸腾速率。说明转 *SAG₁₃-LeNCED1* 基因在老叶片表达,白三叶老叶 ABA

含量显著增高,从而抑制了气孔的开放,降低了老叶中的蒸腾速率,使白三叶蓄水能力增强,提高了白三叶老叶片的长期水分利用效率,从而提高白三叶的抗旱能力。

4 结论

转 *SAG₁₃-LeNCED1* 基因可显著提高白三叶老叶片的 ABA 含量,降低白三叶老叶的蒸腾速率,提高白三叶的水分利用效率,对白三叶在种植过程中的节水抗旱具有重要的实际意义。该研究结果为今后进一步研究 *LeNCED1* 基因和植物的水分利用效率奠定了一定的理论基础。

[参考文献]

- [1] 陈丽丽,王明玖,何丽君,等.高加索三叶草、白三叶及其杂种F₁代的RAPD分析[J].中国草地学报,2011,33(5): 40.
- [2] 赵桂琴,王锁民,任继周.白三叶转基因及其生态适应性研究进展[J].生态学报,2004,24(3): 592. DOI: [10.3321/j.issn:1000-0933.2004.03.029](https://doi.org/10.3321/j.issn:1000-0933.2004.03.029).
- [3] 李亚萍,谢欢,雍斌,等.两个白三叶品种抗旱生理研究[J].中国草地学报,2017,39(1): 63. DOI: [10.16742/j.zgdx.2017-01-10](https://doi.org/10.16742/j.zgdx.2017-01-10).
- [4] 赵翔,李娜,王棚涛,等.脱落酸调节植物抵御水分胁迫的机制研究[J].生命科学,2011,23(1): 115. DOI: [10.13376/j.cbbs/2011.01.008](https://doi.org/10.13376/j.cbbs/2011.01.008).
- [5] 田亚然,薛璟祺,赵家昱,等.叶子花脱落酸生物合成关键酶基因NCED的克隆及调节开花功能初探[J].西北植物学报,2015,35(6): 1106. DOI: [10.7606/j.issn.1000-4025.2015.06.1106](https://doi.org/10.7606/j.issn.1000-4025.2015.06.1106).
- [6] TUNG S A, SMEETON R, WHITE C A, et al. Over-expression of *LeNCED1* in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) with the *rbcS3C* promoter allows recovery of lines that accumulate very high levels of abscisic acid and exhibit severe phenotypes[J]. Plant, Cell & Environment, 2008, 31(7): 968. DOI: [10.1111/j.1365-3040.2008.01812.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2008.01812.x).
- [7] 孙宽莹,陈彦.植物内源激素的分析方法[J].湖北农业科学,2011,50(18): 3681. DOI: [10.3969/j.issn.0439-8114.2011.18.003](https://doi.org/10.3969/j.issn.0439-8114.2011.18.003).
- [8] 张宪政.植物叶绿素含量测定——丙酮乙醇混合液法[J].辽宁农业科学,1986(3): 26.
- [9] DAVIES W. Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil[J]. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1991, 42(1): 55. DOI: [10.1146/annurev.arplant.42.1.55](https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.42.1.55).
- [10] CHANDLER P. Gene expression regulated by abscisic acid and its relation to stress tolerance[J]. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1994, 45(1): 113. DOI: [10.1146/annurev.arplant.45.1.113](https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.45.1.113).
- [11] ZHU C F, KAUDER F, RÖMER S, et al. Cloning of two individual cDNAs encoding 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase from *Gentiana lutea*, their tissue-specific expression and physiological effect in transgenic tobacco[J]. Journal of Plant Physiology, 2007, 164(2): 195. DOI: [10.1016/j.jplph.2006.02.010](https://doi.org/10.1016/j.jplph.2006.02.010).
- [12] XIAN L H, SUN P P, HU S S, et al. Molecular cloning and characterization of *CrNCED1*, a gene encoding 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase in *Citrus reshni*, with functions in tolerance to multiple abiotic stresses[J]. Planta, 2014, 239(1): 61. DOI: [10.1007/s00425-013-1963-4](https://doi.org/10.1007/s00425-013-1963-4).
- [13] THOMPSON A J, THORNE E T, BURBIDGE A, et al. Complementation of *Notabilis* an abscisic acid-deficient mutant of tomato: importance of sequence context and utility of partial complementation[J]. Plant, Cell and Environment, 2004, 27(4): 459. DOI: [10.1111/j.1365-3040.2003.01164.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2003.01164.x).
- [14] THOMPSON A J, JACKSON A C, PARKER R A, et al. Abscisic acid biosynthesis in tomato: regulation of zeaxanthin epoxidase and 9-*Cis*-epoxycarotenoid dioxygenase mRNAs by light/dark cycles, water stress and abscisic acid[J]. Plant Molecular Biology, 2000, 42(6): 833. DOI: [10.1023/a:1006448428401](https://doi.org/10.1023/a:1006448428401).
- [15] 孔祥强,罗振,李存东,等.棉花早衰的分子机理研究进展[J].棉花学报,2015,27(1): 71.
- [16] SMART C M. Gene express during leaf senescence[J]. NewPhytol,1994,126:419.DOI:[10.1111/j.1469-8137.1994.tb04243.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1994.tb04243.x).

责任编辑: 何承刚