

转火龙果过氧化氢酶基因烟草植株 的获得及其抗旱性分析^①

葛菲^{1,2}, 聂琼², 乔光²,
张婷², 吴艳², 文晓鹏²

1. 贵州大学 生命科学学院, 贵阳 550025;

2. 贵州大学农业生物工程研究院/山地植物资源保护与种质创新省部共建教育部重点实验室, 贵阳 550025

摘要: 根据前期克隆的火龙果过氧化氢酶基因(*HuCAT*)设计特异引物, 从克隆载体 PMD18T-*HuCAT* 中扩增出特异带, 将其连入植物表达载体 pSH737, 构建了 CaMV35s 启动子驱动的表达载体 pSH737-*HuCAT*; 采用农杆菌介导法转化烟草, 获得 37 个抗性植株, 经 GUS 组织化学染色及 PCR 扩增鉴定, 有 29 个株系为转基因植株; 经半定量 RT-PCR 及荧光定量 PCR 检测, 筛选出高表达株系 22 个; 以 PEG-6000 溶液模拟干旱胁迫条件, 测定转基因烟草的抗旱相关生理指标, 结果显示, 转基因烟草 CAT 活性、SOD 活性、POD 活性、PRO 含量和相对含水量均高于野生型烟草, MDA 含量低于野生型烟草, 表明转 *HuCAT* 基因可能提高了烟草的抗旱性。

关键词: 火龙果; *CAT* 基因; 植物表达载体; 遗传转化; 烟草; 基因表达

中图分类号: Q291; Q786

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2016)11-0057-07

逆境胁迫严重影响植物的分布、生长发育及品质的形成^[1-2]. 在逆境胁迫下, 植物积累了大量的活性氧(ROS), 从而导致蛋白质、膜脂、DNA 及其他细胞组分的严重损伤. 过氧化氢酶(CAT)属血红素蛋白酶类, 它的主要作用就是催化 H_2O_2 分解为 H_2O 与 O_2 , *CAT* 基因的过量表达可有效清除植株体内的 ROS, 提高其对氧化胁迫的抗性^[3-5].

火龙果(*Hylocereus undulatus*)为仙人掌科三角柱属的果用栽培种, 原产于中美洲热带沙漠地区, 耐热耐旱, 具有很高的利用价值^[6-7]. 前期工作中, 我们克隆了火龙果 *CAT* 基因(*HuCAT*), 并在 mRNA 水平上分析了该基因与非生物胁迫的关系^[8]. 本研究拟构建 *HuCAT* 的植物表达载体, 并通过遗传转化模式植物烟草, 以 PEG-6000 溶液模拟干旱胁迫处理, 对转基因烟草的生理指标进行分析, 以期进一步探讨 *HuCAT* 的高效超表达提高烟草植物抗逆性的潜在功能.

1 材料与方法

1.1 植物材料

烟草(*Nicotiana tabacum* ‘Xanthin’)种子由贵州大学农业生物工程研究院基因工程分室提供, 无菌苗由种子萌发培养保存, 选取继代生长 2~3 周烟草无菌苗的幼嫩叶片为外植体.

① 收稿日期: 2016-02-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31260464, 31560549); 贵州省留学人员科技活动项目(2014-04).

作者简介: 葛菲(1989-), 女, 安徽安庆人, 硕士研究生, 主要从事植物分子细胞生物学研究.

通信作者: 文晓鹏, 教授.

1.2 菌株及试剂

大肠杆菌 DH5 α 菌株购于天根生物科技有限公司; 农杆菌菌株 LBA4404 和植物表达载体 pSH737 由贵州大学农业生物工程研究院基因工程分室惠赠; 含有目的基因的克隆载体 PMD18T-*HuCAT* 由本实验室保存; PowerUp SYBR Green Master Mix 试剂盒购于 Applied Biosystems 公司; 高保真 PCR 酶 KOD-Plus-Neo 购于 TOYOBO 公司, LA Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶 *Xba* I、*Eco*R I 购于 Takara 公司, T4 DNA 连接酶购于 Promega 公司。

1.3 植物表达载体的构建

根据 *HuCAT* (GeneBank: KF887150.1) 完整开放阅读框序列结合 pSH737 表达载体上的酶切位点, 利用 Primier 5.0 软件设计全长扩增引物, 并分别在上下游引物 5' 和 3' 端引入 *Eco*R I、*Xba* I 酶切位点。基因扩增引物: 上游引物 *HuCAT*-F: 5'-GCTCTAGAATGGATCCTTACAAGCA-3', 下游引物 *HuCAT*-R: 5'-CGGAATTCTCACATGGTTGGCCTCA-3'。以含有 *HuCAT* 基因全长的质粒为模板进行 PCR 扩增。由于 KOD-Plus-Neo 高保真酶扩增产物为平滑末端, 为了与“T”克隆载体连接, 使用 LA Taq DNA 聚合酶对扩增克隆目的片段 3' 端进行加 A 反应。通过 TA 克隆连接到 PGEM-T vector 上, 转化大肠杆菌 DH5 α 后挑菌落提取质粒进行酶切鉴定及测序, 构成中间载体 PGEM-T-*HuCAT*。利用 *Eco*R I 和 *Xba* I 酶分别双酶切 PGEM-T-*HuCAT* 与 pSH737 质粒, 酶切产物纯化后, 用 T4 DNA 连接酶 4 °C 过夜连接, 转化 DH5 α 后鉴定阳性克隆送测序, 获得重组质粒 pSH737-*HuCAT*。

1.4 重组子转化烟草及鉴定

通过冻融法^[9]将重组子导入农杆菌 LBA4404 感受态细胞中, 再利用叶盘法转化烟草, 经过卡那霉素筛选的抗性芽长至 1~2 cm 高时切下转入生根培养基中诱导生根。利用 GUS 组织化学染色及 PCR 检测目的基因的整合情况。设计特异性引物 (*cat6f*: 5'-AATAGATCCCAGGAACCACCA-3', *cat6r*: 5'-ACCCA-GAGAGCCTCAACACC-3'), 以提取的烟草 DNA 为模板对转基因植株进行 PCR 检测, PCR 检测体系: 2 \times Master Mix 5 μ L, 模板 DNA 25 ng, 正反向引物各 0.5 μ mol/L, 加入 ddH₂O 至 10 μ L。反应条件: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 60 s, 共 28 个循环; 72 °C 度延伸 5 min。经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。

1.5 转基因植株中 *HuCAT* 基因的表达分析

采用半定量 RT-PCR 及荧光定量 PCR 检测目的基因的相对表达量。以烟草 β -actin 作为内参基因, PCR 反应体系同 1.4。反应条件: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 60 s, 共 27 个循环; 72 °C 度延伸 5 min。引物序列如下:

内参基因引物序列:

β -actin-F: 5'-GCCATCAGCAACAAATACCA-3'

β -actin-R: 5'-GCCTCATCACCAACATAAGCA-3'

目的基因引物序列:

cat6f: 5'-AATAGATCCCAGGAACCACCA-3'

cat6r: 5'-ACCCAGAGAGCCTCAACACC-3'

采用荧光定量 PCR 进一步分析转基因植株的表达特性。PCR 反应体系为 10 μ L: PowerUp SYBR Green Master Mix: 5 μ L, ddH₂O: 4.1 μ L, 正反向引物各 0.25 μ mol/L, cDNA 100 ng。反应条件: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 10 s, 60 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 20 s, 共 40 个循环; 熔解曲线测定为从 65 °C 到 95 °C。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因的相对表达量。引物序列如下:

内参基因引物序列:

β -actin-F: 5'-GCCATCAGCAACAAATACCA-3'

β -actin-R: 5'-GCCTCATCACCAACATAAGCA-3'

atp A-F: 5'-ATAGAGGTGCAAGGCTGACA-3'

atp A-R: 5'-TTGTAGTAATTCTGGTTTGACAC-3'

目的基因引物序列:

Cat2f: 5'-CCCACATCGTCTGAAGAGCCA-3'

Cat2r: 5'-CCACGCATTCAAGCCAAACC-3'

1.6 转基因烟草抗旱生理生化指标测定

选择生长一致的过表达转基因株系 T6 和野生型烟草, 在温室内盆栽(基质: 营养土)培养至 6 片成熟叶后, 分别加入 20% (w/v) PEG-6000 溶液模拟干旱胁迫处理. 20 d 后选取烟草植株中大小相近的叶片测定各项生理生化指标. 每处理 3 株, 重复 3 次, 数据分析用 SPSS 22.0 和 Excel 进行处理.

组织相对含水量(RWC)测定: 参照高俊凤^[10]的方法测定.

参照苏州科铭试剂盒说明书测定过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化物酶(POD)活性, 以及脯氨酸(PRO)和丙二醛(MDA)含量.

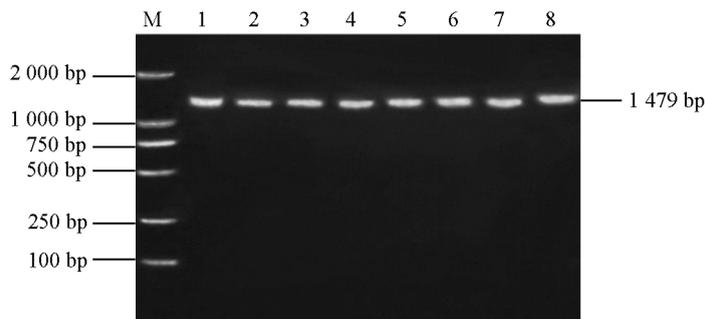
2 结果与分析

2.1 *HuCAT* 的 T 载体克隆与测序验证

以 PMD18T-*HuCAT* 为模板, 利用高保真酶进行扩增, 电泳检测 *HuCAT*, 扩增产物大小为 1479 bp (图 1). 测序结果表明, 该产物与 GeneBank 中该基因的序列一致. 回收目的片段连接到 PGEM-T 上并转化大肠杆菌, 经测序表明, 序列无移码或突变.

2.2 植物表达载体的构建及鉴定

PGEM-T-*HuCAT* 和提取的 pSH737 质粒载体分别使用 *EcoR* I、*Xba* I 双酶切, 电泳检测酶切产物. 结果表明(图 2), PGEM-T-*HuCAT* 质粒酶切后, 得到大小两个片段, 小片段的大小约为 1500 bp 左右, 条带与预期大小相符, pSH737 质粒经双酶切后得到单一的大片段条带. 回收大、小片段后用 T4 DNA 连接酶进行连接得到表达载体 pSH737-*HuCAT*, 酶切鉴定, 得到约 1500bp 的 *HuCAT* 基因片段. 将鉴定结果为阳性的表达载体测序, 进一步确定序列无移码或突变发生, 插入方向正确, 表明植物表达载体构建成功. 转化农杆菌同样扩增出约 1500 bp 的条带, 表明表达载体已导入根癌农杆菌.



M: 2000bp DNA Ladder; 1-8: 引物扩增片段.

图 1 *HuCAT* 序列高保真 PCR 扩增的琼脂糖凝胶图

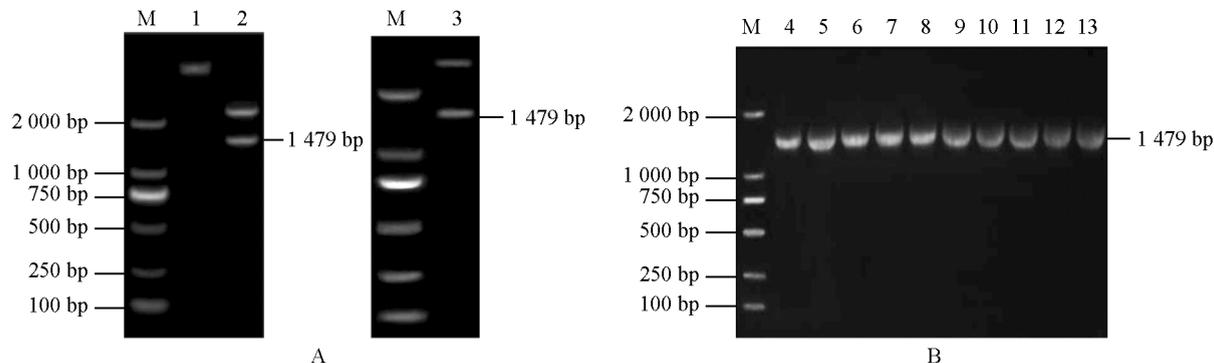
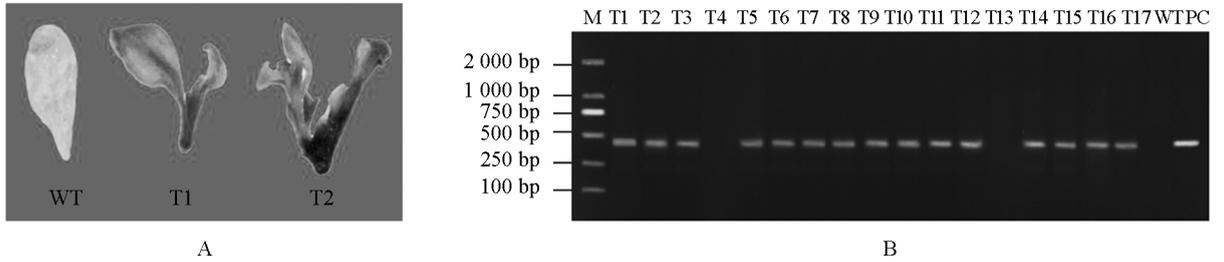


图 2 PGEM-T-*HuCAT*、pSH737 与 pSH737-*HuCAT* 质粒载体的双酶切(A)和重组子菌落 PCR(B)

2.3 转基因植株的鉴定

对抗性植株进行 GUS 组织化学染色, 结果显示, 37 个抗性克隆中有 29 株的叶片呈蓝色, 而野生型叶片未出现蓝色(图 3A). 对 GUS 染色呈阳性的植株, 提取总 DNA 进行目的基因的 PCR 检测, GUS 检测呈阳性的 29 个克隆与阳性对照均扩增出目的条带, 而阴性对照野生型烟草未扩增出特异带(图 3B), 说明

GUS 和 PCR 检测结果一致。

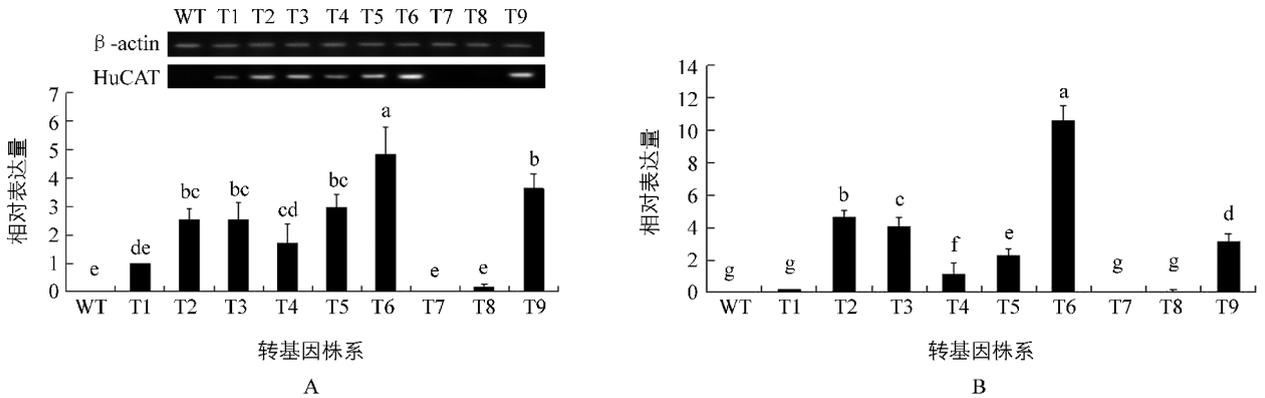


M: 2000bp DNA Ladder; T1-T17: *HuCAT*; PC: pSH737-*HuCAT* 农杆菌质粒。

图 3 抗性植株的 GUS 组织化学染色(A)及 PCR 检测(B)

2.4 转基因植株中 *HuCAT* 的表达分析

采用半定量 RT-PCR 与荧光定量 PCR, 对 *HuCAT* 进行表达分析. 两种方法检测都表明, 与野生型比较, 在得到的 29 个转基因株系中有 22 个株系 *HuCAT* 的表达量显著提高, 其中 T6、T11、T13 等 13 个株系的表达量较高, T2、T3、T10 等 9 个株系次之; T1、T8、T12 等 7 个株系增强不显著, 其中 T7、T22 植株中不表达(图 4). 因此, 通过农杆菌介导法获得了 22 个 *HuCAT* 高表达的转基因烟草植株。



同一小图中不同英文字母表示差异显著($p < 0.05$)。

图 4 转基因烟草株系外源 *HuCAT* 表达的半定量 RT-PCR(A)及定量(B)分析

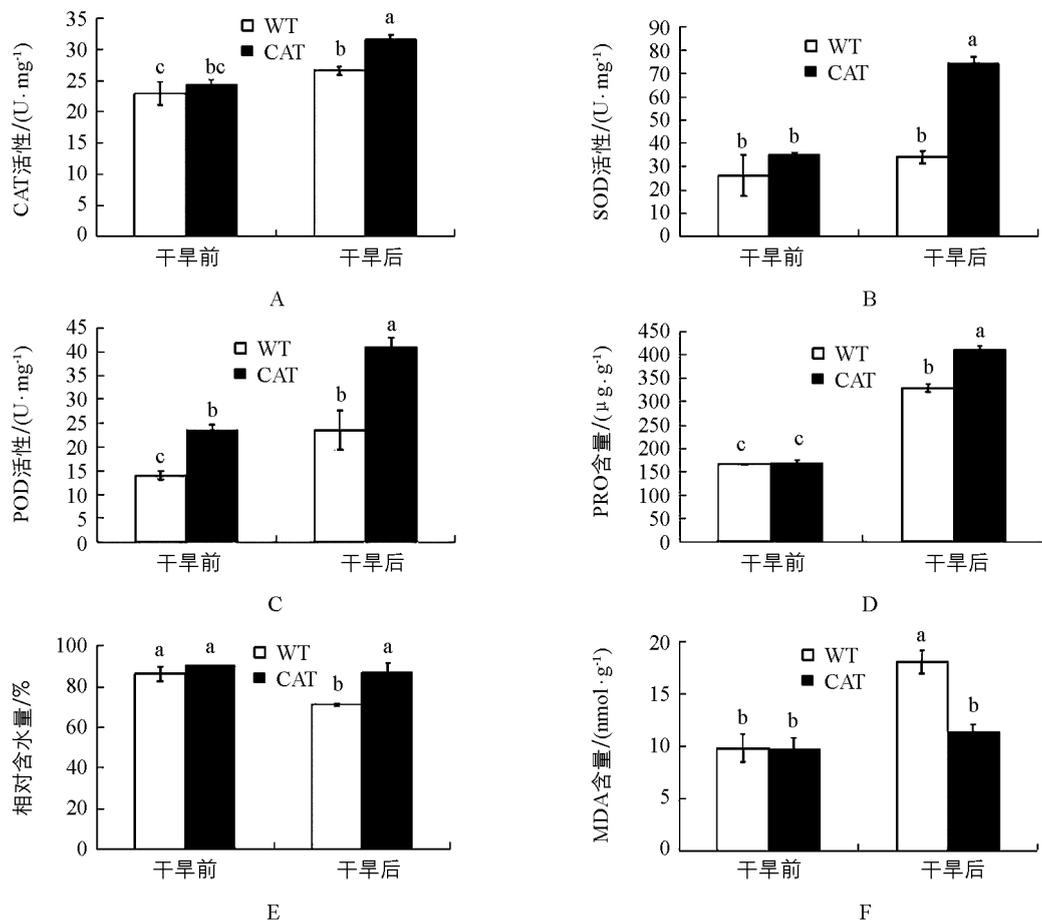
2.5 干旱胁迫对转基因烟草生理生化指标的影响

结果显示, 与野生型植株相比, 干旱处理前转 *HuCAT* 基因的各项理化指标无显著差异(POD 活性除外); 干旱处理后转 *HuCAT* 基因烟草的 CAT 活性(图 5A)、SOD 活性(图 5B)、POD 活性(图 5C)、PRO 含量(图 5D)和相对含水量(图 5E)均显著高于野生型, 而转基因植株 MDA 含量(图 5F)低于野生型, 表明干旱胁迫下, 转 *HuCAT* 基因能显著提高植株的抗氧化能力及抗旱性。

3 讨论

我国的水资源时空分布极不均匀, 每年都会因为缺水造成国民经济的重大损失, 干旱是引起作物减产最主要的非生物逆境. 因此从分子层面研究植物耐旱机理, 克隆耐旱相关基因并应用于转基因可成为改良作物耐旱性的有效渠道^[11-12]. 转基因育种具有周期短、目的性强的特点, 能够准确地将目的基因整合到宿主植物内, 大大拓宽了作物遗传改良可利用的基因来源^[13].

根据 CAT 基因命名的分类方法^[14], 本文研究的 *HuCAT* 编码的酶属于 II 类过氧化氢酶, 主要在火龙果成熟茎中表达, 可清除光呼吸产生的 H_2O_2 . 经 *HuCAT* 氨基酸序列及理化性质预测, *HuCAT* 编码 492 个氨基酸, 分子量为 57.03KDa, 理论等电点为 7.03, 属稳定蛋白. 经 *HuCAT* 氨基酸同源性分析, 火龙果 *catalase* 与其他物种的 cDNA 序列以及推测的氨基酸序列同源性高达 73~77% 和 75~80%. *HuCAT* 具有保守的过氧化氢酶结构域和催化位点, 系统发育树分析显示其与枇杷树(*Eriobotrya japonica*)CAT 基因、龙眼(*Dimocarpus longan*)CAT 基因、烟草(*Nicotiana tabacum*)CAT1 基因同源性很高^[8]. *HuCAT* 氨基酸序列的 C-端有一个与过氧化物酶体靶向序列 1(PTS1)相似的 TRL 序列(Thr-Arg-Leu), 过氧化氢酶通



A, B, C, D, E, F 代表 CAT 活性、SOD 活性、POD 活性、PRO 含量、相对含水量和 MDA 含量。

同一小图中不同英文字母表示差异显著 ($p < 0.05$)。

图 5 转 *HuCAT* 基因烟草的抗旱前后生理生化特征变化

常定位于过氧化物酶体中, 因此 *HuCAT* 合成的过氧化氢酶可能通过 PTS1 系统进入过氧化物酶体, 进而维持体内 H_2O_2 的氧平衡^[15]。此外 *HuCAT* 的表达量在 H_2O_2 处理条件下显著上调, mRNA 表达量与酶活性能够响应干旱、低温、高盐等逆境胁迫^[8]。在干旱等逆境条件下, CAT 是清除 H_2O_2 的主要酶类, CAT 基因上调以促进 H_2O_2 分解从而提高了植物的抗逆水平^[16]。已有很多报道证实利用基因工程手段将外源基因导入植物中, 获得的转基因植株中 CAT 基因的过量表达能不同程度地提高植物对干旱胁迫的抵抗能力, 增强植物的耐旱性^[17-19]。

本研究所用的花椰菜花叶病毒启动子 (CAMV35S) 为组成型启动子, 被广泛应用于双子叶植物转基因工程^[20]。组成型启动子调控的基因表达不受外界环境条件的影响, 能在整合到双子叶植物基因组后启动外源基因在大多数器官和不同发育时期高强度的表达, 且其在转基因的大部分组织中都有高效的表达^[21]。CAMV35S 启动子驱动的目的基因过量表达激活了许多其他胁迫基因的表达, 使得转基因植株比非转基因植株有着更强的抗旱、抗冻、抗盐的能力^[22]。

前期工作中, *HuCAT* 的功能得到了初步证实^[8]。由于火龙果同源转化体系尚未成功建立, 为了分析 *HuCAT* 的抗旱功能, 本研究依据 *HuCAT* 的编码区和植物表达载体 pSH737 上的酶切位点, 设计特异引物成功扩增了完整的开放阅读框, 将基因的编码序列插入到 pSH737 的 CAMV35S 启动子和 Nos 终止子之间, 构建了植物表达载体。将 *HuCAT* 在模式植物烟草中组成型过表达, 获得的转基因烟草将进一步解析 *HuCAT* 抗氧化性, 进而为全面揭示 *HuCAT* 的抗逆功能奠定基础, 同时也有望获得高抗旱的转基因烟草新种质。

本研究中 T7 不表达, T8 表达量也很低 (图 4), 表现出转基因沉默。前人研究表明目的基因随 T-DNA 随机整合到烟草基因组的不同位点, 会导致基因表达水平存在差异, 转基因植株中也可能出

现转基因沉默现象^[23-24]。

抗氧化酶活性的高低反映了植物对于干旱适应能力的强弱。抗氧化酶体系包括 CAT、SOD、POD 等,它们通过协同作用,清除植物体内积累的活性氧,共同抵御自由基对膜系统的伤害^[25]。本研究发现表达 *HuCAT* 基因烟草 CAT、POD 和 SOD 活性均高于野生型植株(图 5A-C),推测由于转入的 CAMV35S 启动子增强了编码 POD 和 SOD 的基因表达,从而导致 POD 和 SOD 活性得到提升。这表明转 *HuCAT* 烟草幼苗具备一定的抵御干旱逆境的能力。作为细胞膜脂过氧化程度的重要的标志物质,MDA 通常被作为判断膜脂过氧化作用的主要指标,与质膜透性变化呈正相关,细胞中丙二醛质量分数的高低反映了细胞氧化损伤的程度,可用来评价植物的抗旱性^[26-27]。本研究发现转 *HuCAT* 烟草 MDA 含量低于野生型植株(图 5F),可能是因为 CAT、POD 和 SOD 等抗氧化酶活性的提高抑制了 MDA 的合成,从而减轻细胞膜的损伤,增强抗逆性。研究表明,外源脯氨酸可以提高 CAT、POD 和 SOD 酶的活性,同时还可降低 MDA 的质量分数^[28]。干旱胁迫前,转 *HuCAT* 基因与野生型烟草的脯氨酸含量基本相同,而干旱胁迫后转基因烟草脯氨酸增量明显大于野生型烟草(图 5D)。PRO 的大量积累是其主动进行渗透调节的一种反应,也反映出其对干旱环境的适应性变化,提高了其抗逆适应性。此外,研究表明,RWC 值越大,下降速率越小,植物抗旱性越强。干旱胁迫下植物 RWC 是衡量植物水分状况和研究植物抗旱能力比较稳定的生理指标,可直接反映缺水时植物体内的水分损失情况^[29-30]。本研究中野生型和转 *HuCAT* 烟草的叶片相对含水量在干旱胁迫下均呈下降趋势,但转 *HuCAT* 烟草的下降速率小于野生型烟草,且转基因烟草叶片相对含水量显著高于野生型烟草(图 5E),这说明转 *HuCAT* 烟草叶片具有较强的保水能力,幼苗较野生型植株更抗旱。

参考文献:

- [1] FARIDUDDIN Q, KHANAM S, HASAN S A, et al. Effect of 28-Homobrassinolide on Drought Stress-Induced Changes in Photosynthesis and Antioxidant System of *Brassica juncea* L. [J]. Acta Physiol Plant, 2009, 31(5): 889-897.
- [2] 郭利娜,张锐,孙国清. cyFBPase 基因过表达提高转基因烟草的抗旱性 [J]. 生物技术通报, 2013, (11): 63-68.
- [3] BAJJI M, KINET J M, LUTTS S. The Use of the Electrolyte Leakage Method for Assessing Cell Membrane Stability as a Water Stress Tolerance Test in Durum Wheat [J]. Plant Growth Regulation, 2002, 36(1): 61-70.
- [4] 时丽冉,刘志华. 干旱胁迫对苜蓿菜抗氧化酶和渗透调节物质的影响 [J]. 草地学报, 2010, 18(5): 673-677.
- [5] 杜秀敏,殷文璇,赵彦修,等. 植物中活性氧的产生及清除机制 [J]. 生物工程学报, 2001, 17(2): 121-125.
- [6] 王彬,蔡永强,郑伟. 火龙果果实氨基酸含量及组成分析 [J]. 中国农学通报, 2009, 25(8): 210-214.
- [7] TAO J, QIAO G, WEN X P, et al. Characterization of Genetic Relationship of Dragon Fruit Accessions (*Hylocereus* spp.) by Morphological Traits and ISSR Markers [J]. Scientia Horticulturae, 2014(170): 82-88.
- [8] NIE Q, GAO G L, FAN Q J, et al. Isolation and Characterization of a Catalase Gene "*HuCAT3*" from *Pitaya (Hylocereus undatus)* and Its Expression Under Abiotic Stress [J]. Gene, 2015, 563(1): 63-71.
- [9] 王学全,沈晓,何赞绵,等. 根瘤农杆菌 EHA105 和 LBA4404 冻融法转化条件的优化研究 [J]. 药物生物技术, 2011, 18(5): 382-386.
- [10] 高俊凤. 植物生理学实验指导 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2006: 15-16.
- [11] ISOLA N R, ARUNDHATI A, LAKSHMI T V R, et al. Gene-Chips in Plant Genetics [J]. Plant Tiss-Ue Cult, 2003, 12(2): 195-213.
- [12] 赵恢武,刘晗,于海源,等. 耐旱植物厚叶旋蒴苣苔 BDN1 脱水素基因的克隆及表达特性分析 [J]. 科学通报, 2000, 45(15): 1648-1654.
- [13] 张欣,付亚萍,周君莉,等. 水稻规模化转基因技术体系构建与应用 [J]. 中国农业科学, 2014, 47(21): 4141-4145.
- [14] WILLEKENS H, INZÉ D, VAN MONTAGU M, et al. Catalases in Plants [J]. Molecular Breeding, 1995, 1(3): 207-228.
- [15] 任伟,徐博,耿慧,等. 朝鲜碱茅过氧化氢酶基因(PuCAT)的克隆及表达分析 [J]. 北方园艺, 2014, (20): 90-95.
- [16] SHIKANAI T, TAKEDA T, YAMAUCHI H, et al. Inhibition of Ascorbate Peroxidase Under Oxidative Stress in Tobacco Having Bacterial Catalase in Chloroplasts [J]. FEBS Letters, 1998, 428(1): 47-51.
- [17] 蔡永智,祝建波,郝晓云,等. 转过氧化氢酶基因 *KatG* 棉花的抗旱性 [J]. 西北农业学报, 2013, 22(12): 56-61.
- [18] 程星,王燕雯,包爱科,等. 超表达 AVP1 基因提高转基因百脉根的耐盐性和抗旱性 [J]. 植物生理学通讯, 2010, 46(8): 808-816.
- [19] 王升平,杨金广,战徊旭,等. 烟草过氧化氢酶基因 *CAT1* 的克隆及表达特征分析 [J]. 中国烟草学报, 2014, 20(5):

103–109.

- [20] 焦改丽, 孟钊红, 聂安全, 等. 花椰菜花叶病毒(CAMV) 35s 启动子在转基因棉花中的表达 [J]. 作物学报, 2004, 30(11): 1135–1139.
- [21] MARTÍNEZ F, ARIF A, NEBAUER S G, et al. A Fungal Transcription Factor Gene is Expre-Ssed in Plants from Its Own Promoter and Improves Drought Tolerance [J]. *Planta*, 2015, 242(1): 39–52.
- [22] 朱丽萍, 于 壮, 邹翠霞, 等. 植物逆境相关启动子及功能 [J]. 遗传, 2010, 32(3): 229–234.
- [23] IYER L M, KUMPATLA S P, CHANDRASEKHARAN M B, et al. Transgene Silencing in Monocots [M]. *Plant Molecular Biology*, 2000(43): 323–346.
- [24] 罗 滨, 陈永康, 王 莹. 植物外源基因拷贝数及插入位点的检测方法与技术 [J]. 河南师范大学学报(自然科学版), 2012, 40(6): 111–116.
- [25] 杨 牟, 何 平, 段才绪, 等. 外源 SNP, Spd 对盐碱胁迫下射干幼苗体内抗氧化酶活性的影响 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2015, 37(6): 13–19.
- [26] 马文涛, 樊卫国. 贵州野生柑橘的抗旱性及其活性氧代谢对干旱胁迫的响应 [J]. 果树学报, 2014, 31(3): 394–400.
- [27] 喻泽莉, 何 平, 张春平, 等. 干旱胁迫对决明种子萌发及幼苗生理特性的影响 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2012, 34(2): 39–44.
- [28] 苏贝贝, 刘 佳, 李琳琳, 等. 外源脯氨酸对高温胁迫下半夏抗氧化酶活性及光合特性的影响 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2015, 37(12): 34–39.
- [29] 颜淑云. 紫穗槐幼苗对干旱胁迫的生理生化响应 [D]. 兰州: 兰州大学, 2010.
- [30] 王传明, 乙 引. 外源 Ca^{2+} 对喜钙植物、随遇植物和嫌钙植物 POD 活性和相对含水量的影响 [J]. 湖北农业科学, 2014, 53(10): 2347–2351.

Gain of the *HuCAT* Genetic Tobacco and Analysis on Drought Stress Resistance of Transgenic Tobacco

GE Fei^{1,2}, NIE Qiong², QIAO Guang²,
ZHANG Ting², WU Yan², WEN Xiao-peng²

1. College of Life Science, Guizhou University, Guiyang 550025, China;

2. Key Laboratory of Plant Resource Conservation and Germplasm Innovation in Mountainous Region (Ministry of Education)/ Institute of Agro-Bioengineering, Guizhou University, Guiyang 550025, China

Abstract: Based on our previous work, *HuCAT* was amplified from cloning vector PMD 18T-*HuCAT* using specific primer pair. Products were then inserted into vector pSH737 to construct sense and anti-sense plant expression vectors promoted by CaMV35S. Using *Agrobacterium tumefaciens*-mediated co-transformation method, 37 clones were harvested from the leaf discs of tobacco ('Xanthin'), among which, 29 were proven to be transgenic lines after GUS gene histochemical staining and PCR detection. With semi-quantitative PCR and real-time quantitative PCR detection, 22 transgenic lines over-expressing *HuCAT* were obtained. Some drought resistance physiology indices for transgenic tobacco were investigated under simulated drought stress conditions by using PEG-6000. The results show that the enzyme activity of CAT, SOD, POD, the content of PRO and relative content of water were higher than wild-type plants. On the contrary, the content of MDA was below it. The *HuCAT* transgenic tobacco plants could resist drought stress, which provides updated information in the role of *HuCAT* under abiotic stress.

Key words: Pitaya; *Catalase*; expression vectors; genetic transformation; tobacco; gene expression

