

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2010.00498

## 垫状卷柏海藻糖-6-磷酸合成酶基因的克隆及功能分析

林荆, 付凤玲, 蒋伟, 牟禹, 雍太明, 李晚忱

四川农业大学玉米研究所, 雅安 625014

**摘要:** 海藻糖-6-磷酸合成酶(Trehalose-6-phosphate synthase, TPS)是植物海藻糖合成途径的关键酶, 在旱生卷柏等复苏植物对逆境胁迫应答中起重要作用。文章以我国特有旱生植物垫状卷柏(*Selaginella pulvinata*)为材料, 采用同源扩增与 RACE 技术相结合的方法克隆了海藻糖-6-磷酸合成酶基因 *SpTPSI*, cDNA 全长 3 223 bp, 包括一个 2 790 bp 的开放阅读框, 推导的氨基酸序列与模式物种的海藻糖-6-磷酸合成酶具有较高的序列相似性, 催化活性中心保守位点基本一致。酵母功能互补实验证明, 用 *SpTPSI* 基因开放阅读框转化的海藻糖合成酶基因突变(*tps1*△)酵母菌株, 可恢复在以葡萄糖作为唯一碳源培养基上的生长, 说明垫状卷柏海藻糖-6-磷酸合成酶基因 *SpTPSI* 的编码蛋白具有生物活性, 可应用于植物抗逆性的转基因改良。

**关键词:** 垫状卷柏; 海藻糖-6-磷酸合成酶; 基因克隆; 功能

## Cloning and functional analysis of trehalose -6-phosphate synthase gene from *Selaginella pulvinata*

LIN Jing, FU Feng-Ling, JIANG Wei, MU Yu, YONG Tai-Ming, LI Wan-Chen

Maize Research Institute, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China

**Abstract:** Trehalose-6-phosphate synthase, a key enzyme in trehalose synthesis pathway of plant, plays an important role in response to abiotic stress in xerophilous rock lily and other resurrection plants. In this study, homologous amplification and RACE technique were used to clone gene *SpTPSI* for trehalose-6-phosphate synthase from *Selaginella pulvinata*, which is an endemic xerophilous plant in China. The full-length cDNA is 3 223 bp long, containing an open reading frame (ORF) of 2 790 bp. Protein sequence comparison showed that the putative amino acid sequence of this ORF shares high similarity to trehalose-6-phosphate synthases of model species, especially at the conserved sites of catalytic activity centers. Yeast functional complementation test showed that trehalose-6-phosphate synthase mutant (*tps1*△), transformed by the ORF of *SpTPSI* gene, can restore growth on the medium supplemented with glucose as a sole carbon source. This result indicated that *SpTPSI* of *S. pulvinata* encodes for an active protein and is hopeful to be applied in transgenic improvement of abiotic stress tolerance in plant.

**Keywords:** *Selaginella pulvinata*; trehalose-6-phosphate synthase; gene cloning; function

干旱是许多作物生产的主要限制因素。通过品种改良提高作物品种耐旱能力, 是克服干旱危害最为经济有效的方法。然而, 大多数作物的品种间耐

旱性差异只是相对的, 即使耐旱性最强的种质材料, 往往也不能满足生产上对品种耐旱性的要求。而且, 耐旱性一般是微效多基因控制的数量性状, 遗传改

收稿日期: 2009-10-09; 修回日期: 2009-12-02

基金项目: 国家科技重大专项(编号: 2009ZX08003-012B)和国家自然科学基金项目(编号: 30671309)资助

作者简介: 林荆(1982-), 女, 硕士研究生, 专业方向: 生物化学与分子生物学。E-mail: linjingwang2008@163.com

通讯作者: 李晚忱(1958-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 玉米遗传育种与生物技术。Tel: 0835-2882526; E-mail: aumdym@sicau.edu.cn

良比较困难,多年来进展不大。转基因技术可以打破物种间生殖隔离,转化利用其他物种有益基因。国内外曾用 *SOD*、*DREB* 等多种抗逆耐旱基因转化水稻、玉米等作物,试图提高其耐旱性。但因这些基因耐旱能力不够强,耐旱机制与作物生理代谢不协调等原因,转基因后代的耐旱性不能达到农业生产要求<sup>[1]</sup>。开发利用耐旱能力更高,适宜作物生理代谢机制与农业生产要求,且具有自主知识产权的耐旱基因,是我国转基因耐旱作物品种培育的技术关键。

许多微生物可在干旱、高温、高盐碱等恶劣环境条件下长期生存,与细胞内高浓度海藻糖含量密切相关。海藻糖是由两个葡萄糖残基经  $\alpha$ -1,1 糖苷键连接的非还原二糖,无毒无臭,略带甜味。海藻糖的非还原性决定其对酸、碱、高温的稳定性。海藻糖可与 2 个水分子结合形成玻璃态结构,吸水性比蔗糖、麦芽糖、葡萄糖和果糖大 3 倍以上。在生物体内,海藻糖具有很强的抗脱水作用,在干旱、寒冷、高盐碱条件下可保护生物膜、蛋白质等免受伤害<sup>[2,3]</sup>。在食品、化妆品和医药工业上,海藻糖是理想的低热量糖,并具有防腐保鲜作用,只因价格昂贵,一般较少添加。

大肠杆菌海藻糖的合成,先由 *otsA* 基因编码的海藻糖-6-磷酸合成酶(Trehalose-6-phosphate synthase, TPS)催化 UDP-葡萄糖与 6-磷酸葡萄糖经  $\alpha$ -1,1 糖苷键连接合成 6-磷酸海藻糖,再由 *otsB* 基因编码的海藻糖-6-磷酸磷酸酯酶(trehalose-6-phosphate phosphatase, TPP)转化为海藻糖<sup>[4]</sup>。在酵母菌中,参与海藻糖合成的 TPS 和 TPP 酶,以及 TSL1 和 TPS3 两个调节亚基,组成海藻糖合成复合体,催化海藻糖合成。但是,TPS 酶单体也具有海藻糖合成活性<sup>[5]</sup>。

在蕨类植物中,卷柏科卷柏属一些旱生种 TPS 酶活性较高,在干旱条件下体内海藻糖含量可高达 20%。Zentella 等<sup>[6]</sup>从卷柏科旱生种复活卷柏(*Selaginella lepidophylla*)中克隆出 TPS 酶基因 *SITPS1*,并用相应的酵母突变体进行功能互补实验,证实它具有生物活性。2005 年,我们从川西南太平洋季风背风坡干热河谷气候带,海拔 1 500 m 的向阳干燥岩石裸露地采集到一种复苏蕨类植物,经鉴定为耐旱性极强的垫状卷柏(*Selaginella pulvinata* Maxim),干旱时卷曲如枯死状,湿润时迅速恢复生长,民间素称九死还魂草。目前,尚未见垫状卷柏 TPS 酶基因克隆的相关报道。因为真核与原核生物遗传密码子偏爱性

的差异,植物来源的 TPS 酶基因比微生物来源的基因更容易在作物体内高效表达。本研究以我国特有旱生植物垫状卷柏为材料,采用同源扩增与 RACE 技术相结合的方法克隆 TPS 酶基因,以期能为植物抗逆性的转基因改良提供外源基因。

## 1 材料和方法

### 1.1 垫状卷柏 *SpTPS1* 基因的克隆

取垫状卷柏叶片,用 Trizol 试剂(Invitrogen, 上海)提取分离 RNA。以此作模板,设计加接头的 oligod(T)[5'-GCTGTCAACGATACGCTACGTACGGCATGACAGTG(T)<sub>18</sub>-3']作引物,用反转录试剂盒 PrimeScript<sup>TM</sup> Reverse Transcriptase(TaKaRa, 大连)合成 cDNA 第一链。然后,按图 1 所示步骤,先设计简并引物 DP1(5'-TGGTCGTAAGGTTATGTTGGG-3')和 DP2(5'-TGTTCGGGCATTGTTGTCA-3'),PCR 扩增 *SpTPS1* 基因 cDNA 中间片段。根据中间片段测序结果,设计扩增 3'端上游的特异引物 S1(5'-GCCATCAGAGAAGCGGTTACT-3'),与 3'端通用引物(5'-ATGCA TGCCGTACTGTCAC-3')一起,扩增 *SpTPS1* 基因 cDNA 的 3'端片段。根据复活卷柏海藻糖-6-磷酸合成酶基因 *SITPS1* 的序列(GenBank 注册号: AB368491.1)<sup>[6]</sup>和中间片段测序结果,分别设计上游同源引物 S3(5'-ATCGGATGGCCTGGTGTCTATG-3')和下游特异引物 S4(5'-TCTTTTCATTTTGACAGGCGAC-3'),扩增 *SpTPS1* 基因 cDNA 中间片段 5'端一侧的片段。再根据这一片段的测序结果和 5'端反转录接头引物,分别设计下游特异引物 S6(5'-GCGGTCTTCTTGACGCAATCCAATGTAG-3')和上游通用引物(5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'),扩增 *SpTPS1* 基因 cDNA 的 5'端片段。最后,用 DNAMAN 软件(LynnonBiosoft, USA)拼接上述 4 个扩增片段,得到 *SpTPS1* 基因全长 cDNA 序列。

用 NCBI 网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)的 ORF Finder 软件,分析全长 cDNA 序列,得到 *SpTPS1* 基因开放阅读框(Open reading frame, ORF),并以此推导氨基酸序列,用 NCBI 网站的 BlastN 软件与近缘物种和模式物种 TPS1 酶的氨基酸序列作序列相似性比对。再根据 ORF 序列,设计引入表达载

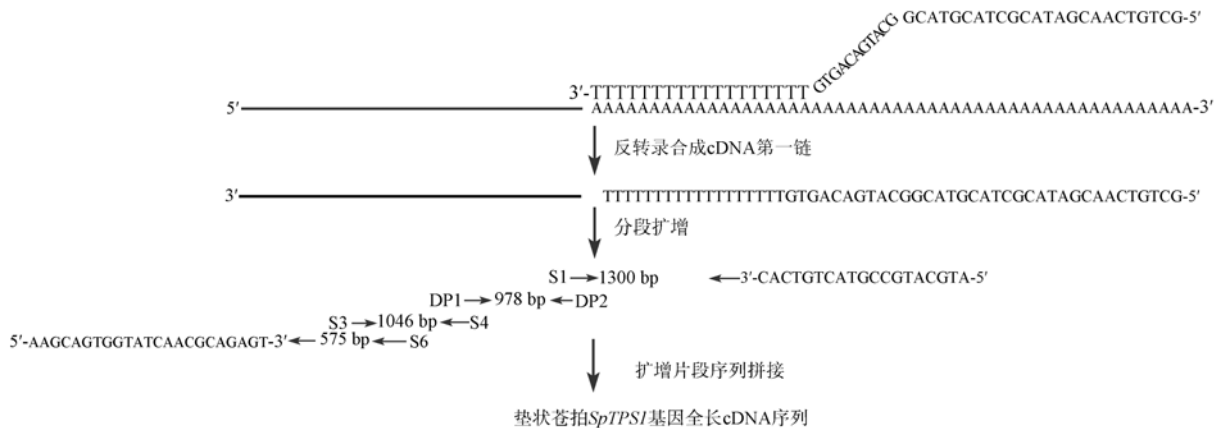


图 1 垫状卷柏 *SpTPS1* 基因全长 cDNA 序列的分段同源扩增

体连接所需 *Hind* 和 *Xho* 酶切位点的上游特异引物 5'-CCCAAGCTTCCTCGAGATGCCTACTCCGTATTCCAATAC-3', 和引入表达载体连接所需 *Bam*H 酶切位点下游特异引物 5'-CGCGGATCCATT AATTATCGACAGCGACAACC-3', 用高保真酶 LA *Taq*(TaKaRa, 大连)扩增 *SpTPS1* 基因 ORF 序列。

### 1.2 *SpTPS1* 基因真核表达载体 OpRS6 的构建

用 *Xho* 和 *Bam*H 双酶切 pRS6/*AtTPS1* 质粒 (Katholieke 大学 Johan M. Thevelein 教授惠赠)和上

述 *SpTPS1* 基因 ORF 序列, 将 ORF 序列插入质粒, 构建 *SpTPS1* 基因真核生物表达载体 OpRS6(图 2)。在此质粒结构中, 包括复制起点和合成组氨酸的筛选标记基因 *HIS3*, *SpTPS1* 基因由 *PMA1* 启动子启动, 以 *CYC1* 为终止子<sup>[7, 8]</sup>。再用 *Xho* 和 *Bam*H 双酶切, 电泳分离验证表达载体 OpRS6 的结构。

### 1.3 酵母功能互补实验

将 *TPS1* 酶基因缺失(*tps1*Δ)的酵母突变菌株 YSH290(W303-1A, *ggs1/tps1*Δ::TRP1, Katholieke

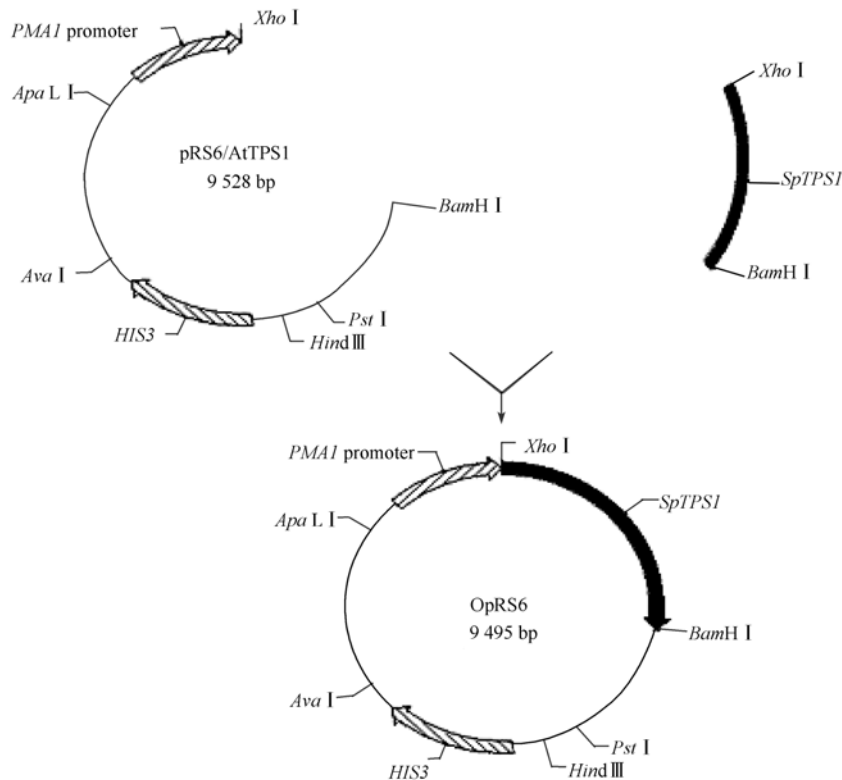


图 2 垫状卷柏 *SpTPS1* 基因真核表达载体构建

大学 Johan M. Thevelein 教授惠赠)转接到含 2% 半乳糖的 YPD 培养基(1% 酵母提取物、2% 蛋白胨、2% 半乳糖、2% 琼脂, pH5.8)上, 30 °C 培养, 醋酸锂法制备感受态细胞<sup>[9]</sup>。分别用 *SpTPS1* 基因真核表达载体 OpRS6 和阳性对照质粒 pRS6/AtTPS1 醋酸锂法转化缺失突变菌株 YSH290, 在含 2% 半乳糖的组氨酸缺失培养基(0.67% 去氨基酸酵母氮碱、2% 半乳糖、0.077% His Do Supplement、2% 琼脂, pH5.8)上筛选。挑选阳性转化子提取酵母质粒 DNA, 以反转录的 cDNA 为阳性对照, 用上述特异引物扩增 *SpTPS1* 基因 ORF 序列。验证转化成功后, 将转化子转接在含 2% 葡萄糖的组氨酸缺失培养基(0.67% 去氨基酸酵母氮碱、2% 葡萄糖、0.077% His Do Supplement、2% 琼脂, pH5.8)上, 同时转接酵母野生菌株 W303-1A(*Mataleu2-3, 112ura3-1, trp1-1, his3-11, 15ade2-1, can1-100 GAL, SUC2*, Katholieke 大学 Johan M. Thevelein 教授惠赠)作阳性对照, 以未转化的 *TPS1* 酶基因缺失(*tps1Δ*)酵母突变菌株 YSH290 作阴性对照, 30 °C 培养 3~5 d, 验证转化的垫状卷柏 *TPS1* 酶基因 *SpTPS1* 能否恢复 *TPS1* 酶基因缺失(*tps1Δ*)酵母突变菌株的生长缺陷。

## 2 结果与分析

### 2.1 垫状卷柏海藻糖-6-磷酸合成酶基因序列

以垫状卷柏总 mRNA 的反转录 cDNA 样品为模板, 用简并引物 DP1 和 DP2 扩增分离出一条近 1 000 bp 长的片段(图 3A), 测序后进行 BLAST 比对, 发现该片段的碱基序列与复活卷柏、拟南芥和马铃薯 *TPS1* 基因的同源性分别为 75%、69% 和 68%, 初步确认为垫状卷柏 *TPS1* 酶基因的序列片段。根据这一片段序列设计特异性引物 S1、S4

和 S6, 分别与 3' 端通用引物、上游同源引物 S3 和上游通用引物配对, 扩增分离出长 1 300、1 046 和 575 bp 的端片段(图 3B、C、D), 测序后与中间片段序列一起拼接得到长 3 223 bp 的 *SpTPS1* 基因 cDNA 全长序列, 用 ORF finder 软件分析发现一条长 2 790 bp 的开放阅读框。

由此推导的氨基酸序列与复活卷柏(*Selaginella lepidophylla*)、小麦(*Triticum aestivum*)、番茄(*Solanum lycopersicum*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)和大肠杆菌(*Escherichia coli*)海藻糖-6-磷酸合成酶氨基酸序列的比对结果见图 4, 序列相似性分别为 75%、69%、64%、47% 和 33%。根据 Gibson 等<sup>[10]</sup>的测定, 大肠杆菌海藻糖-6-磷酸合成酶的三维结构包含两个结构域, 酶催化活性中心位于两个结构域相连的裂缝中, 参与结合 6-磷酸葡萄糖底物的位点是 Arg9、Gly40、Tyr76、Trp85 和 Arg300, 参与结合 UDP-葡萄糖底物的位点是 Gly22、Asp130、His154、Arg262、Asp361 和 Glu369。参与比对的 6 个物种海藻糖-6-磷酸合成酶的氨基酸序列在这些位点都表现出高度保守性。其中, Glu 和 Asp 是糖原磷酸化酶糖基转移酶(Glycogen phosphorylase glycosyltransferase, GPGTF)家族共有的保守位点, 它们同时也具有标志性的糖原磷酸化酶糖基转移酶的保守区域“1”和“2”<sup>[11]</sup>。

### 2.2 *SpTPS1* 基因真核表达载体 OpRS6 的酶切鉴定

根据 ORF finder 软件预测的 *SpTPS1* 基因 ORF 设计上游特异引物和下游特异引物, 从反转录 cDNA 样品中扩增分离出一条长约 2 800 bp 的片段, 测序后去除引入的限制性酶切位点序列, 长 2 790 bp, 与 ORF finder 软件预测的开放阅读框比较, 序列完全一致。

表达载体 OpRS6 经 *Xho* 和 *Bam*H 双酶切, 结果见图 5。2 790 和 6 705 bp 的片段与 *SpTPS1* 基

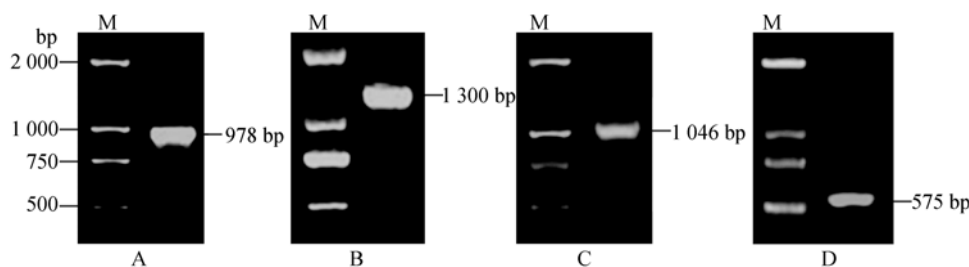


图 3 *SpTPS1* 基因扩增片段

A: 中间片段的扩增; B: 3' 端片段的扩增; C: 近 5' 端片段的扩增; D: 5' 端片段的扩增。M: DL2000 Marker。

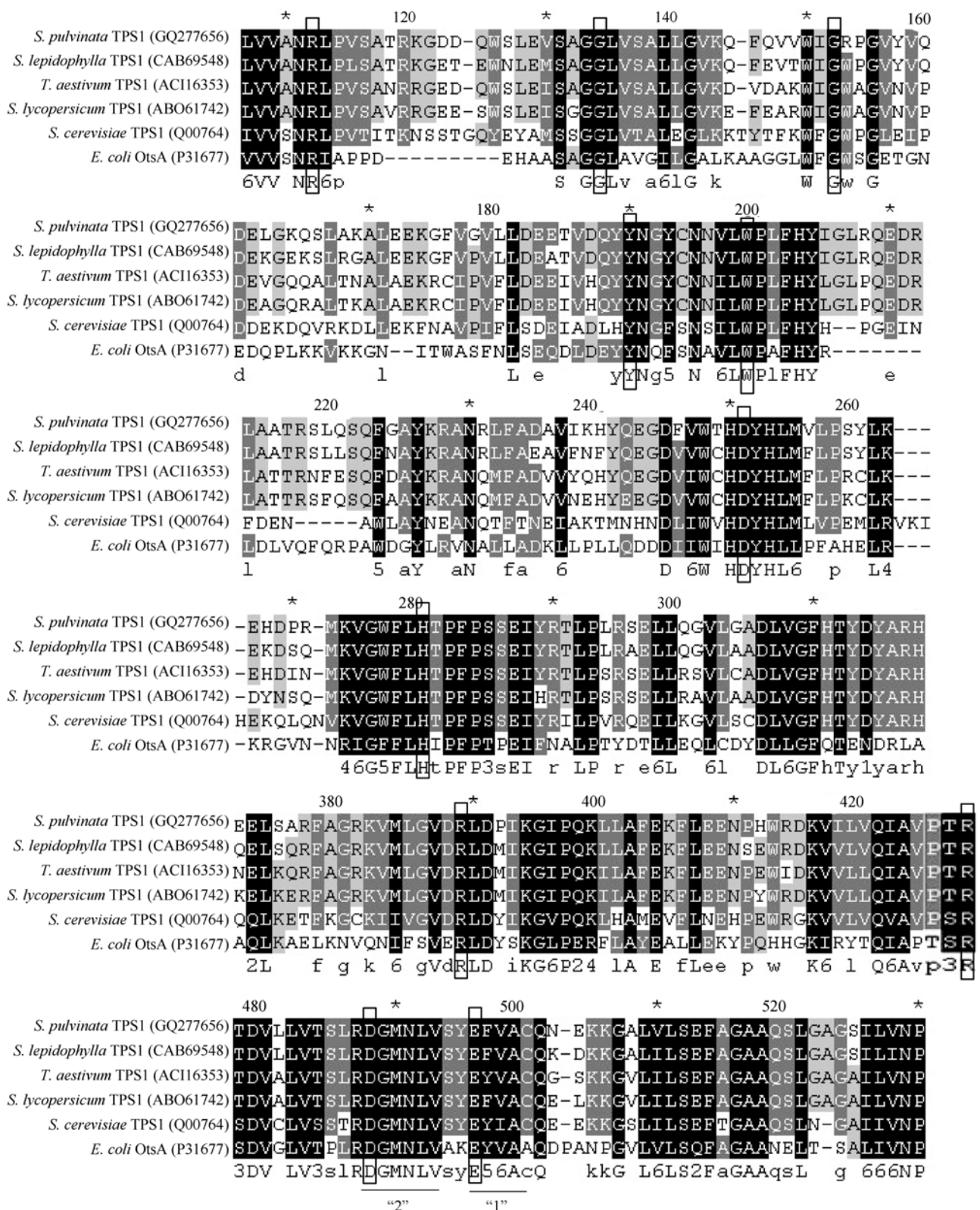


图 4 *SpTPS1* 基因推导的氨基酸序列与模式物种海藻糖合成酶氨基酸序列的相似性比对

图中黑色背景的氨基酸为高度保守序列, 白色背景氨基酸位点的保守性低, 灰色背景氨基酸的保守性中等。黑框表示海藻糖合成酶活性中心保守位点。“1”和“2”表示糖原磷酸化酶糖基转移酶的保守区域。

因 ORF 片段和 pRS6 线性骨架匹配, 由此证明表达载体 OpRS6 的结构正确。

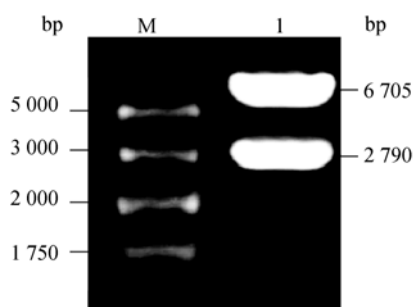


图5 *SpTPS1* 基因真核表达载体 OpRS6 的酶切图谱  
M: NA marker; 1: OpRS6。

### 2.3 酵母功能互补

因为上述 *SpTPS1* 基因真核表达载体 OpRS6 和阳性对照质粒 pRS6/AtTPS1 结构中, 存在合成组氨酸的筛选标记基因 *HIS3*, 转化 *SpTPS1* 基因和阳性对照质粒 pRS6/AtTPS1 的 *TPS1* 酶基因缺失(*tps1*Δ)酵母突变菌株 YSH290, 在含 2% 半乳糖的组氨酸缺失培养基上能够恢复生长, 而未转化的 *TPS1* 酶基因缺失(*tps1*Δ)酵母突变菌株 YSH290 和野生菌株 W303-1A 不能合成组氨酸, 所以不能在该培养基上恢复生长(图 6A)。挑选阳性转化子提取酵母质粒 DNA, 以反转录的 cDNA 为阳性对照, 用 ORF 特异引物扩增分离出了长 2790 bp 的片段, 进一步证明 *SpTPS1* 基因表达载体 OpRS6 对 *TPS1* 酶基因缺失(*tps1*Δ)酵母突变菌株的转化成功(图 6B)。

在含 2% 葡萄糖的组氨酸缺失培养基上, 野生菌株 W303-1A 因不能合成组氨酸而不能恢复生长; 突变菌株 YSH290 因 *TPS1* 酶基因功能缺失不

能调控葡萄糖的糖酵解过程<sup>[12~14]</sup>, 不能以葡萄糖作为碳源, 同时也不能合成组氨酸, 因而不能恢复生长; 但是, 用 *SpTPS1* 基因真核表达载体 OpRS6 和阳性对照质粒 pRS6/AtTPS1 转化的突变菌株, 由于 *SpTPS1* 基因和 *AtTPS1* 基因对缺失突变基因 *tps1*Δ 的互补, 能以葡萄糖作为碳源, 同时存在合成组氨酸的筛选标记基因 *HIS3*, 因而可以恢复生长(图 6C)。

由此证明, 我们克隆的 ORF 片段, 确实为垫状卷柏海藻糖-6-磷酸合成酶基因的编码序列。因此, 我们将这一基因命名为 *SpTPS1*, 申请中国专利(申请号为 200910059934.1), 并在 GenBank 注册(因专利申请方面的原因, 登陆号保护至 2012 年 12 月)。

### 3 讨论

Zentella 等<sup>[6]</sup>进行的酵母突变体功能互补实验, 不仅验证了复活卷柏海藻糖-6-磷酸合成酶基因 *SITPS1* 的功能, 而且还证明该基因的转化还可以增强酵母突变体对高温和高渗透条件的耐受性。我们发现的垫状卷柏是与复活卷柏同科的近缘种, 两者海藻糖-6-磷酸合成酶基因 *SpTPS1* 与 *SITPS1* 推导的氨基酸序列相似性高达 75%, 且保守序列基本一致(图 4)。

在植物细胞内, UDP-葡萄糖和 6-磷酸葡萄糖是碳水化合物代谢的中间产物, 只要导入编码 *TPS* 酶的外源基因, 即可合成 6-磷酸海藻糖。而 6-磷酸海藻糖脱磷酸转化为海藻糖, 可由细胞内广泛存在的非特异性磷酸酯酶催化完成。同时导入 *TPP* 酶的编码基因, 对海藻糖的积累作用不大<sup>[6, 15]</sup>。这与 Tarczynski 等<sup>[16]</sup>用细菌甘露醇-1-磷酸脱氢酶基因转化烟草, 获得具有甘露醇合成活性烟草植株的情形相似。许多研究表明, 转化大肠杆菌和酵母菌 *TPS*

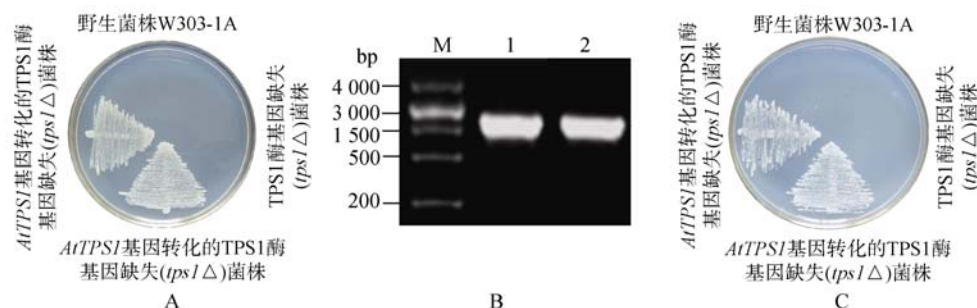


图6 酵母功能互补实验

A: *SpTPS1* 基因转化的 *TPS1* 酶基因缺失酵母突变菌株在组氨酸缺失的半乳糖培养基上恢复生长; B: 从 *TPS1* 酶基因缺失酵母突变菌株转化子质粒扩增的 *SpTPS1* 基因 ORF 片段。M: DNA marker; 1: *SpTPS1* ORF; 2: 阳性对照; C: *SpTPS1* 基因转化的 *TPS1* 酶基因缺失酵母突变菌株在组氨酸缺失的葡萄糖培养基上恢复生长。

酶基因, 或者 TPS 酶与 TPP 酶融合基因的烟草、小麦和马铃薯转基因株系, 耐旱性均有不同程度的提高<sup>[17~23]</sup>。本研究结果证明, 垫状卷柏海藻糖-6-磷酸合成酶基因 *SpTPS1* 的编码蛋白具有生物活性, 可能在转基因抗逆植物品种培育中具有较好的应用前景。

此外, 根据 Van Dijck 等<sup>[24]</sup>的研究, 复活卷柏和拟南芥海藻糖-6-磷酸合成酶的 N-末端对该的催化活性有抑制作用。将两物种海藻糖-6-磷酸合成酶基因 *SITPS1* 和 *AtTPS1* 的 5' 端截断后再转化酵母突变菌株, 海藻糖-6-磷酸合成酶的活性比截断前提高 10 倍, 而酵母细胞的海藻糖积累比截断前提高 20 倍。在后续研究中, 我们也在尝试对 *SpTPS1* 基因进行截断改造, 以期进一步发挥其抗逆功效。

#### 参考文献(References):

- [1] 王关林, 方宏筠主编. 植物基因工程(第二版). 北京: 科学出版社, 2002, 61-73.
- [2] Colaco C, Kampinga J, Roser B. Amorphous stability and trehalose. *Science*, 1995, 268(5212): 788.
- [3] Crowe JH, Crowe LM, Chapman D. Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose. *Science*, 1984, 223(4637): 701-703.
- [4] Kaasen I, Falkenberg P, Styrvoid OB, Strom AR. Molecular cloning and physical mapping of the *otsB* genes, which encode the osmoregulatory trehalose pathway of *Escherichia coli*: evidence that transcription is activated by katF (AppR). *J Bacteriol*, 1992, 174(3): 889-898.
- [5] Bell W, Klaassen P, Ohnacker M, Boller T, Herweijer M, Schoppink P, Van der Zee P, Wiemken A. Characterization of the 56-kDa subunit of yeast trehalose-6-phosphate synthase and cloning of its gene reveal its identity with the product of CIF1, a regulator of carbon catabolite inactivation. *Eur J Biochem*, 1992, 209(3): 951-959.
- [6] Zentella R, Mascorro-Gallardo JO, Van Dijck P, Folch-Mallol J, Bonini B, Van Vaeck C, Gaxiola R, Covarrubias AA, Nieto-Sotelo J, Thevelein JM, Iturriaga G. A *Selaginella lepidophylla* trehalose-6-phosphate synthase complements growth and stress-tolerance defects in a yeast *tps1* mutant. *Plant Physiol*, 1999, 119(4): 1473-1482.
- [7] Serrano R, Villalba JM. Expression and localization of plant membrane proteins in *Saccharomyces*. *Methods Cell Biol*, 1995, 50: 481-496.
- [8] Christianson TW, Sikorski RS, Dante M, Shero JH, Hieter P. Multifunctional yeast high-copy number shuttle vectors. *Gene*, 1992, 110(1): 119-122.
- [9] Elble R. A simple and efficient procedure for transformation of yeasts. *BioTechniques*, 1992, 13(1): 18-20.
- [10] Gibson RP, Turkenburg JP, Charnock SJ, Lloyd R, Davies GJ. Insights into trehalose synthesis provided by the structure of the retaining glucosyltransferase OtsA. *Chem Biol*, 2002, 9(12): 1337-1346.
- [11] Boume Y, Henrissat B. Glycoside hydrolases and glycosyltransferases: families and functional modules. *Curr Opin Struct Biol*, 2001, 11(5): 593-600.
- [12] Van Aelst L, Hohmann S, Bulaya B, de Koning W, Sierkstra L, Neves MJ, Luyten K, Alijo R, Ramos J, Coccetti P. Molecular cloning of a gene involved in glucose sensing in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol*, 1993, 8(5): 927-943.
- [13] Thevelein JM, Hohmann S. Trehalose synthase: guard to the gate of glycolysis in yeast? *Trends Biochem Sci*, 1995, 20(1): 3-10.
- [14] Blazquez MA, Lagunas R, Gancedo C, Gancedo IM. Trehalose-6-phosphate, a new regulator of yeast glycolysis that inhibits hexokinases. *FEBS Lett*, 1993, 329(1-2): 51-54.
- [15] Blazquez MA, Santos E, Flores CL, Martinez Zapater JM, Salinas J, Gancedo C. Isolation and characterization of the *Arabidopsis TPS1* gene. *Plant J*, 1998, 13(5): 685-689.
- [16] Tarczynski MC, Jensen RG, Bohnert HJ. Expression of a bacterial *mtlD* gene in transgenic tobacco leads to production and accumulation of mannitol. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(7): 2600-2604.
- [17] Holmstrom KO, Mantyla E, Welin B, Mandal A, Palva ET, Tunnela OE, Londesborough J. Drought tolerance in tobacco. *Nature*, 1996, 379(6567): 683-684.
- [18] Goddijn OJ, Verwoerd TC, Voogd E, Krutwagen RW, de Graaf PT, van Dun K, Poels J, Ponstein AS, Damm B, Pen J. Inhibition of trehalose activity enhances trehalose accumulation in transgenic plants. *Plant Physiol*, 1997, 113(1): 181-190.
- [19] Romero C, Belles JM, Vaya JL, Serrano R, Culianez-Macia FA. Expression of the yeast trehalose-6-phosphate synthase gene in transgenic tobacco plants: pleiotropic phenotypes include drought tolerance. *Planta*, 1997, 201(3): 293-297.
- [20] Pilon-Smits EAH, Terry N, Sears T, Kim H, Zayed A, Hwang S, van Dun K, Voogd E, Verwoerd TC, Krutwagen RWHH, Goddijn OJ. Trehalose-producing transgenic tobacco plants show improved growth performance under drought stress. *J Plant Physiol*, 1998, 152(4-5): 525-532.
- [21] Cortina C, Culianez-Macia FA. Tomato abiotic stress enhanced tolerance by trehalose biosynthesis. *Plant Sci*, 2005, 169(1): 75-82.
- [22] 杜丽璞, 徐惠君, 叶兴国, 林忠平. 小麦转 *TPS* 基因植株的获得及其初步功能鉴定. 麦类作物学报, 2007, 27(3): 369-373.
- [23] Suarez R, Calderon C, Iturriaga G. Enhanced tolerance to multiple abiotic stresses in transgenic alfalfa accumulating trehalose. *Crop Sci*, 2009, 49(5): 1791-1799.
- [24] Van Dijck P, Mascorro-gallardo JO, De Bus M, Royackers K, Iturriaga G, Thevelein JM. Truncation of *Arabidopsis thaliana* and *Selaginella lepidophylla* trehalose-6-phosphate synthase unlocks high catalytic activity and supports high trehalose levels on expression in yeast. *Biochem J*, 2002, 366(1): 63-71.