

## 淹水对转超氧化物歧化酶或过氧化物酶基因烟草某些生理生化指标的影响

曾淑华<sup>1,2</sup> 赵正雄<sup>1</sup> 覃鹏<sup>3</sup> 刘飞虎<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup> 云南农业大学烟草学院, 昆明 650201; <sup>2</sup> 云南大学生命科学学院, 昆明 650091; <sup>3</sup> 宝山师范高等专科学校化学和生物系, 云南宝山 678000

**摘要** 对盆栽十二叶龄的3个烟草近等基因系进行淹水处理后的结果表明: 随着淹水时间的延长, 细胞质膜透性、超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化物酶(POD)活性均显著升高; 叶绿素和可溶性蛋白质含量、株高、叶片数及生物量均下降。各种指标在短时间内不能恢复到正常水平或者根本不能恢复。3个品系抗涝性强弱依序为: 转基因抗坏血酸过氧化物酶(APX)高表达品系>转Mn-SOD基因叶绿体高表达品系>非转基因品系。

**关键词** 转基因烟草; 水涝胁迫; 超氧化物歧化酶(SOD); 过氧化物酶(POD); 生理生化指标

## Effects of Waterlogging on Some Physiological and Biochemical Indexes of Transgenic Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) Lines with Superoxide Dismutase or Peroxidase Gene

ZENG Shu-Hua<sup>1,2</sup>, ZHAO Zheng-Xiong<sup>1</sup>, QIN Peng<sup>3</sup>, LIU Fei-Hu<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>College of Tobacco Science, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; <sup>2</sup>College of Life Science, Yunnan University, Kunming 650091, China; <sup>3</sup>Department of Chemistry and Biology, Baoshan Higher Teachers College, Baoshan, Yunnan 678000, China

**Abstract** Three near isogenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) lines were pot-cultured and then waterlogged at their 12-leaf stage. The results showed that with the elongation of waterlogging time, cell membrane permeability, superoxide dismutase (SOD) and peroxidase (POD) activities increased evidently, while chlorophyll content, soluble protein content, plant height, number of leaves and biomass per plant decreased remarkably. These indexes of the tested tobacco lines couldn't recover to the normal level in the observed period or couldn't recover at all. The waterlogging tolerance of the three near isogenic tobacco lines showed as transgenic tobacco plants with ascorbate peroxidase (APX) gene over-expressed > transgenic tobacco plants with Mn-SOD gene over-expressed > non-transgenic tobacco plants.

**Key words** transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.); waterlogging; superoxide dismutase (SOD); peroxidase (POD); physiological and biochemical indexes

随着分子生物学的发展, 采用基因工程方法将与抗性密切相关的外源目的基因导入栽培植物中来提高其胁迫耐性已引起了人们的注视。有研究表明, 过量表达Cu/Zn-超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)的转基因烟草在冷和高光照度下可保持90%的光合能力, 转基因植株对过氧化物毒害的耐性也提高<sup>[1]</sup>; 在叶绿体和线粒体中定向过量表达Mn-SOD可减轻氧化胁迫对细胞的伤害<sup>[2]</sup>; 还有研究表明, 转Mn-SOD基因叶绿体高表达烟草的耐水涝能力明显强于非转基因的近等基因系烟草<sup>[3]</sup>。本文研究淹水对转过氧化物酶(peroxidase, POD)或Mn-SOD基因烟草抗性的影

响, 比较转基因烟草与非转基因的近等基因系烟草对水涝胁迫耐性的差异, 为评价用转基因方法改良植物抗逆性的可行性提供参考。

### 材料与方法

材料为由国外引进的3个近等基因烟草(*Nicotiana tabacum* L.)品系, 即非转基因品系、转Mn-

收稿 2004-09-23 修定 2005-07-22

资助 云南省人才基金。

\*通讯作者(E-mail: plantbreed2004@yahoo.com.cn, Tel: 0871-5035256)。

SOD 基因叶绿体高表达品系 (Mn-SOD 高表达品系) 和转基因抗坏血酸过氧化物酶 (ascorbate peroxidase, APX) 高表达品系 (APX 高表达品系)。五叶期时, 将烟苗移栽入内径 25 cm、高 20 cm 的塑料花盆中, 按常规进行肥水管理和病虫害防治。烟株长到十二叶期时, 选择生长状况基本一致的烟株进行淹水处理, 处理时水深与盆内土表高度相齐, 处理分 0、2、4、6 d 及处理 6 d 后再在正常条件下恢复生长 2 和 4 d; 以正常肥水管理的为对照。对照与处理均设 5 个重复。取烟株顶端以下第 5 片叶测定生理生化指标。处理后的烟株在正常条件下生长 10 或 20 d 时, 测株高和叶片数; 连根拔起, 洗掉泥土等杂质, 晒干后分别称得地下部分和地上部分重量。

SOD 活性的测定采用氮蓝四唑 (NBT) 光化还原法<sup>[4]</sup>, POD 活性的测定采用愈创木酚法<sup>[5]</sup>, 可溶性蛋白质含量的测定采用考马斯亮兰 (G-250) 法<sup>[6]</sup>,

叶绿素含量测定采用混合液提取法<sup>[7]</sup>, 细胞质膜透性测定参考文献 8 的方法。

## 结果与讨论

### 1 淹水对烟草叶细胞质膜透性的影响

由表 1 可知, 烟草叶细胞的质膜透性随着淹水时间的延长显著升高, 恢复期间则下降。3 个品系中, APX 高表达品系在处理和恢复期间变化相对较小, Mn-SOD 高表达品系变化最快, 淹水对烟草叶细胞膜的损伤主要发生在淹水处理后的第 1~2 天。这些与前人研究大麦与小麦受涝时的结果<sup>[9,10]</sup>一致。

### 2 淹水对烟草叶中 SOD 和 POD 活性的影响

图 1 显示:

(1) 3 个品系未处理时, APX 高表达品系的 SOD 活性明显高于另外 2 个品系。淹水期间, 3 个品系的 SOD 活性都明显升高, 非转基因品系增

表1 淹水对烟草叶片细胞质膜透性的影响

Table 1 Effect of waterlogging on cell membrane permeability of tobacco leaves

品系	处理	处理时间/d				恢复时间/d	
		0	2	4	6	2	4
非转基因品系	对照	9.0 (100.0)	9.5 (100.0)	8.9 (100.0)	8.8 (100.0)	11.2 (100.0)	9.2 (100.0)
	处理	9.2 (101.8)	16.7* (175.3)	18.1** (203.8)	18.6** (210.8)	22.6** (202.9)	11.8 (128.2)
Mn-SOD 高表达品系	对照	8.8 (100.0)	8.6 (100.0)	8.5 (100.0)	8.5 (100.0)	8.3 (100.0)	9.0 (100.0)
	处理	8.7 (99.0)	18.5** (215.9)	19.8** (231.6)	20.1** (237.3)	16.1* (193.1)	12.2 (135.7)
APX 高表达品系	对照	9.5 (100.0)	9.5 (100.0)	9.8 (100.0)	9.1 (100.0)	10.8 (100.0)	8.2 (100.0)
	处理	9.6 (100.6)	14.1 (149.3)	15.0* (153.9)	15.1* (166.2)	16.5* (153.0)	10.3 (125.0)

\* 表示处理或恢复与对照之间的差异显著 ( $P=0.05$ ); \*\* 表示处理或恢复与对照的差异极显著 ( $P=0.01$ )。括弧中为相对数。表 2 同此。

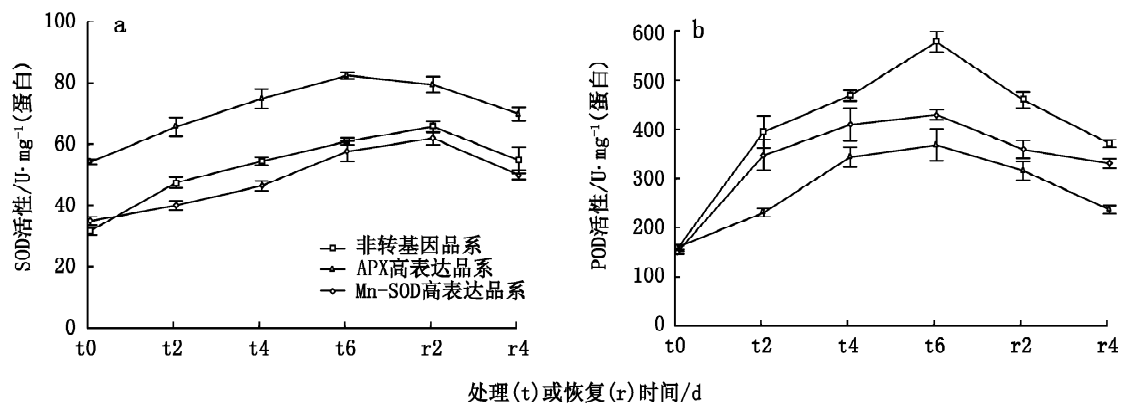


图1 淹水对烟草叶片 SOD 和 POD 活性的影响

Fig. 1 Effects of waterlogging on SOD and POD activities in tobacco leaves

加较快; 恢复期间, APX 高表达品系在恢复的第2天就开始下降, 而另外2个品系直到第4天才下降(图1-a)。

(2) 未经淹水, 3个品系 POD 活性无差别。淹水下, POD 活性与 SOD 活性的变化趋势一致, 随着淹水时间的延长, 其活性逐渐升高。3个品系中, 非转基因品系的 POD 活性升高最快, APX 高表达品系的升高最慢。恢复期间, 3个品系的 POD 活性都明显下降(图1-b)。

上述的 SOD 活性变化与前人在烟草<sup>[11,12]</sup>中的结果一致, 但与有人在大白菜<sup>[13]</sup>受水涝胁迫时, SOD 活性开始上升而后急剧下降, 以及小麦、大麦<sup>[9,10]</sup>和芝麻<sup>[14]</sup>淹水处理后 SOD 活性明显下降有一定的差异。APX 高表达品系的 SOD 活性水平比较高, 暗示其清除活性氧的能力较强, 而受水涝影响较小。POD 活性的变化与前人在小麦和大麦<sup>[9,10]</sup>中的结果基本相同。

### 3 淹水对烟草叶片可溶性蛋白质和叶绿素含量的影响

图2 显示:

(1) 未淹水时, 3个品系可溶性蛋白质含量接近。淹水的烟草叶中可溶性蛋白质含量显著下

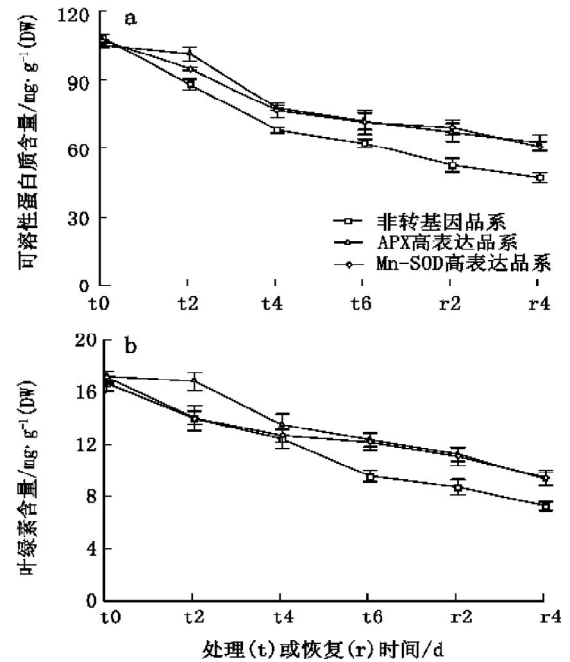


图2 淹水对烟草叶片可溶性蛋白质和叶绿素含量的影响

Fig. 2 Effects of waterlogging on soluble protein and chlorophyll contents in tobacco leaves

降, 即使在恢复生长期间仍继续下降。非转基因品系的可溶性蛋白质含量下降明显快于2个转基因品系(图2-a)。这与前人在大麦、小麦<sup>[9,10]</sup>和芝麻<sup>[14]</sup>

表2 淹水对烟草单株叶片数、株高和生物量的影响

Table 2 Effects of waterlogging on leaf number, plant height and biomass of tobacco

品系	处理	淹水2 d恢复10 d				淹水4 d恢复10 d			
		叶片数	株高/cm	地上部重/g	地下部重/g	叶片数	株高/cm	地上部重/g	地下部重/g
非转基因品系	对照	12.4 (100.0)	55.2 (100.0)	15.0 (100.0)	1.7 (100.0)	11.8 (100.0)	64.8 (100.0)	16.2 (100.0)	1.7 (100.0)
	处理	7.2** (58.1)	40.5* (73.4)	7.6** (50.7)	0.5** (29.8)	6.4** (54.2)	38.4** (59.3)	6.0** (37.0)	0.4** (24.1)
APX 高表达品系	对照	13.2 (100.0)	67.0 (100.0)	19.0 (100.0)	2.2 (100.0)	12.8 (100.0)	66.5 (100.0)	18.0 (100.0)	1.9 (100.0)
	处理	9.2* (69.7)	49.5* (73.9)	10.0** (52.6)	0.9** (41.8)	8.0* (62.5)	43.4* (65.3)	8.0** (44.4)	0.8** (40.6)
Mn-SOD 高表达品系	对照	13.2 (100.0)	53.3 (100.0)	14.8 (100.0)	1.6 (100.0)	13.4 (100.0)	60.8 (100.0)	18.0 (100.0)	1.6 (100.0)
	处理	8.8* (66.7)	38.5* (72.3)	8.0** (54.1)	0.7** (41.3)	8.8* (65.7)	38.2* (62.8)	7.8** (43.3)	0.5** (28.4)
品系	处理	淹水6 d恢复10 d				淹水6 d恢复20 d			
		叶片数	株高/cm	地上部重/g	地下部重/g	叶片数	株高/cm	地上部重/g	地下部重/g
非转基因品系	对照	11.4 (100.0)	72.0 (100.0)	16.1 (100.0)	2.0 (100.0)	10.8 (100.0)	62.8 (100.0)	21.5 (100.0)	2.6 (100.0)
	处理	5.6** (49.1)	38.2** (53.1)	5.0** (31.1)	0.4** (21.6)	6.8* (62.5)	44.5** (56.5)	5.0** (23.2)	0.5** (19.4)
APX 高表达品系	对照	13.8 (100.0)	76.6 (100.0)	15.9 (100.0)	2.4 (100.0)	12.3 (100.0)	77.0 (100.0)	21.8 (100.0)	4.7 (100.0)
	处理	8.6* (62.3)	44.2** (57.7)	6.3** (39.3)	0.6** (24.2)	8.2** (66.9)	47.8* (62.1)	8.9** (40.9)	0.9* (19.0)
Mn-SOD 高表达品系	对照	13.4 (100.0)	70.0 (100.0)	14.5 (100.0)	2.1 (100.0)	14.2 (100.0)	77.6 (100.0)	21.3 (100.0)	2.8 (100.0)
	处理	8.8* (65.7)	39.2** (56.0)	4.7** (32.2)	0.5** (25.7)	9.4* (66.2)	45.6** (58.8)	5.7** (26.8)	0.6** (21.5)

中的结果一致。

(2)未淹水时,3个品系叶绿素含量接近。淹水的烟草叶中叶绿素含量明显下降,恢复期间仍继续下降。淹水处理的第2和4天,APX高表达品系叶绿素含量较高,另外2个品系含量接近,都较低,处理的第6天到恢复的第4天,2个转基因品系叶绿素的含量明显高于非转基因品系(图2-b)。这与大麦、小麦<sup>[9,10]</sup>、水稻<sup>[15]</sup>和芝麻<sup>[14]</sup>中的结果一致。

#### 4 淹水对烟草生物量的影响

从表2可见,淹水烟株的叶片数除非转基因品系下降比较明显外,2个转基因品系下降不显著。淹水后的株高下降,品系间无差别。另外,淹水烟草的生物量急剧下降,非转基因品系下降比较快。处理6 d的烟草即使在正常条件下恢复生长20 d,其生物量仍然下降,只有APX高表达品系的生物量保持在恢复10 d时的水平。地下部分生物量下降比地上部分快。

#### 参考文献

- Gupta AS, Heinen JL, Holaday AS et al. Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants that overexpress chloroplast Cu/Zn superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 1629~1633
- Bowler C, Slooten L, Vandenbranden S et al. Manganese superoxide dismutase can reduce cellular damage mediated by oxygen radicals in transgenic plants. *EMBO J*, 1991, 10: 1723~1732
- Yu Q, Rengel Z. Waterlogging influence plant growth and activities of superoxide dismutase in narrow-leafed lupin and transgenic tobacco plants. *J Plant Physiol*, 1999, 155(3): 431~438
- Giannopolitis CN, Ries SK. Superoxide dismutase I: Occurrence in higher plant. *Plant Physiol*, 1977, 59: 309~314
- 张志良. 植物生理学实验指导. 第2版. 北京: 高等教育出版社, 1990. 154
- 李如亮. 生物化学实验. 武汉: 武汉大学出版社, 1998. 57~58
- 沈伟其. 测定水稻叶片叶绿素含量的混合液提取法. *植物生理学通讯*, 1988, (3): 62~64
- 中国科学院上海植物生理研究所, 上海市植物生理学会编. 现代植物生理学实验指南. 北京: 科学出版社, 1999. 302
- 蔡永萍, 陶汉之, 张玉琼. 土壤渍水对小麦开花后叶片几种生理特性的影响. *植物生理学通讯*, 2000, 36(2): 110~113
- 王三根, 何立人, 李正伟等. 淹水对大麦与小麦若干生理生化特性影响的比较研究. *作物学报*, 1996, 22(2): 228~232
- 钟雪花, 杨万年, 吕应堂. 淹水胁迫下烟草、油菜某些生理指标的比较研究. *武汉植物学研究*, 2002, 20(5): 395~398
- 曾淑华, 刘飞虎, 覃鹏等. 淹水对烟草生理指标的影响. *烟草科技*, 2004, (1): 36~38
- 杨显, 陈小燕, 杨云英. 淹水对开花期大白菜花的形成和细胞保护系统的影响. *中国蔬菜*, 2000, (2): 7~10
- 刘华山, 韩锦峰, 孟凡庭等. 土壤渍水下芝麻叶片中几个与抗性能力有关的生理指标的变化. *植物生理学通讯*, 2001, 37(2): 106~108
- 史济林, 罗中元, 唐厚传等. 水逆境下水稻生育反应及抗逆措施的研究. *浙江农业学报*, 1995, 7(2): 65~71