

干旱胁迫下CO₂浓度升高对转*StAPX*番茄植株耐旱能力的影响

孙卫红^{1,*}, 孙禛禛¹, 吴秋霞¹, 刘汉玄², 陈梅¹, 陈喆¹

江苏大学¹食品与生物工程学院, ²农业工程学院, 江苏镇江212013

摘要: 在干旱胁迫伴随大气CO₂浓度以及升高的CO₂浓度(加倍)条件下, 以过量表达番茄类囊体膜抗坏血酸过氧化物酶基因(*StAPX*)的转基因番茄为试材, 探明干旱胁迫下CO₂浓度升高对转基因及其野生型番茄植株清除活性氧及耐旱能力的影响。结果表明: 升高的CO₂浓度明显增加了干旱胁迫下植物的光合水平; 升高的CO₂浓度明显降低了干旱导致的植物体内H₂O₂和O₂⁻的积累, 影响了干旱胁迫下番茄植株的水-水循环系统的活性氧清除酶活性和小分子抗氧化物质含量; 干旱胁迫下即使伴随升高的CO₂浓度, 测试番茄植株体内的渗透调节物质含量变化也不大; 升高的CO₂浓度明显降低了干旱胁迫下的植物细胞膜伤害程度; 干旱胁迫下, 升高的CO₂浓度对转基因番茄株系比对野生型植株的影响更加明显。结果证明干旱逆境下, 升高的CO₂浓度能够在一定程度上进一步提高转基因番茄植株的耐旱性。

关键词: 干旱胁迫; 升高的CO₂浓度; 转基因番茄植株; 耐旱能力

Effects of Elevated CO₂ Concentration on Drought Tolerance in Transgenic Tomato Plants under Drought Stress

SUN Wei-Hong^{1,*}, SUN Zhen-Zhen¹, WU Qiu-Xia¹, LIU Han-Xuan², CHEN Mei¹, CHEN Zhe¹

¹College of Food and Biological Engineering, ²Institute of Agricultural Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212013, China

Abstract: In this study, transgenic tomato plants over-expression of *StAPX* were tested under drought stress, accompanied with atmosphere and elevated (doubled) CO₂ concentration. The influences of elevated CO₂ concentration on the ROS-scavenging ability and the drought tolerance in transgenic and wild tomato plants under drought stress were studied. It was found that elevated CO₂ concentration increased the photosynthetic level in plants under drought stresses. Elevated CO₂ concentration reduced the accumulation of H₂O₂ and O₂⁻, and influenced antioxidant enzyme activities of water-water cycle system and small molecule antioxidant substance contents in tomato plants under drought stress conditions. Osmotic adjustment substances contents in tested plants changed little even at elevated CO₂ concentration under drought stresses. Elevated CO₂ concentration reduced the damage of cell membrane under drought stresses. The influence degree of elevated CO₂ concentration on transgenic lines was more outstanding than that in wild tomato plants. The results showed that elevated CO₂ concentration can increase the tolerance of transgenic tomato plants to drought stress to some extent.

Key words: drought stress; elevated CO₂ concentration; transgenic tomato plants; drought tolerance

干旱胁迫是目前降低全球作物产量的非生物胁迫中最主要影响因素之一(Zhang和Chen 2005)。当干旱胁迫伴随高CO₂浓度时, “CO₂施肥”效果会受到限制(Parry等2004)。在干旱胁迫下, 由于植物叶片气孔关闭引起CO₂同化的限制, 导致同化力的过剩从而产生过多的活性氧物质(ROS)。ROS是一类化学性质极其活泼的含氧物质, 包括超氧阴离子自由基(O₂⁻)、过氧化氢(H₂O₂)、羟基自由基(-OH)等, 过量的ROS会破坏植物细胞结构及细胞组分, 甚至引起植物死亡。

植物叶绿体往往是逆境ROS产生和攻击的最

初部位, 因为从光合电子传递系统逃逸的电子会与分子氧结合产生O₂⁻等ROS物质。同时, 在叶绿体中, 植物体自身存在着O₂⁻和H₂O₂的产生与清除的动态平衡(Mittler 2002): 即超氧化物歧化酶

收稿 2013-08-12 修定 2013-09-10

资助 江苏省自然科学基金面上项目(BK2010344)、作物生物学国家重点实验室开放基金(2011KF11)、江苏省博士后基金(1102132C)和国家博士后基金(2011M500867)。

致谢 山东农业大学生命科学学院孟庆伟教授对本研究工作大力支持。

* 通讯作者(E-mail: weihongsun2009@163.com; Tel: 0511-88797059)。

(SOD)催化两分子的 O_2^- 形成 O_2 和 H_2O_2 , 然后由抗坏血酸过氧化物酶(APX)催化 H_2O_2 转化为 H_2O , 此过程称为水-水循环。此循环能快速地清除生成部位的ROS, 否则, 积累的 H_2O_2 会通过Haber-Weiss反应生成氧化性质极强的 $\cdot OH$, $\cdot OH$ 能够氧化并破坏几乎所有的细胞组分。研究表明过量表达SOD和APX同工酶在植物抵御逆境胁迫过程中起着关键作用(Badawi等2004; Kavitha等2008; Saxena等2011)。

干旱胁迫限制植物生长并影响作物产量, 而适量升高的 CO_2 浓度能够提高植物的光合能力和水分利用效率。升高 CO_2 浓度是否影响干旱胁迫下植物ROS清除系统的活性及其植物耐旱性? 本研究以转 $StAPX$ 的番茄植株及野生型植株为研究对象, 阐明 CO_2 浓度增加对于干旱胁迫下番茄植株活性氧清除能力的影响以及植株耐旱能力的影响, 为未来 CO_2 浓度升高条件下干旱、半干旱地区番茄的抗逆育种及栽培提供理论依据。

材料与方 法

1 植物材料与胁迫处理

以转 $StAPX$ 番茄植株 T_2 代及野生型番茄(*Solanum lycopersicum* cv. ‘中蔬6号’)植株为材料。播种于30 cm直径含营养土的塑料盆中(一棵一盆), 于温室(15~30 °C, 16 h光照)中生长。转基因番茄种苗经PCR检测验证后用于逆境处理及相关实验, 基因转化方法及株系获得见Sun等(2013)。

待种苗生长至6周大小时进行胁迫处理。处理期间 CO_2 浓度利用Telair7001 CO_2 检测仪(Hoyt Electrical Instrument Works Inc., New Hampshire, USA)连续监测。实验在2个规格完全相同的人工气候室内进行, 一个为大气 CO_2 浓度($\approx 350 \mu mol \cdot mol^{-1}$), 另一个为升高的 CO_2 浓度[$\approx (700 \pm 50) \mu mol \cdot mol^{-1}$], 由带减压阀控制的压缩 CO_2 钢瓶来实现。水分处理采用限制浇灌方法: 中度干旱胁迫为限制灌水, 土壤相对持水量(WRC)约65%; 重度干旱胁迫为限制灌水, WRC约50%; 对照为正常浇灌, WRC约80% (早期验证此为番茄植株生长最佳水分条件)。处理后第7天取样, 至少重复3次, 叶片取样后迅速在液氮中冷冻并保存于-80 °C超低温冰箱中待测。所有试验样品测定每处理至少重复3次, 结果以平均值 \pm 标准误差表示。

2 方 法

2.1 干旱胁迫下番茄植株光合水平的测定

采用便携式光合作用系统(CIRAS-2, PP Systems, Boston, USA)测定植株净光合速率(P_n)。待测植株在光照强度 $100 \mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ 光量子通量密度(PPFD)条件下适应30 min, 然后在 $800 \mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ PPFD适应15 min后, 最后于叶温25 °C、氧气含量21%、 CO_2 浓度 $360 \mu mol \cdot mol^{-1}$ 条件下测定 P_n 值。

采用脉冲调制式便携荧光仪(FMS2, Hansatech, Norfolk, UK)测定光系统II最大光化学量子产量(F_v/F_m)。将番茄植株在 $800 \mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ PPFD光下(25 °C)适应30 min, 打远红光($3\ 000 \mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ PPFD) 3 s后暗适应15 min, 测定 F_o 、 F_m 、 F_v/F_m 等参数。

2.2 干旱胁迫下番茄叶片ROS含量测定

O_2^- 含量测定时, 将2.0 g叶片于加入10% (M/V) TCA的研钵中研磨, 研磨混合物以 $4\ 000 \times g$ 离心10 min。取上清液并加入 $10 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ 氯化羟胺于25 °C温浴20 min。再加入 $17 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ p -氨基苯磺酸和 $7 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ α -萘胺, 于25 °C温浴20 min。在以上混合物中加入乙醚并以 $1\ 500 \times g$ 离心5 min。最后吸取上清液并测定530 nm处的吸光值。

H_2O_2 含量测定参照Sairam和Srivastava (2002)的方法进行。

2.3 干旱胁迫下番茄叶片抗氧化酶活性测定

SOD活性测定根据Giannopolitis和Ries (1977)的方法进行。tAPX活性参照Amako等(1994)的方法进行测定。

2.4 干旱胁迫下番茄叶片抗氧化小分子物质含量的测定

抗坏血酸(AsA)含量的测定根据Kampfenkel等(1995)的方法进行。谷胱甘肽(GSH)含量参照Law等(1983)的方法进行测定。

2.5 干旱胁迫下番茄叶片渗透调节物质含量测定

游离脯氨酸含量的测定参照赵世杰等(2002)的方法进行。总蛋白含量的测定根据Bradford (1976)的方法进行。可溶性糖含量的测定参照赵世杰等(2002)的方法进行。

2.6 干旱胁迫下番茄叶片质膜伤害度测定

丙二醛(MDA)含量及质膜伤害度测定参照Sun等(2010)方法进行。以相对电子渗透率表示细胞质膜伤害度, 伤害度(%)=(最初处理叶片电导率)/(最终煮沸叶片电导率) $\times 100$ 。

实验结果

1 干旱胁迫伴随CO₂变化条件下番茄植株光合水平的变化

干旱胁迫下测试植株的 P_n 下降,且在大气CO₂条件下比在升高CO₂时植株的 P_n 降低更明显(图

1-A)。干旱胁迫下番茄植株的 F_v/F_m 有所下降,但在升高CO₂时 F_v/F_m 下降缓慢。与对照(80% WRC)相比,在50% WRC干旱胁迫下大气CO₂野生型、大气CO₂转基因型、升高CO₂野生型和升高CO₂转基因植株的 F_v/F_m 分别降低了58.76%、40.11%、47.43%和26.32%(图1-B)。

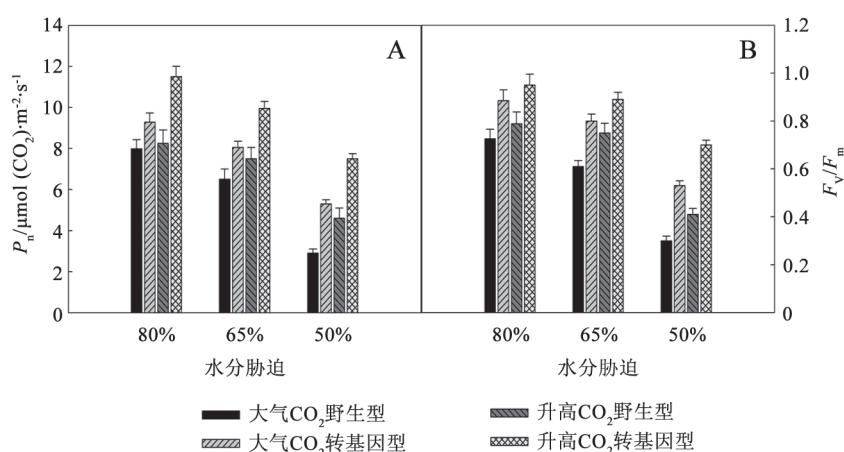


图1 干旱胁迫伴随CO₂变化条件下番茄植株中光合水平的变化

Fig.1 Changes of photosynthetic capacity in tomato plants under drought stresses accompanied with CO₂ change

2 干旱胁迫伴随CO₂变化条件下番茄植株H₂O₂和O₂⁻含量变化

干旱胁迫下野生型番茄植株的H₂O₂含量明显高于转基因植株,在升高CO₂时几乎所有测试植株的H₂O₂含量均低于大气CO₂时的含量。与对照(80% WRC)相比,在50% WRC干旱胁迫下大气CO₂野生型、大气CO₂转基因型、升高CO₂野生型和升高CO₂转基因植株叶片的H₂O₂含量分别增加了

175.92%、99.00%、133.01%和57.14%(图2-A)。干旱胁迫伴随无论是大气CO₂还是升高CO₂条件下,野生型番茄植株的O₂⁻含量均明显高于转基因植株。在50% WRC干旱胁迫下大气CO₂野生型、大气CO₂转基因型、升高CO₂野生型和升高CO₂转基因植株叶片的O₂⁻含量分别比其对照(80% WRC)增加了354.50%、230.19%、294.74%和140.82%(图2-B)。

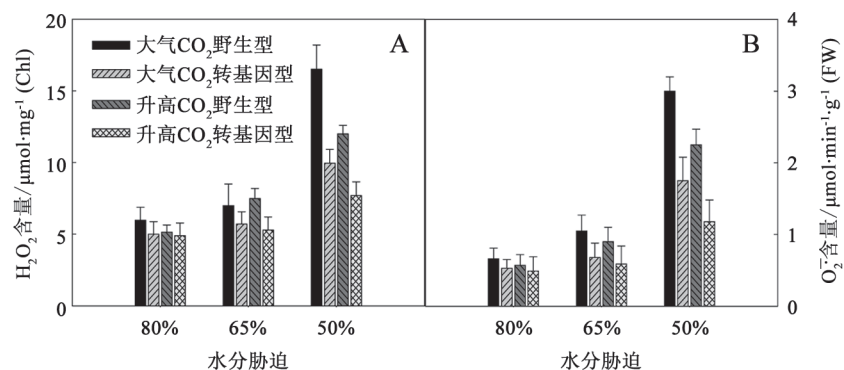


图2 干旱胁迫伴随CO₂变化条件下番茄植株中H₂O₂和O₂⁻含量变化

Fig.2 Changes of H₂O₂ and O₂⁻ contents in tomato plants under drought stresses accompanied with CO₂ change

3 干旱胁迫伴随CO₂变化条件下番茄植株APX和SOD活性变化

在65% WRC和50% WRC干旱胁迫下测试番茄植株的APX和SOD活性均有增加, 而且转基因植株的酶活性明显高于野生型。与大气CO₂条件相比, 测试植株在升高CO₂条件下的酶活性略有增

强。在50% WRC干旱胁迫下大气CO₂野生型、大气CO₂转基因型、升高CO₂野生型和升高CO₂转基因植株叶片的APX活性比对照植株(80% WRC处理)分别升高了72.36%、72.45%、89.87%和100.00% (图3-A)。其SOD活性分别升高了23.81%、36.17%、31.91%和41.05% (图3-B)。

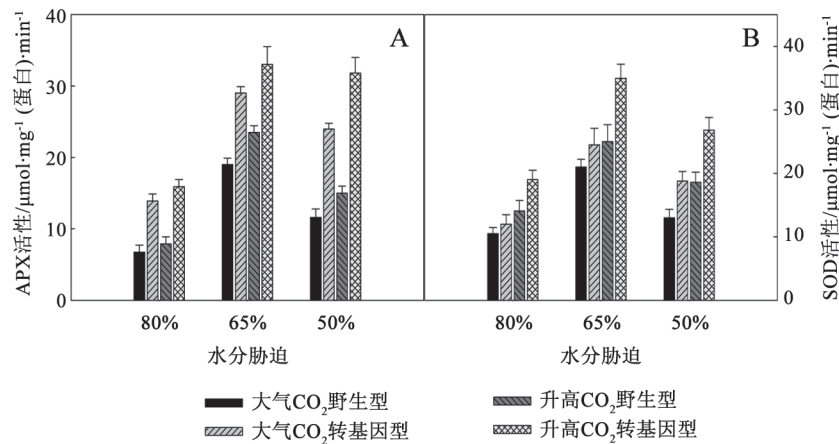


图3 干旱胁迫伴随CO₂变化条件下番茄植株中APX和SOD活性变化

Fig.3 Changes of APX and SOD activities in tomato plants under drought stress accompanied with CO₂ change

4 干旱胁迫伴随CO₂变化条件下番茄植株AsA和GSH含量变化

随着干旱胁迫程度加剧, 升高CO₂时测试植株的总AsA含量高于大气CO₂条件下的含量。在50% WRC干旱胁迫下大气CO₂野生型、大气CO₂转基因型、升高CO₂野生型和升高CO₂转基因植

株叶片的总AsA含量比对照植株(80% WRC处理)分别升高了8.33%、23.45%、23.03%和51.83% (图4-A)。随着干旱胁迫程度加剧, 测试植株的GSH含量有所增加, 但在升高CO₂时测试植株的GSH含量比大气CO₂条件下的变化不明显(图4-B)。

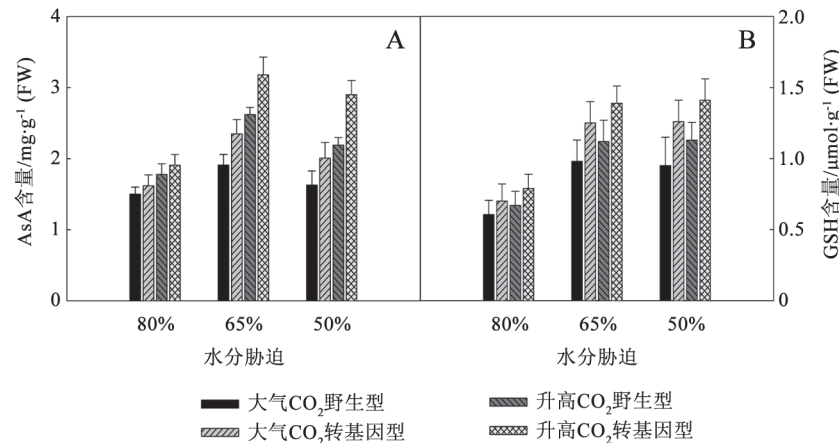


图4 干旱胁迫伴随CO₂变化条件下番茄植株中AsA和GSH含量变化

Fig.4 Changes of AsA and GSH contents in tomato plants under drought stress accompanied with CO₂ change

5 干旱胁迫伴随CO₂变化条件下番茄植株渗透调节物质含量变化

干旱胁迫伴随大气CO₂及升高CO₂条件下, 测试植株的游离脯氨酸及可溶性糖含量比对照略有增加, 且转基因植株高于野生型, 但总体变化不明显(图5-A、B)。测试植株的总蛋白含量随着干旱

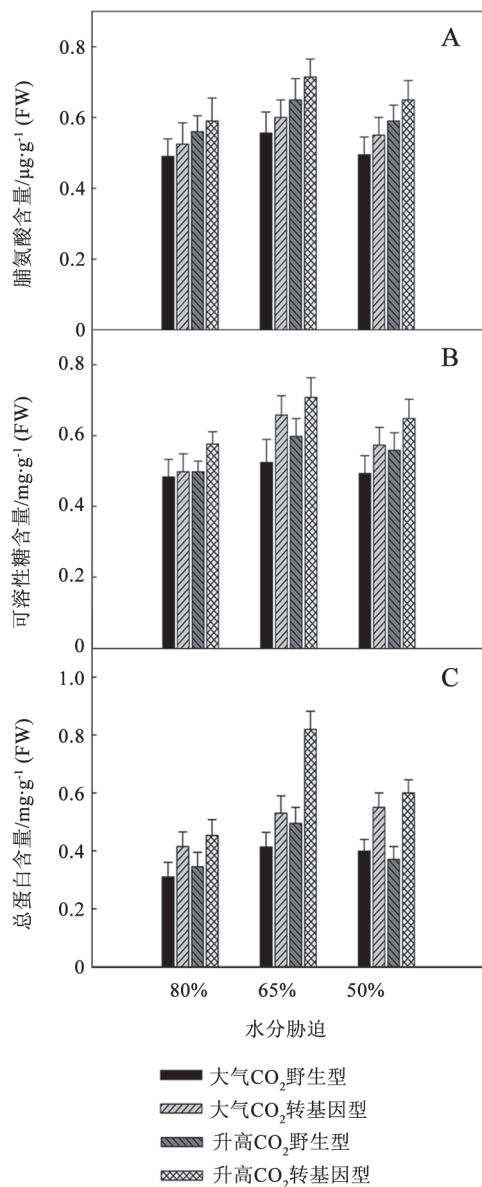


图5 干旱胁迫伴随CO₂变化条件下番茄植株中渗透调节物质含量变化

Fig.5 Changes of osmotic adjustment substances contents in tomato plants under drought stress accompanied with CO₂ change

胁迫以及CO₂升高而略有增加(图5-C)。

6 干旱胁迫伴随CO₂变化条件下番茄叶片膜脂伤害变化

测试植株叶片的MDA含量随着干旱胁迫程度的加剧而明显增加, 但是在升高的CO₂时测试植株叶片的MDA含量低于大气CO₂时的MDA含量, 而且干旱胁迫下野生型植株的MDA含量均明显高于转基因植株。在50% WRC干旱胁迫下大气CO₂野生型、大气CO₂转基因型、升高CO₂野生型和升高CO₂转基因植株的MDA含量分别比对照植株(80% WRC处理)增长了178.08%、109.21%、155.22%和72.79%(图6-A)。

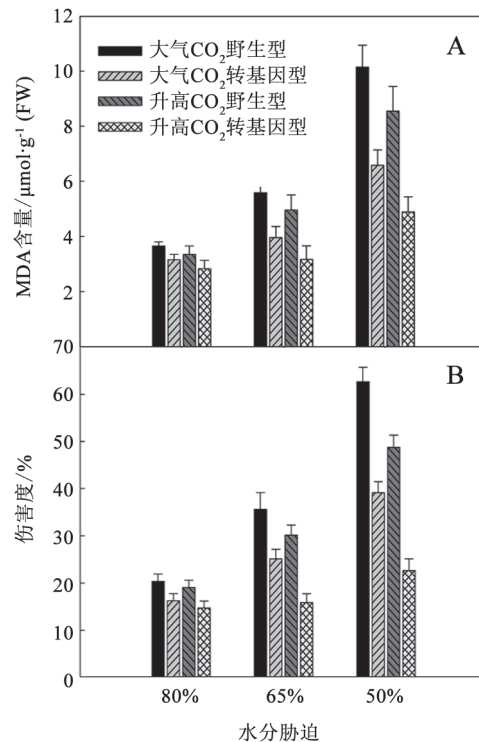


图6 干旱胁迫伴随CO₂变化条件下番茄植株叶片膜脂伤害变化

Fig.6 Changes of plasma-membrane injury in tomato plants under drought stress accompanied with CO₂ change

在50% WRC干旱胁迫下大气CO₂野生型、大气CO₂转基因型、升高CO₂野生型和升高CO₂转基因植株叶片的膜伤害度分别是其对照(80% WRC)的209.40%、142.23%、157.14%和54.64%(图6-B)。

讨 论

ROS是植物细胞代谢过程中产生的强毒副产品,可以直接造成膜脂过氧化(Mittler 2002)。图2所示,在水分胁迫伴随升高CO₂条件下番茄植株ROS含量低于大气CO₂条件下的含量,可能是由于升高的CO₂部分弥补了干旱条件下气孔导度下降引起的胞间CO₂浓度下降,提升了植物的光合能力(图1),而且升高的CO₂能增加作为PSI电子受体的NADP⁺的利用效率,从而限制电子流传递给分子氧而避免形成过多的ROS。同时,转基因番茄植株中过量表达的APX具有较强的清除ROS能力,所以其在升高CO₂条件下体内ROS含量积累更明显低于野生型(图2、3)。

CO₂浓度影响Rubisco的催化能力并调节光合电子传递速率,从而影响植物光合水平。图1所示,在大气CO₂条件下的干旱逆境中,番茄植株的 P_n 和 F_v/F_m 降低比在升高CO₂条件下更明显,说明干旱胁迫下升高CO₂能够提高番茄植株的光合水平。同时,在干旱胁迫下野生型比转基因番茄植株的 P_n 和 F_v/F_m 降低更明显,表明过量表达*SlAPX*能有效减轻植物在干旱胁迫下的光氧化损伤(图1)。其他的研究结果也证明水-水循环系统能够维持植物体内ROS的平衡及补偿逆境胁迫引起的光合水平的下降(Zhou等2004; Saxena等2011)。

水-水循环系统表明了叶绿体中氧化胁迫最初产生部位的ROS清除机制存在的重要性。作为叶绿体内清除ROS的首道防线, SOD歧化O₂⁻成O₂和H₂O₂。植物体内过氧化氢酶和过氧化物酶可催化H₂O₂成为H₂O,但是定位在植物叶绿体中清除H₂O₂的主要是APX。实验结果显示在干旱胁迫下测试番茄植株的APX和SOD活性高于非胁迫条件下的酶活性(图3)。同时,干旱胁迫下,番茄植株的总AsA和GSH含量有所增加(图4),其中还原性AsA含量在干旱胁迫下略有降低(图未显示),说明有更多的AsA作为电子供体参与APX对ROS的清除过程并不断再生新的AsA。以上结果表明番茄植株,尤其是转基因植株在干旱胁迫下能够充分利用ROS清除酶和小分子抗氧化物质保持ROS产生和清除之间的平衡。在较高的CO₂条件下植物通过光合电子传递系统的调控作用而产生更多的NADPH, NADPH是清除ROS的AsA-GSH循环系统不

可缺少的能量,而且能促进APX催化过程中电子供体AsA的再生(Long等2004)。因此,在逆境胁迫伴随升高CO₂条件下,植物具有更强的清除ROS能力,当然在过量表达*SlAPX*的转基因植株中清除ROS能力更显著(图2~4)。

渗透调节也是植物适应逆境胁迫的防御机制之一,低分子量的渗透调节物质的积累能使植物细胞在失水条件下维持一定的膨压。然而,渗透调节物质在某些植物(如番茄、水稻等)中的积累量较少(李国龙等2010)。本实验结果表明干旱胁迫下测试番茄植株叶片内脯氨酸和可溶性糖等渗透调节物质含量增加极少(图5)。因此,番茄植株可能主要依赖于其他保护途径来抵御干旱胁迫,如清除ROS的抗氧化酶类以及小分子抗氧化物质等(图3、4)。

干旱逆境会诱发植物氧化胁迫,造成膜结构和功能的破坏。实验结果表明,随着干旱胁迫程度加剧,番茄叶片质膜透性加大,MDA含量升高。但转基因植株的质膜受伤害程度轻于野生型,而且升高CO₂可在一定程度上减轻番茄植株在干旱胁迫下的膜伤害度(图6),说明转基因番茄通过提高ROS清除能力减轻干旱对膜脂的过氧化,且这一作用在高CO₂浓度时更明显,因为较高的胞间CO₂浓度促进更多的电子流向碳同化,降低了ROS积累,减轻了植物膜脂过氧化。

叶绿体是植物在逆境下氧化胁迫主要攻击的部位,ROS清除系统最重要的功能是迅速清除叶绿体部位产生的O₂⁻和H₂O₂。本研究结果显示干旱胁迫下提高CO₂浓度对番茄植株ROS清除系统的酶活性影响明显,转基因番茄植株通过其ROS清除能力的提高来减轻干旱对植物膜脂的过氧化和光合的抑制作用。因此适度升高CO₂浓度能够提高干旱胁迫下番茄植株尤其是转基因植株的抗性。

参考文献

- 李国龙, 吴海霞, 温丽, 邵科, 李占有, 张少英(2010). 作物抗旱生理与分子作用机制研究进展. 中国农学通报, 26: 185~191
- 赵世杰, 史国安, 董新纯(2002). 植物生理学实验指导. 北京: 中国农业科学技术出版社
- 张木青, 陈如凯(2005). 作物抗旱分子生理与遗传改良. 北京: 科学出版社
- Amako K, Chen GX, Asada K (1994). Separate assays specific for ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase and for the chloroplastic and cytosolic isozymes of ascorbate peroxidase in plants.

- Plant Cell Physiol, 35: 497~504
- Badawi GH, Kawano N, Yamauchi Y, Shimada E, Sasaki R, Kubo A, Tanaka K (2004). Over-expression of ascorbate peroxidase in tobacco chloroplasts enhances the tolerance to salt stress and water deficit. *Physiol Plant*, 121: 231~238
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248~254
- Giannopolitis CN, Ries SK (1977). Superoxide dismutases. I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiol*, 59: 309~314
- Kampfenkel K, van Montagu M, Inzé D (1995). Extraction and determination of ascorbate and dehydroascorbate from plant tissue. *Anal Biochem*, 225: 165~167
- Kavitha K, Venkataraman G, Parida A (2008). An oxidative and salinity stress induced peroxisomal ascorbate peroxidase from *Avicennia marina*: molecular and functional characterization. *Plant Physiol Biochem*, 46: 794~804
- Law MY, Charles SA, Halliwell B (1983). Glutathione and ascorbic acid in spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplasts. The effect of hydrogen peroxide and of Paraquat. *Biochem J*, 210: 899~903
- Long SP, Ainsworth EA, Roberts A, Ort DR (2004). Rising atmospheric carbon dioxide: plants FACE the future. *Annu Rev Plant Physiol*, 55: 591~628
- Mittler R (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci*, 7: 405~410
- Parry ML, Rosenzweig C, Iglesias A, Livermore M, Fischer G (2004). Effects of climate change on global food production under SRES emissions and socio-economic scenarios. *Global Environ Change*, 14: 53~67
- Sairam PK, Srivastava GC (2002). Changes in antioxidant activity in sub-cellular fractions of tolerant and susceptible wheat genotypes in response to long term salt stress. *Plant Sci*, 162: 897~904
- Saxena SC, Joshi PK, Grimm B, Arora S (2011). Alleviation of ultraviolet-C-induced oxidative damage through overexpression of cytosolic ascorbate peroxidase. *Biologia*, 66: 1052~1059
- Sun WH, Duan M, Li F, Shu DF, Yang S, Meng QW (2010). Overexpression of tomato *tAPX* gene in tobacco improves tolerance to high or low temperature stress. *Biol Plant*, 54: 614~620
- Sun WH, Liu XY, Wang Y, Hua Q, Song XM, Gu Z, Pu DZ (2013). Effect of water stress on yield and nutrition quality of tomato plant overexpressing *StAPX*. *Biol Plant*, doi.10.1007/s10535-013-0360-y
- Zhou YH, Yu JQ, Huang LF, Nogues S (2004). The relationship between CO₂ assimilation, photosynthetic electron transport and water-water cycle in chill-exposed cucumber leaves under low light and subsequent recovery. *Plant Cell Environ*, 27: 1503~1514