

## 研究报告 Original Papers

## 干旱胁迫下番茄叶片碳酸酐酶活性的变化

孙卫红<sup>1\*</sup>, 吴秋霞<sup>1</sup>, 温新宇<sup>1</sup>, 何华纲<sup>1</sup>, 吴沿友<sup>2</sup>, 丁佳俊<sup>1</sup>, 封丽娜<sup>1</sup>江苏大学<sup>1</sup>食品与生物工程学院; <sup>2</sup>农业工程研究院, 江苏镇江212013

**摘要:** 碳酸酐酶(carbonic anhydrase, CA)催化CO<sub>2</sub>的可逆水合反应,是参与CO<sub>2</sub>传导而进入羧化位点的重要光合酶,其活性高低对植物水分利用及光合作用有较大影响。为了研究干旱胁迫下番茄CA表达活性变化对植株光合作用及水分利用的影响,本文利用Northern杂交检测番茄叶片的胞质CA基因在干旱胁迫下的表达;测定干旱胁迫下番茄叶片CA活性、光合速率和叶片水势变化。结果表明,番茄叶片胞质CA基因受干旱胁迫诱导;CA活性随着干旱胁迫时间延长而发生由低至高再回落的变化,且变化规律基本与CA基因相似。番茄叶片的净光合速率和水势随着干旱程度和处理时间延长而降低。在75%的土壤相对水分含量条件下,植株的CA活性、光合速率及水势变化不明显。可见番茄叶水势和光合速率与CA表达活性之间存在一定的变化趋势相似性。

**关键词:** 干旱胁迫; 番茄叶片; 碳酸酐酶活性

## Changes of Carbonic Anhydrase Activities in Tomato Leaves under Drought Stress

SUN Wei-Hong<sup>1\*</sup>, WU Qiu-Xia<sup>1</sup>, WEN Xin-Yu<sup>1</sup>, HE Hua-Gang<sup>1</sup>, WU Yan-You<sup>2</sup>, DING Jia-Jun<sup>1</sup>, FENG Li-Na<sup>1</sup><sup>1</sup>School of Food and Biological Engineering; <sup>2</sup>Institute of Agricultural Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212013, China

**Abstract:** Carbonic anhydrase (CA) catalyzes the reversible hydration of CO<sub>2</sub>, and it is an important photosynthetic enzyme which take part in the CO<sub>2</sub> conduction and get into the carboxylation site. The CA activity has a great effect on photosynthesis and water use efficiency. In order to study the effect of expression of CA gene on the plant photosynthesis and plant water potential in tomato (*Lycopersicon esculentum*), the expression of cytosolic CA gene in tomato leaves under drought stress were determined by Northern blotting. And the CA enzyme activity, photosynthetic rate and water potential in tomato leaves under drought stress were also determined. The results showed that the expression of cytosolic CA gene in tomato leaves was induced by drought stress. With the time of drought stress, the CA activity increased and then fell, and the changes were basically similar to that of CA gene expression. Net photosynthetic rate and water potential of tomato leaves decreased with the degree of drought and the treatment time. However, the CA activity, net photosynthetic rate and water potential changed slightly with the soil relative water content of 75%. The results indicated that there was a certain corresponding relationship between the changes of water potential and photosynthetic rate in tomato leaves and the change of CA activity.

**Key words:** drought stress; tomato (*Lycopersicon esculentum*) leaves; CA activity

干旱胁迫对植物造成的伤害是多方面的, 可以导致叶片蒸腾量过大, 细胞失水, 膜脂过氧化, 严重时会导致作物死亡(Reddy等2004)。土壤及大气干旱造成叶片气孔失水关闭, 以保持叶片内相对较高的水势, 但同时又严重阻碍了CO<sub>2</sub>进入叶肉细胞, 降低了植物的光合作用, 影响了作物产量。碳酸酐酶(carbonic anhydrase, CA, EC 4.2.1.1)催化CO<sub>2</sub>的可逆水合反应(Khalifah 1980), 它能快速地将HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>转化成H<sub>2</sub>O和CO<sub>2</sub>, 可以弥补水分逆境后植物缺水和CO<sub>2</sub>的缺失。作为参与CO<sub>2</sub>传导而进入羧化位点的重要光合酶, CA活性高低对光合作用

有较大影响(Kaul等2011; Diamantopoulos等2013)。在C<sub>3</sub>植物中, CA可通过促进CO<sub>2</sub>的液相扩散调节对光合起作用(Burnell等1990; Moroeny等2011), 而适量升高的CO<sub>2</sub>浓度能够提高植物的光合能力和水分利用效率(孙卫红等2013)。在低CO<sub>2</sub>的胁迫环

收稿 2014-11-06 修定 2015-03-14

资助 江苏省自然基金面上项目(BK20130503)、江苏省博士后基金项目(1102132C)和江苏高校优势学科建设工程资助项目。

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

境中, 利用CA保持Rubisco周围高浓度的CO<sub>2</sub>水平对于植物维持光合系统的最适功能是至关重要的。此外, 研究证明缺少CA基因 $\beta CA1$ 和 $\beta CA4$ 的拟南芥突变体对空气中CO<sub>2</sub>的响应被削弱, 而过量表达这两种基因的植物则表现出较高的水分利用效率(Hu等2010)。研究证明诸葛菜的CA活力大于几乎所有的被测十字花科植物, 这种较高的CA活性可能与卡斯特地区植物耐干旱贫瘠适应性有一定的关系(吴沿友等2006), 而番茄的CA是否具有同样的机制至今未见报道。

番茄是中国的主要蔬菜作物, 经常会受到干旱胁迫等逆境伤害, 干旱胁迫会影响番茄的产量甚至营养品质(Sun等2014)。在植物CA作用机制的探索中, 有研究表明逆境胁迫下烟草Rubisco和CA的表达呈现出一致性(Vats等2011), 玉米叶片中PEPCase和CA表达上亦有紧密相关性(Badger 2003), 说明在水分逆境条件下CA活性对光合速率有一定调节作用(Shao等2014), 其对水分逆境的响应程度可以作为作物生长及水分灌溉的指标之一。

本研究分析番茄叶片胞质CA基因(*ScCA*)在干旱胁迫下的表达情况及CA活性变化, 以及干旱胁迫下CA表达活性与植株的光合效率和水势变化之间的关系, 为作物节水灌溉技术的应用提供理论依据。

## 材料与方 法

### 1 植物材料与干旱胁迫处理

植物材料种植在江苏大学玻璃温室内, 温度为(25±5) °C, 光照强度平均约为1 000  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , 相对湿度(75±5)%。以番茄(*Lycopersicon esculentum* Mill.) ‘中蔬6号’植株为试材。种子在育苗盘培育2周后移栽于温床中定植生长, 采用黄土添加约1/5的炉渣和腐熟鸡粪等混合有机基质培养, 栽培基质约50 cm深度。

从定植后21 d开始处理(此时为对照, 记为0 d)。按土壤相对含水率不同, 设3个水分处理: 土壤相对含水率(relative water content, RWC) (75±5)%为正常对照、(50±5)%为干旱处理、(25±5)%为严重干旱处理。滴灌系统灌溉, 每天10:00和15:00测定栽培基质水分, 取土样于实验室利用称重法测定土壤相对含水率。同时采用手持式HH2水分仪(Delta-T Devices 英国)与ML2探头(Delta-T Devices

英国)测定, 滴灌补充水分确保不同处理的土壤水分含量基本稳定。处理5 d后测定各个指标。3次重复, 每个重复以10株测试。

### 2 干旱胁迫下番茄叶片*ScCA*基因的表达

干旱胁迫处理番茄植株, 处理时间分别为0、1、2、3、4和5 d。取顶部以下3~4层叶片, 提取叶片总RNA, RNA的提取采用Trizol (Invitrogen)抽提法, 详细步骤按试剂说明书进行。Northern杂交方法参照《分子克隆实验指南》(Sambrook和Russell 2010), RNA (25  $\mu\text{g}$ )用甲醛变性凝胶电泳分离, 电泳完毕后将RNA转移至尼龙膜上, 交联固定RNA。于65 °C预杂交12 h, 42 °C杂交36 h。其中构建探针的引物序列为5' CCCTTAGCTTCATCATCAACG 3' 和5' TTAGAGTGCAACAGAAGGAGT 3' (用 $[\text{a}^{32}\text{P}]$  dCTP标记)。于-80 °C放射自显影后, 磷屏成像。

### 3 干旱胁迫下番茄植株叶片CA活性测定

取各个处理时期的叶片于液氮冷冻处理后放于超低温冰箱中保存, 用于CA活性测定。采用电化学法, 利用自制的pH梯微电极测定CA活力(施倩倩等2010)。反应系统在冰箱中保持0~2 °C, 用梯微电极监测反应体系的pH值变化。根据该时间电位曲线得到酶存活和失活条件下单位pH值下降的时间 $t_1$ 和 $t_0$ , 酶活性用WA-U表示(其中 $\text{WA}=\frac{t_0}{t_1-1}$ )。

### 4 干旱胁迫下番茄植株叶片光合速率测定

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( $P_n$ )。于上午10:00时测定, 待测植株先在光照强度100  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 下适应30 min, 后在800  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 下适应15 min, 于叶温25 °C、CO<sub>2</sub>浓度360  $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ 条件下测定 $P_n$ 值。

### 5 干旱胁迫下番茄植株叶片水势变化测定

在进行光合参数测定的同时, 叶片水势测定采用PSYPRO (Water Potential System, South Logan, Utah, USA)露点水势仪进行。

### 6 数据处理方法

每个处理及测定至少3个重复, 结果以平均值±误差表示。图表中显示的值是平均值±SD,  $P\leq 0.05$ 为差异显著。

## 实验结果

### 1 干旱胁迫下番茄叶片*ScCA*基因的表达分析

图1显示番茄叶片*ScCA*基因的表达随着不同

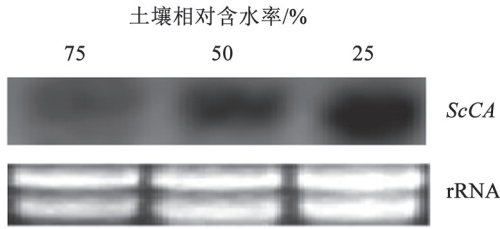


图1 不同干旱胁迫下番茄叶片*ScCA*基因的表达  
Fig.1 Expression of *ScCA* in tomato leaves under different drought stress

RWC而变化。在50%及25% RWC胁迫处理5 d, 番茄*ScCA*基因的表达量高于75% RWC正常生长条件下的表达量(图1)。这表明番茄*ScCA*基因的表达受干旱胁迫诱导。

图2显示, 在50% RWC的干旱胁迫下, *ScCA*基因的表达量逐渐增加, 第3天达到最高, 以后逐渐降低, 表明番茄叶片*ScCA*基因的表达随时间延长变化。

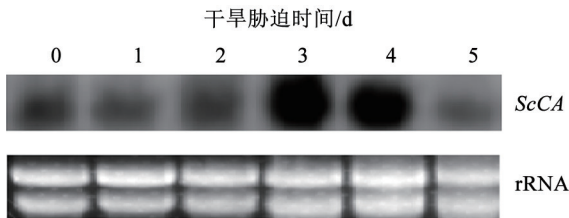


图2 不同干旱胁迫时间下番茄叶片*ScCA*基因的表达  
Fig.2 Expression of *ScCA* in tomato leaves in different time under drought stress

## 2 干旱胁迫下番茄叶片胞质CA的活性变化

图3所示, 在不同干旱胁迫下, 番茄植株叶片

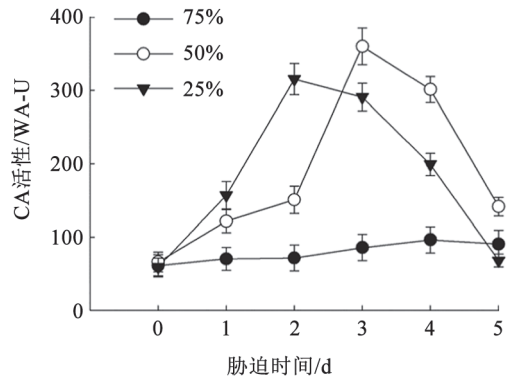


图3 干旱胁迫下番茄叶片CA活性变化  
Fig.3 Changes of CA activities in tomato leaves under drought stress

的CA活性随着时间而变化。在50%和25% RWC胁迫下, 植株的CA活性均先升高后降低。在25% RWC胁迫下, 番茄的CA活性急剧上升, 第2天就达到高峰, 之后则下降。而50% RWC胁迫的CA活性则缓慢上升, 第3天达到峰值, 之后也急剧下降。从第3天起, 50% RWC胁迫的CA活性都高于25% RWC胁迫的。75% RWC正常条件下, 植株的CA活性略有上升, 变化量不明显。

## 3 干旱胁迫下番茄叶片光合速率变化与水势变化

如图4-A所示, 不同干旱胁迫的番茄叶片 $P_n$ 都呈下降趋势。25% RWC胁迫的番茄 $P_n$ 急剧下降, 50% RWC胁迫的番茄 $P_n$ 下降程度比较缓和, 而75% RWC条件下的 $P_n$ 略微下降, 第4天略有上升, 变化不明显。

不同干旱胁迫下番茄植株叶片的水势与番茄叶片 $P_n$ 保持一致的变化趋势(图4-B)。而在75% RWC条件下, 植株的水势几乎没有变化。

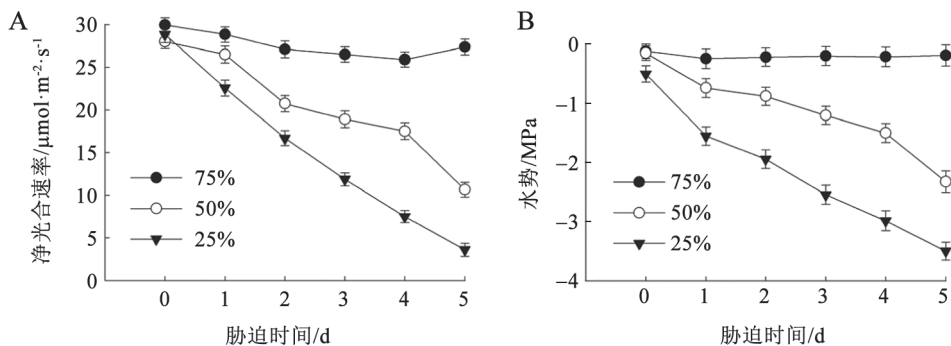


图4 干旱胁迫下番茄叶片净光合速率和水势的变化  
Fig.4 Changes of  $P_n$  and water potential in tomato leaves under drought stress

## 讨 论

在胁迫环境下, 植物体内的某些耐逆功能酶能够对逆境胁迫作出一定的响应。本文研究结果表明干旱胁迫诱导CA基因的表达及CA活性升高(图1~3), 其它研究如盐胁迫等也有类似的结论(Li等2010)。在严重干旱胁迫下, 番茄植株叶片的 $P_n$ 与水势随着土壤干旱程度加剧和处理时间延长而下降(图4-A), 可见, 番茄的生长对水分胁迫反应敏感。干旱胁迫使植物体内水势下降, 气孔关闭, 光合速率减弱, 产量降低(Munne-Bosch和Penuelas 2004; Reinfelder 2011)。在逆境光合过程中, 正是CA催化进行可逆的 $\text{CO}_2$ 水合反应, 降低了 $\text{CO}_2$ 在叶肉细胞中的扩散阻力, 促进其向Rubisco扩散, 有效地将 $\text{CO}_2$ 转化为 $\text{HCO}_3^-$ , 为羧化反应提供底物, 从而尽量维持较高的光合作用(图3~4)。

在一定的水分胁迫下, 番茄植株胞质CA的基因表达量及其酶活性与其光合速率和水势变化趋势之间存在一定的相似性(图1~4)。75% RWC条件下第5天番茄叶片ScCA基因几乎没有被诱导表达, 其相应CA活性较低, 但能持续维持较高的净光合速率水平和较高的水势, 生长情况良好, 可见75% RWC可能是番茄植株的最佳生长条件之一(Sun等2014)。50% RWC干旱胁迫下, ScCA基因从开始表达(逆境下CA调控光合的开始)到第3~4天表达量达到最高峰(CA达到最大光合调控能力), 再回到初始对照水平(CA对光合的调控能力及对叶片水势的调控能力急剧下降)。之后, CA活性再继续下降, 则CA对光合的调控能力失控, 水势急速下降。在25% RWC重度干旱胁迫第5天, 番茄植株ScCA基因表达量虽高于其在75% RWC条件下的测定值, 但其酶活性已降低, 植株膜系统受损, 植株外观形态改变, 光合能力快速下降。

综上所述, 以CA活性变化作为植物灌溉指标, 能更准确反映植物的光合速率和水势变化情况。如50% RWC干旱胁迫第5天, 应进行灌溉(达到75% RWC即可), 此时没有光合产量损失及水势胁迫和膜系统损伤, 否则会有无法弥补的光合产量损失; 在这之前的灌溉则会造成水分浪费。当然, 这是在温度和湿度条件基本恒定的温室内测定得出的结论。如果是针对大田作物, 应该针对不同季节、不同温度条件下, 利用CA活性变化所对应的

土壤含水率为灌溉指标, 比以植株的外观形态变化为指标更具有节水灌溉和达到高产的优势。利用CA活性变化对大田作物实际生产的应用验证研究正在进行中, 目前研究表明, 春季5月(19~26 °C)大田番茄植株在50% RWC干旱胁迫的研究结果基本符合温室条件的试验结论。

## 参考文献

- 施倩倩, 吴沿友, 朱咏莉, 宋艳娇(2010). 构树与桑树叶片的碳酸酐酶胞外酶活力比较. 安徽农业科学, 38 (16): 8376~8377
- 孙卫红, 孙祺祺, 吴秋霞, 刘汉玄, 陈梅, 陈喆(2013). 干旱胁迫下 $\text{CO}_2$ 浓度升高对转SLPX番茄植株耐旱能力的影响. 植物生理学报, 49: 1~7
- 吴沿友, 李西腾, 郝建朝, 李萍萍, 王宝利(2006). 不同植物的碳酸酐酶活力差异研究. 广西植物, 26 (4): 366~369
- Sambrook J, Russell DW (2010). 分子克隆实验指南. 北京: 科学出版社
- Badger M (2003). The role of carbonic anhydrase in photosynthetic  $\text{CO}_2$  concentrating mechanism. Photosynth Res, 77: 83~94
- Burnell JN, Gibbs MJ, Mason JG (1990). Spinach chloroplastic carbonic anhydrase: nucleotide sequence analysis of cDNA. Plant Physiol, 92: 37~40
- Diamantopoulos PD, Aivalakis G, Fletmetakis E, Katinakis P (2013). Expression of three  $\beta$ -type carbonic anhydrase in tomato fruits. Mol Biol Rep, 40: 4189~4196
- Hu H, Boisson-Dernier A, Israelsson-Nordstrom M, Bohmer M, Xue SW, Ries A, Godoski J, Kuhn JM, Schroeder JI (2010). Carbonic anhydrases are upstream regulators of  $\text{CO}_2$ -controlled stomatal movements in guard cells. Nat Cell Biol, 12: 87~93
- Kaul T, Reddy PS, Mahanty S, Thirugachandar V, Reddy RA, Kumar B, Sopory SK, Reddy MK (2011). Biochemical and molecular characterization of stress-induced  $\beta$ -carbonic anhydrase from a  $C_4$  plant *Pennisetum glaucum*. Plant Physiol, 168: 601~610
- Khalifah RG (1980). Kinetics and mechanistic implications of  $\text{CO}_2$  hydration activity of human erythrocyte carbonic anhydrases. Biophysics and physiology of carbon dioxide. In: Bauer C, Gros G, Bartels H (eds). Biophysics and Physiology of Carbon Dioxide. New York: Springer Berlin Heidelberg, 206~215
- Li J, Lu Y, Xue L, Xie H (2010). A structurally novel salt regulated promoter of duplicated carbonic anhydrase gene 1 from *Dunaliella salina*. Plant Mol Biol Rep, 37: 1143~1154
- Moroeny JV, Ma Y, Frey WD, Fusilier KA, Pham TT, Simms TA, Dimario RJ, Yang J, Mukherjee B (2011). The carbonic anhydrase isoforms of *Chlamydomonas reinhardtii*: intracellular location, expression, and physiological roles. Photosynth Res, 109: 133~149
- Munne-Bosch S, Penuelas J (2004). Drought-induced oxidative stress

- in strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) growing in Mediterranean field conditions. *Plant Sci*, 166: 1105~1110
- Reddy AR, Chaitanya KV, Vivekanandan M (2004). Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plant. *J Plant Physiol*, 161: 1189~1202
- Reinfelder JR (2011). Carbon concentrating mechanism in Eukaryotic marine phytoplankton. *Ann Rev Mar Sci*, 3: 291~315
- Shao Z, Liu F, Li Q, Yao J, Duan D (2014). Characterization of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and transcriptional analysis of its related genes in *Saccharina japonica* (Laminariales, Phaeophyta). *Chin J Oceanol Limnol*, 32: 377~389
- Sun WH, Liu XY, WY, Hua Q, Song XM, Gu Z, Pu DZ (2014). Effect of water stress on yield and nutrition quality of tomato plant overexpressing *StAPX*. *Biol Plant*, 58: 99~104
- Vats SK, Kumar S, Ahuja PS (2011). CO<sub>2</sub> sequestration in plants: lesson from divergent strategies. *Photosynthetica*, 49: 481~496