

桃*PpSnRK1α*在番茄中超表达提高植株耐盐性

张淑辉, 罗静静, 陈晓璐, 王红, 肖元松*, 彭福田*

山东农业大学园艺科学与工程学院, 作物生物学国家重点实验室, 山东泰安271018

摘要: 以超表达桃(*Prunus persica*)蔗糖非发酵蛋白激酶-1 (SnRK1)基因(*PpSnRK1α*)的番茄(*Solanum lycopersicum*)株系及野生型为试材, 研究盐胁迫下SnRK1对植株生长的影响。结果表明: 盐胁迫下, 番茄叶片和根系中SnRK1活性呈现先上升后下降的趋势, 但超表达*PpSnRK1α*番茄叶片和根系中SnRK1活性始终显著高于野生型植株; 正常条件下, 超表达*PpSnRK1α*番茄相比野生型根系活力提高了10.16%, 盐胁迫下提高了18.92%, 差异显著; 叶片伊文思蓝(Evans blue)染色结果发现, 超表达*PpSnRK1α*番茄叶片受伤害程度明显轻于野生型; 盐胁迫处理3、6、9和12 d后, 超表达*PpSnRK1α*番茄叶片过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化物酶(POD)活性均显著高于野生型植株, 而超氧阴离子(O_2^-)和丙二醛含量显著低于野生型植株; 盐胁迫处理4、8和12 d后, 超表达*PpSnRK1α*番茄叶片叶绿素含量、净光合速率(P_n)及最大光化学效率(F_v/F_m)的降低幅度显著低于野生型番茄。这些结果表明, 盐胁迫下, 超表达*PpSnRK1α*番茄植株比野生型植株SnRK1活性显著提高, 并通过提高植株的抗氧化能力和活性氧清除能力, 缓解盐胁迫对叶片叶绿素的降解和对光系统II (PSII)的破坏程度, 进而提高了植株的耐盐性。

关键词: *PpSnRK1α*; 番茄; 盐胁迫; 活性氧代谢; 根系活力; PSII

我国是农业大国, 土壤盐渍化严重制约着农业的开发和可持续发展, 盐碱胁迫使得植物渗透不平衡, 吸收营养能力下降, 总体毒性上升从而影响植物的生长(Ahmad和Sharma 2010)。对于多年生的果树来说, 盐胁迫严重影响植株的生长以及果实的品质和产量, 因此, 研究植株抵御盐胁迫的分子机理是非常重要的。

蔗糖非发酵蛋白激酶-1 (SnRK1)在植物体内扮演重要角色, 参与植物代谢、发育及胁迫应答等多种生理过程(Hulsmans等2016; Liu等2017)。Geigenberger等(2004)研究发现高浓度蔗糖下, SnRK1可以激活ADP-葡萄糖焦磷酸化酶(ADP-glucose pyrophosphorylase, AGPase, 淀粉合成关键酶), 参与淀粉的生物合成, SnRK1也可以调节蔗糖合酶和 α -淀粉酶的转录活性, 进而参与植物的生长代谢。在豌豆(*Pisum sativum*)中反义表达*SnRK1*, 其种子内部球蛋白含量明显降低, 多数种子的子叶外观、形状都畸形且有早熟现象(Radchuk等2006)。本实验室前期研究发现, 超表达*SnRK1*的番茄(*Solanum lycopersicum*)果实成熟期比野生型的提前10 d, 并增加了叶片和果实中可溶糖和可溶性淀粉含量(Wang等2012)。养分胁迫下, 转*PpSnRK1α*番茄植株可以延缓叶片衰老; 桃(*Prunus persica*) *PpSnRK1β1*在拟南芥中超表达提高了其萌芽率, 并且提高了植株抗氧化能力(罗静静等2017; 赵永飞等2017)。然

而SnRK1在抗盐胁迫方面的研究未见报道, 因此本试验在前人研究的基础上, 以超表达桃*PpSnRK1α*的番茄和野生型番茄为试材, 在盐胁迫条件下, 研究超表达桃*PpSnRK1α*番茄植株耐盐胁迫的能力及其响应机制, 以期园艺作物的分子抗逆育种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试材及处理

本实验室2015年培育得到超表达桃[*Prunus persica* (L.) Batsch] *PpSnRK1α* (ppa004347m)的‘S以12粉’番茄(*Solanum lycopersicum* L.)株系, 2017年3~8月对其进一步纯化得到纯合的T₃代株系(T_{4,3})。2018年3月将超表达株系及野生型株系种子催芽后, 在25℃下采用穴盘基质育苗, 在幼苗四叶一心时定植于32 cm×25 cm的花盆中[盆中土的组成为园土:基质:蛭石=2:1:1 (V/V), 混和均匀], 培养30 d后, 选取生长一致的植株进行处理。实验分为4个处理, T1: 超表达番茄, 100 mmol·L⁻¹ NaCl胁迫; T2:

收稿 2018-07-25 修定 2018-09-15

资助 国家现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-30-2-02)、山东省自然科学基金(ZR2017BC017)和山东省“双一流”建设奖补资金(SYL2017YSTD10)。

* 共同通讯作者: 肖元松(yxsiao@sdau.edu.cn)、彭福田(pft@sdau.edu.cn)。

野生型番茄, 100 mmol·L⁻¹ NaCl胁迫; T3: 超表达番茄, 清水; T4: 野生型番茄, 清水。每个处理设置3次重复, 每个重复30株, 每隔2 d于下午16:30~18:00处理, 每次浇灌液体至从盆底流出(1 000 mL)。

1.2 总RNA提取及半定量PCR分析

于处理0、3、6、9和12 d时, 取功能叶片样品, 液氮冻样, -80°C保存。采用康为世纪科技有限公司的RNA提取试剂盒提取样品中总RNA, 利用Perfect Real Time (TaKaRa)反转录试剂盒合成cDNA第一链, 具体操作参照试剂盒说明书进行。从NCBI网站查找*PpSnRK1α*基因(pp004347m)保守区域, 并通过BLAST比对番茄基因, 找到该基因同源基因*SLSnRK1α* (Solyc02g067030.2)。通过Primer 5.0软件设计*PpSnRK1α*和*SLSnRK1α*引物, 以*EF-1α* (GenBank登记号: X144491)为*Actin*, 进行半定量PCR分析。具体步骤为: 95°C预变性5 min; 95°C变性30 s, 56°C (*PpSnRK1α*基因为48°C)退火40 s, 72°C延伸40 s, 28个循环; 72°C延伸5 min。所用引物为: *PpSnRK1α*正向引物5'-CTCTTGGTATTGGTTCTT-3', 反向引物5'-TCTCTTCTCACTTTCTCT-3'; *SLSnRK1α*正向引物5'-ACTCTGCCAGCCATTATCA-3', 反向引物5'-TTCTTTGCTTGTTGGGTTGTATC-3'; *EF-1α*正向引物5'-GGAAC-TTGAGAAGGAGCCTAAG-3', 反向引物5'-CAA-CACCAACAGCAACAGTCT-3'。

1.3 SnRK1活性测定

分别称取各处理0、3、6、9和12 d的叶片和根系1 g鲜样, 加入1 mL提前预冷的提取缓冲液, 研钵充分研磨, 提取缓冲液成分参照王贵芳等(2014)的文献, 其他步骤参照罗静静等(2017)的文献, 以AMARA多肽为底物(Zhang等2009; Debast 2011), 用Universal Kinase Activity Kit (R&D Systems, USA)测定SnRK1活性。

1.4 生理指标测定

于处理0、3、6、9和12 d后, 取样测定番茄叶片超氧阴离子(superoxide anion, O₂⁻)含量以及超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化物酶(oxidase, POD)和过氧化氢酶(catalase, CAT)活性。O₂⁻含量采用羟胺氧化法定量检测(赵世杰等2002); SOD活性采用氮蓝四唑光化还原法测定(陈贻竹和帕特森1988), 单位为U·g⁻¹ (FW); CAT活性

采用Kar和Mishra (1976)的方法, 以1 min内OD₂₄₀变化0.1的酶量为1个酶活性单位; POD活性采用愈创木酚法测定(Omran 1980), 以1 min内OD₄₇₀减少0.1的酶量为1个酶活性单位(U); POD和CAT活性单位为U·min⁻¹·g⁻¹ (FW)。

于处理0、3、6、9和12 d后, 测定叶片细胞伤害度、丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量和细胞活力。取生长部位一致的叶片, 用圆形打孔器打孔, 每个处理40个圆片, 将其放在去离子水中(含吐温20)室温浸泡3~4 h, 期间多次摇动, 测定初电导率(S₁), 封口沸水浴30 min, 自来水冷却3 min, 振荡器振荡平衡2 h, 测定终电导率(S₂), 同时测定空白电导率(S₀), 按照赵世杰等(2002)方法进行计算。MDA含量采用硫代巴比妥酸法(赵世杰等2002); 细胞活力采用伊文思蓝(Evans blue)染色方法进行染色(刘楠和林植芳2011)。

于处理0、4、8和12 d后, 采用CIRAS-3便携式光合仪(PPSystems, 英国)测定各处理功能叶片的净光合速率(net photosynthetic rate, P_n); 利用连续激发式荧光仪(Handy PEA, Hansatech, 英国)以3 000 μmol·m⁻²·s⁻¹的脉冲光测定暗处理30 min的功能叶快速叶绿素荧光诱导曲线(李鹏民等2005), 得出最大光化学效率(maximal photochemical efficiency of photosystem II, F_v/F_m); 用叶绿素仪(SPAD-502)测定功能叶片的叶绿素相对含量(chlorophyll content, 以SPAD值表示)。

于处理12 d后, 全株进行取样, 根系洗净、拍照后, 采用氯化三苯基四氮唑法测定根系活力(赵世杰等2002)。每处理各随机选取3株进行取样, 取其平均值, 重复3次。

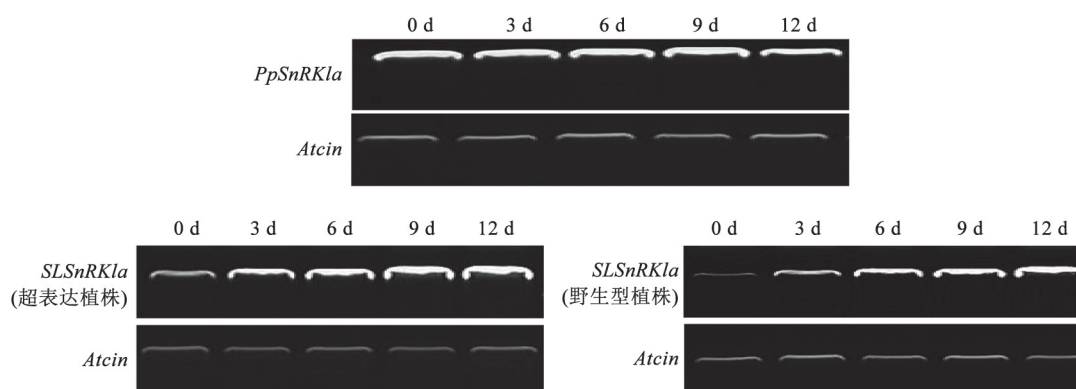
1.5 统计分析

所有结果都是基于3个及以上平均实验的平均值, 利用Microsoft Excel 2007软件处理数据并作图, 并用SPSS 20.0软件的最小显著差(least significant difference, LSD)法进行差异显著性检验。

2 实验结果

2.1 盐胁迫下*PpSnRK1α*及同源基因*SLSnRK1α*表达分析

半定量PCR (RT-PCR)结果表明(图1), 随着盐胁迫时间增长, *PpSnRK1α*基因表达量并未受到影

图1 盐胁迫下超表达植株*PpSnRK1α*和*SLSnRK1α*表达分析Fig.1 Expression profiles of *PpSnRK1α* and *SLSnRK1α* in *PpSnRK1α*-overexpressing lines under salt stress

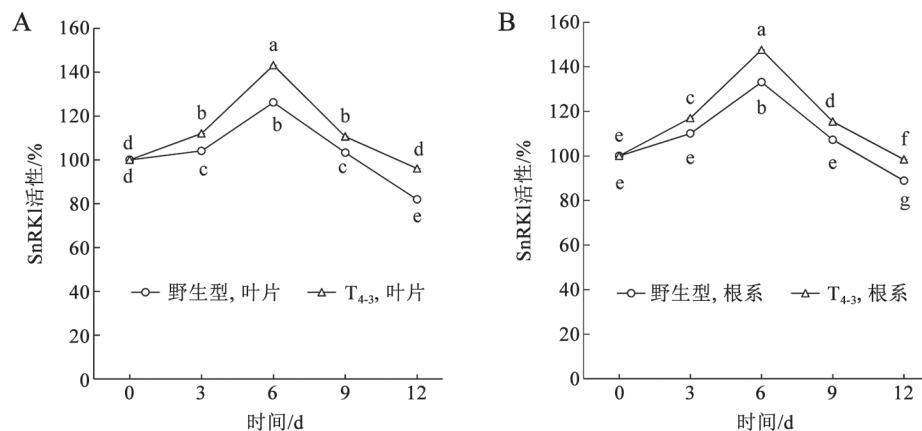
响, 始终保持高水平增长, 但其自身同源基因*SLSnRK1α*对盐胁迫表现出敏感, 相比0 d未胁迫, 盐胁迫后其表达量升高, 且超表达*PpSnRK1α*植株比野生型植株条带更清晰, 说明盐胁迫后超表达*PpSnRK1α*植株体内*SLSnRK1α*基因表达量高于野生型。

2.2 盐胁迫下超表达*PpSnRK1α*番茄及野生型番茄叶片及根系中SnRK1活性变化

如图2所示, 超表达*PpSnRK1α*番茄及野生型番茄叶片及根系中SnRK1活性整体呈现先上升后下降的趋势, 但超表达植株叶片和根系中SnRK1活性在相同检测时间均大于野生型植株, 胁迫6 d时, 相比野生型番茄, 超表达*PpSnRK1α*番茄叶片和根系中SnRK1活性分别提高了13.48%和10.89%; 胁迫12 d时, 活性分别提高了17.25%和10.99%。

2.2 超表达*PpSnRK1α*对番茄根系表型及根系活力的影响

盐胁迫首先并直接伤害的是植物根系, 根系的生长状况及活力对于植物来说是相当重要的。图3-A为处理12 d后, 不用处理间的根系图片对比, 可以看出, 正常条件下, 超表达*PpSnRK1α*番茄根系发生量和根系体积都比野生型番茄高, 胁迫后两者根系生长受到抑制, 但是超表达*PpSnRK1α*番茄相比野生型而言根系生长情况好。同时本实验测定了各处理的根系活力, 如图3-B所示, 正常条件下超表达*PpSnRK1α*番茄相比野生型根系活力提高了10.16%, 盐胁迫下高出18.92%。由此可见, 超表达*PpSnRK1α*番茄提高了植物根系对逆境的抵抗能力。

图2 盐胁迫下超表达*PpSnRK1α*番茄和野生型番茄叶片(A)及根系(B)中SnRK1活性Fig.2 SnRK1 activities in leaves (A) and roots (B) of *PpSnRK1α*-overexpressing line and wild type tomatoes under salt stress
不同数据点上用不同小写字母标识表示数据间差异显著($P < 0.05$)。

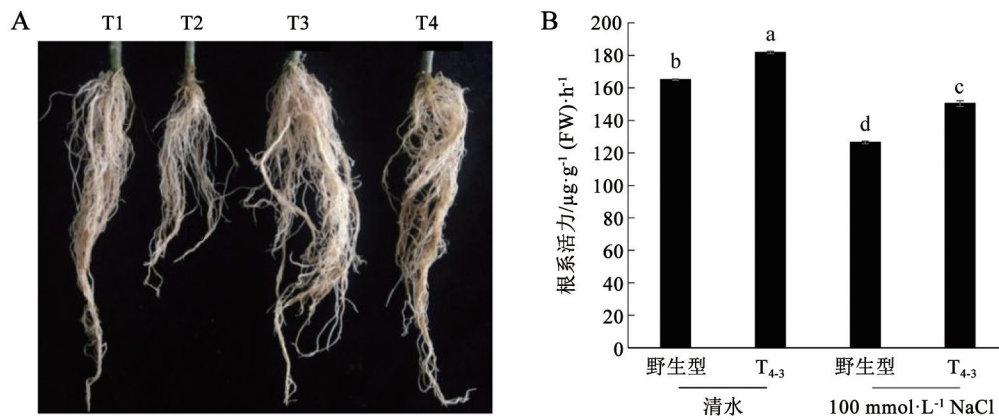


图3 不同处理12 d时番茄根系表型(A)和根系活力(B)

Fig.3 Root phenotypes (A) and activities (B) of the *PpSnRK1α*-overexpressing line and wild type tomatoes after 12 days under different conditions

T1: 超表达番茄, 100 mmol·L⁻¹ NaCl胁迫; T2: 野生型番茄, 100 mmol·L⁻¹ NaCl胁迫; T3: 超表达番茄, 清水; T4: 野生型番茄, 清水; 下图同。不同柱形上用不同小写字母标识表示数据间差异显著($P < 0.05$), 图4-B同。

2.3 盐胁迫下超表达*PpSnRK1α*番茄与野生型番茄叶片细胞活力及伤害度的比较

植物逆境条件下都会受到不同程度的伤害, 通过检测植物叶片细胞活性, 是判定植物受伤害程度和检验其抗逆性直接有效的方法(刘楠和林植芳2011)。本实验通过伊文思蓝染色法观察盐胁迫下超表达*PpSnRK1α*番茄与野生型番茄叶片细胞活力, 如图4-A可见, 随着盐胁迫时间的增加, 超表达*PpSnRK1α*番茄与野生型番茄叶片的细胞受伤害程度增加, 但野生型番茄叶片细胞受伤害程度明显高于超表达*PpSnRK1α*番茄的叶片。同时本实验定

量测定了叶片细胞伤害程度(图4-B), 以0 d未胁迫为对照, 处理3、6、9和12 d后, 超表达*PpSnRK1α*叶片伤害度分别为3.89%、10.82%、14.87%和41.73%, 而野生型叶片的伤害度分别为7.6%、28.15%、32.75%和84.59%, 可见随着时间的增加, 细胞伤害度增加, 但是超表达*PpSnRK1α*叶片伤害度明显小于野生型。

2.4 超表达*PpSnRK1α*对番茄叶片活性氧代谢及MDA含量的影响

由图5可知, 正常处理条件下, 超表达*PpSnRK1α*番茄与野生型番茄叶片中的活性氧代谢平衡, 但

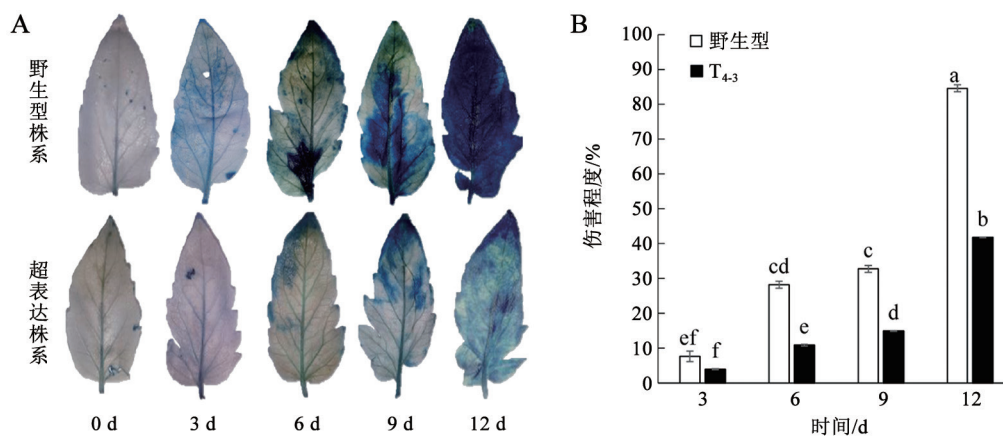


图4 盐胁迫下超表达*PpSnRK1α*番茄和野生型番茄叶片伊文思蓝染色照片(A)和细胞伤害度(B)

Fig.4 Evans blue dyeing pictures (A) and cell injury degrees (B) in leaves of the *PpSnRK1α*-overexpressing line and wild type tomatoes under salt stress

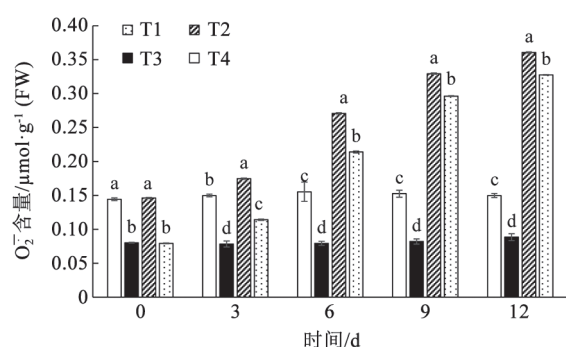


图5 超表达*PpSnRK1α*番茄和野生型番茄叶片中 O_2^- 含量
Fig.5 Contents of O_2^- in leaves of the *PpSnRK1α*-overexpressing line and wild type tomatoes

同一时间的不同柱形上用不同小写字母标识表示数据间差异显著($P < 0.05$), 图6~9同。

超表达*PpSnRK1α*番茄植株中比野生型番茄植株体内活性氧含量平均低40%~50%, 说明超表达*PpSnRK1α*番茄具有更强的活性氧代谢能力。当受到盐胁迫后, 植株体内活性氧含量随着胁迫时间增长大量积累, 但超表达*PpSnRK1α*番茄相比野生型 O_2^- 含量低, 胁迫3、6、9和12 d后, 野生型 O_2^- 含量相比超表达*PpSnRK1α*番茄高出53.01%、26.55%、11.13%和10.07%。

由图6可知, 叶片中MDA含量在正常养分供应条件下基本保持不变, 超表达*PpSnRK1α*番茄比野生型番茄叶片中MDA含量平均低23.4%; 盐胁迫后两者均升高, 但是超表达*PpSnRK1α*番茄叶片中MDA含量仍小于野生型, 说明超表达*PpSnRK1α*番茄叶片的膜系统受伤害程度小于野生型。

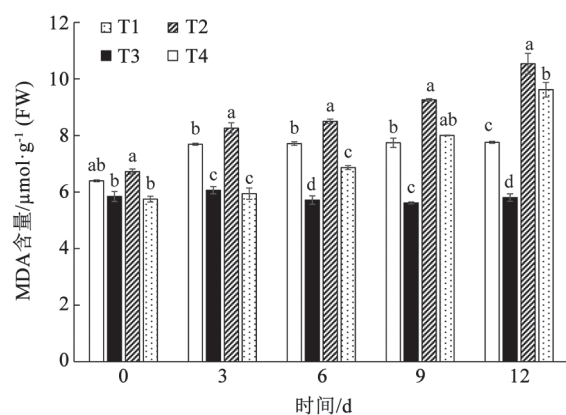


图6 超表达*PpSnRK1α*番茄及野生型番茄叶片中MDA含量
Fig.6 Contents of MDA in leaves of the *PpSnRK1α*-overexpressing line and wild type tomatoes

2.5 超表达*PpSnRK1α*对番茄叶片抗氧化酶活性的影响

由图7可以看出, 未受胁迫的超表达*PpSnRK1α*番茄和野生型番茄随着时间变化, 其叶片内抗氧化酶(SOD、POD和CAT)活性变化幅度较小, 前者高于后者, 而盐胁迫的植株叶片内抗氧化酶活性整体呈现先上升后下降的趋势。盐胁迫6 d后超表达*PpSnRK1α*番茄叶片内SOD、POD和CAT活性比野生型分别高50.18%、29.07%和33.65%, 盐胁迫12 d后分别提高30.81%、29.77%和29.68%, 说明超表达*PpSnRK1α*番茄提高了番茄抗氧化能力。

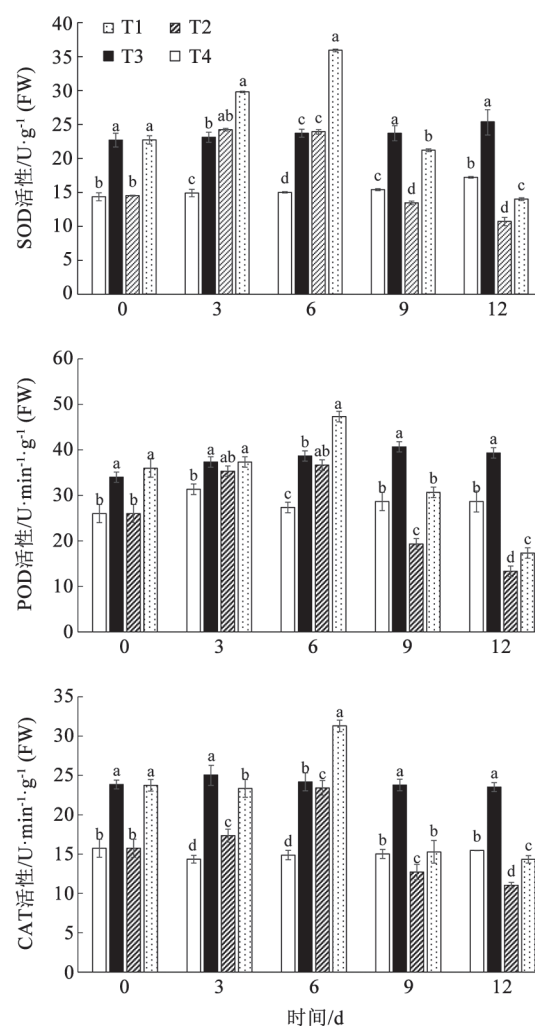


图7 超表达*PpSnRK1α*番茄及野生型番茄叶片中抗氧化酶活性

Fig.7 Activities of antioxidant enzymes in leaves of the *PpSnRK1α*-overexpressing line and wild type tomatoes

2.6 超表达*PpSnRK1α*对番茄叶片叶绿素相对含量、 P_n 和 F_v/F_m 的影响

由图8可见,超表达*PpSnRK1α*番茄叶片叶绿素相对含量(SPAD值)显著高于野生型,正常处理条件下,超表达*PpSnRK1α*番茄叶片SPAD值比野生型植株平均高出约10%,盐胁迫4、8和12 d后,超表达*PpSnRK1α*番茄叶片SPAD值比野生型植株分别高28.64%、24.56%和20.88%,这说明盐胁迫条件下,超表达*PpSnRK1α*番茄叶片叶绿素降解减少,从而提高了植物抗盐胁迫能力。

为更好地说明超表达*PpSnRK1α*提高了番茄抵抗胁迫的能力,本实验测定了不同处理下番茄叶片的 P_n (图9),正常处理条件下,超表达*PpSnRK1α*番

茄叶片的 P_n 比野生型植株平均高出约14%,盐胁迫4、8和12 d后,超表达*PpSnRK1α*番茄叶片的 P_n 比野生型植株分别高出46.15%、35.45%和32.72%,且随着胁迫时间的延长,超表达*PpSnRK1α*番茄叶片的 P_n 下降的速度也明显低于野生型植株。

F_v/F_m 反映光系统II (photosystem II, PSII)反应中心光能的最大转换效率。如图10所示,随着盐胁迫时间的增加,超表达*PpSnRK1α*番茄和野生型番茄叶片的 F_v/F_m 降低,且野生型番茄叶片降低幅度较为明显,尤其在胁迫4 d后降幅更明显,说明盐胁迫使得PSII反应中心受损,但超表达*PpSnRK1α*可以减少其受损程度。

3 讨论

越来越多的研究表明,SnRK1在维持植物能量平衡、激活转录、响应脱落酸信号以及应对多种生物和非生物胁迫时起着重要作用(Rodrigues等2013; Nukarinen等2016)。它与酵母SNF1以及哺乳动物AMPK在结构功能上具有较高的同源性,由 α 、 β 和 γ 亚基结合形成三聚复合体(Halford和Hardie 1998; Smeekens等2010),其中 α 催化亚基被认为是调节SnRK1活性的关键所在(Baena-González等2007; Crozet等2010)。本试验通过测定超表达*PpSnRK1α*番茄及野生型番茄叶片和根系中的SnRK1活性,发现在一定盐胁迫范围内,植株体内SnRK1活性比未胁迫处理高,且超表达*PpSnRK1α*番茄叶片和根系中SnRK1活性均高于野生型,说明适度盐胁迫可以增加植物自身SnRK1来提高植物耐盐性。超表达

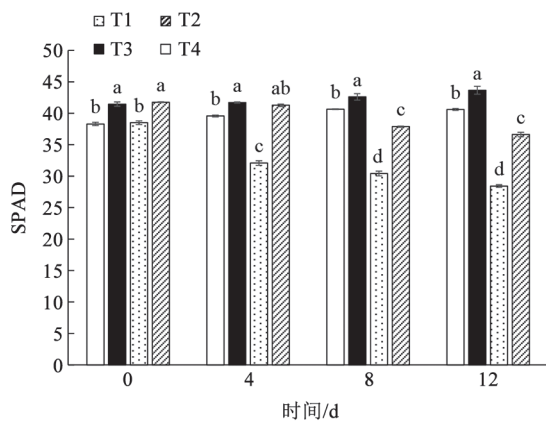


图8 超表达*PpSnRK1α*番茄和野生型番茄叶片SPAD值
Fig.8 SPAD values of leaves of the *PpSnRK1α*-overexpressing line and wild type tomatoes

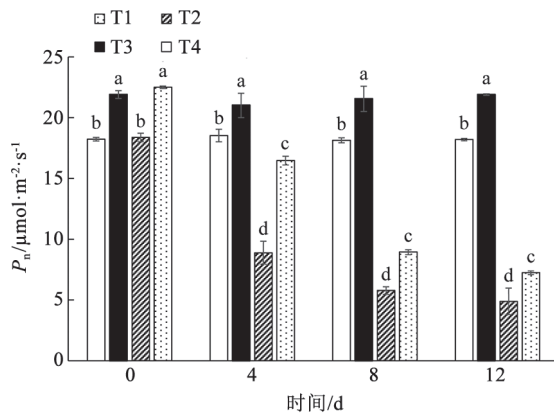


图9 超表达*PpSnRK1α*番茄和野生型番茄叶片 P_n
Fig.9 P_n of leaves of the *PpSnRK1α*-overexpressing line and wild type tomatoes

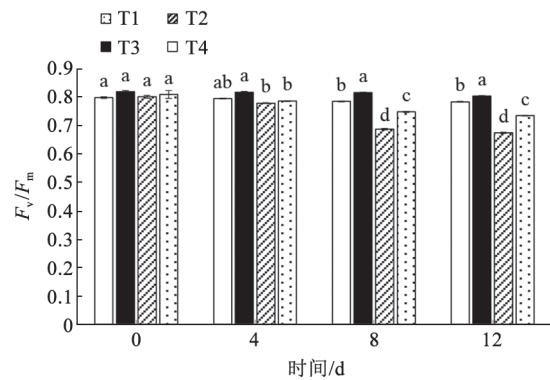


图10 超表达*PpSnRK1α*番茄和野生型番茄叶片 F_v/F_m
Fig.10 F_v/F_m of leaves of the *PpSnRK1α*-overexpressing line and wild type tomatoes

*PpSnRK1α*比野生型番茄具有更强的耐胁迫能力, 这也可能由于SnRK1参与脱落酸、水杨酸信号途径, 影响植株生长发育, 进而提高植株对胁迫抗性(Liu等2017; 罗静静等2018), 或是SnRK1直接参与抗氧化酶类的合成, 参与活性氧清除进而提高植物抗盐胁迫能力。本实验室通过对超表达*MhSnRK1*番茄进行高通量数字表达谱分析发现, 其中和*bZIP*转录因子家族有关的84个基因以及*MYB*转录因子家族390个基因都发生了变化, 说明SnRK1蛋白激酶可能影响了这些基因的转录表达, 进而影响了植株抗性。

逆境胁迫会打破植物体内活性氧产生和清除的平衡, 导致体内积累大量的活性氧, 使细胞膜质过氧化而产生大量的MDA, 破坏膜结构(蔡志全等2003; Ahmad和Sharma 2010), 此时植物体内一些抗氧化酶类如SOD、POD、CAT等会参与之中来抵抗部分胁迫(Zimmermann等2006)。本实验中, 当植株受到盐胁迫后, 随着时间延长, 叶片的细胞伤害度增加, O_2^- 含量增多, 且体内积累较多的MDA, 但是整体而言, 超表达*PpSnRK1α*番茄受到伤害程度小于野生型番茄, 而且超表达*PpSnRK1α*番茄体内抗氧化酶类(SOD、POD和CAT)活性均高于野生型, 这说明超表达*PpSnRK1α*番茄对活性氧的清除能力更强, 从而降低了细胞的损伤程度。这可能是由于该基因与抗盐胁迫的蛋白互作, 从而导致超表达*PpSnRK1α*番茄对盐胁迫具有一定的抵抗作用, 但是该机制需进一步研究。

根系是植物生长的根本, 当植物处于胁迫环境下首先危害的是植物根系, 而根系活力是评价根系功能的重要指标之一, 逆境环境会导致植物根系活力下降(刘建新等2011)。本试验通过观察根系表型和测定根系活力结果发现, 超表达*PpSnRK1α*番茄根系生长状况在盐胁迫和非盐胁迫下都要好于野生型且根系活力也高于野生型, 说明超表达*PpSnRK1α*番茄受到伤害程度小于野生型, *PpSnRK1α*可以提高植物抗胁迫能力。

刘建新等(2015)研究表明, 盐碱胁迫会伤害植物叶片PSII反应中心, 导致PSII的光能转换效率降低, 从而降低光合效率。本研究中, 随着盐胁迫时间增长, 叶片的叶绿素相对含量逐渐降低, P_n 和 F_v/F_m 也降低, 但是超表达*PpSnRK1α*番茄叶片的叶绿素相对含量、 P_n 、 F_v/F_m 都要高于野生型番茄,

说明盐胁迫使得叶片受到严重损害, 但是超表达*PpSnRK1α*番茄的损伤程度小, 可以抵抗部分盐胁迫, 这可能是由于SnRK1与光保护机制中某个蛋白互作, 从而保护植物的光系统, 但具体机理需要进一步研究。

综上所述, 本实验结果表明, 超表达*PpSnRK1α*番茄可以提高植物体内SnRK1活性, 进而降低盐胁迫对植物细胞伤害度, 降低根系损伤程度, 加快 O_2^- 的代谢, 减少对光合系统破坏, 同时提高植物体内抗氧化酶类的活性, 因此, 我们更清楚认识了SnRK1在抵御盐胁迫中发挥的作用, 对今后果树上的遗传改良提供了理论参考。

参考文献(References)

- Ahmad P, Sharma S (2010). Physio-biochemical attributes in two cultivars of mulberry (*Morus alba* L.) under $NaHCO_3$ stress. *Int J Plant Prod*, 4 (2): 79–86
- Baena-González E, Rolland F, Thevelein JM, et al (2007). A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. *Nature*, 448: 938–942
- Cai Z, Cao K, Feng Y, et al (2003). Effect of low nocturnal temperature stress on fluorescence characteristics and active oxygen metabolism in leaves of *Garcinia hanburyi* seedlings grown under two levels of irradiance. *Chin J Appl Ecol*, 14 (3): 326–330 (in Chinese with English abstract) [蔡志全, 曹坤芳, 冯玉龙等(2003). 夜间低温胁迫对两种生长光强下藤黄幼苗叶片荧光特征和活性氧代谢的影响. *应用生态学报*, 14 (3): 326–330]
- Chen YZ, Patterson BD (1988). The effect of chilling temperature on the level of superoxide dismutase, catalase and hydrogen peroxide in some plant leaves. *Acta Phytophysiol Sin*, 14: 323–328 (in Chinese with English abstract) [陈贻竹, 帕特森(1988). 低温对植物叶片中超氧化物歧化酶、过氧化物酶和过氧化氢水平的影响. *植物生理学报*, 14: 323–328]
- Crozet P, Jammes F, Valot B, et al (2010). Cross-phosphorylation between *Arabidopsis thaliana* Sucrose Nonfermenting 1-related Protein Kinase 1 (AtSnRK1) and its activating kinase (AtSnAK) determines their catalytic activities. *J Biol Chem*, 285: 12071–12077
- Debast S, Nunes-Nesi A, Hajirezaei MR, et al (2011). Altering trehalose-6-phosphate content in transgenic potato tubers growth and alters responsiveness to hormones during sprouting. *Plant Physiol*, 156: 1754–1771
- Geigenberger P, Stitt M, Fernie AR (2004). Metabolic control analysis and regulation of the conversion of sucrose to starch in growing potato tubers. *Plant Cell Environ*, 27 (6): 655–673
- Halford NG, Hardie DG (1998). SNF1-related protein kinases:

- global regulators of carbon metabolism in plants? *Plant Mol Biol*, 37: 735–748
- Hulsmans S, Rodriguez M, De Coninck B, et al (2016). The SnRK1 energy sensor in plant biotic interactions. *Trends Plant Sci*, 21 (8): 648–661
- Kar M, Mishra D (1976). Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiol*, 57 (2): 315–319
- Li PM, Gao HY, Strasser RJ (2005). Application of the fast chlorophyll fluorescence induction dynamics analysis in photosynthesis study. *J Plant Physiol Mol Biol*, 31 (6): 559–566 (in Chinese with English abstract) [李鹏民, 高辉远, Strasser RJ (2005). 快速叶绿素荧光诱导动力学分析在光合作用研究中的应用. *植物生理与分子生物学学报*, 31 (6): 559–566]
- Liu JX, Wang JC, Wang RJ, et al (2015). Effects of salt and alkali stress on photosynthesis in *Avena nuda* seedlings. *Agr Res Arid Areas*, 33 (6): 155–160 (in Chinese with English abstract) [刘建新, 王金成, 王瑞娟等(2015). 盐、碱胁迫对燕麦幼苗光合作用的影响. *干旱地区农业研究*, 33 (6): 155–160]
- Liu JX, Wang X, Wang RJ, et al (2011). Effects of alkaline stress on the metabolism of reactive oxygen species and osmotic accumulation in ryegrass seedling roots. *Bull Bot Res*, 31 (6): 674–679 (in Chinese with English abstract) [刘建新, 王鑫, 王瑞娟等(2011). 碱胁迫对黑麦草幼苗根系活性氧代谢和渗透溶质积累的影响. *植物研究*, 31 (6): 674–679]
- Lin N, Lin ZF (2011). Use of Evans blue for testing cell viability of intact leaves of plant. *Plant Physiol J*, 47 (6): 570–574 (in Chinese with English abstract) [刘楠, 林植芳(2011). 用伊文思蓝染色法检测植物整体叶片的细胞活性. *植物生理学报*, 47 (6): 570–574]
- Liu XJ, Liu X, An XH, et al (2017). An apple protein kinase MdSnRK1.1 interacts with MdCAIP1 to regulate ABA sensitivity. *Plant Cell Physiol*, 58: 1631–1641
- Luo J, Zhao Y, Peng Y, et al (2017). Effects of overexpressing *PpSnRK1α* on the growth of tomato plants under nutrient stress. *Acta Horti Sin*, 44 (4): 644–652 (in Chinese with English abstract) [罗静静, 张亚飞, 彭妍等(2017). 桃 *PpSnRK1α* 在番茄中过表达对营养胁迫下植株生长的影响. *园艺学报*, 44 (4): 644–652]
- Luo JJ, Zhnag YF, Zhao YF, et al (2018). Effects of salicylic acid on the SnRK1 activity and growth of strawberry plant. *Plant Physiol J*, 54 (1): 113–120 (in Chinese with English abstract) [罗静静, 张亚飞, 赵永飞等(2018). 水杨酸对草莓SnRK1活性及植株生长的影响. *植物生理学报*, 54 (1): 113–120]
- Nukarinen E, Nägele T, Pedrotti L, et al (2016). Quantitative phosphoproteomics reveals the role of the AMPK plant ortholog SnRK1 as a metabolic master regulator under energy deprivation. *Sci Rep*, 6: 31697
- Omran RG (1980). Peroxide levels and the activities of catalase, peroxidase, and indoleacetic acid oxidase during and after chilling cucumber seedlings. *Plant Physiol*, 65 (2): 407–408
- Radchuk R, Radchk V, Weschke W, et al (2006). Repressing the expression of the SUCROSE NONFERMENTING-1-RELATED PROTEIN KINASE gene in pea embryo causes pleiotropic defects of maturation similar to an abscisic acid-insensitive phenotype. *Plant Physiol*, 140: 263–278
- Rodrigues A, Adamo M, Crozet P, et al (2013). ABI1 and PP2CA phosphatases are negative regulators of Snf1-Related Protein Kinase1 signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 25: 3871–3884
- Smeekens S, Ma J, Hanson J, et al (2010). Sugar signals and molecular networks controlling plant growth. *Curr Opin Plant Biol*, 13: 274–279
- Wang GF, Peng FT, Zhang YF, et al (2014). Effects of overexpressing Pingyi Tiancha *MhSnRK1* on carbohydrate metabolism in tomato. *Acta Horti Sin*, 41 (11): 2188–2195 (in Chinese with English abstract) [王贵芳, 彭福田, 张亚飞等(2014). 平邑甜茶 *MhSnRK1* 在番茄中超表达对植株碳代谢的影响. *园艺学报*, 41 (11): 2188–2195]
- Wang X, Peng F, Li M, et al (2012). Expression of a heterologous *SnRK1* in tomato increases carbon assimilation, nitrogen uptake and modifies fruit development. *J Plant Physiol*, 169: 1173–1182
- Zhang Y, Primavesi LF, Jhurrea D, et al (2009). Inhibition of SNF1-related protein kinase1 activity and regulation of metabolic pathways by trehalose-6-phosphate. *Plant Physiol*, 149: 1860–1871
- Zhao S, Shi G, Dong X (2002). *Techniques of Plant Physiological Experiment*. Beijing: Chinese Agricultural Science and Technology Press (in Chinese) [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]
- Zhao YF, Chen XL, Peng FT, et al (2017). Over expression of a peach *PpSnRK1βγ1* gene improving oxidative stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol J*, 53 (7): 1251–1258 (in Chinese with English abstract) [赵永飞, 陈晓璐, 彭福田等(2017). 桃 *PpSnRK1βγ1* 在拟南芥中超表达提高植株氧化胁迫耐性. *植物生理学报*, 53 (7): 1251–1258]
- Zimmermann P, Heinlein C, Orendi G, et al (2006). Senescence-specific regulation of catalases in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Cell Environ*, 29 (6): 1049–1060

Overexpression of a peach *PpSnRK1α* gene improving salt stress tolerance in tomato

ZHANG Shu-Hui, LUO Jing-Jing, CHEN Xiao-Lu, WANG Hong, XIAO Yuan-Song*, PENG Fu-Tian*

College of Horticulture Science and Engineering, Shandong Agricultural University; State Key Laboratory of Crop Biology, Taian, Shandong 271018, China

Abstract: *PpSnRK1α*-overexpressing tomato (*Solanum lycopersicum*) and wild type (WT) tomato were used to study the effect of sucrose non-fermenting-1-related protein kinase-1 (SnRK1) on the growth of tomato plants under salt stress. The results show that, under salt stress, the activities of SnRK1 in tomato leaves and roots showed a trend of first rising and then falling, but SnRK1 activities in the leaves and roots of *PpSnRK1α*-overexpressing lines were significantly higher than those of WT. Under normal conditions, *PpSnRK1α*-overexpressing lines increased the root activity by 10.16% compared to WT. Under salt stress, it's 18.92% higher than WT, and the difference was significant. The results show that the damage degree of *PpSnRK1α*-overexpressing line leaves were significantly lower than those of WT by Evans blue dyeing. Under 3, 6, 9 and 12 days of salt stress, activities of catalase, superoxide dismutase and peroxidase in *PpSnRK1α*-overexpressing line leaves were significantly higher than those of WT, and O_2^- production and MDA content in *PpSnRK1α*-overexpressing line leaves significantly lower than those of WT. The reductions of chlorophyll content, net photosynthetic rate (P_n) and maximal photochemical efficiency of photosystem II (F_v/F_m) in *PpSnRK1α*-overexpressing lines were significantly less than those of WT. The results show that, under salt stress, SnRK1 activities in *PpSnRK1α*-overexpressing line leaves increased significantly than those of WT. In consequence, the abilities of oxidation resistance and reactive oxygen species removal in *PpSnRK1α*-overexpressing lines were improved, the degradation of chlorophyll and the degree of damage to the photosystem II were alleviated, and salt resistance of the plants was improved.

Key words: *PpSnRK1α*; tomato; salt stress; reactive oxygen species metabolism; root activity; PSII

Received 2018-07-25 Accepted 2018-09-15

This work was supported by Modern Agricultural Industry Technology System (CARS-30-2-02), Shandong Natural Science Fund (ZR-2017BC017), and Funds of Shandong "Double Tops" Program (SYL2017YSTD10).

*Co-corresponding authors: Xiao YS (ysxiao@sdau.edu.cn), Peng FT (pft@sdau.edu.cn).