

转 *YHem1* 番茄植株耐盐性的研究

李 翠, 冯新新, 张治平, 孙新娥, 汪良驹*

(南京农业大学园艺学院, 南京 210095)

摘 要: *YHem1* 是一个由拟南芥 *HemA1* 启动子 (一种光响应型启动子) 控制的酿酒酵母菌 5-氨基乙酰丙酸 (ALA) 合酶基因 (*Hem1*)。将该基因转化番茄植株, 可以提高叶片内源 ALA 含量及其代谢能力, 增加叶绿素含量和抗氧化酶活性, 并降低 O_2^- 产生速率和丙二醛 (MDA) 含量。200 mmol · L⁻¹ NaCl 处理, 降低了野生型番茄叶片 ALA 合成与代谢能力和叶绿素含量, 同时诱导叶片 O_2^- 产生速率、 H_2O_2 和丙二醛 (MDA) 含量上升, 而超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT)、过氧化物酶 (POD) 和抗坏血酸过氧化物酶 (APX) 等抗氧化酶活性则逐渐降低。盐胁迫也导致转 *YHem1* 番茄 ALA 合成与代谢能力、叶绿素含量和抗氧化酶活性下降, 但其降幅明显低于野生型。盐处理 10 d 后, 转基因番茄植株保持着较高的生物学积累量和较低的盐胁迫抑制程度, 说明转入 *YHem1* 基因可以提高番茄耐盐性。此外, 转基因番茄叶片 H_2O_2 含量始终保持较高水平, 暗示其可能作为一种信号分子参与细胞生理调节。

关键词: 番茄; 5-氨基乙酰丙酸 (ALA); 抗氧化酶; 耐盐性; *YHem1* 基因

中图分类号: S 634.1

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2012) 10-1937-12

Studies on Salt Tolerance in Tomato Plants by Transformation of *YHem1*

LI Cui, FENG Xin-xin, ZHANG Zhi-ping, SUN Xin-e, and WANG Liang-ju*

(College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: *YHem1* was a *Saccharomyces cerevisiae* *Hem1* gene, controlled by an *Athaliana* *HemA1* promoter (a light responsive promoter). When *YHem1* was transformed into tomato plants, the leaf endogenous ALA content, the capacities for ALA biosynthesis and catabolism, the chlorophyll content and the antioxidant enzyme activities were all improved, while the superoxide anion (O_2^-) production rate and the malondialdehyde (MDA) content were depressed significantly. Treatment by 200 mmol · L⁻¹ NaCl solution dramatically decreased the ALA biosynthetic and catabolic capacities, and the chlorophyll content in the wild type of tomato plants. It also induced increase of the O_2^- production rate and the H_2O_2 and MDA content, but inhibited the activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POD) and ascorbic peroxidase (APX). In the transgenic plants, the ALA metabolic capacities, the chlorophyll content and the antioxidant enzyme activities were also affected by salt stress, but the impacted seriousness was much lower than that in the wild type. Ten days after salt treatment, the transgenic plants kept higher biomass with less salt-induced inhibition, compared with the wild type, which suggested that the *YHem1* transformation into tomato might improve its salt tolerance. Additionally, the H_2O_2 content was generally

收稿日期: 2012-06-15; 修回日期: 2012-07-06

基金项目: 江苏高校优势学科建设工程 (PAPD) 项目

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: wlj@njau.edu.cn)

higher in transgenic plants than in the WT, either under salt stress or not, which implied that H_2O_2 might be a molecular signal involved in cellular regulation.

Key words: tomato; 5-aminolevulinic acid (ALA); antioxidant enzyme; salt tolerance; *YHem1*

土壤盐渍化一直是一个世界性的生态资源问题(李彦等, 2008)。特别是在当今, 随着农业生产的不断发展, 灌溉农业和设施农业都会不同程度地引起土壤的次生盐渍化(伍林涛等, 2010)。为了减少盐胁迫伤害, 有人提出通过嫁接耐盐砧木(陈淑芳等, 2005; He et al., 2009)或者施用外源植物激素(Mercedes et al., 2006; 吴雪霞等, 2006; 赵许朋等, 2010; 张纪涛等, 2011)来提高植株耐盐性, 但一直没有取得显著进展。

5-氨基乙酰丙酸(5-aminolevulinic acid, ALA)是所有卟啉化合物生物合成的关键前体, 作为植物叶绿素合成研究的一个部分, 很早就受到重视(von Wettstein et al., 1995)。近年来, 人们发现它在农业生产上有着重要的应用前景(汪良驹等, 2003)。Watanabe等(2000)最早报道, 外源ALA可以增强棉花耐盐性。Nishihara等(2003)证实, ALA能够提高菠菜耐盐性。Wang等(2005)和刘晖等(2006)提出, ALA可以促进盐胁迫下小白菜和西瓜种子萌发。但是, ALA提高植物耐盐性的遗传学机制尚有待进一步研究。

在高等植物体内, ALA生物合成的前体为谷氨酸, 并由谷氨酰 tRNA 合成酶、谷氨酰 tRNA 还原酶以及谷氨酸 1-半醛-1, 2-氨基转移酶催化三步生化反应转化而来; 在动物以及微生物中, ALA由甘氨酸和琥珀酰 CoA 经 ALA 合酶(ALAS)催化一步缩合反应而来(汪良驹等, 2003)。Zavgorodnyaya等(1997)利用转基因技术将酵母菌 ALAS 基因(*Hem1*)转入烟草中, 获得过量合成ALA的转基因植株。这些植株能够生长于 $300 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 弱光条件下, 而是否可以生长于自然光照下则不清楚。Jung等(2004)将慢生型大豆根瘤菌(*Bradyrhizobium japonicum*)的 *Hem1* 转入水稻中, 发现在 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 光照强度下可以正常生长, 而在 $350 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 光照下便出现光氧化漂白。导致这一后果的原因与选用的组成型启动子(分别为 CaMVS35 启动子和玉米泛素启动子)有关。在转基因水稻中, 黑暗下叶片可以大量合成ALA, 积累原卟啉 IX 等不稳定中产物, 一旦转入光下便诱发光敏性反应, 导致植株死亡, 试验无法继续下去(Jung et al., 2008)。鉴于ALA这一特性, 本试验室从酿酒酵母中克隆出 *Hem1*, 并将其与拟南芥 *HemA1* 启动子(一种光敏性启动子)构建在一起, 形成一个新基因 *YHem1*, 转化植物后得到转基因植株(张治平, 2010)。与转基因水稻(Jung et al., 2004)不同, 转 *YHem1* 植株ALA合成呈现昼夜节律变化, 即光照下ALA过量合成, 黑暗中ALA合成与野生型无异(Zhang et al., 2010), 因而, 它们可以生长于 $2\ 000 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 自然光强下, 并且具有更强的光合能力(Zhang et al., 2011)。业已证明, 转 *YHem1* 拟南芥具有更强耐盐性(Zhang et al., 2010)。但迄今为止, 尚不清楚 *YHem1* 转化番茄对其植株耐盐性的影响。

本试验中以转 *YHem1* 番茄为材料, 研究了 $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 处理对植株叶片ALA代谢、活性氧代谢以及植株生物量与耐盐性的关系, 证明 *YHem1* 转入可以提高番茄耐盐性, 从而为番茄耐盐育种提供一种新手段。

1 材料与方法

1.1 试验材料与处理

材料为番茄(*Lycopersicon esculentum* Mill.) ‘合作 903’ 及其转 *YHem1* 植株(张治平, 2010),

上述两种材料均由本实验室保存。

试验于 2011 年 2—7 月在南京农业大学园艺学院塑料大棚内进行。种子经消毒、浸种、催芽后, 选取发芽一致的饱满种子点播在盛有营养土的穴盘中。待幼苗长出真叶后, 用 *gus* 染色液对转基因苗进行染色、检测、标记。待幼苗长至五叶一心时, 选取长势一致的阳性幼苗, 洗净根部营养土后移栽入装有蛭石和珍珠岩的塑料盆中。转基因和野生型植株各 12 盆, 每盆 3 株, 用 1/2Hoagland 营养液 (Hoagland & Arnon, 1950) 浇灌。

移植缓苗后, 进行 NaCl 胁迫处理。设 2 个基因型, 2 个处理, 即: WT (野生型植株, 浇灌 1/2Hoagland 营养液); WT + NaCl (野生型植株, 浇灌 1/2Hoagland 营养液 + 200 mmol · L⁻¹NaCl); T (转基因植株, 浇灌 1/2Hoagland 营养液); T + NaCl (转基因植株, 浇灌 1/2Hoagland 营养液 + 200 mmol · L⁻¹NaCl)。为了减少盐休克影响, 试验采用每天递增 50 mmol · L⁻¹ 的方式处理, 4 d 后达到最终盐浓度。此后, 每天补充 NaCl 溶液或营养液, 以维持 NaCl 胁迫强度。在处理 0、2、4、6、8、10 d, 分别取样测定叶片的相关生理指标, 并在处理 10 d 后测定植株生物学产量。

1.2 测定项目与方法

1.2.1 叶片内源 ALA 含量测定

参照 Harel 和 Klein (1972) 的方法进行。取 0.1 g 幼嫩叶片, 用 200 mmol · L⁻¹ 乙酸缓冲液 (pH 4.6) 研磨, 经离心 (5 000 × g, 15 min) 后取上清液, 立即加入乙酰丙酮原液, 在 100 °C 条件下缩合 10 min, 冷却至室温后加入 1 mL 新鲜 Ehrlich's 试剂 (成分为 42 mL 冰乙酸 + 8 mL 70% 高氯酸, 加入 1 g 二甲氨基苯甲醛) 显色, 摇匀后静置 5 ~ 10 min, 测定 553 nm 处 OD 值。

1.2.2 ALA 合成能力、代谢能力测定

将一定量的离体番茄叶片放置于盛有 20 mmol · L⁻¹ 乙酰丙酸 (LA, 一种 ALA 代谢抑制剂) 溶液的培养皿中, 在 40 μmol · m⁻² · s⁻¹ 光照下诱导 6 h, 在阻断 ALA 代谢情况下测定 ALA 含量, 作为 ALA 合成能力。经 LA 诱导测定的 ALA 含量与直接测定的内源 ALA 含量的差值, 即为 ALA 代谢能力 (Harel & Klein, 1972)。

1.2.3 ALA 合酶 (ALAS) 活性测定

取 0.1 g 番茄幼嫩叶片, 加入 1.5 mL 20 mmol · L⁻¹ 磷酸缓冲液 (pH 7.6), 研磨匀浆。10 000 × g, 4 °C 离心 10 min, 上清液即为酶液。ALAS 活性测定按 Hampp 等 (1975) 的方法进行。取 0.3 mL 酶液加入到反应混合液 (含 50 mmol · L⁻¹ Tris-HCl, pH 7.5, 10 mmol · L⁻¹ MgCl₂, 100 mmol · L⁻¹ 甘氨酸, 270 μmol · L⁻¹ 磷酸吡哆醛, 8.45 mmol · L⁻¹ ATP, 100 mmol · L⁻¹ 琥珀酸钠, 370 μmol · L⁻¹ CoA 和 100 mmol · L⁻¹ 乙酰丙酸) 中, 37 °C 反应 30 min, 加入 100 g · L⁻¹ 的 TCA 液终止反应, 4 000 × g 离心 5 min。取 300 μL 上清液加到盛有 400 μL 1 mol · L⁻¹ 乙酸钠溶液的试管中, 加入 50 μL 乙酰丙酮, 100 °C 水浴 15 min。冷却后, 加入等体积新鲜 Ehrlich's 试剂, 5 min 后 553 nm 比色, 分析 ALA 合成量。ALAS 活性以每小时内每毫克蛋白催化生成 ALA 的量表示。叶片蛋白含量采用考马斯亮蓝法测定 (李合生, 2000)。

1.2.4 ALA 脱水酶 (ALAD) 活性测定

取 0.1 g 番茄幼叶, 加入 1.5 mL 50 mmol · L⁻¹ Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.5, 内含 8 mmol · L⁻¹ MgCl₂ 和 5 mmol · L⁻¹ 巯基乙醇), 匀浆后, 10 000 × g, 4 °C 离心 10 min, 上清液即为酶液。参照 Mauzerall 和 Cranick (1956) 的方法并加以改进。将 0.2 mL 酶液在 37 °C 活化 30 min, 加入 0.3 mL 50 mmol · L⁻¹ ALA, 37 °C 反应 30 min 后, 加入 0.5 mL 100 g · L⁻¹ TCA 液终止反应。将上清液取出, 加入 0.5 mL 的 Ehrlich's 试剂, 555 nm 比色, 计算胆色素原 (PBG) 的含量, 其吸光系数是 6.1 × 10⁴ M⁻¹ · cm⁻¹, 以每毫克蛋白每小时催化产生的 PBG 量表示 ALAD 活性。

1.2.5 保护酶系统活性的测定

取 0.2 g 新鲜叶片, 加入 2 mL 预冷的 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液冰浴研磨匀浆。4 °C 下 $10\,000 \times g$ 离心 15 min, 上清液即为酶液。超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化物酶 (POD)、抗坏血酸过氧化物酶 (APX) 和过氧化氢酶 (CAT) 活性按李合生 (2000) 的方法测定, 其中 SOD 活性以抑制 NBT 光化学反应 50% 为 1 个酶活性单位, CAT 活性以 OD_{240} 下降 0.01 为 1 个酶活性单位, POD 和 APX 的活性分别以 $\Delta A_{460} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$ 和 $\Delta A_{290} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$ 表示。

1.2.6 O_2^- 产生速率、 H_2O_2 含量以及丙二醛 (MDA) 含量的测定

O_2^- 产生速率采用王爱国和罗广华 (1990) 的方法测定; H_2O_2 含量的测定按照 Steven 等 (2002) 的方法进行; 丙二醛含量用硫代巴比妥酸法 (TBA) 测定 (李合生, 2000)。

以上代谢产物含量以及酶活性测定时, 每个处理重复取样 3 次, 每次样品重复 2 次测定, 所得数据为至少 3 次重复的平均值。

1.2.7 叶绿素含量及叶绿素相对含量 (SPAD) 值测定

采用乙醇浸提法 (李合生, 2000) 测定叶绿素含量; 利用日本 Konica Minolta 公司 SPAD-502 Plus 型叶绿素仪, 测定植株叶片叶绿素相对含量 (SPAD)。每处理重复测定 15 次。

1.2.8 生物学产量测定

处理 10 d 后, 将完整的番茄植株取出, 用清水洗净, 用万分之一天平测定植株、地上部和地下部鲜样质量, 而后置于 105 °C 烘箱中杀青 10 min, 转至 80 °C 条件下烘至恒重, 测定干样质量, 重复 10 次。

2 结果与分析

2.1 盐胁迫对番茄叶片 ALA 合酶和脱水酶活性的影响

高等植物体内不存在 ALA 合酶 (ALAS) (von Wettstein et al., 1995), 因而 ALAS 活性测定只能在转 *YHem1* 基因植株叶片中进行。如图 (1, A) 所示, 试验期间, 未经 NaCl 处理的转基因植株叶片 ALAS 活性比较稳定, 而在盐胁迫下的转基因植株呈直线下降, 说明 ALAS 虽然是异源 *YHem1* 基因表达的产物, 但它同样对盐胁迫敏感。

图 (1, B) 显示, 与野生型相比, 转基因番茄叶片具有较高的 ALA 脱水酶 (ALAD) 活性。盐胁迫导致番茄叶片 ALAD 活性下降。这种效应, 野生型植株在胁迫后 6 d 达到显著水平, 而转基因植株中, 盐处理 10 d 内, 差异也未达到显著水平 ($P > 0.05$), 说明野生型番茄叶片 ALAD 对盐胁迫敏感, 而转化 *YHem1* 后, ALAD 对盐分的敏感性明显下降。

2.2 盐胁迫对转基因番茄内源 ALA 含量、ALA 合成能力及 ALA 代谢能力的影响

从图 (2, A) 中可以看出, 转基因番茄叶片内源 ALA 含量显著高于野生型 ($P < 0.05$), 而盐处理有降低番茄叶片内源 ALA 含量的趋势, 但在大多数测试点的差异没有达到显著水平, 说明转化 *YHem1* 基因可以提高番茄植株叶片内源 ALA 含量, 而盐处理对内源 ALA 水平影响不大。

从图 (2, B) 和图 (2, C) 中看出, 转基因植株 ALA 合成与代谢能力都显著高于野生型, 而盐胁迫同时抑制 ALA 合成与 ALA 代谢。在测定的大多数时间里, 转基因植株和野生型的 ALA 合成和代谢差异都能达到显著水平, 表明内源 ALA (图 2, A) 中保持相对稳定水平与其合成与代谢同时增减有关。

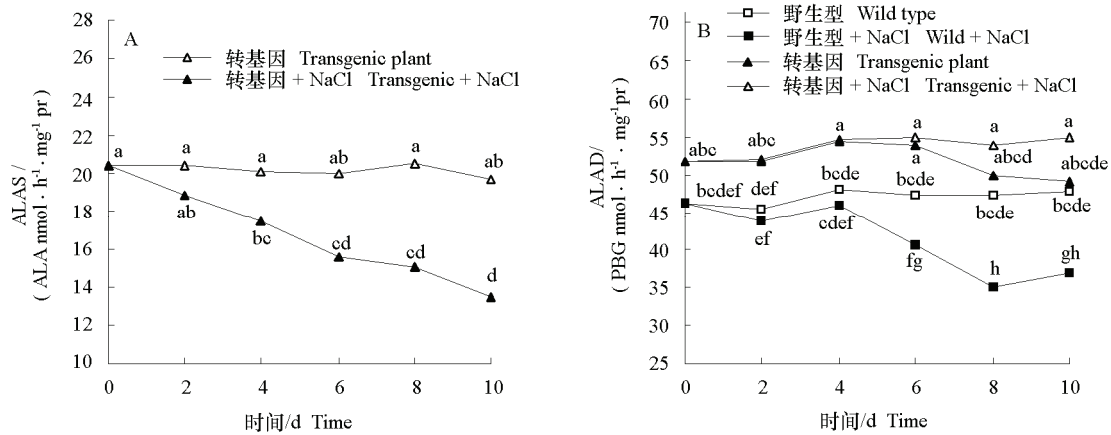


图 1 盐胁迫对转基因番茄叶片 ALAS (A) 及 ALAD (B) 活性的影响

图中相同字母表示一个项目内数据间在 $P=0.05$ 水平上没有差异。

Fig. 1 Effects of salt stress on the activities of ALAS (A) and ALAD (B) in leaves of tomato plants

The same letters represent no significant difference at $P=0.05$ level between data in each item.

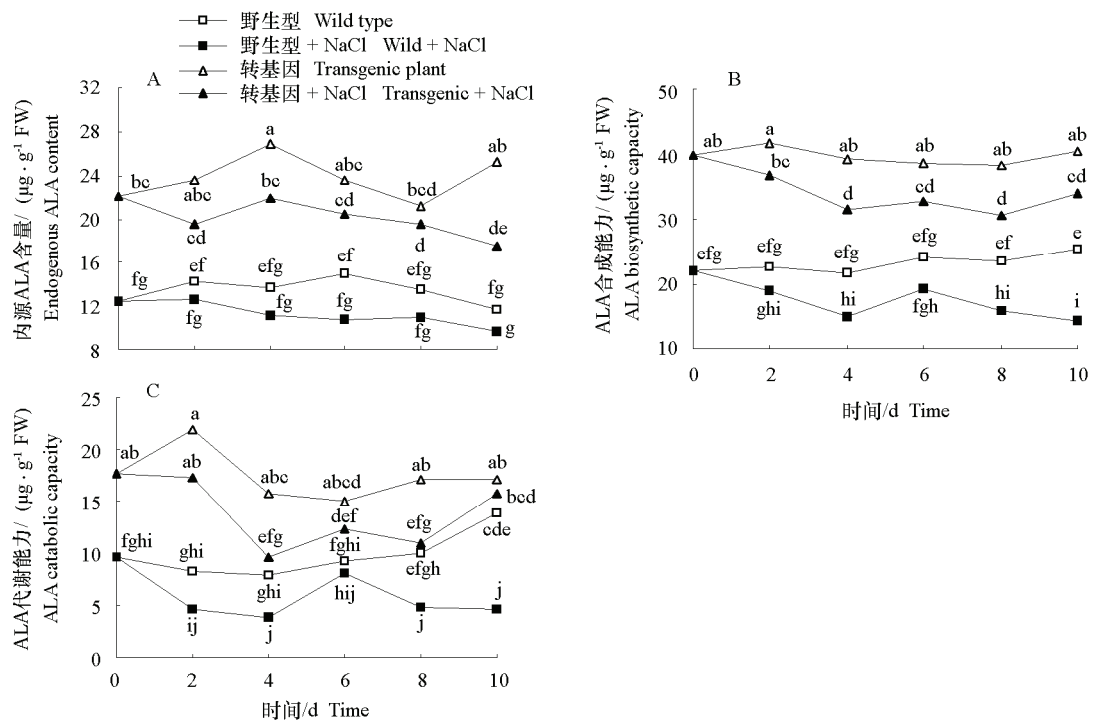


图 2 盐胁迫对番茄叶片内源 ALA 含量 (A)、ALA 合成 (B) 与 ALA 代谢能力 (C) 的影响

图中相同字母表示一个项目内数据间在 $P=0.05$ 水平上没有差异。

Fig. 2 Effect of salt stress on the endogenous ALA content (A), ALA biosynthetic capacity (B) and ALA catabolic capacity (C) in leaves of tomato plants

The same letters represent no significant difference at $P=0.05$ level between data in each item.

2.3 盐胁迫对番茄叶片 SPAD 与叶绿素含量的影响

图 (3, A) 数据为活体测得的番茄叶片叶绿素相对含量 (SPAD)。从中看出, 转基因番茄叶

片叶绿素相对含量显著高于野生型, 而盐处理导致 SPAD 迅速下降, 说明番茄叶片叶绿素含量是一个盐胁迫敏感指标。

从图 (3, B) 可以看出, 盐处理 2 d 时, 野生型植株叶片叶绿素总量仅有少量下降, 而转基因植株已明显下降。此后两者均保持在较低水平, 但转基因植株整体上高于野生型。

图 (3, C) 和图 (3, D) 显示, 转基因番茄叶片叶绿素 a 和叶绿素 b 含量均显著高于野生型, 盐处理显著降低叶绿素 a 和叶绿素 b 含量。在盐胁迫下, 转基因植株叶片叶绿素 a 和叶绿素 b 含量整体上高于野生型。但叶绿素 b/a 比值却没有显现出可循环性改变规律。

如果对基因型、盐处理以及处理时间做三因素的方差分析, 则可以看出, 基因型对 Chl.b/a 没有明显效应 ($F < F_{0.05}$), 而盐处理叶片 Chl.b/a 平均值为 0.601, 显著高于对照 (0.582), 表明盐处理提高番茄叶片 Chl.b/a 比值。从处理时间上看, 10 d 的比值最高 (0.608), 显著高于 0 d (0.582) 和 2 d (0.587)。

此外, 基因型与盐处理、盐处理与处理时间之间存在互作效应, 但其关系非常复杂, 难以看出明显的规律性 (资料未列出)。

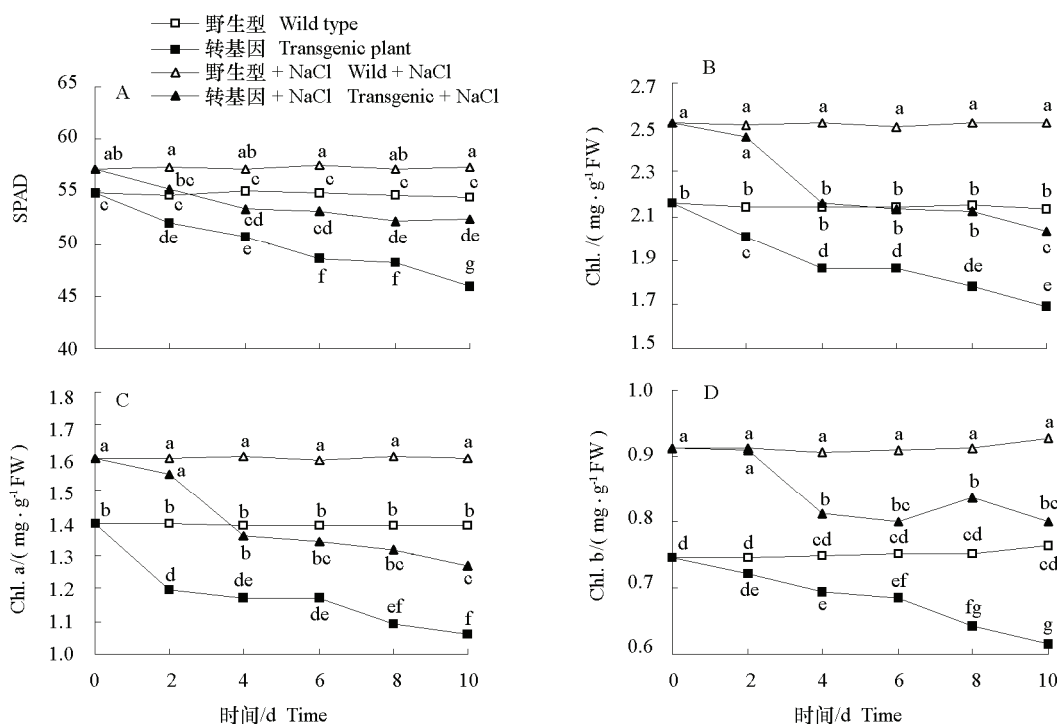


图 3 盐胁迫对番茄叶片叶绿素相对含量 (A)、叶绿素总量 (B)、叶绿素 a (C) 和叶绿素 b (D) 含量的影响

图中相同字母表示一个项目内数据间在 $P=0.05$ 水平上没有差异。

Fig. 3 Effect of salt stress on the relative content of leaf chlorophylls (A), total chlorophylls (B), chlorophyll a (C) and chlorophyll b content (D) in tomato plants

The same letters represent no significant difference at $P=0.05$ level between data in each item.

2.4 盐胁迫对番茄叶片 O_2^- 产生速率、 H_2O_2 含量和 MDA 含量的影响

图 (4, A) 显示, 非盐胁迫下转基因番茄叶片 O_2^- 产生速率显著低于野生型; 盐胁迫后, 均迅速上升, 转基因植株在盐处理 4 d 时达到高峰, 然后逐渐下降, 而野生型持续上升到 8 d 后才回落, 说明盐处理诱导野生型植株叶片产生更多的 O_2^- 。10 d 时, 野生型植株 O_2^- 产生速率比胁迫前上升了 57.75%, 而转基因植株比胁迫前上升了 47.68%。

由图 (4, B) 可以看出, 转基因番茄叶片 H_2O_2 含量明显高于野生型。盐处理后, 两种番茄 H_2O_2 含量都显著增加, 6 d 后达到最大值, 随后下降。其中, 转基因番茄下降幅度大于野生型。处理 10 d 后, 野生型 H_2O_2 含量仍然比其对照高 13.80%, 而转基因植株与其对照没有明显差异 ($P > 0.05$)。

图 (4, C) 显示, 转基因番茄叶片丙二醛 (MDA) 含量显著低于野生型。盐处理后, 两者叶片 MDA 含量迅速上升。其中, 野生型植株在 6 d 后达最大值, 并维持高水平, 而转基因植株在 8 d 后达最大值。10 d 后, 野生型与转基因植株 MDA 含量分别比各自对照增加 49.14% 和 37.56%。转基因植株叶片 MDA 含量始终低于野生型。

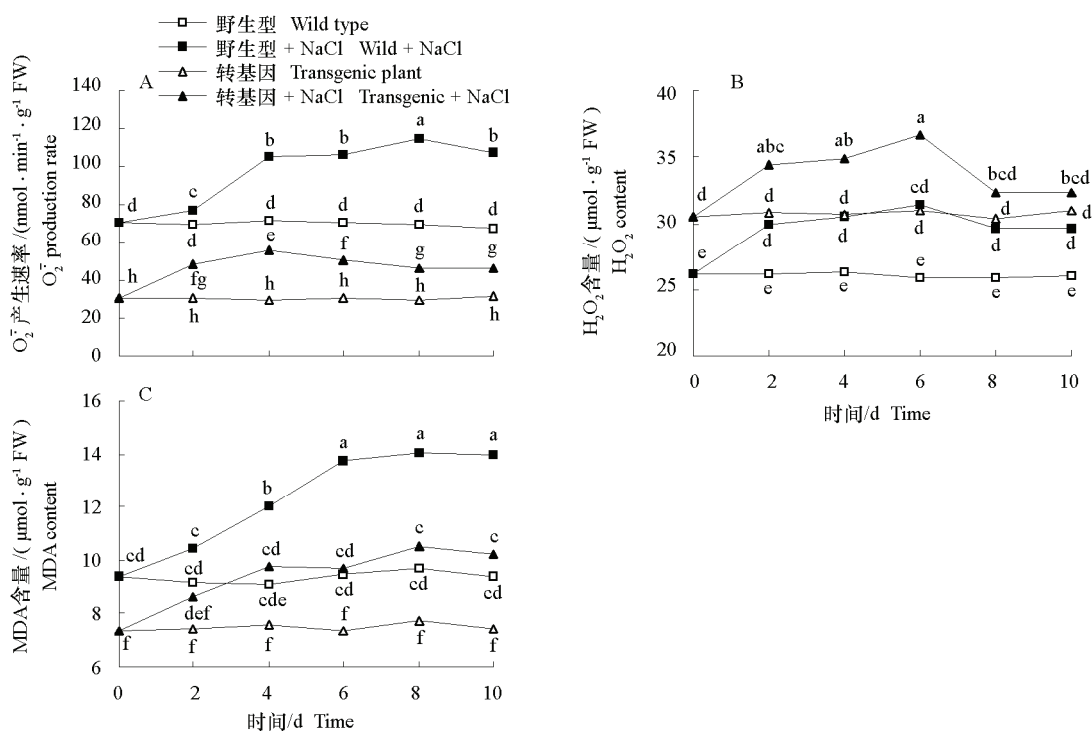


图 4 盐胁迫对番茄叶片 O_2^- 产生速率 (A)、 H_2O_2 含量 (B) 和 MDA 含量 (C) 的影响

图中相同字母表示表示一个项目内数据间在 $P = 0.05$ 水平上没有差异。

Fig. 4 Effect of salt stress on the superoxide anion production rate (A), H_2O_2 content (B) and MDA content (C) in tomato leaves

The same letters represent no significant difference at $P = 0.05$ level between data in each item.

2.5 盐胁迫对转基因番茄保护酶系统活性的影响

图 (5, A) 显示, 转基因番茄叶片 SOD 活性明显高于野生型, 盐胁迫下两者均有不同程度提高。其中, 转基因植株在盐处理后 SOD 活性直线上升, 6 d 后达最大值, 以后一直维持在较高水平; 而野生型植株只有盐处理早期有少量上升, 而且与对照间没有显著差异 ($P > 0.05$), 4 d 后逐渐下降。

转基因植株 POD (图 5, B) 和 CAT (图 5, C) 活性显著高于野生型, 盐处理后迅速提高, 并维持较高水平; 而野生型植株酶活性上升不多, 4 d 后逐渐下降。

转基因番茄 APX 活性也高于野生型, 但野生型酶活性在盐处理后迅速上升, 甚至 4 d 后达到转基因植株水平, 此后迅速下降。

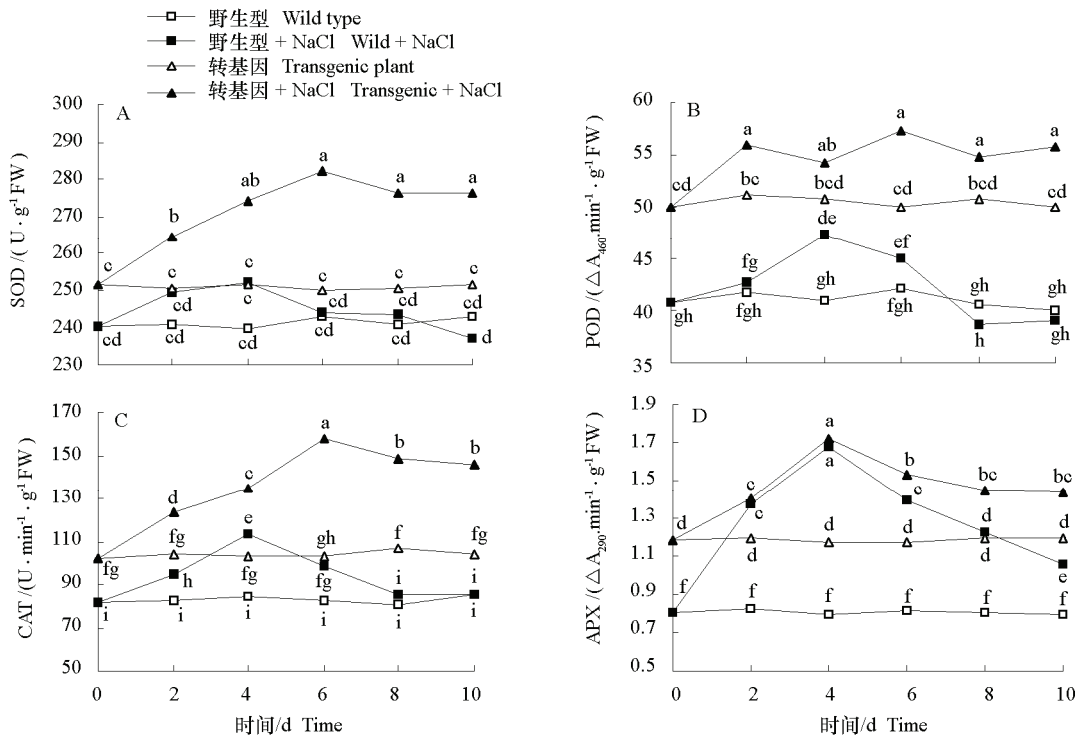


图 5 盐胁迫对番茄叶片抗氧化酶 SOD (A)、POD (B)、CAT (C)、APX (D) 活性的影响

图中相同字母表示一个项目内数据间在 $P=0.05$ 水平上没有差异。

Fig. 5 Effect of salt stress on the superoxide dismutase (SOD, A), peroxidase (POD, B), catalase (CAT, C) and ascorbate peroxidase (APX, D) activities in tomato leaves

The same letters represent no significant difference at $P=0.05$ level between data in each item.

2.6 盐胁迫对番茄植株生物学产量的影响

盐处理 10 d 后测定番茄植株生物学产量的结果 (表 1) 表明, 转基因番茄植株干质量显著高于野生型。盐胁迫后两者产量都降低, 野生型番茄地上部、地下部以及整株鲜质量, 地上部、地下部以及整株干质量与其对照相比, 分别减少了 18.21%、27.52%、19.43%、27.92%、20.91%、26.37%; 转基因植株与其对照相比, 分别减少了 12.30%、13.38%、12.47%、24.72%、12.39%、22.45%。这些结果表明, 在盐胁迫下转基因植株生物积累减少程度低于野生型。

表 1 盐胁迫对转基因番茄生物学产量的影响

Table 1 Effects of salt stress on the biomass of the tomato plants

处理 Treatment	地下部鲜质量/g Root fresh weight	植株鲜质量/g Plant fresh weight	地上部干质量/g Shoot dry weight	地下部干质量/g Root dry weight	植株干质量/g Plant dry weight
野生型 WT	7.23 ± 0.71 ab	56.057 ± 4.60 ab	4.37 ± 0.59 b	1.10 ± 0.10 ab	5.46 ± 0.60 b
WT + NaCl	5.24 ± 0.71 c	45.17 ± 5.71 c	3.15 ± 0.32 c	0.87 ± 0.99 c	4.02 ± 0.24 d
转基因 T	8.07 ± 0.83 a	59.36 ± 7.87 a	5.34 ± 0.89 a	1.13 ± 0.14 a	6.46 ± 0.76 a
T + NaCl	6.99 ± 1.36 b	51.96 ± 6.75 b	4.02 ± 0.37 b	0.99 ± 0.15 b	5.01 ± 0.28 c

注: 表中每个项目相同字母代表在 $P=0.05$ 水平上无显著差异。WT: 野生型; WT + NaCl: 野生型 + NaCl; T: 转基因植株; T + NaCl: 转基因植株 + NaCl。

Note: The same letters in each item represent no significant difference at $P=0.05$ level. WT: Wild type; WT + NaCl: Wild type + NaCl; T: Transgenic plants; T + NaCl: Transgenic plants + NaCl.

3 讨论

有关 ALA 处理提高作物耐盐性效应已经有大量报道 (Watanabe et al., 2000; Nishihara et al., 2003; Wang et al., 2005; 刘晖 等, 2006; 祁向玲 等, 2008; 王巍 等, 2008; 赵晓进和李亚芳, 2008; Naeem et al., 2011), 而且大多数结果来自于外源 ALA 的使用。张治平 (2010) 将拟南芥 *HemA1* 光敏型启动子控制的酿酒酵母 ALA 合酶基因 (*YHem1*) 转入拟南芥和烟草中, 获得了转基因植株, 并且证明, 过量合成 ALA 的转基因烟草具有更强的光合能力 (Zhang et al., 2011), 而过量合成 ALA 的转基因拟南芥具有更强的耐盐性 (Zhang et al., 2010)。本试验结果表明, 转 *YHem1* 番茄生物积量明显高于野生型, 而盐处理对转基因植株的生长抑制程度明显低于野生型 (表 1), 再次证明 ALA 含量增加有利于提高植物耐盐性。

Hem1 在酿酒酵母菌中编码 ALA 合酶 (ALAS), 后者在线粒体中催化琥珀酰 CoA 与甘氨酸缩合成 ALA。但是高等植物体内并不存在 *Hem1* 基因, 而且 ALA 合成是在叶绿体内完成的 (von Wettstein et al., 1995)。张治平 (2010) 利用绿色荧光蛋白原位表达 (EGFP) 亚细胞定位技术研究发现, 由 *Hem1* 基因编码的蛋白分布于线粒体中, 表明 *Hem1* 基因可在植物体表达, 并定位在线粒体中。由此可知, 转 *YHem1* 基因植株不仅可以在叶绿体内合成 ALA, 而且可以在线粒体内合成额外的 ALA。这是转基因植株 ALA 过量合成的根本原因 (图 2, A)。但是在盐胁迫下, ALAS 活性同样是敏感的。200 mmol · L⁻¹ NaCl 处理后, 番茄体内 ALAS 活性迅速下降 (图 1, A)。但无论如何, 转基因番茄内源 ALA 含量始终高于野生型 (图 2, A), 说明 ALAS 在盐胁迫下仍然起作用。但是, 盐胁迫或非盐胁迫下, 番茄叶片 ALA 一直保持相对稳定水平 (图 2, A)。这可能与 ALA 合成和代谢几乎同步受到调节有关。在转基因番茄中, ALA 合成由于 ALAS 的存在而明显上调, ALAD 活性和代谢能力也同步上升; 在盐胁迫下, ALA 合成受到抑制, 但 ALAD 活性也明显下调。因而, 植物体内 ALA 水平处于动态平衡状态。类似现象在转 *YHem1* 基因拟南芥中也曾观察到 (Zhang et al., 2010)。

ALA 代谢的最终产物是叶绿素和亚铁血红素等卟啉化合物 (von Wettstein et al., 1995)。因而, 外源 ALA 处理的结果往往是导致叶片叶绿素含量上升 (Sasaki et al., 2002)。本研究中, 转基因番茄叶片叶绿素 a、b 及其总量都明显高于野生型; 盐胁迫下, 两种基因型番茄叶片叶绿素含量均迅速下降。这是 ALA 以及卟啉化合物合成受抑的结果。但转基因植株叶绿素含量仍然高于野生型 (图 3), 说明转入 *YHem1* 基因可以提高盐胁迫下番茄叶片叶绿素含量。这与转基因拟南芥结果相似 (Zhang et al., 2010)。Tanaka 等 (1993) 曾经提出, 外源 ALA 可以促进叶绿素 a 转化为叶绿素 b, 从而提高 b/a 比值。因而, 叶绿素 b/a 比值上升似乎是 ALA 调节叶绿素合成的重要指标。但本试验中, 虽然转基因番茄叶片叶绿素 b/a 也高于野生型, 但没有达到差异显著水平 ($P > 0.05$)。相反, 盐处理显著提高番茄叶片叶绿素 b/a, 而且盐处理时间越长, 比值越高, 说明盐胁迫对番茄叶片叶绿素 a 合成的抑制效应显著高于其转化为叶绿素 b。张纪涛等 (2011) 提出, ‘中蔬 4 号’ 番茄在 200 mmol · L⁻¹ NaCl 处理时叶绿素 b/a 明显上升, 而 ‘白果强丰’ 则无此效应, 说明不同番茄品种叶绿素合成与转化对盐胁迫的响应方式不同。本试验中采用的番茄野生型品种为 ‘合作 903’, 其转基因植株虽然内源 ALA 含量增加, 但叶绿素 b/a 比值没有显著增加。这也许是品种特性所致。

Watanabe 等 (2000) 最早提出外源 ALA 可以提高棉花耐盐性, 而且认为这种效应与其减少 Na⁺ 吸收有关。Wang 等 (2005) 发现, ALA 代谢抑制剂乙酰丙酸 (LA) 可以抑制 ALA 对盐胁迫下白菜种子萌发的促进效应, 因而提出, ALA 转化为卟啉化合物如亚铁血红素是其提高植物耐盐性的重要方面。由于亚铁血红素是包括 POD、CAT 和 POX 在内的许多氧化还原酶的辅基, 外源 ALA 可

以诱导多种植物抗氧化酶活性提高 (Nishihara et al., 2003; 刘晖 等, 2006; 祁向玲 等, 2008; Naeem et al., 2011), 这是 ALA 诱导植物抗逆性的重要原因。刘卫琴等 (2006) 用铜离子螯合剂 DDTc 抑制草莓植株 SOD 活性, 发现它可以消除 ALA 对叶片光合作用的促进效应, 从而证明 ALA 的生理效应与其诱导抗氧化酶活性有关。Jung 等 (2008) 观察到, 过量合成 ALA 的转基因水稻体内 SOD 同工酶活性明显增强。本试验结果与此相似, 转基因番茄叶片 SOD、POD、CAT 和 APX 活性明显高于野生型。尽管它们在盐胁迫下都随着时间延长, 先上升后下降, 但转基因植株始终保持着较高的酶活性 (图 5)。这可能是它无论适境还是逆境下保持较低的 O_2^- 产生速率以及 MDA 含量的原因 (图 4)。

转基因番茄叶片始终保持较高水平的 H_2O_2 。 H_2O_2 是生物体内活性氧的一种, 也可作为细胞信号, 参与气孔运动、超敏反应、细胞凋亡和基因表达等许多生理过程的调节 (程艳丽和宋纯鹏, 2005)。各种生物与非生物胁迫均能诱导植物 H_2O_2 过量产生, 进而调控一系列胁迫应答的信号转导 (Steven et al., 2002; 李师翁 等, 2007)。外源 ALA 处理可以诱导菠菜 (Nishihara et al., 2001)、马铃薯 (Zhang et al., 2006) 和梨 (Shen et al., 2011) 叶片 H_2O_2 含量上升。本研究结果表明, 转基因番茄叶片含较高 H_2O_2 和较低 O_2^- (图 4), 这可能是其较高的 SOD 活性 (图 5) 消除 O_2^- 的结果。盐胁迫下, 两种基因型番茄叶片 H_2O_2 含量均明显上升。然而, 野生型植株 H_2O_2 含量一直保持较高水平, 而转基因植株 H_2O_2 含量在胁迫 6 d 后下降至与对照相似水平 (图 4, B)。这是其具有较高活性的清除 H_2O_2 的酶类 (POD、CAT 和 APX) 作用的结果 (图 5), 也类似于植物病理性防御性反应中“氧迸发”。因而, H_2O_2 可能是一种重要细胞信号, 诱导植物抗逆性增强。有关 ALA 诱导的 H_2O_2 含量上升的生理学意义值得进一步研究。

References

- Chen Shu-fang, Zhu Yue-lin, Liu You-liang, Li Shi-jun. 2005. Effects of NaCl stress on activities of protective enzymes, contents of osmotic adjustment substances and photosynthetic characteristics in grafted tomato seedlings. *Acta Hort Sin*, 32 (4): 609 – 613. (in Chinese)
- 陈淑芳, 朱月林, 刘友良, 李式军. 2005. NaCl 胁迫对番茄嫁接苗保护酶活性、渗透调节物质含量及光合特性的影响. *园艺学报*, 32 (4): 609 – 613.
- Cheng Yan-li, Song Chun-peng. 2005. Hydrogen peroxide signaling sources in plant cells. *Science in China Series C: Life Sciences*, 35 (6): 480 – 489. (in Chinese)
- 程艳丽, 宋纯鹏. 2005. 植物细胞 H_2O_2 的信号转导途径. *中国科学 C 辑: 生命科学*, 35 (6): 480 – 489.
- Hampp R, Sankhla N, Humber W. 1975. Effect of EMD-IT-5914 on chlorophyll synthesis in leaves of *Pennisetum typhoides* seedlings. *Physiol Plant*, 33: 53 – 57.
- Harel E, Klein S. 1972. Light dependent formation of δ -aminolevulinic acid in etiolated of higher plants. *Biochem Biophys Res Commun*, 49: 364 – 370.
- He Y, Zhu Z J, Yang J, Ni X L, Zhu B. 2009. Grafting increases the salt tolerance of tomato by improvement of photosynthesis and enhancement of antioxidant enzymes activity. *Environ Exp Bot*, 66: 270 – 278.
- Hoagland D R, Arnon D I. 1950. The water-culture method for growing plants without soil. *California Agri Exp Station Circul*, 347: 1 – 32.
- Jung S, Back K, Yang K, Kuk Y I, Chon S U. 2008. Defence response produced during photodynamic damage in transgenic rice overexpressing 5-aminolevulinic acid synthase. *Potosynthetica*, 46 (1): 3 – 9.
- Jung S, Yang K, Lee D, Back K. 2004. Expression of *Bradyrhizobium japonicum* 5-aminolevulinic acid synthase induces severe photodynamic damage in transgenic rice. *Plant Sci*, 167: 789 – 795.
- Li He-sheng. 2000. Plant physiology and biochemistry experiment principle and technique. Beijing: Higher Education Press. (in Chinese)
- 李合生. 2000. 植物生理生化实验原理与技术. 北京: 高等教育出版社.

- Li Shi-weng, Xue Lin-gui, Feng Hu-yuan, Xu Shi-jian, An Li-zhe. 2007. Hydrogen peroxide signaling and its biological importance in plants. *Chinese J Biochem Mol Biol*, 23: 804 – 810. (in Chinese)
- 李师翁, 薛林贵, 冯虎元, 徐世键, 安黎哲. 2007. 植物中的 H_2O_2 信号及其功能. *中国生物化学与分子生物学报*, 23: 804 – 810.
- Li Yan, Zhang Ying-peng, Sun Ming, Gao Bi-mo. 2008. Research advance in the effects of salt stress on plant and the mechanism of plant resistance. *Chinese Agri Sci Bull*, 24 (1): 258 – 265. (in Chinese)
- 李 彦, 张英鹏, 孙 明, 高弼模. 2008. 盐胁迫对植物的影响及植物耐盐机理研究进展. *中国农学通报*, 24 (1): 258 – 265.
- Liu Hui, Kang Lang, Wang Liang-ju. 2006. Promotion of 5-aminolevulinic acid on seed germination of watermelon (*Citrullus lanatus*) under salt stress. *J Fruit Sci*, 23 (6): 854 – 859. (in Chinese)
- 刘 晖, 康 琅, 汪良驹. 2006. ALA 对盐胁迫下西瓜种子萌发的促进效应. *果树学报*, 23 (6): 854 – 859.
- Liu Wei-qin, Kang Lang, Wang Liang-ju. 2006. Effects on strawberry photosynthesis and relations to anti-oxidant enzymes of ALA. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 26: 57 – 62. (in Chinese)
- 刘卫琴, 康 琅, 汪良驹. 2006. ALA 对草莓光合作用的影响及其与抗氧化酶的关系. *西北植物学报*, 26: 57 – 62.
- Mauzerall D, Cranick S. 1956. The occurrence and determination of δ -aminolevulinic acid and porphobilinogen in urine. *J Biol Chem*, 219: 435 – 446.
- Mercedes R, Romero-Aranda, Oliva Jurado, Jesús Cuartero. 2006. Silicon alleviates the deleterious salt effect on tomato plant growth by improving plant water status. *J Plant Physiol*, 163: 847 – 855.
- Naeem M S, Rasheed M, Liu D, Jin Z L, Ming D F, Yoneyama K, Takeuchi Y, Zhou W J. 2011. 5-Aminolevulinic acid ameliorates salinity-induced metabolic, water-related and biochemical changes in *Brassica napus* L. *Acta Physiol Plant*, 33: 517 – 528.
- Nishihara E, Kondo K, Masud Parvez M, Takahashi K, Watanabe K, Tanaka K. 2003. Role of 5-aminolevulinic acid (ALA) on active oxygen-scavenging system in NaCl-treated spinach (*Spinacia oleracea*). *J Plant Physiol*, 160: 1085 – 1091.
- Nishihara E, Takahashi K, Nakata N, Tanaka K, Watanabe K. 2001. Effect of 5-aminolevulinic acid (ALA) on photosynthetic rate, hydrogen peroxide content, antioxidant level and active oxygen scavenging enzymes in spinach (*Spinacia oleracea* L.). *J Jpn Soc Hort Sci*, 70: 346 – 352.
- Qi Xiang-ling, Zou Zhi-rong, Yang Rui. 2008. Mitigative effect of 5-aminolevulinic acid on lettuce under NaCl stress. *Acta Agri Boreali-Occident Sin*, 17: 202 – 206. (in Chinese)
- 祁向玲, 邹志荣, 杨 蕊. 2008. 外源 ALA 对 NaCl 胁迫下生菜植株的缓解效应. *西北农业学报*, 17: 202 – 206.
- Sasaki K, Watanabe M, Tanaka T, Tanaka T. 2002. Biosynthesis, biotechnological production and applications of 5-aminolevulinic acid. *Appl Microbiol Biotechnol*, 58: 23 – 29.
- Shen M, Zhang Z P, Wang L J. 2011. Effect of 5-aminolevulinic acid (ALA) on leaf photosynthesis and antioxidant activity in pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) // Najafpour M M. Artificial photosynthesis. Morn Hill: InTech: 239 – 265.
- Steven N, Radhika D, John H. 2002. Hydrogen peroxide signaling. *Curr Opin Plant Biol*, 5: 388 – 395.
- Tanaka Y, Ktana K A A, Ktsuj I H. 1993. Effects of 5-aminolevulinic acid on the accumulation of chlorophyll b and apoproteins of the light-harvesting chlorophyll a/b-protein complex of photosystem II. *Plant Cell Physiol*, 34: 465 – 472.
- von Wettstein D, Gough S, Kannangara C G. 1995. Chlorophyll biosynthesis. *Plant Cell*, 7: 1039 – 1057.
- Wang Ai-guo, Luo Guang-hua. 1990. Quantitative relation between the reaction of hydroxylamine and superoxide anion radicals in plants. *Plant Physiol Commun*, (6): 55 – 57. (in Chinese)
- 王爱国, 罗广华. 1990. 植物的超氧化物自由基与羟胺反应的定量关系. *植物生理学通报*, (6): 55 – 57.
- Wang L J, Jiang W B, Liu H, Liu W Q, Kang L, Hou X L. 2005. Promotion of 5-aminolevulinic acid (ALA) on germination of pakchoi (*Brassica chinensis*) seeds under salt stress. *J Integrative Plant Biol*, 47 (9): 1084 – 1091.
- Wang Liang-ju, Jiang Wei-bing, Zhang Zhen, Yao Quan-hong, Matsui Hiroyuki, Ohara Hitoshi. 2003. Biosynthesis and physiological activities of 5-aminolevulinic acid (ALA) and its potential application in agriculture. *Plant Physiol Commun*, 39 (3): 185 – 192. (in Chinese)

- 汪良驹, 姜卫兵, 章 镇, 姚泉洪, 松井弘之, 小原均. 2003. 5-氨基乙酰丙酸的生物合成和生理活性及其在农业中的潜在应用. 植物生理学通讯, 39 (3): 185 - 192.
- Wang Wei, Zou Zhi-rong, Qiao Fei, Xu Xiao-jie. 2008. Effects of exogenous ALA on physiological characteristics of spinach under NaCl stress. Acta Agri Boreal-Occident Sin, 17 (1): 137 - 141, 156. (in Chinese)
- 王 魏, 邹志荣, 乔 飞, 徐晓洁. 2008. 外源 ALA 对 NaCl 胁迫下菠菜生理特性的影响. 西北农业学报, 17 (1): 137 - 141, 156.
- Watanabe K, Tanaka T, Hotta Y, Kuramochi H, Takeuchi Y. 2000. Improving salt tolerance of cotton seedlings with 5-aminolevulinic acid. Plant Growth Regul, 32: 99 - 103.
- Wu Lin-tao, Du Cai-fu, Shao Ming-bo. 2010. The plant salt stress tolerance research progress. Jilin Agri, (9): 51 - 52. (in Chinese)
- 伍林涛, 杜才富, 邵明波. 2010. 植物盐胁迫耐受性研究进展. 吉林农业, (9): 51 - 52.
- Wu Xue-xia, Zhu Yue-lin, Zhu Wei-min, Chen Jian-lin. 2006. Effects of exogenous nitric oxide on seedling growth of tomato under NaCl stress. Acta Bot Boreal-Occident Sin, 26 (6): 1206 - 1211. (in Chinese)
- 吴雪霞, 朱月林, 朱为民, 陈建林. 2006. 外源一氧化氮对 NaCl 胁迫下番茄幼苗生长和光合作用的影响. 西北植物学报, 26 (6): 1206 - 1211.
- Zhang Ji-tao, Xu Meng, Han Kun, Wang Lin-quan. 2011. Effect of salt stress on plant nutrition and physiology of tomato seedlings. Acta Agri Boreali-Occidental Sin, 20 (2): 128 - 133. (in Chinese)
- 张纪涛, 徐 猛, 韩 坤, 王林权. 2011. 盐胁迫对番茄幼苗的营养及生理效应. 西北农业学报, 20 (2): 128 - 133.
- Zhang Z J, Li H Z, Zhou W J, Takeuchi Y, Yoneyama K. 2006. Effect of 5-aminolevulinic acid on development and salt tolerance of potato (*Solanum tuberosum* L.) microtubers *in vitro*. Plant Growth Regul, 49: 27 - 34.
- Zhang Zhi-ping. 2010. Changes of physiological characteristics of the obtained transgenic *YHem1* plants with ability to over-product 5-amino-levulinic acid [Ph. D. Dissertation]. Nanjing: Nanjing Agricultural University. (in Chinese)
- 张治平. 2010. 四种转 ALA 合酶基因 (*YHem1*) 植物的获得及其生理特性的研究 [博士论文]. 南京: 南京农业大学.
- Zhang Z P, Yao Q H, Wang L J. 2010. Expression of yeast *Hem1* gene in *Arabidopsis* plants improves salt tolerance. BMB Reports, 43: 330 - 336.
- Zhang Z P, Yao Q H, Wang L J. 2011. Expression of yeast *Hem1* controlled by *Arabidopsis HemA1* promoter enhances leaf photosynthesis in transgenic tobacco. Mol Biol Reports, 38: 4369 - 4379.
- Zhao Xiao-jin, Li Ya-fang. 2008. A study on Promotion of ALA on resistance of wheat to saline soil and amendment of saline-alkali soil through addition of sulfur. Acta Agri Boreali-occident Sin, 17 (6): 303 - 308. (in Chinese)
- 赵晓进, 李亚芳. 2008. ALA 增强小麦抗盐性及硫磺改良碱性盐土的研究. 西北农业学报, 17 (6): 303 - 308.
- Zhao Xu-peng, Yang Li, Yang Shuang-yan, Tang Shao-hu. 2010. Effects of exogenous ABA on physiological characteristics of tomato seedlings under salt stress. J Anhui Agri Sci, 38 (27): 14833 - 14835. (in Chinese)
- 赵许朋, 杨 立, 杨双燕, 汤绍虎. 2010. ABA 对盐胁迫下番茄幼苗生理特性的影响. 安徽农业科学, 38 (27): 14833 - 14835.
- Zavgorodnyaya A, Papenbrock J, Grimm B. 1997. Yeast 5-aminolevulinic acid synthase provides additional chlorophyll precursor in transgenic tobacco. Plant J, 12: 169 - 178.