

文章编号: 1674-7054(2013)02-0169-04

耐盐番茄的生理生化特征

陈智¹, 史进弘¹, 曲莹², 江行玉¹, 邓用川¹

(1. 海南大学农学院, 海南 海口 570228; 2. 威海市环境保护监测站, 山东 威海 264200)

摘要: 用盐水、淡水处理耐盐番茄和对照番茄(未导入外源 DNA), 对其生长情况和各种生理生化指标进行分析。结果表明: 盐胁迫下耐盐番茄植株生长良好, 而对照番茄生长受到抑制, 植株矮小; 盐胁迫下耐盐番茄叶片维生素 C、脯氨酸、叶绿素、可溶性糖含量明显高于对照的, 蛋白含量下降的幅度比对照的大, MDA 浓度比对照的低, SOD 活性比对照番茄稍有下降。因此, 耐盐番茄具有较强的耐盐性。

关键词: 耐盐番茄; 生理生化指标; 耐盐性

中图分类号: Q 945.78; S 641.2

文献标志码: A

土壤盐渍化对农业生产的威胁是人类所共知的。据估计, 全世界大约有 3.6 亿 hm^2 的土地存在着不同程度的盐渍化。随着温室效应引起的全球气候变暖, 部分地区环境恶化引起土地沙漠化、盐碱化。VIN-OCUR 等预计, 到 2050 年将会有超过 50% 的耕地盐碱化^[1]。利用传统的土壤改良方法, 虽然可以改善作物生长条件, 但耗费人力、物力、财力。运用生物技术进行植物改良, 提高作物对盐环境的适应能力, 以减少盐渍对农业生产的影响, 是一条值得探索的经济有效的途径^[2]。培育转基因耐盐作物可能需要同时转移多个基因。刘晶等人^[3]运用农杆菌浸染法向转 *AtNHX1* 的番茄 Money-maker 株系 X10EA1 自交 2 代植株 (T_2) 中转入山菠菜甜菜碱醛脱氢酶基因 (*BADH*)。在 $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaCl 胁迫下, 双转化的番茄植株各项生理指标均优于单转化 *AtNHX1* 的番茄, 初步证明, 双基因转化有助于增强番茄的耐盐性。花粉管通道法由于适用于各种开花植物, 也被广泛应用于番茄转基因育种中。邓用川等人^[2]、林栖凤等人^[4-5]采用花粉管通道技术, 将耐盐植物的总 DNA 转入番茄等作物, 经耐盐筛选, 已培育出能用含盐 $w = 2.5\% \sim 3.0\%$ 的海水直接灌溉的耐盐转化株。笔者利用花粉管通道技术, 以盐生植物红海榄的总 DNA 作为基因供体导入番茄, 开展耐盐作物分子育种的研究, 并将获得的转化株后代在海滩上试种, 用海水直接灌溉, 通过多次单株筛选, 现已传到第 17 代, 具有很强的耐盐性。笔者认为, 这是比较理想的多基因转化途径, 因为转移单个基因往往只能获得部分耐盐性状^[6]。笔者用盐水 ($V_{\text{海水}}: V_{\text{淡水}} = 1:2$, 盐含量约为 $w = 1\%$)、淡水处理耐盐番茄和对照番茄(未导入外源 DNA), 观察其生长情况, 并对其各种生理生化指标进行分析, 旨在为深入开展耐盐植物基因工程研究提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 实验材料 选用第 17 代耐盐番茄种子, 并用常规番茄种子作对照。

1.1.2 主要试剂 维生素 C、考马斯亮蓝 G-250、2,6-二氯酚靛酚、核黄素(北京索莱宝科技有限公司)、牛血清白蛋白(北京康为世纪生物科技有限公司)、脯氨酸、氮蓝四唑(NBT)(上海生工生物工程技术服务有限公司)、酸性茚三酮(上海伯奥生物科技有限公司)、乙二醇四乙酸(武汉市杰辉生物技术有限公司)、葡萄糖、蒽酮、酚酞、草酸、硫酸、丙酮、丙二醛、巯基乙醇、磷酸钾、硫酸铵等均为分析纯或生化试剂。

收稿日期: 2013-4-16

基金项目: 国家自然科学基金(31260354)

作者简介: 陈智(1989-), 男, 海南临高人, 海南大学农学院 2009 级本科生。

通信作者: 邓用川, 海南大学农学院副研究员, E-mail: dengyc8@sina.com

1.1.3 仪器 UV-1100 型紫外可见分光光度计(上海美谱达仪器有限公司),101-1A 型数显式电热恒温干燥箱(上海沪越实验仪器有限公司),FA2104 电子天平(上海民桥精密科学仪器有限公司),Sartorius 普及型 pH 计(PB-10)(德国赛多利斯股份公司),智能光照培养箱(宁波海曙赛福实验仪器厂),HH-S24 电热恒温水浴锅(金坛市大地自动化仪器厂),UPHW-IV-90T 优普超纯水系统(成都超纯科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 盆栽 将土壤装盆,浸种后按常规播种。设 2 组对照 2 组耐盐番茄,每组 4 盆。每天用自来水浇灌 2 次,放在自然条件下生长。待番茄生长到 3~4 片真叶时,一组用盐水处理,另一组用淡水处理,每天 2 次。处理 14 d 后,即可取样测量相关的生理生化指标。

1.2.2 抗坏血酸(维生素 C)含量测定 按文献[7]的方法进行。

1.2.3 脯氨酸测定 采用酸性茚三酮显色法^[8]测定植物脯氨酸,用分光光度计测定 520 nm 处的 OD 值。将标准脯氨酸稀释(1~500 mg·L⁻¹)制作标准曲线,计算样品脯氨酸含量。

1.2.4 蛋白质测定 按文献[9]的方法进行。

1.2.5 可溶性糖的测定 采用蒽酮比色法^[9]测定可溶性糖的含量。糖在硫酸作用下生成糖醛,糖醛再与蒽酮作用形成绿色络合物。测定 625 nm 波长处的 OD 值,取标准溶液将其稀释(0~100 mg·L⁻¹)制作标准曲线,计算样品糖含量。

1.2.6 叶绿素含量测定^[9] 利用丙酮提取样品色素,在 663、645 nm 处测定 OD 值,再根据 lambert-beer 定律算出样品的总叶绿素。

1.2.7 丙二醛测定^[10] 在酸性条件下,丙二醛可与硫代巴比妥反应生成红棕色的 3,4,5-三甲基恶唑 2,4-二酮。在 532 nm 波长处测定样品 OD 值,根据 lambert-beer 定律算出样品丙二醛含量。

1.2.8 超氧化物歧化酶(SOD)活性测定^[11-12] 取新鲜番茄叶片,按 $m_{\text{叶片}}:V_{\text{缓冲液}}=1:2$ 的比例加入 100 mmol·L⁻¹ 的磷酸钾缓冲液(pH8.2,含 1 mmol·L⁻¹ 的 EDTA,2 mmol·L⁻¹ 的巯基乙醇),匀浆,过滤。用 $\rho=40\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NaOH 溶液将滤液的 pH 调至 7.8,4℃静置 3 h,7 000 r·min⁻¹ 离心 20 min,取上清液,加入适量的 (NH₄)₂SO₄,静置过夜,7 000 r·min⁻¹ 离心 20 min,取上清液,将 (NH₄)₂SO₄ 饱和度调整为 80%,15 000 r·min⁻¹ 离心 20 min,取沉淀,用 500 mmol·L⁻¹ 磷酸钾缓冲液(pH 7.8,含 1 mmol·L⁻¹ 的 EDTA,2 mmol·L⁻¹ 的巯基乙醇)溶解,即可用于测定 SOD 活性。

SOD 活性测定采用 NBT(氮蓝四唑)光还原法。于分光光度计上测定反应液在 560 nm 处的消光值。以在 1 mL 反应液中,抑制 NBT 光还原 50% 的酶量定义为 1 个活力单位,计算出每克鲜叶的 SOD 酶活力单位。

2 结果与分析

2.1 盐胁迫对番茄植株生长的影响 从图 1 可看出,耐盐番茄在盐胁迫条件下生长未受到抑制,生长良好;而对照番茄生长受抑制严重,植株矮小。



图 1 盐胁迫对番茄植株生长的影响

注: 1A 为淡水处理, 1B 为盐水处理

Fig. 1 Effect of salt stress on the growth of tomato plants

Note: 1A: Fresh water treatment; 1B: Salt water treatment

2.2 盐胁迫对番茄叶片维生素 C、蛋白质、可溶性糖、叶绿素含量的影响 从表 1 可以看出 ,耐盐番茄叶片维生素 C 含量明显高于对照株 ,淡水处理的耐盐番茄叶片维生素 C 含量是对照株的 1.4 倍 ,盐胁迫下耐盐番茄叶片维生素 C 含量是对照株的 1.8 倍 ,蛋白含量下降的幅度比对照番茄的大 ,可溶性糖含量比对照株的高 ,叶绿素含量明显高于对照株。

表 1 盐胁迫对番茄叶片维生素 C、蛋白质、可溶性糖、叶绿素含量的影响				
Tab.1 The content of vitamin C , proline , chlorophyll and soluble sugar in tomato leaf				
g · kg ⁻¹				
番茄种类 Tomato species	Vitamin C	蛋白质 Proline	可溶性糖 Soluble sugar	叶绿素 Chlorophyll
对照番茄(淡水) Control (freshwater)	0.164 1	19.25	3.45	0.14
对照番茄(盐水) Control (salt water)	0.126 8	15.54	4.56	0.16
耐盐番茄(淡水) Salt-tolerant tomato (freshwater)	0.229 0	13.38	2.94	0.60
耐盐番茄(盐水) Salt-tolerant tomato (salt water)	0.227 7	12.31	5.60	0.57

2.3 盐胁迫对番茄叶片脯氨酸、丙二醛和 SOD 活性的影响 从表 2 可以看出 ,盐胁迫下耐盐番茄、对照番茄叶片的脯氨酸含量比淡水处理的耐盐番茄和对照番茄的增加明显 ,但耐盐番茄的脯氨酸含量增加更明显 ,其中盐胁迫下耐盐番茄是淡水处理对照番茄的 12 倍 ,盐胁迫下对照番茄是淡水处理对照番茄的 9 倍;耐盐番茄 MDA 浓度较对照的低 ,盐胁迫下耐盐番茄的 MDA 浓度更低;2 种处理的耐盐番茄的 SOD 活性均比淡水处理的对照番茄的低 ,盐胁迫下耐盐番茄的 SOD 活性下降明显。

表 2 盐胁迫对番茄叶片脯氨酸、丙二醛含量和 SOD 活性的影响			
Tab.2 The content of proline and MDA and the SOD activity in the tomato leaf			
番茄种类 Tomato species	脯氨酸 Proline / (mg · kg ⁻¹)	MDA /(nmol · g ⁻¹)	SOD/(U · g ⁻¹)
对照番茄(淡水) Control (freshwater)	20.57	10.85	0.68
对照番茄(盐水) Control (salt water)	194.07	11.66	0.62
耐盐番茄(淡水) Salt-tolerant tomato (freshwater)	21.12	9.76	0.66
耐盐番茄(盐水) Salt-tolerant tomato (salt water)	245.90	9.02	0.64

3 讨 论

盐胁迫下耐盐番茄植株生长基本未受抑制 ,生长良好 ,而对照番茄生长受到抑制 ,植株矮小;耐盐番茄叶片叶绿素、脯氨酸、维生素 C、可溶性糖含量明显高于对照株。本实验结果与 GOEL 等^[13]将渗透蛋白基因通过农杆菌介导法转移到番茄中 ,转基因番茄在压力情况下叶绿素和脯氨酸含量明显高于野生型 ,以及张桂和等^[14]将海蓬子 Na⁺ /H⁺ 逆向转运蛋白基因(*Nhap*)转入番茄中 ,转基因植株的叶绿素含量明显高于对照的研究结果是一致的。盐胁迫可导致植株叶片的叶绿素含量降低 ,是由于受盐胁迫 ,植株体内的叶绿素酶活性增强 ,从而促进了叶绿素 b 的降解所致^[15]。脯氨酸既是细胞质的渗透调节物质 ,又是酶和细胞结构的保护剂及自由基清除剂 ,在植物的抗性生理生化中发挥关键作用^[16]。维生素 C 是植物细胞内重要非酶类保护性物质 ,能有效清除植物体内的自由基。植物在经受逆境胁迫时 ,植物细胞受外界环境条件刺激 ,在一系列信号传导途径的控制下 ,细胞内可溶性糖含量增多 ,以增加渗透压来抵抗干旱或盐碱地 ,增加水分的吸收。

盐胁迫下耐盐番茄叶片蛋白含量下降的幅度比对照的大,这是由于细胞在适应盐胁迫的生理过程中需要调整蛋白质的合成与降解,以适应新的环境。可溶性蛋白含量的高低直接影响到细胞代谢速度的快慢^[17];耐盐番茄的蛋白含量的下降以减慢细胞代谢速度,增强对盐胁迫的适应力。盐胁迫下耐盐番茄叶片 MDA 浓度比对照低, SOD 活性比对照番茄稍有下降,这与 SINGH 等人^[18]采用 Rd29A 启动子,将 *At-CBF1* 转化到番茄中,转基因 T₁ 代植株在形态学和农艺学性状上与非转基因植株无差别,但耐冷性提高了 40% (4 °C 下处理 3 d),转基因植株 SOD、NPQ 增高,MDA 含量降低的报道是一致的。MDA 是膜脂过氧化作用的最终产物,是膜系统受害的重要标志之一^[19]。盐胁迫下,作物被迫吸收盐离子,由于盐离子的毒害作用,使植物细胞质膜的膜脂过氧化作用增大,膜脂或膜蛋白受损,清除自由基作用的超氧化物歧化酶(SOD)活性降低,从而导致活性氧自由基浓度增大,使细胞膜伤害加剧,最终导致膜透性增加,结构和功能受损^[16]。本实验结果表明,选育的耐盐番茄具有很强的耐盐性,这为开发利用盐碱地、进一步开展耐盐植物基因工程研究提供了科学依据。

参考文献:

- [1] VINOCUR B, ALTMAN A. Recent advances in engineering plant tolerance to a biotic stress: achievements and limitations [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2005, 16(2): 123–132.
- [2] 邓用川, 陈菊培, 林栖凤, 等. 导入红树 DNA 的番茄后代在 NaCl 胁迫下的某些生理变化 [J]. *海南大学学报: 自然科学版*, 2003, 21(3): 255–258.
- [3] 刘晶, 周树峰, 陈华, 等. 农杆菌介导的双价抗盐基因转化番茄的研究 [J]. *中国农业科学*, 2005, 38(8): 1636–1644.
- [4] 林栖凤, 邓用川, 黄微, 等. 红树 DNA 导入茄子获得耐盐性后代的研究 [J]. *生物工程进展*, 2001, 21(5): 40–44.
- [5] 林栖凤, 方清, 邓用川, 等. 耐盐番茄分子育种研究 [J]. *生命的化学*, 2004(8): 35–37.
- [6] 林栖凤, 邓用川, 李冠一. 外源 DNA 导入辣椒、番茄、茄子培育耐盐植株的研究 [G]// 中国生物化学与分子生物学会. 中国生物化学与分子生物学会农业生物化学与分子生物学会第八次学术研讨会论文集. 北京: 科学出版社, 2008: 32–35.
- [7] 陈毓荃. 生物化学实验方法和技术 [M]. 北京: 科学出版社, 2002: 102–106.
- [8] 朱广廉, 邓兴旺, 左卫能. 植物体内游离脯氨酸的测定 [J]. *植物生理学通讯*, 1983 (1): 77–83.
- [9] 张志良, 瞿伟菁. 植物生理学实验指导 [M]. 第 3 版. 北京: 高等教育出版社, 2003: 67–158.
- [10] 林栖凤. 耐盐植物研究 [M]. 北京: 科学出版社, 2004: 338.
- [11] 林栖凤, 曾驰, 潘济文, 等. 海南野生猕猴桃、子京、人心果的生化分析研究 [J]. *海南大学学报: 自然科学版*, 1994, 12(2): 117–120.
- [12] 王爱国. 大豆种子超氧化物歧化酶的研究 [J]. *植物生理学报*, 1983, 9(1): 77–83.
- [13] GOEL D, SINGH A K, YADAV V, et al. Over expression of osmotic gene confers tolerance to salt and drought stresses in transgenic tomato (*Solanum lycopersicum* L.) [J]. *Protoplasma*, 2010, 245(1/4): 133–141.
- [14] 张桂和, 郭建春, 叶妙水. 转海蓬子 Na⁺/H⁺ 逆向运输蛋白基因番茄的耐盐性研究 [J]. *贵州科学*, 2007, 25(2): 47–50.
- [15] 徐鲜钧, 沈宝川, 祁建民. 植物耐盐性及其生理生化指标的研究进展 [J]. *亚热带农业研究*, 2007, 3(4): 275–280.
- [16] 陈敏, 李海云, 吕福堂. 植物耐盐性研究进展 [J]. *聊城大学学报*, 2011, 24(3): 47–50.
- [17] 柳展基, 于翠梅, 张月杰, 等. 不同盐浓度下水稻胚性愈伤组织生理生化指标分析 [J]. *山东农业科学*, 2000(3): 22–23.
- [18] SINGH S, RATHORE M, GOYARY D, et al. Induced ectopic expression of *At-CBF1* in marker-free transgenic tomatoes confers enhanced chilling tolerance [J]. *Plant Cell Rep.*, 2011, 30(6): 1019–1028.
- [19] 毛桂莲, 许兴. 枸杞耐盐突变体的筛选及生理生化分析 [J]. *西北植物学报*, 2005, 25(2): 275–280.

(下转第 188 页)

参考文献:

- [1] 曹志刚,冯仲科,龙春玲,等. 基于数字图像视觉分析的叶面积活体测定系统研究[J]. 北京林业大学学报, 2005, 27(2): 200-203.
- [2] 宋来庆,尹克林,赵珍珍,等. 利用计算机快速测定葡萄叶面积的方法研究[J]. 中外葡萄与葡萄酒, 2005(1): 1-6.
- [3] 程鸿,占军芬. CAD 图形处理技术在植物叶面积测量中的应用[J]. 甘肃农业大学学报, 2003, 8(4): 467-470.
- [4] 刘玉华,贾志宽,史纪安,等. GIS 空间分析技术在苜蓿叶面积测定中的应用[J]. 草业学报, 2006, 15(2): 119-123.
- [5] 黄永敬,卢美英,何金光,等. 芒果叶面积测定方法的研究[J]. 广西热带农业, 2004(2): 1-3.
- [6] 王家保,林秋全,叶小德,等. 5 种测量热带果树单叶面积的方法研究[J]. 热带农业科学, 2003, 23(1): 11-15.
- [7] 周开兵,陈志霞. 人心果叶片面积测定方法[J]. 实验科学与技术, 2008, 6(1): 43-44.

Method of Measuring Leaf Area of Lychee on Tree

ZHOU Kaibing, WAN Jinggang, WANG Yongmei, HE Xin, XU Bing

(Ministry of Education Key Laboratory of Protection, Development and Utilization of Tropical Crop
Germplasm Resources, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: The true area (S), length (a) and width (b) of leaves of lychee Feizixiao were determined, and the corrected coefficients (the ratio of the true area to the product of the length and width of leaves) were calculated and analyzed in linear regression, based on which two formulas ($S = 0.65ab$ and $S = 0.6488ab + 0.0018$) were established to estimate the leaf area. The verification of these two formulas indicated that they both can be used for accurately estimating the area of the leaves of lychee Feizixiao through measuring the length and width of leaves.

Key words: lychee Feizixiao; leaf area; measuring method

(上接第 172 页)

Physiological and Biochemical Characteristics of Salt-tolerant Tomato

CHEN Zhi¹, SHI Jinhong¹, QU Ying², JIANG Xingyu¹, DENG Yongchuan¹

(1. College of Agronomy, Hainan University, Haikou 570228, China;

2. Weihai Environmental Protection Monitoring Station, Weihai, Shandong 264200, China)

Abstract: Salt solution and fresh water were used to irrigate the salt-tolerant and control tomatoes. The control tomatoes were not introduced with exogenous DNA. The results showed that the salt-tolerant tomato plants grew better than the control when they were irrigated under salt stress, and the control tomato plants grew short. Additionally, the salt-tolerant tomatoes were obviously higher in the leaf content of vitamin C, proline, chlorophyll and soluble sugar than the control, but much higher in the leaf protein content and lower in the leaf MDA content than the control. Their leaf SOD activity declined slightly than that of the control. It was suggested that the salt-tolerant tomato had a high salt resistance.

Key words: salt-tolerant tomato; physiological and biochemical indexes; salt tolerance