

转基因甘薯旱后复水的修复机制和叶片喷施 H₂O₂ 的效果

董永会¹, 邓西平¹, 郭尚洙²

(1.西北农林科技大学 黄土高原土壤侵蚀与旱地农业国家重点实验室/生命科学学院, 陕西 杨凌 712100;
2.韩国生命工学研究院, 韩国 大田 305-806)

摘要: 对转入铜/锌超氧化物歧化酶(Cu/Zn SOD)和抗坏血酸氧化酶(APX)基因的甘薯和非转基因甘薯进行 PEG 胁迫处理(PE 组)和 H₂O₂ 处理后再胁迫处理(PE+组),对比胁迫后两个处理组及其对照组的抗氧化酶活性、MDA 与 H₂O₂ 的变化情况。得出胁迫和复水前期,转基因植株抗氧化酶活性和光合速率高于非转基因植株,MDA 和 H₂O₂ 含量则低于非转基因植株,复水后期抗氧化酶活性下降较快,出现较高的光合速率以及较低的 MDA 和 H₂O₂ 含量;PE+组比 PE 组表现出了较强的抗氧化酶活性,也出现较高的 MDA 和 H₂O₂ 含量和较低光合速率。研究表明:转基因甘薯更具有抗旱优势;H₂O₂ 预处理后有加重其胁迫程度的趋势。

关键词: 甘薯;转基因;干旱复水;过氧化氢(H₂O₂)

中图分类号: S531.01 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7601(2011)04-0013-06

目前随着分子生物学的发展,通过导入抗氧化酶来提高植物抗逆性已经得到广泛应用,Smimoff N^[1]等研究发现烟草和土豆中过量表达 Cu/Zn SOD 可增强它们的抗氧化能力;Lim S^[2]向甘薯中导入在叶绿体中同时表达 Cu/Zn SOD 和 APX 的基因,并且证明甘薯的抗氧化能力得到了提高。对叶绿体中同时表达 Cu/Zn SOD 和 APX 基因的甘薯也作了一些研究,表明转基因甘薯较非转基因甘薯有较强的抗旱性及旱后与冷后恢复能力^[3]。过氧化氢(H₂O₂)是植物体内一种较为稳定的活性氧分子^[4],近年来,通过生物化学与分子生物学手段证实,H₂O₂ 活性氧不只是被认为对细胞有毒害作用的代谢产物,而且也是一种介导了植物和动物细胞对生物与非生物胁迫反应的信号分子^[5]。因而通过转基因手段(如转入活性氧清除酶系统)以及生理调控处理(如用外源 H₂O₂)提高其干旱复水后的恢复能力是非常有必要的。

然而植物的抗旱性不仅表现在植物在干旱环境条件下生长、繁殖或生存的能力,还体现在干旱解除后迅速恢复的能力^[6]。只有从逆境中更快、更好恢复的植物,才能更好地在多变的环境中生存。但前人的研究多集中在植物的忍耐能力方面,而对其在逆境后的恢复机制涉及较少。尤其是通过转基因以及生理调控(H₂O₂ 处理)相结合来研究甘薯的抗旱

性及旱后恢复机制还未见报道。

本研究旨在探讨转入 Cu/Zn SOD 和 APX 基因的甘薯幼苗是否具有更强的抗旱性以及旱后恢复能力,以及明确外源 H₂O₂ 预处理能否对甘薯幼苗的抗旱性以及旱后恢复能力有所增强。

1 材料与方法

1.1 植物材料的培养

供试材料为韩国生命科学与生物技术研究所提供的在叶绿体中同时表达 Cu/Zn SOD 和 APX 抗氧化酶基因的甘薯盆栽植株和未转基因植株(*Ipomoea batatas* L.)。试验在黄土高原土壤侵蚀与旱地农业国家重点实验室完成。

1.2 甘薯植株的水分胁迫及复水处理

从盆栽植株中剪取五叶一心苗移入 1/2 Hoagland 溶液中,散射光照 400 μmol/(m²·s),室温 20℃~30℃,室内水培一周。采用桶栽,转基因甘薯植株 40 小桶和非转基因植株 40 小桶进行试验处理,两类植株均按如下 3 种方案进行处理(表 1):处理 1,对照组(CK 组),将水培一周的培养苗转入 1/2 Hoagland 培养液中;处理 2(PE 组)将水培一周的培养苗用 10% 浓度聚乙二醇(PEG 6000)的 1/2 Hoagland 培养液中进行水分胁迫,水分胁迫 48 h 后,改换正常营养液(即复水);处理 3(PE+组),用 1.0

收稿日期:2011-01-12
基金项目:国家重点基础研究(973)发展计划项目(2009CB118604);国际科技合作计划(2010DFA91930)
作者简介:董永会(1985—),女,陕西咸阳人,硕士研究生,主要从事植物水分生理和抗逆性研究。E-mail:heidan-0824@163.com。
通信作者:邓西平(1959—),男,陕西西安人,研究员,主要从事植物生理生态研究。E-mail:dengxp@ms.iswc.ac.cn。

mmol/L H₂O₂ 喷施叶片后再用 10% 的 PEG 进行水分胁迫,同样 48 h 后复水。3 个处理都于胁迫 24 h,48 h 及复水 6 h,12 h,24 h 后测定各项指标,每一处理各 3 次重复。

表 1 试验处理
Table 1 Treatments of plants

植株 Plant	CK	PE	PE+
转基因 (TS) Transgenic	W1	W2	W3
非转基因 (NT) Non-transgenic	W4	W5	W6

1.3 测定指标及其方法

超氧化物歧化酶 (SOD)、抗坏血酸氧化酶 (APX)、过氧化氢酶 (CAT) 酶活性参照李忠光^[7]的方法;H₂O₂ 含量的测定参照 Mukherjee 和 Choudhuri 的方法^[8];MDA 含量参照高俊凤^[9]的方法测定;光合测定使用美国 LI-COR 公司生产的 Li-6400 气体交换光合测定系统,采用开放式气路,测定条件:28℃±2℃,空气 CO₂ 浓度(290±10)μmol/(m²·s),内部光强(500±1)μmol/(m²·s)。

1.4 数据处理

实验数据与图表处理采用 Sigmaplot10.0 和 SAS 数据统计分析软件。

2 结果与分析

2.1 干旱复水和叶片喷施 H₂O₂ 对甘薯叶片抗氧化酶系统的影响

在 PEG 胁迫后 24 h、48 h 和复水后 6 h、12 h、24 h,分别对各处理组中的甘薯叶片进行 APX、SOD、CAT 3 种抗氧化酶活性检测。活性变化情况如图 1 所示:在对照组中(CK 组),上述 3 种抗氧化酶活性在转基因与非转基因两类植株间均没有表现出显著差异。胁迫后 24 h,转基因与非转基因植株的 SOD、APX、CAT 酶活性都显著升高,所不同的是,转基因植株 3 种酶升高的程度都显著高于非转基因植株。胁迫 48 h 后,3 种抗氧化酶在转基因与非转基因植株中都有所降低,但是转基因植株较非转基因植株降低程度低,并且此时转基因植株的酶活性还是明显高于非转基因甘薯。复水 6 h 后,转基因植株的 SOD、APX 都稍有升高,CAT 酶活性却仍在降低;而非转基因甘薯的 SOD、APX 都继续降低,但程度不显著,非转基因甘薯的 CAT 酶却在此时较胁迫 48 h 时显著升高。复水 12 h 后 3 种抗氧化酶活性在转基因与非转基因两类植株中均显著升高,但仍是转基因植株的酶活性显著高于非转基因植株。复水 24 h 后,转基因植株的上述 3 种酶活性均显著降低;而非

转基因植株除 APX 的酶活性较前一时间段稍有降低外,SOD、CAT 酶活性均还显著升高($P<0.05$)。

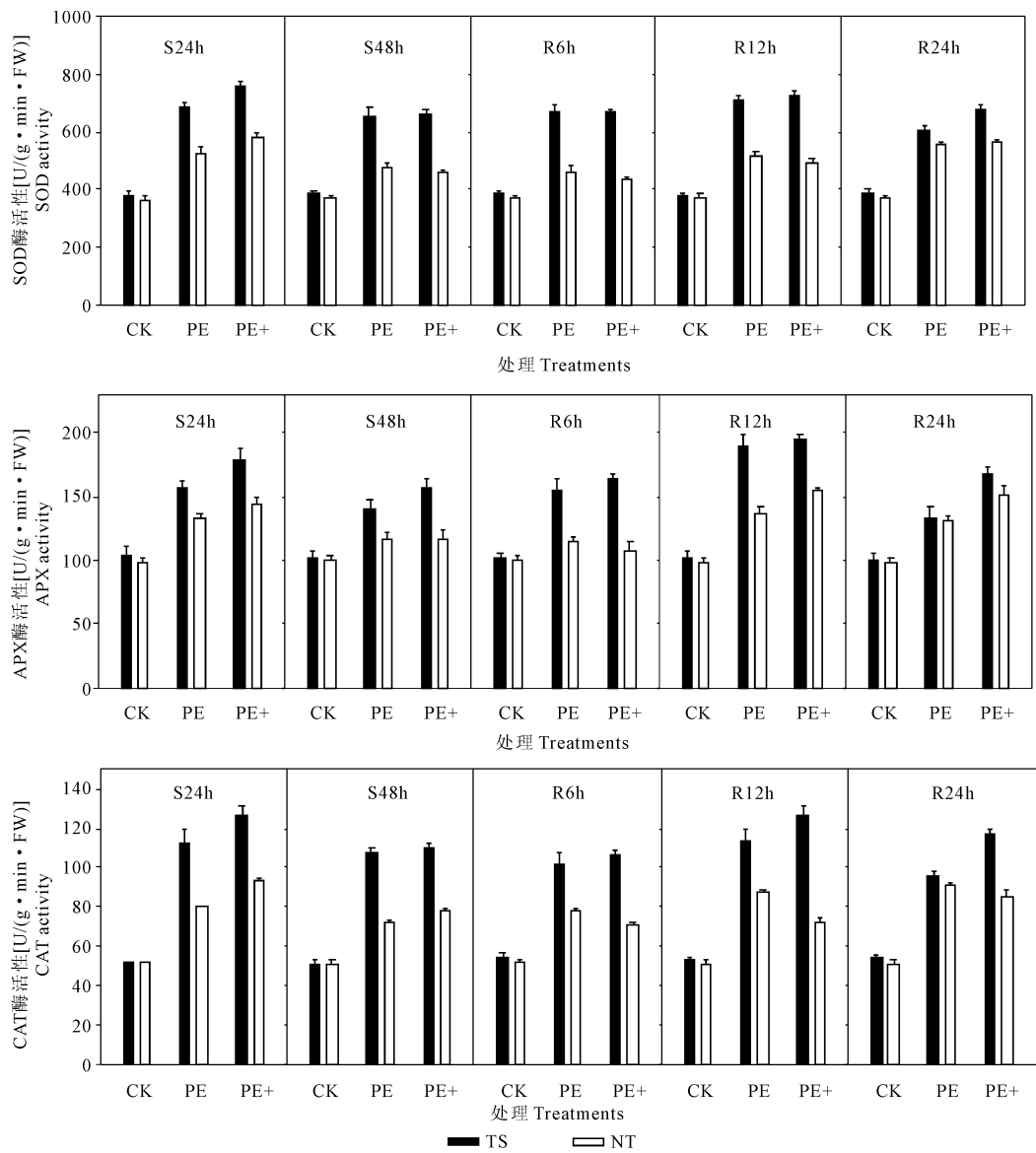
水分胁迫促使甘薯叶片 SOD、APX、CAT 酶活性增加,但是胁迫时间与其活性并不呈正相关。由图 1 可看出,转基因甘薯植株在水分胁迫 24 h 时叶片 SOD、APX、CAT 活性上升,但继续增加胁迫时间至 48 h,上述 3 种酶活性反而下降。转基因甘薯植株叶片 SOD、APX、CAT 活性较非转基因甘薯在水分胁迫时上升快,胁迫解除后又能迅速降低。

图 1 还显示了叶片喷施过氧化氢对转基因与非转基因两类植株干旱胁迫及复水后抗氧化酶体系的影响情况。在 PEG 胁迫处理后 24 h 时,与 PE 组比较,用过氧化氢预处理(PE+)显著升高了转基因和非转基因甘薯幼苗叶片 SOD、CAT、APX 酶活性,转基因植株 PE+组上述 3 个抗氧化酶活性显著高于非转基因;胁迫 48 h 后,无论是转基因还是非转基因植株 H₂O₂ 处理组 SOD、CAT、APX 酶活性都显著降低,基本与 PE 组持平,甚至稍高于 PE 组胁迫组;复水后 6 h,转基因植株 PE+组 SOD、CAT、APX 酶活性较前一时间段稍有升高或基本持平,而非转基因 PE+组除 APX 酶外,SOD、CAT 酶活性都较前一时间段显著降低,并且转基因与非转基因植株在这一时间段 PE+组与 PE 组均无显著性差异。复水后 12 h,转基因植株 PE+组中 3 种酶活性均显著升高,且均高于 PE 组,但无显著性差异,非转基因植株 PE+组 SOD、APX 也显著升高,并且 APX 显著高于 PE 组,而 CAT 稍有升高,并且显著低于 PE 组;复水后 24 h,转基因植株 PE+组中 3 种酶活性均显著降低,但仍显著高于 PE 组,而非转基因植株 SOD、CAT 酶活性显著升高,与此时 PE 组升高放缓的趋势相反,APX 酶活性此时表现出与 PE 组相同的趋势,但仍显著高于 PE 组($P<0.05$)。

2.2 干旱复水和叶片喷施 H₂O₂ 对甘薯叶片 MDA、H₂O₂ 的影响

H₂O₂ 是一种活性氧分子,MDA 是自由基对细胞膜质过氧化伤害的主要最终产物之一,所以 H₂O₂、MDA 含量的多少能够反映出逆境条件下植物所受伤害的程度。图 2 表明,在对照组中(CK 组),H₂O₂、MDA 含量在转基因植株中比非转基因植株稍低,但差异不显著;PEG 模拟的干旱胁迫促使转基因与非转基因甘薯叶片的 H₂O₂、MDA 含量上升,且随着胁迫时间的延长,H₂O₂、MDA 含量的积累逐渐增加,表明植株受到的伤害程度加深;复水之后细胞得到修复,但由于之前积累了较多,所以 H₂O₂、MDA 含量均在复水初期先上升,然后下降,但即使经过 24 h 的

恢复,H₂O₂、MDA 含量仍然与对照有显著差异。另外,非转基因甘薯植株叶片的 MDA 含量,不管是在胁迫期间还是随后的复水过程中,均显著高于转基因甘薯植株($P<0.05$)。



注:TS、NT 分别表示转基因植株和非转基因植株;CK、PE、PE+ 分别表示对照组、PEG 胁迫组、喷施 H₂O₂ 组的样品;S24、S48R、R6、R12、R24 则表示植株 PEG 胁迫处理后 24 h、48 h 和复水后 6h、12h、24h 的样品。下同。

Note: TS and NT indicate the plant sample of non-transgenic control plant; CK, PE and PE+ indicated control, drought treatment and pre-treated with H₂O₂ treatment respectively; S24, S48R, R6, R12 and R24 indicate the plant sample of plant took at 24 h and 48 h after drought stress and 6 h, 12 h and 24 h after re-watering condition respectively. The same below.

图 1 干旱复水和喷施 H₂O₂ 后两类植株各种抗氧化酶活性变化情况

Fig.1 The activity of anti-oxidative enzymes of two types of plants after drought stress and pre-treated with H₂O₂

图 2 还表明,叶片喷施 H₂O₂ 促使转基因与非转基因甘薯叶片的 H₂O₂、MDA 含量上升,与 PE 组相同,转基因 PE+ 组显著低于非转基因 PE+ 组,且表现出基本相同的趋势,即 H₂O₂ 含量在胁迫 24 h、48 h、复水 6 h 都处于上升趋势,直到复水 24 h,其含量才得到显著下降,而 MDA 的含量到复水 12 h 时还处于上升趋势,直到复水 24 h 后,除非转基因 PE+ 组稍有下降外,其它 3 个处理组均得到显著下降(P

2.3 干旱复水和叶片喷施 H₂O₂ 对甘薯叶片光合速率的影响

从图 3 看出,在对照组中(CK 组),转基因植株光合速率较非转基因植株稍高,但没有表现出显著差异。胁迫 48 h 后,两类植株叶片光合速率均显著降低,转基因植株降低的程度要比非转基因的低,但

两类植株无显著差异;复水 24 h 后,转基因植株叶片光合速率较胁迫 48 h 后有显著升高,而非转基因植株升高不显著,并且转基因植株叶片光合速率已

与 CK 已无显著性差异,而非转基因植株仍与 CK 有显著性差异,说明转基因植株在胁迫后可以较快地恢复($P<0.05$)。

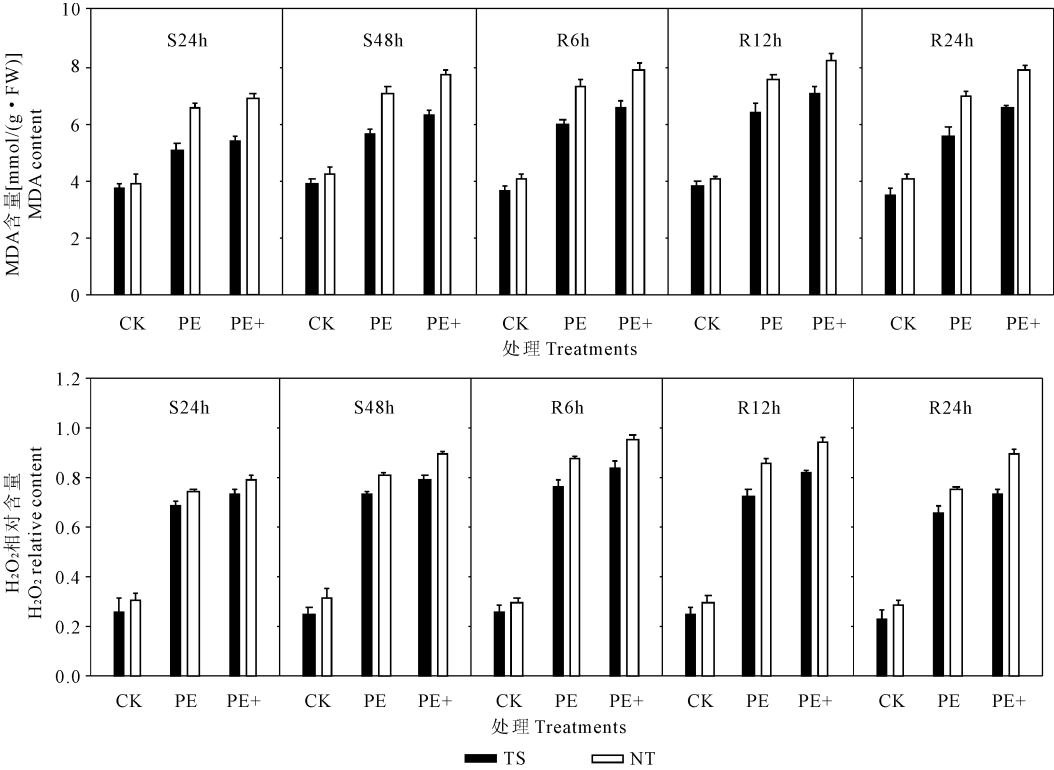


图 2 干旱复水和喷施 H₂O₂ 后两类植株 MDA、H₂O₂ 变化情况

Fig.2 The MDA and H₂O₂ content of two types of plants after drought stress and pre-treated with H₂O₂

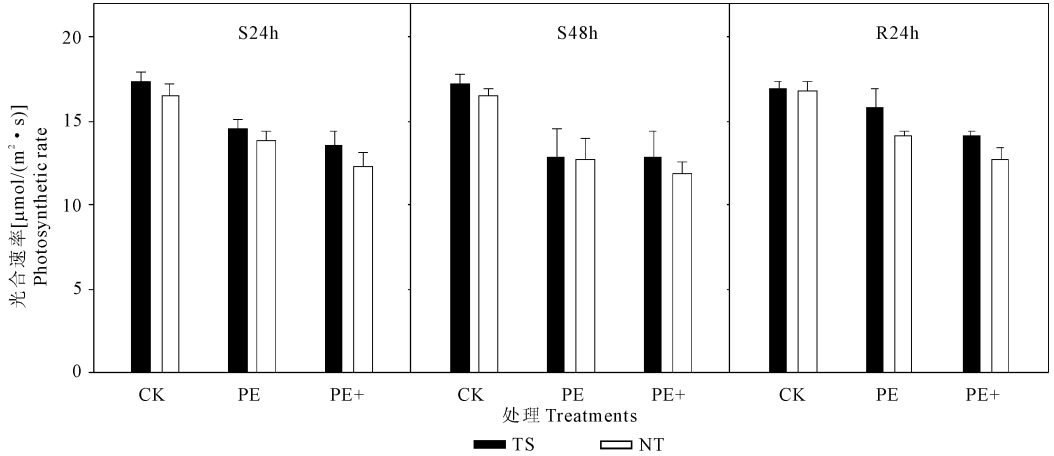


图 3 干旱复水和喷施 H₂O₂ 后两类植株光合速率变化情况

Fig.3 The photosynthetic rate of two types of plants after drought stress and pre-treated with H₂O₂

图 3 还表明,无论是转基因植株还是非转基因植株 PE+组在各个时间段都低于 PE 组,且转基因植株 PE+组都高于非转基因植株 PE+组。在胁迫 24 h 后,转基因植株 PE+组光合速率低于 PE 组,但无显著性差异,而非转基因植株 PE+组已显著低于 PE 组,并

率已无显著性差异;胁迫 48 h 后,转基因植株中 PE+组与 PE 组光合速率基本持平,非转基因植株 PE+组仍低于 PE 组,但已无显著性差异,PE+组转基因与未转基因植株光合速率仍无显著性差异;复水 24 h 后,两种植株的 PE+组光合速率都有升高,转基因植株已显著高于胁迫 48 h 时,而非转基因植株

只略高于前一时间段,并且两种植株的 PE+组在此时都显著低于 PE 组,说明 H_2O_2 处理后,复水后光合速率升高减缓($P<0.05$)。

3 讨论与结论

3.1 转入 Cu/Zn SOD 和 APX 基因对甘薯幼苗干旱及旱后恢复的作用

干旱胁迫下,植物为了减缓由胁迫造成的压力,生理代谢迅速作出调整以保证细胞的正常生理功能。其中包括水分状况变化、细胞膜的稳定性^[10,11]、渗透物质和活性氧的积累(丙二醛含量、 H_2O_2)^[12]、抗氧化酶活性的变化、光合速率的变化等。植物细胞膜对维持细胞微环境和正常代谢具有重要作用。从本实验可以看出,植株受到短时间的胁迫后(24 h),抗氧化酶活性迅速提高,继续延长胁迫时间到 48 h,由于活性氧积累过多时,诱发膜脂过氧化产生大量的 MDA,对细胞造成的伤害加剧,与膜结合的酶系统受到一定破坏,加之活性氧增加,因而酶活力有所下降。复水初期 6 h,甘薯植株抗氧化酶活性继续降低,同时伴随着 MDA、 H_2O_2 含量继续上升,可能是原先受到胁迫时积累的伤害尚未清除,而抗氧化酶也在恢复中并且还肩负清除先前大量积累的活性氧;复水中期(12 h)抗氧化酶活性上升,则可能是酶活性得到恢复同时还在诱导新的抗氧化酶合成;而复水后期(24 h)抗氧化酶活性继续升高,则是因为诱导的过量抗氧化酶还未及时分解,所以仍显示出较高的活性,所以可以看出抗氧化酶活性的表达,并不与胁迫时间呈正比关系。一定程度的胁迫,可以迅速而有效地提高酶活性;但是过于严重的胁迫,反而会抑制酶活性。

Tang 等^[13]证明了在叶绿体中同时表达 Cu/Zn SOD 和 APX 基因的土豆与非转基因植株比较,具有较强的抗氧化与抗高温的能力;Lim 等^[14]在甘薯中证明了在叶绿体中同时表达 Cu/Zn SOD 和 APX 基因植株较非转基因对照同样具有较强的抗氧化能力。本实验与上述基本保持相同的趋势,即在受到干旱胁迫时 SWPA2 诱导性启动子^[15]启动,使转基因植株 APX、SOD 这两种抗氧化酶得到大量诱导表达,酶活力有显著提高,同时 CAT 酶由于受到上述两种酶的协同作用,其活性也显著提高,因而植株有了更强的活性氧清除能力,还表现出了更高的光合速率(Pn),更低的 MDA、 H_2O_2 含量;植株复水后又表现出快速恢复到胁迫前水平酶活性、光合速率和 MDA、 H_2O_2 含量的能力。

3.2 叶片喷施 H_2O_2 预处理对甘薯幼苗干旱及复水后恢复的作用

刘忠静^[16]等以温室黄瓜品种‘春光 2 号’为试材,研究外源过氧化氢是否通过提高叶片抗氧化酶的活性来减轻干旱胁迫对叶绿体膜的伤害。结果表明:外源过氧化氢预处理能够提高抗氧化物的活性,降低活性氧的积累,从而缓解干旱对黄瓜叶绿体膜的伤害。伍小兵^[3]同样以甘薯为材料,发现用 1.0 mmol/L H_2O_2 预处理组的植株与未预处理对照植株相比,在冷胁迫后的恢复过程中,表现出了较强的 SOD 与 APX 酶活性的恢复能力,较低的 MDA 产生量以及膜透性,且冷处理后植株的生长状况更好。本实验结果与以上有所不同,可能由于多种原因,如实验材料、PEG 胁迫程度、喷施 H_2O_2 浓度等多种原因。

本实验初步认为,由于 H_2O_2 这一活性氧在预处理组中的加入,使得预处理组植株的细胞在干旱胁迫初期(24 h)时具有更多的活性氧成分,产生更多的 MDA,诱导大量新的抗氧化酶的产生;当胁迫至 48 h 时,PEG 胁迫伤害加剧,再加之 H_2O_2 的胁迫作用,大量积累活性氧,产生较多的 MDA,对细胞造成更大的伤害,因而细胞中已有的抗氧化酶承担清除活性氧的任务更为繁重,且 H_2O_2 是 APX 酶、CAT 酶的直接底物,也是 SOD 酶的产物,这些酶的活性都直接受到了添加的 H_2O_2 的影响^[17],因而酶活性较胁迫 24 h 时显著降低。复水后,由于 H_2O_2 预处理受到双重胁迫,积累的毒害物质也就较多,因而较 PE 组,其酶活性、光合速率、MDA、 H_2O_2 含量就表现出了长时间无法恢复到胁迫前水平的现象。本研究表明在甘薯体内同时转入 SOD 和 APX 基因,可以有效减轻甘薯在水分胁迫条件下受损害的程度,提高甘薯的抗氧化能力。在水分胁迫的逆境解除后,也可以更快、更强地进行自我修复。外施 H_2O_2 不仅不能提高甘薯幼苗的抗旱性及旱后恢复能力,反而有加重其胁迫程度的趋势。

参考文献:

- [1] Snirnoff N. Antioxidant systems and plant response to the environment [C]//Environment and Plant Metabolism. Oxford, UK: BIOScientific Publishers, 217—243.
- [2] Lim S, Kim Y H, Kim S H, et al. Enhanced tolerance of transgenic sweet potato plants that express both Cu/Zn SOD and APX in chloroplasts to methyl viologen-mediated oxidative stress and chilling [J]. Mol Breeding, 2007, 19: 227—239.
- [3] 伍小兵,成雨洁,邓西平.叶片喷施 H_2O_2 以及转入 Cu/Zn SOD 和 APX 基因对甘薯幼苗冷后恢复的作用[J].中国农业科学,

2010,43(7);1379—1388.

[4] 李师翁,薛林贵,冯虎元,等.植物中的 H₂O₂ 信号及其功能[J].中国生物化学与分子生物学报,2007,23(10);804—810.

[5] Neill S, Desikan R, Hancock J. Hydrogen peroxide signaling [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2002,5(5);388—395.

[6] 戴建良.侧柏种源抗旱性测定和选择[D].北京:北京林业大学,1996.

[7] 李忠光,李江鸿,杜朝昆.在单一提取系统中同时测定五种植物抗氧化酶[J].云南师范大学学报(自然科学版),2002,22(6);44—48.

[8] Mukherjee S P, Choudhuri M A. Determination of glycolate oxidase activity H₂O₂ content and catalase activity [J]. Plant Physiol, 1983, 58;167—170.

[9] 高俊凤.植物生理学实验技术[M].西安:世界图书出版公司,2000,92(97);101.

[10] 李锦树,王洪春,王文英,等.干旱对玉米叶片细胞透性及膜脂的影响[J].植物生理学报,1983,9(3);221—229.

[11] 闫玉基,张佩兰.玉米抗旱性生理指标筛选鉴定的研究[J].河北省科学院学报,1992,(2);50—54.

[12] 张烈,沈秀瑛,孙彩霞.脯氨酸对玉米苗期抗旱性影响的研究[J].华北农学报,1999,14(1);38—41.

[13] Tang L, Kwon S, Kim S, et al. Enhanced tolerance of transgenic potato plants expressing both superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in chloroplasts against oxidative stress and high temperature [J]. Plant Cell Reports, 2006,25(12);1380—1386.

[14] Lim S, Kim Y, Kim S, et al. Enhanced tolerance of transgenic sweet potato plants that express both Cu/Zn SOD and APX in chloroplasts to methyl viologen-mediated oxidative stress and chilling [J]. Molecular Breeding, 2007,19(3);227—239.

[15] Kim K, Kwon S, Lee H, et al. A novel oxidative stress-inducible peroxidase promoter from sweet potato: Molecular cloning and characterization in transgenic tobacco plants and cultured cells [J]. Plant Molecular Biology, 2003,51(6);831—838.

[16] 刘忠静,郭延奎,林少航.外源过氧化氢对干旱胁迫下温室黄瓜叶绿体超微结构和抗氧化酶的影响[J].园艺学报,2009,36(8);1140—1146.

[17] 尹永强,胡建斌,邓明军.植物叶片抗氧化系统及其对逆境胁迫的响应研究进展[J].中国农学通报,2007,23(1);105—110.

Recovery effect of re-watering condition on transgenic sweet potato after drought stress and the effect of pre-spray leaves with H₂O₂

DONG Yong-hui¹, DENG Xi-ping¹, KWAK Sang-soo²

(1. State Key Laboratory of Soil Erosion and Dryland Farming on Loess Plateau / College of Life Sciences, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2. Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Daejeon 305—806, Korea)

Abstract: In the experiment, the recoverability of the sweet potato, which expressed both Cu/Zn superoxidedismutase (SOD) and ascorbate peroxidase (APX) in chloroplasts, was compared with its control plants, and foliar application of exogenous hydrogen peroxide (H₂O₂) before drought stress on enhancement of seedling recovery capability after drought stress was studied. The transgenic sweet potato and its non-transgenic control plants were treated with 10% PEG and pretreated with 1.0 mmol/L H₂O₂ before drought stress, anti-oxidative enzymes system, content of MDA and H₂O₂ and photosynthetic rate of each plant were tested in this experiment. Under water stress and a short time after re-watering, for transgenic sweet potato, the activities of the three mentioned anti-oxidative enzymes and photosynthetic rate were higher and the content of MDA and H₂O₂ were lower compared with the non-treatments; At the terminal of re-watering, the recovery capabilities of the anti-oxidative enzymes were stronger, the content of MDA and H₂O₂ was lower, and photosynthetic rate was higher. It was also observed that in the recovery process of the plants treated with 1.0 mmol/L H₂O₂ before drought stress, compared with the non-treatments, anti-oxidative enzymes was stronger, and the content of MDA and H₂O₂ was higher, while the photosynthetic rate was lower. A stronger drought-resistant ability and a stronger recovery capability after stress was showed in transgenic sweet potato compared with non-transgenic sweet potato under the treatment of drought stress. However, the pretreatment with 1.0 mmol/L H₂O₂ enhanced stress level.

Keywords: sweet potato; transgenic; drought stress and re-watering; hydrogen peroxide