

5°C 低温对转 SOD 或 POD 基因烟草影响的研究

曾淑华^{1,2}, 刘飞虎^{2*}

(1. 云南农业大学烟草学院, 云南昆明 650201; 2. 云南大学生命科学学院, 云南昆明 650091)

摘要: 对盆栽 9 叶龄的 3 个烟草近等基因系进行 5°C 低温处理。测定处理 2 d、4 d 和 6 d 以及处理 6 d 后恢复生长 2 d 和 4 d 烟草叶片的生理生化指标, 观察处理 2 d、4 d 和 6 d 后恢复生长 7 d 烟草的生长情况。结果表明: 随着低温处理时间的延长, 细胞质膜透性、丙二醛含量、可溶性蛋白质和糖含量均升高; SOD 活性则开始下降随后升高, 但始终低于对照; 低温造成株高、叶片数和生物量显著下降。

关键词: 转基因烟草; 低温处理; SOD; POD; 生物量

中图分类号: Q945 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2006)05-0488-04

A study on effects of low temperature at 5°C on transgenic tobacco with SOD or POD over-expressed

ZENG Shu-hua^{1,2}, LIU Fei-hu^{2*}

(1. College of Tobacco Science, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;

2. College of Life Sciences, Yunnan University, Kunming 650091, China)

Abstract: Three lines of near isogenic tobacco were pot-cultured and treated under low temperature(5°C) at their 9-leaf stage. Some physiological and biochemical indices were tested respectively on the 2nd, 4th and 6th day of treatment and on the 2nd and 4th day of recovery growth after 6 days of treatment, and the growth of tobacco was observed on the 7th day of recovery growth after 2, 4 and 6 days of treatment respectively. The results indicated that as the time of plants under low temperature elongated, cell membrane permeability, MDA content, soluble protein and sugar content increased, but the plants height, number of leaves and biomass of per plant decreased. While the SOD activity first decreased and then increased.

Key words: transgenic tobacco; low temperature; SOD; POD; biomass

低温引起喜温作物减产甚至死亡是世界范围内普遍存在的问题, 至今还尚未找到根本的解决途径。低温对植物的损伤常分为冷害(零上低温对植物造成的伤害)和冻害(零下低温对植物造成的伤害), 一般发生在早春和晚秋, 危害一旦发生将严重影响作物的生长和发育(金博闻等, 1994)。烟草起源于雨量充沛的热带, 对低温甚为敏感, 属温度敏感型作

物, 在烟草的整个生长发育期间, 常会遭受低温的影响, 导致烟草品质和产量下降, 而烟草又是我国乃至全世界主要的经济作物之一, 因此研究烟草的抗冷性, 培育抗冷性较强的烟草品种有着重要的意义。

本试验主要通过对转基因烟草进行 5°C 低温处理, 分析相关的生理生化和生长发育指标, 评价利用转基因方法培育高表达 SOD 或 POD 的烟草品系在

收稿日期: 2004-11-01 修回日期: 2005-08-07

基金项目: 云南省人才基金“转基因 SOD 高表达烟草近等基因系利用价值”部分研究内容[Supported by the Foundation for Talents of Yunnan Province]

作者简介: 曾淑华(1977-), 女(土家族), 湖北利川人, 硕士研究生, 助教, 主要从事植物生理生化研究。

* 通讯作者(Author for correspondence)

改良植物抗逆性方面的应用价值。

1 材料与方 法

1.1 材料

供试材料为国外引进的 3 个近等基因烟草品系,即非转基因品系、转 Mn-SOD 基因叶绿体高表达品系(Mn-SOD 高表达品系)和转基因抗坏血酸 POD 高表达品系(POD 高表达品系)。

1.2 方法

2003 年 5 月,在温室中播种育苗。将 5 叶期的烟苗移栽入纸杯中,进行正常的肥水管理,防治病虫害。烟株长到 9 叶期时,在室内的冰柜里分别同时给予 2 d、4 d 和 6 d 的 5℃低温处理,其中处理 6 d 后的植株在正常条件下分别恢复生长 2 d 和 4 d。对照在正常条件下生长,对照与处理均设 5 个重复。取自烟株顶端往下第 4 片烟叶进行生理生化指标测定。处理后的烟株在正常条件下恢复生长 7 d 后,测其株高和叶片数,连根拔出洗净泥沙,晾干后称干重。

SOD 活性的测定采用 NBT 光化还原法(Gian-

nopolitis,1977),可溶性蛋白质含量的测定采用考马斯亮兰(G-250)法(刘祖祺等,1994),丙二醛和可溶性糖含量用硫代巴比妥酸法测定(李如亮,1998),细胞质膜透性的测定参考现代植物生理学实验指南的方法(汤章城,1999)。

2 结果与分析

2.1 低温对烟草叶片相对电导率的影响

低温胁迫导致烟草叶片细胞质膜透性升高,表现为电解质渗漏量增加。由表 1 可知,随着低温处理时间的延长,3 个品系的相对电导率逐渐增加,处理的第 2 天,3 个品系均比对照升高 8%左右,从第 4 天起,非转基因品系的增加明显快于 2 个转基因品系,第 6 天时比对照升高 23.80%,POD 高表达品系上升最慢,第 6 天时只比对照升高 17.20%,Mn-SOD 高表达品系处于中间。恢复期间,3 个品系的相对电导率都有所下降,但 2 个转基因品系下降较快。电导率的这种变化说明转基因烟草品系的细胞膜受到的伤害较小且恢复能力较强。

表 1 低温对烟草叶片相对电导率的影响

Table 1 Effect of low temperature on relative conductivity of tobacco leaves

品系 Lines	对照或处理 Control or treatment	处理天数 Days of treatment (d)			恢复天数 Days of recovery (d)	
		2	4	6	2	4
非转基因品系 Non-transgenic line	对照	9.23	9.10	9.34	9.79	9.35
	处理	9.99	10.76	11.56	11.61	10.90
	%	108.3	118.2 *	123.8 *	118.5 *	116.5
Mn-SOD 高表达品系 Mn-SOD gene transgenic line	对照	9.28	9.36	9.55	9.37	9.54
	处理	10.11	10.35	11.71	10.86	10.58
	%	108.8	110.7	122.7 *	115.9	110.9
POD 高表达品系 POD gene transgenic line	对照	9.24	9.22	9.93	9.32	9.25
	处理	9.96	10.02	11.64	10.79	10.45
	%	107.8	108.7	117.2 *	115.8	112.9

“*”表示处理或恢复与对照之间的差异显著($p=0.05$)。“*”Difference between treatment or recovery and control at $p=0.05$.

2.2 低温对烟草叶片 SOD 活性的影响

低温处理期间,烟草叶片内 SOD 活性的变化比较特殊,呈现先下降随后升高的趋势,这种趋势一直延续到恢复期间,但即使在恢复的第 4 天,SOD 活性也不能达到正常水平(图 1)。其中 POD 高表达品系下降最慢,处理第 4 天时只下降了 25%,而另外 2 个品系下降了 40%左右;恢复的第 4 天 POD 高表达品系 SOD 活性为对照的 90%左右,另外 2 个品系 SOD 活性相对较低,其中以非转基因品系的 SOD 活性最低。

2.3 低温对烟草叶片丙二醛含量的影响

低温处理导致烟草叶片 MDA 含量显著升高(图 2)。3 个品系中 POD 高表达品系上升最慢,另外 2 个品系上升较快,且升高的幅度接近;处理 6 d 时,POD 高表达品系只比对照升高 35.92%,而另外 2 个品系升高 46%左右。恢复期间,3 个品系都有恢复正常的趋势,POD 高表达品系下降最快,恢复 4 d 时,几乎达到正常水平。

2.4 低温对烟草叶片可溶性蛋白质含量的影响

由图 3 可知,低温导致烟草叶片可溶性蛋白质

含量显著升高,恢复期间其含量明显下降。低温处理的第2天,非转基因品系升高最多,比对照升高50%左右,而2个转基因品系的含量接近,比对照升高30%左右;在处理的第4天和第6天,POD高表达品系可溶性蛋白质的含量明显低于另外2个品系,到处理的第6天时,只比对照升高60%,另外2个品系比对照升高80%左右;恢复期间3个品系可溶性蛋白质的含量都明显下降。

2.5 低温对烟草叶片可溶性糖含量的影响

低温处理使得烟草叶片可溶性糖含量显著升高,恢复期间有所下降(图4)。低温处理的第2天,3个品系可溶性糖含量接近,都比对照升高10%左右;处理4d时,非转基因品系的含量明显高于2个转基因品系,其中POD高表达品系升高最少;而处理6d时,3个品系的含量又比较接近,都比对照升高40%左右。恢复期间3个品系可溶性糖含量都明显下降,其中2个转基因品系下降较快。

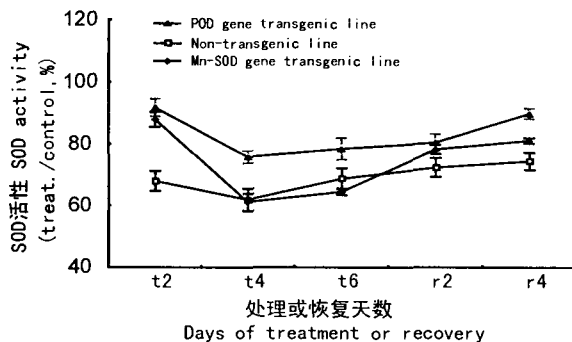


图1 低温对烟草叶片 SOD 活性的影响
Fig.1 Effect of low temperature on SOD activity in tobacco leaves

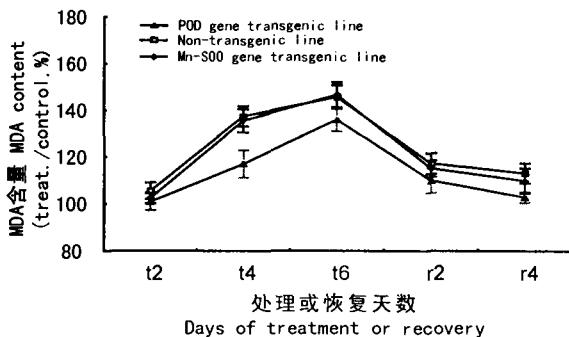


图2 低温对烟草叶片丙二醛含量的影响
Fig.2 Effect of low temperature on MDA content in tobacco leaves

2.6 低温对烟草生物量的影响

由表2可知,低温会导致烟草的株高、叶片数和

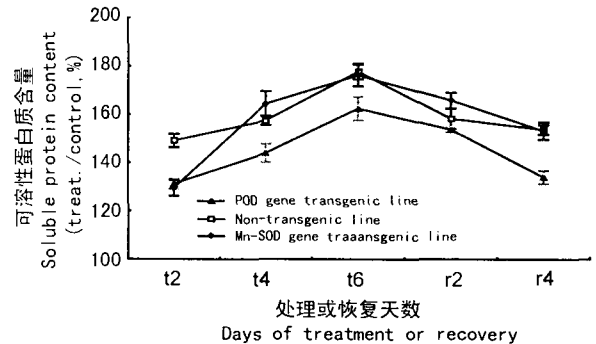


图3 低温对烟草叶片可溶性蛋白质含量的影响
Fig.3 Effect of low temperature on soluble protein content in tobacco leaves

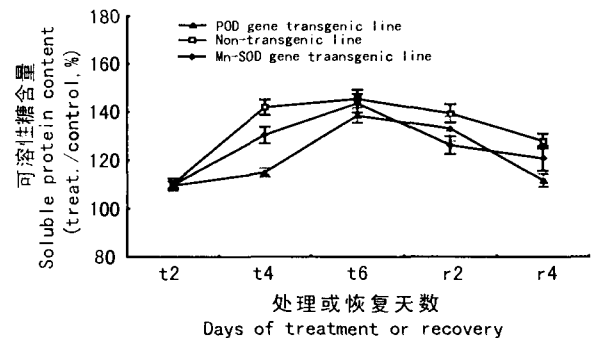


图4 低温对烟草叶片可溶性糖含量的影响
Fig.4 Effect of low temperature on soluble sugar content in tobacco leaves

干重都有不同程度的下降。比较3项指标可以看出,低温对烟草生物量的影响最严重,2d的处理3个品系的干重都降为对照的80%左右,6d的处理都降为对照的70%左右,而非转基因品系降得更低,只有对照的63.06%;低温对叶片数的影响最小,2d的处理3个品系都为对照的90%以上,随着处理时间延长,叶片数变化很少,6d的处理为对照的80%以上。3个品系中,POD高表达品系3项指标的变化都最慢,非转基因品系3项指标的变化最快,Mn-SOD高表达品系处于两者中间。

3 讨论

膜系统是细胞的重要组成部分,膜的稳定性是细胞及整个生命活动赖以生存的基础(关世英等,1995)。按照生物膜的流动镶嵌学说,膜的双分子层脂质通常呈液晶相,但如果植物处于低温条件下时,膜就会由液晶态转变成凝胶态,膜收缩,引起细胞膜

透性的改变(Lyons 等, 1971)。试验中, 3 个品系的相对电导率都随着低温处理时间的延长逐渐升高, 说明细胞质膜受到了明显的伤害, 而 POD 高表达品

系受到的伤害相对较小, 非转基因品系的相对电导率升高最快, 说明受低温影响最严重。恢复期间, 3 个品系的相对电导率都下降, 说明受损质膜的功能

表 2 低温对烟草生长及生物量的影响

Table 2 Effect of low temperature on growth and biomass of tobacco

品系 Lines	对照或处理 Treat. or control	株高 Plant height			叶片数 Number of leaves			干重 Dry weight		
		2	4	6	2	4	6	2	4	6
非转基因品系 Non-transgenic line	对照 Control	37.80	43.00	47.20	10.00	10.20	9.80	3.52	3.28	4.44
	处理 Treatment	32.20 *	33.00 *	32.60	9.20	8.75 *	8.20 *	2.72 *	2.20	2.80
	%	85.19	76.74	69.07 **	92.00	85.78	83.67	77.27	67.07 **	63.06 **
Mn-SOD 高表达品系 Mn-SOD gene transgenic line	对照 Control	29.20	29.40	39.25	10.00	9.60	9.80	3.34	3.32	4.90
	处理 Treatment	24.40	22.75	28.60	9.10	8.20	8.40 *	2.72 *	2.54	3.44
	%	83.56 *	77.38 *	72.87 *	91.00	85.42 *	85.71	81.44	76.51 *	70.20 *
POD 高表达品系 POD gene transgenic line	对照 Control	29.50	34.20	34.60	8.80	10.20	9.60	3.54	3.44	3.90
	处理 Treatment	26.40	28.80	25.88	8.20	9.00	8.40 *	3.00 *	2.79	2.90
	%	89.49	84.21 *	74.78 *	93.18	88.24	87.50	84.75	81.10 *	74.36 *

“*”表示处理或恢复与对照之间的差异显著($p=0.05$); “**”表示处理或恢复与对照之间的差异显著($p=0.01$)。

“*”Difference between treatment or recovery and control at $p=0.05$; “**”Difference between treatment or recovery and control at $p=0.01$.

有一定的恢复。

植物体一旦遭受低温胁迫, 体内活性氧产生和清除之间的动态平衡就会遭到破坏, 对植物体造成伤害, 植物细胞内活性氧代谢的失调及活性氧对细胞的损伤是植物在低温逆境下发生伤害的重要原因之一。SOD 是植物抗氧化系统的第一道防线, 在一定程度上能有效地清除超氧阴离子等活性氧的危害(Mead 等, 1976)。本试验发现低温处理后烟草叶片 SOD 活性都有不同程度的下降, 表明在烟草体内活性氧的产生已超出了细胞的防御能力, 低温对烟草造成了比较严重的伤害; 但是 POD 高表达品系所受的损伤相对较小, 因为 SOD 活性变化最小。本试验中 SOD 活性的变化与其他植物的变化有一定的差别, 在水稻(陈善娜等, 1995)中发现 SOD 活性在低温胁迫下明显下降, 而番茄和鸡蛋果(陈贻竹, 1988)中 SOD 活性不受低温的影响。

活性氧伤害的另一方面表现为膜脂过氧化产物 MDA 含量的增加。我们的试验发现 MDA 含量随着处理时间的延长逐渐增加, 与在水稻(陈善娜等, 1995)等植物中的研究一致。3 个品系中 POD 高表达品系上升最慢, 说明体内活性氧自由基的积累较少, 可能是由于清除活性氧自由基的能力较强, SOD 的活性变化证明了这一点, 低温条件下 POD 高表达品系保持了较高的活性, 而另外 2 个品系的 SOD 活性下降较多, 使得活性氧的积累多, 最终导致 MDA 含量增加较多。

低温导致植物细胞中可溶性蛋白质质量变的一般

趋势是含量的增加, 研究表明可溶性蛋白质的含量与植物的抗冷性之间有着密切的关系(刘祖祺等, 1989)。本试验中烟草叶片经过低温处理后可溶性蛋白质的含量明显高于对照, 与在红花三叶草、冬油菜、黄瓜(艾希珍等, 1999)和棉花(范月仙等, 1995)等植物的抗寒锻炼中的研究一致。3 个品系中, POD 高表达品系可溶性蛋白质含量升高最慢, 可能说明其受低温影响较小。

低温往往会导致植物细胞中可溶性糖含量升高, 可溶性糖的积累, 细胞液浓度增大, 可以抵抗低温对细胞特别是细胞膜可能造成的损伤。本试验中烟草叶片经低温处理后, 其可溶性糖含量明显升高, 与在棉花(范月仙等, 1995)等植物中的研究一致。3 个烟草品系中, 2 个转基因品系可溶性糖含量升高较慢, 且恢复时下降最快, 可能表明低温对转基因品系的伤害较小。

本试验通过对 3 个近等基因烟草品系进行低温处理, 发现低温严重影响烟草的生长发育。低温处理后的烟草植株矮小, 严重时叶片出现水渍状的斑点, 各项生理生化和生长发育指标与对照相比发生明显变化。比较各项生理生化和生长发育指标以及观察生长发育情况, 3 个品系抗冷性强弱依次为: POD 高表达品系 > Mn-SOD 高表达品系 > 非转基因品系。从结果可知利用转基因方法导入与抗性密切相关的外源目的基因, 确实能够提高烟草的抗冷性, 而抗冷性的强弱又与外源基因的种类密切相关。(下转第 487 页 Continue on page 487)

- Hernandez M, Rodriguez-Lazaro D, Esteve T, *et al.* 2003. Development of melting temperature-based SYBR Green I polymerase chain reaction methods for multiplex genetically modified organism detection[J]. *Anal Biochem*, **323**(2): 164—170.
- Holst-Jensen A, Ronning S B, Lovseth A, *et al.* 2003. PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs) [J]. *Anal Bioanal Chem*, **375**(8): 985—993.
- Hubner P, Studer E, Luthy J. 1999. Quantitation of genetically modified organisms in food[J]. *Nat Biotechnol*, **17**(11): 1 137—1 138.
- Hupfer C, Hotzel H, Sachse K, *et al.* 1998. Detection of the genetic modification in heat-treated products of Bt maize by polymerase chain reaction[J]. *Z Lebensm Unters Forsch A*, **206**: 203—207.
- Hurburgh C R, Roussel S A, Hardy C L, *et al.* 2000. Identification of Genetically Modified Grains using NIR Spectroscopy [C]//10th International Diffuse Reflectance Conference (IDRC 2000), Chambersburg, PA. USA: Prix du meilleur poster.
- James C. 2003. Global review of commercialized transgenic crops. ISAAA Brief No. 30—2003, The International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications, Ithaca, N. Y.
- Jennings J C, Albee L D, Kolwyck D C, *et al.* 2003. Attempts to detect transgenic and endogenous plant DNA and transgenic protein in muscle from broilers fed YieldGard corn Borer corn[J]. *Poult Sci*, **82**(3): 371—380.
- Lipp M, Anklam E, Stave J W, *et al.* 2000. Validation of an immunoassay for detection and quantitation of a genetically modified soybean in food and food fractions using reference materials: interlaboratory study[J]. *J AOAC Int*, **83**(4): 919—927.
- Perningeat H R, Reggiardo M I, Vallejos R H. 2002. Detection and quantification of transgenes in grains by multiplex and real-time PCR[J]. *J Agric Food Chem*, **50**(16): 4 431—4 436.
- Rogan G J, Dudin Y A, Lee T C, *et al.* 1999. Immunodiagnostic methods for detection of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in Roudup Ready soybeans[J]. *Food Control*, **10**: 407—414.
- Shindo Y, Kuribara H, Matsuoka T, *et al.* 2002. Validation of real-time PCR analyses for line-specific quantitation of genetically modified maize and soybean using new reference molecules[J]. *J AOAC Int*, **85**(5): 1 119—1 126.
- Urbanek-Karlowska B, Sawilska-Rautenstrauch D, Jedra M, *et al.* 2003. Detection of genetic modification in maize and maize products by ELISA-test[J]. *Rocz Panstw Zakl Hig*, **54**(4): 345—353.
- Vaitilingom M, Pijnengurg H, Gendre F, *et al.* 1999. Real-time quantitative PCR detection of genetically modified maximizer maize and Roundup Ready soybean in some representative foods[J]. *Agric Food Chem*, **47**, 5 261—5 266.
- Vollenhofer S, Burg K, Schmidt J, *et al.* 1999. Genetically modified organisms in food-screening and specific detection by polymerase chain reaction[J]. *J Agric Food Chem Dec*, **47**(12): 5 038—5 043.
- Windels P, Theuns I, Dendaauw J, *et al.* 1999. Development of a line specific GMO detection method; a case study[J]. *Meded Fac Landbouwwet Rijksuniv Gent*, **64**/5b.

(上接第 491 页 Continue from page 491)

参考文献:

- 李如亮. 1998. 生物化学实验[M]. 武汉: 武汉大学出版社: 57—58.
- 刘祖祺, 王洪春. 1989. 植物耐寒性及防寒技术[M]. 北京: 农业出版社: 93—115.
- 刘祖祺, 张石城. 1994. 植物抗性生理学[M]. 北京: 中国农业出版社: 84—195.
- 汤章城. 1999. 现代植物生理学指南[M]. 北京: 科学出版社: 302.
- 范月仙, 李生泉, 冯文新. 1995. 棉花抗冷性与其可溶性糖含量变化关系的研究[J]. *棉花学报*, **7**(2): 126—127.
- 范月仙, 张述义, 李生泉. 1995. 棉花苗期抗冷性与可溶性蛋白质含量增加关系的研究[J]. *山西农业大学学报*, **15**(1): 56—58.
- 金博闻, 戴亚. 1994. 烟草化学[M]. 北京: 清华大学出版社.
- Ai XZ(艾希珍), Yu XC(余贤昌), Wang SH(王绍辉), *et al.* 1999. Changes of some substances of grafted and own root cucumber seedlings under low temperature stress(低温胁迫下黄瓜嫁接苗与自根苗某些物质含量的变化)[J]. *Plant Physiol Commun*(植物生理学通讯), **35**(1): 26—29.
- Guan SY(关世英), Su WA(苏维埃). 1995. Approach of mechanism of plant chilling resistance related with phosphatidyl-glycerol(与磷脂酰甘油有关的植物抗冷机理研究)[J]. *Plant Physiol Commun*(植物生理学通讯), **31**(3): 167—173.
- Chen YZ(陈贻竹). 1988. The effect of chilling temperature on the level of superoxide dismutase, catalase and hydrogenperoxide in some plant leaves(低温对植物叶片超氧化物歧化酶、过氧化物酶和过氧化氢酶水平的影响)[J]. *Acta Phytophysiol Sin*(植物生理学报), **14**(4): 323—328.
- Chen SN(陈善娜), Liang B(梁斌), Zhang SJ(张蜀君). 1995. The relationship between the cold resistance of rice seedlings in Yunnan Plateau and the scavenging systems of activated oxygen(云南高原水稻幼苗的抗冷性与其活性氧清除系统的关系)[J]. *Acta Bot Yunnan*(云南植物研究), **17**(4): 452—458.
- Giannopolitis C N, Ries S K. 1977. Superoxide dismutase I: occurrence in higher plant[J]. *Plant Physiol*, **59**: 309—314.
- Lyons J K, Chapman E A. 1971. Membrane phase changes in chilling-sensitive *I'igna radiata* and their significance to growth[J]. *Aust J Plant Physiol*, **3**: 291.
- Mead J F. 1976. Freeradical mechanism of lipid damage, a consequence for cellular membranes[A]. In: proyor W A(ed). *Free radicals in Biology*[C]. New York: Academic Press: 185—210.