

张帆,李景富,姜景彬,等. 外源水杨酸诱导对番茄幼苗抗冷性的影响[J]. 江苏农业科学,2017,45(3):91-94.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.03.025

外源水杨酸诱导对番茄幼苗抗冷性的影响

张帆,李景富,姜景彬,张贺,陈秀玲,许向阳

(东北农业大学园艺学院,黑龙江哈尔滨 150030)

摘要:水杨酸是植物体内的内源激素之一,它的调节作用对于抵御植物生长发育过程中遇到的非生物胁迫起重要作用。在低温条件下,对植物体喷施适宜浓度的外源水杨酸,能有效减轻低温对植物的伤害,使植物在低温环境中也能继续生长。为了研究不同浓度的水杨酸对番茄幼苗抗寒性的影响,测定相关生理指标和相关基因表达量变化,为今后番茄的合理化生产提供理论依据,用不同浓度的外源水杨酸喷洒在叶片上以诱导番茄 4 叶 1 心期幼苗,对水杨酸诱导后的番茄幼苗进行低温处理。结果表明,水杨酸能有效提高番茄幼苗的抗低温能力,使其叶绿素、脯氨酸含量、SOD、POD、CAT 活性升高,相对电导率、可溶性蛋白含量、MDA 含量降低;对低温敏感的 *CBF1*、*ICE1*、*COR15a* 基因表达量增加。其中,以 350 mg/L 浓度的 SA 处理 6 d 效果最佳。

关键词:水杨酸;番茄;抗冷性;实时荧光定量

中图分类号: S641.201 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)03-0091-04

植物的抗逆化学诱导是指利用外源物质模拟逆境信号或作为植物逆境信号传导的中间信号物质,诱发植物启动抗性机制,形成致敏^[1]。通过大量的试验人们发现,水杨酸(SA)在植物体内对生长、发育、成熟、衰老等生理过程有一定的调控作用,在植物抗盐、抗旱、抗低温、抗紫外线、抗重金属等逆境反应的诱导过程中得到广泛的应用^[2]。因此,水杨酸被认为是植物对逆境反应的信号传导分子,能够诱导病程相关蛋白的基因表达,引发及产生系统获得性抗性^[3]。

康国章等在水杨酸对低温胁迫香蕉幼苗呼吸作用的影响中指出 SA 对香蕉的抗环境胁迫能力有显著的增强^[4]。孙艳等在水杨酸对黄瓜幼苗壮苗的形成及抗低温胁迫研究中发现外源 SA 可显著提高系统的稳定性,提高黄瓜幼苗的抗冷胁迫能力^[5]。这都表明 SA 与植物逆境条件下对低温的抵抗能力密切相关。在水杨酸对番茄在低温条件下的影响中,于锡宏等喷施一定浓度的外源 SA,降低了番茄植株体内的相对电导率和丙二醛含量,延缓了叶绿素的降解,增加了脯氨酸的积累,进而有效地降低了冷害指数,提高番茄幼苗的抗冷性^[6]。刘思宇发现外源物质 SA 能降低番茄的相对电导率,缓解低温胁迫后叶绿素含量下降的情况,保持相对较高的 POD 活性,削弱 MDA 积累,保持细胞膜的完整性;外源物质使番茄幼苗渗透调节物质(脯氨酸)含量极显著高于对照,提高了幼苗的抗冷性^[7]。阮舒洁等发现不同浓度的水杨酸喷施番茄幼苗,均可使番茄幼苗叶片中的相对电导率和丙二醛含量降

低,POD 活性提高,脯氨酸含量升高,冷害指数降低^[8]。李艳军发现外源 SA 诱导能明显提高番茄幼苗的抗冷性,经 SA 诱导的番茄幼苗叶片的相对电导率显著降低,POD 活性、叶绿素和可溶性蛋白含量显著提高^[9]。

在处于逆境胁迫条件下时,植物体内的水杨酸含量高于正常环境中生长时的含量,外源水杨酸通过诱导增强细胞内各保护酶活性,提高植物体内渗透调节物质含量,从而使植物在逆境条件下也能继续生长。水杨酸在植物逆境生理过程中的作用具有双重性,适宜浓度的水杨酸可以提高植物对逆境的抵抗能力,改善植物在水分胁迫下的不良生长;浓度较低时,几乎不显示任何作用,但是高浓度的水杨酸却会诱导活性氧自由基水平的上升,使植物遭受更为严重的胁迫伤害^[10-12]。因此,适宜浓度的外源 SA 处理,提高保护酶活性,降低膜质过氧化伤害,提高叶片光合及呼吸性能,提高体内渗透调节物质含量,能有效减轻低温对植物的伤害。

植物的耐寒性是指植物对低温环境的适应及通过自身遗传改变而获得的抗寒能力,具有相对的遗传稳定性,在经过低温驯化(前期低温锻炼而形成的明显的低温适应能力)后,可以明显提高植物的耐寒性^[13-14]。抗寒性受多基因控制,且是一种诱发基因,只有在特定的条件下多个基因共同表达才能提高植物的抗寒能力^[15]。根据抗寒基因产物的功能可简单地将其归为两大类:功能基因和调控基因^[15]。功能基因是提高植物抗寒性直接相关的基因,如冷诱导基因、脂肪酸去饱和酶基因和抗氧化酶基因等对细胞膜起保护作用的基因;而调控基因主要通过调控抗寒基因的表达、寒冷信号传导等过程来提高植物的耐寒性^[16]。本试验旨在研究不同浓度的水杨酸对番茄幼苗耐寒性的影响,测定与低温相关的生理指标,分析后得到抵抗低温效果最好的浓度,设定为最佳处理浓度。之后用 RT-PCR 法测定经过最佳处理浓度诱导的番茄叶片低温相关基因(冷响应转录激活因子基因 *CBF1*、*CBFs* 基因的转录诱导因子 *ICE1*、冷诱导基因 *COR15a*)的相对表达量,为今后番茄的合理化生产提供理论依据。

收稿日期:2015-12-23

基金项目:现代农业产业技术体系专项资金(编号:CARS-25-A-15);国家自然科学基金(编号:31272171);黑龙江省杰出青年科学基金(编号:JC201204)。

作者简介:张帆(1990—),女,黑龙江佳木斯人,硕士研究生,研究方向为蔬菜育种。E-mail:424076961@qq.com。

通信作者:许向阳,研究员,博士生导师,主要从事番茄育种研究。E-mail:xyx709@126.com。

1 材料与方法

1.1 试验材料的处理

试验于 2014 年 9 月 9 日在东北农业大学园艺站番茄课题组试验温室进行。试验材料为东北农业大学番茄课题组东农 11537 种子。当番茄幼苗长至 4 叶 1 心期时,选择生长势相同的幼苗,分别用 200、250、300、350、400、450 mg/L 的 SA 溶液均匀喷洒在叶片上,以喷洒蒸馏水作为对照(CK1 为低温对照,CK2 为常温对照)。连续喷施 3 d,以便提高外源物质的吸收效果。将喷施 SA 溶液植株放在光照培养箱(LRH-250-G 型)中进行低温胁迫,昼夜温度设定为白天(10 ± 0.5) °C,夜晚(5 ± 0.5) °C,光照时间为 16 h,光强为 4 000 lx,低温胁迫 10 d。

在低温胁迫 0、2、4、6、8、10 d 时取样,每次从各浓度中随机选取 10 株,剪取功能叶,混合后测定生理指标;在低温胁迫 0、6、12、24、48、72 h 时取样,用液氮冷冻,存于 -80 °C 条件下,用于基因表达量的测定^[17]。试验重复 3 次。

1.2 生理指标的测定与实时荧光定量 PCR 分析

脯氨酸含量采用脯氨酸试剂盒测定,试剂盒购于南京建成生物工程研究所。

相对电导率、叶绿素含量、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)活性以及丙二醛(MDA)含量和可溶性蛋白含量均参照李合生的方法^[18]测定,有所改动。

用 Trizol 法提取总 RNA。总 RNA 的浓度和质量由 Nano-drop 2000 微体积分光光度计(Thermo Scientific, USA)采用吸光度进行测量。RNA 的完整性通过 1% 琼脂糖凝胶电泳和溴化乙锭染色进行分析。选用番茄 *actin* 内源基因(登录号: EU408340.1)作为内参基因,利用全式金试剂盒将提取的总 RNA 反转录为 cDNA,应用 SYBR Green 荧光染料嵌合法,使用 iQ5 Real Time PCR Detection System(BioRad, USA)对内参基因和目的基因进行实时荧光定量 PCR,每个反应设 3 个重复,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行目的基因相对表达量分析。

1.3 数据分析

数据用 Microsoft Excel 和 SPSS 17.0 软件进行统计分析。

2 结果分析

2.1 叶片各项生理指标

2.1.1 低温处理下外源水杨酸诱导对番茄叶绿素含量的影响

由图 1-a 可知,在未进行低温处理时,经过不同浓度 SA 诱导的叶片叶绿素含量基本相同;在低温处理进行的最初 48 h 里,绝大部分叶片的叶绿素含量在原有基础上有不同程度的降低;48 h 后叶片叶绿素含量回升,其中 350 mg/L 处理与对照组和其他处理相比优势显著,在低温胁迫的 6 d 后,350 mg/L 处理的叶片叶绿素含量达到最高值。

2.1.2 低温处理下外源水杨酸诱导后对番茄叶片相对电导率的影响

由图 1-b 可知,在低温处理进行的最初 48 h 里,大部分叶片的相对电导率在原有基础上均有不同程度的降低;在低温胁迫 4 d 时,常温对照的叶片相对电导率达到了峰值,此时相对电导率最低的是 300 mg/L 的处理;之后,300 mg/L 处理的相对电导率值一直低于其他浓度处理并远

低于对照组。如此认为,300 mg/L 的处理为最佳浓度。

2.1.3 低温处理下外源水杨酸诱导后对番茄脯氨酸含量的影响

由图 1-c 可知,从低温处理开始的 48 h 内,除常温对照组以外,其他叶片的脯氨酸含量在原有基础上均有不同程度的降低;2 d 后叶片脯氨酸含量呈现回升的趋势,在低温胁迫的 4 d 后,大部分叶片脯氨酸含量再次降低,大多数浓度的处理在胁迫 6 d 后达到了自身脯氨酸含量的最低值;胁迫 6 d 后脯氨酸含量升高,其中 350 mg/L 处理的叶片脯氨酸含量明显高于其他处理。

2.1.4 低温处理下外源水杨酸诱导后对番茄超氧化物歧化酶含量的影响

由图 1-d 可知,在低温处理进行的最初 48 h 里,叶片的 SOD 含量在原有基础上均有不同程度的升高;48 h 后叶片 SOD 含量开始下降,在低温胁迫的 4 d 后,多数处理叶片 SOD 含量再次升高,大多数浓度的处理在胁迫 8 d 后达到了自身 SOD 含量的最高值;其中 350 mg/L 处理相对于其他处理有明显优势。

2.1.5 低温处理下外源水杨酸诱导后对番茄过氧化氢酶含量的影响

由图 1-e 可知,在低温处理进行的最初 48 h 里,叶片的 CAT 含量在原有基础上均有不同程度的降低,在低温处理 48 h 后,除 200 mg/L、CK 常温、250 mg/L 的处理以外,其他处理的 CAT 含量达到最低值;并且除 200 mg/L 的处理以外,其他处理的 CAT 含量均在 2 d 后升高,其中,350 mg/L 处理上升幅度最大。整体变化中 350 mg/L 处理明显较其他浓度处理有明显优势。

2.1.6 低温处理下外源水杨酸诱导后对番茄过氧化物酶含量的影响

由图 1-f 可知,在低温处理进行的最初 48 h 里,番茄叶片的 POD 含量在原有基础上均有不同程度的降低,且绝大多数浓度达到了自身最低值;48 h 后多数处理叶片 POD 含量回升且持续升高,直至试验结束。其中以 350 mg/L 处理 POD 含量上升幅度较大,其含量明显高于其他处理。

2.1.7 低温处理下外源水杨酸诱导后对番茄可溶性蛋白含量的影响

由图 1-g 可知,在低温处理开始至处理的 4 d 内,低温使叶片组织遭到破坏,大部分处理的可溶性蛋白含量直线上升;胁迫 4 d 后,大多数处理叶片可溶性蛋白含量均达到了自身含量的最高值;之后又呈现了明显的下降趋势。其中,300 mg/L 的处理为最佳浓度。

2.1.8 低温处理下外源水杨酸诱导后对番茄丙二醛含量的影响

由图 1-h 可知,低温胁迫开始后,各浓度处理番茄叶片 MDA 含量降低趋势显著,在低温胁迫的 4 d 后,大部分叶片 MDA 含量达到了自身含量的最低值;随低温胁迫的进行,MDA 含量有所回升,但变化幅度较小,且逐渐趋于平衡。整体变化中 350 mg/L 处理明显较其他浓度处理有明显优势。

2.2 低温胁迫下番茄叶片低温相关基因相对表达量的变化

由图 2 可知,在低温环境下,外源水杨酸诱导后的番茄叶片中低温相关基因 *CBF1*、*ICE1*、*COR15a* 表达量均高于相同环境下的对照组。大部分处理的 *CBF1* 基因表达量呈现了先下降后上升之后一直下降的趋势,在低温胁迫 24 h 时,*CBF1* 基因表达量达到了最高值。*ICE1*、*COR15a* 基因的表达量变化趋势为先上升后下降,且在胁迫 12 h 时表达量达到最高值。水杨酸诱导过的番茄叶片低温相关基因表达量相对于对照组有明显优势。

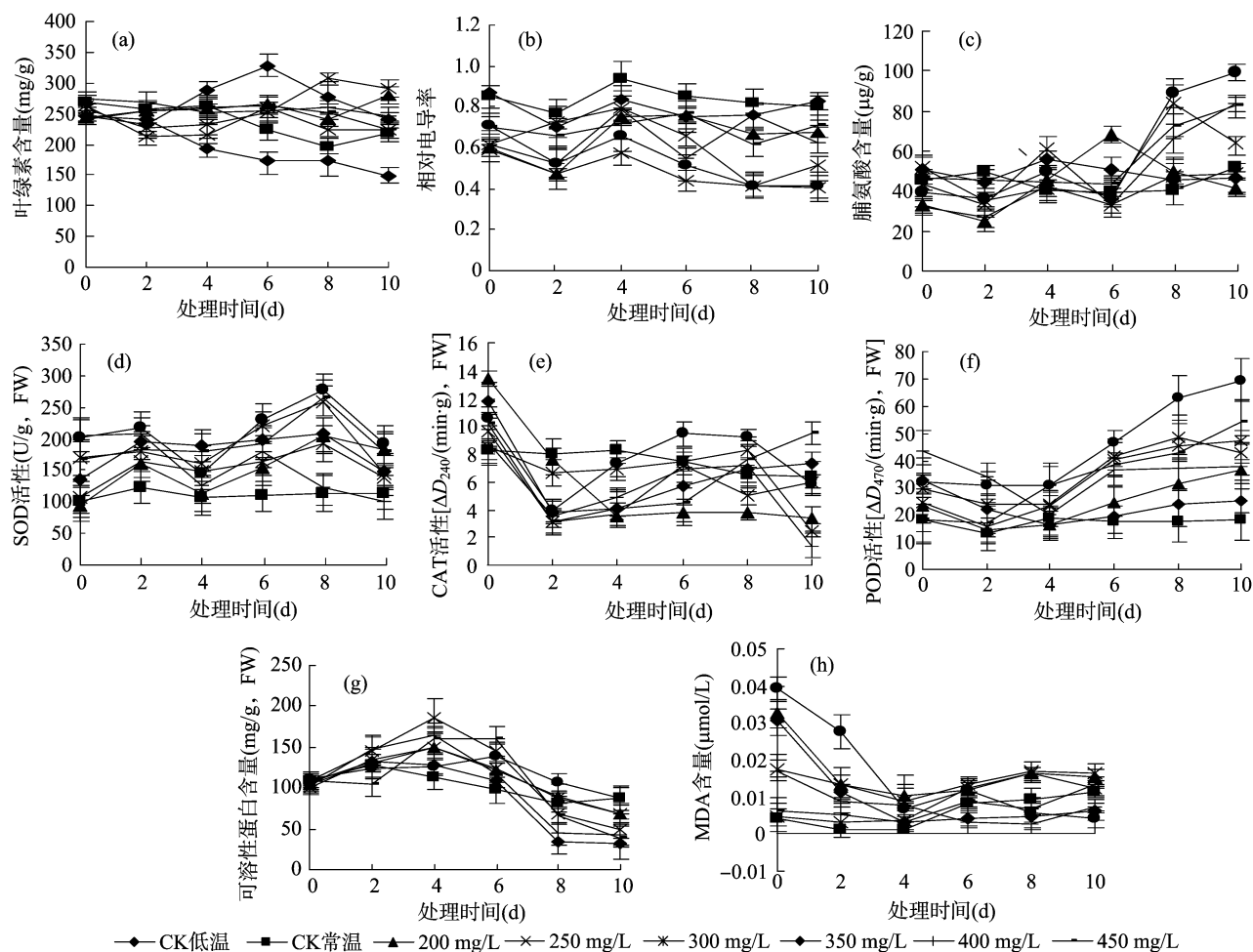


图1 低温胁迫下叶片各项生理指标变化

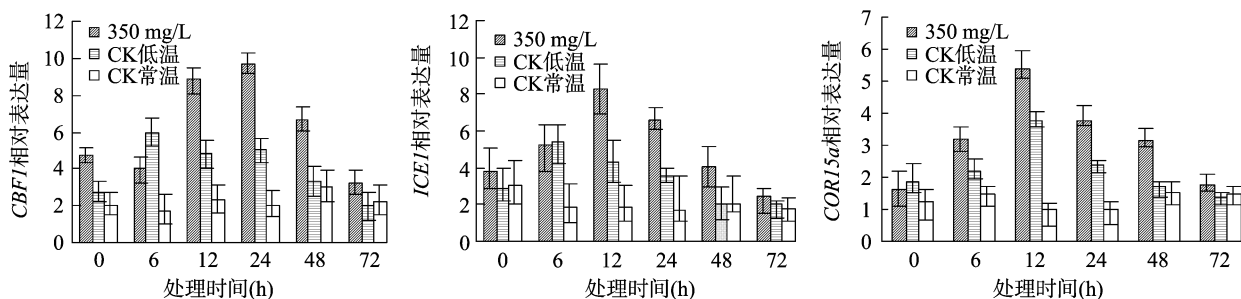


图2 低温胁迫下番茄叶片低温相关基因相对表达量的变化

3 讨论与结论

对番茄幼苗进行适宜浓度的 SA 预处理,能够使其叶片中的 SA 质量分数上升,且上升到一定程度后,便可诱导番茄叶片内的膜系统保护酶(主要指 SOD、POD 和 CAT)的活性增强,SOD 可催化 $O_2 \cdot$ 歧化为 H_2O_2 ,诱导 H_2O_2 的适量积累。POD、CAT 再将其还原为 H_2O ,对于清除氧自由基有较大作用,从而上调植物的抗氧化能力^[19]。MDA 是膜脂过氧化最重要的产物之一,它的产生还能加剧膜的损伤,因此在植物衰老生理和抗性生理研究中 MDA 含量是一个常用指标,可通过 MDA 了解膜脂过氧化的程度,以间接测定膜系统受损程度以及植物的抗逆性^[20]。本试验中,喷施了各浓度 SA 的番

茄叶片 MDA 含量与对照相比明显降低,说明 SA 能降低番茄叶片膜质的过氧化程度,提高其抗性,延缓植株衰老死亡。可溶性蛋白是重要的渗透调节物质和营养物质,其增加和积累能提高细胞的保水能力,对细胞的生命物质及生物膜起到保护作用,因此经常用作筛选抗性的指标之一^[21]。SA 诱导番茄叶片可溶性蛋白含量上升,保护生物膜,抵御低温对叶片组织造成的破坏。其中以 350 mg/L 处理的效果最好。脯氨酸是植物细胞的内含物质,是蛋白质的组分之一。脯氨酸可以游离状态广泛存在于植物体中。试验中,脯氨酸含量在低温胁迫 6 d 后明显升高,说明 SA 可诱导番茄叶片中脯氨酸含量增加,保持植物原生质体与外界环境的渗透平衡,维持细胞膜流动性和膜结构的完整性,提高番茄在低温环境下的抗

逆性^[22]。

叶绿素是一类与光合作用有关的植物色素,植物叶片中叶绿素的含量与叶片吸光性呈正相关,在逆境中的含量变化是反映叶片生理活性的重要指标之一。本试验中,350 mg/L SA 处理的叶绿素含量在胁迫的 6 d 后达到了最高值,且明显高于对照。这说明,低温环境中 SA 能诱导番茄叶片叶绿素含量升高,维持光合作用的顺利进行。相对电导率是衡量细胞膜透性的重要指标,植物体在逆境条件下,电解质的渗透量加大,组织相对电导率升高,细胞膜受到伤害^[23]。喷施不同浓度的 SA 后,番茄叶片相对电导率明显降低。植物叶片组织相对电导率越高,说明细胞膜完整性遭到破坏的程度就越大。由此可知,喷施一定浓度的 SA 能有效降低番茄叶片相对电导率,保护细胞的完整性,其中以 350 mg/L 的处理降低趋势最明显,为最佳处理浓度。这与于锡宏等^[1]、李艳军等^[8]的研究结果一致。

CBF1 转录因子能调控 1 组抗干旱、抗低温基因的表达,*CBF1* 通过感受上游传递的低温信号并将信号向下游传递,更有效地提高植物抗干旱、抗低温的能力^[24]。*ICE1* 是唯一的已鉴定直接作用于 *CBF* 启动子的转录因子。*ICE1* 在细胞核中组成型表达,但是却需要经过冷诱导的构型变化(可能是磷酸化和去磷酸化作用)调节活性,从而激活下游基因的表达^[25]。*COR15a* 基因编码的多肽,富含丙氨酸、天冬氨酸等氨基酸,可形成亲水脂性的 α -螺旋,这种结构对于稳定细胞膜,使植物体免受脱水伤害起重要作用,从而提高植物的抗寒性^[26]。本研究中叶片 *CBF1*、*ICE1*、*COR15a* 的表达情况(图 2)与前人的研究结果相符合,这表明 *CBF1*、*ICE1*、*COR15a* 基因均参与番茄的低温胁迫。在外源水杨酸处理后,上述基因表达量呈先上升再下降的趋势,一定时间内可诱导其抗冷能力在不同程度上增强。根据本试验测定的各项生理指标和 3 种低温相关基因的表达量来看,外源水杨酸处理后番茄的抗冷能力均在不同程度上增强,其中以喷施 350 mg/L 的处理效果最好。

参考文献:

- [1] 于锡宏,蒋欣梅,刁 艳,等. 脱落酸、水杨酸和氯化钙对番茄幼苗抗冷性的影响[J]. 东北农业大学学报,2010,41(5):42-45.
- [2] 韩 涛,李丽萍,葛 兴. 外源水杨酸对桃果实采后生理的影响[J]. 园艺学报,2000,27(5):367-368.
- [3] Shirasu K, Nakajima H, Rajasekhar V K, et al. Salicylic acid potentiates an agonist-dependent gain control that amplifies pathogen signals in the activation of defense mechanisms[J]. Plant Cell, 1997, 9(2):261-270.
- [4] 康国章,孙谷畴,王正询. 水杨酸对低温胁迫香蕉幼苗呼吸作用的影响[J]. 广西植物,2004,24(7):359-362.
- [5] 孙 艳,崔鸿文,胡 荣. 水杨酸对黄瓜幼苗壮苗的形成及抗低温胁迫能力的生理效应[J]. 西北植物学报,2000,20(4):616-

620.

- [6] 刘思宇. 外源物质对低温胁迫下番茄幼苗生理指标的影响[J]. 北方园艺,2010(17):44-46.
- [7] 阮淑洁. 外源物质对番茄幼苗抗冷效果的影响[J]. 安徽农业学报,2011,17(11):46-47.
- [8] 李艳军,王丽丽,蒋欣梅,等. 外源水杨酸诱导对番茄幼苗抗冷性的影响[J]. 东北农业大学学报,2006,37(4):463-467.
- [9] 王小黎,崔世茂,郝静红,等. 水杨酸对黄瓜幼苗生理的影响[J]. 内蒙古农业大学学报(自然科学版),2012,33(1):55-60.
- [10] Kadioglu A, Saruhan N, Sağlam A, et al. Exogenous salicylic acid alleviates effects of long term drought stress and delays leaf rolling by inducing antioxidant system[J]. Plant Growth Regulation, 2011, 64(1):27-37.
- [11] 高晓宽. 外源水杨酸对水分胁迫下小麦幼苗的影响[J]. 考试周刊,2011(59):239-240.
- [12] 李天来,李 森,孙周平. 钙和水杨酸对亚高温胁迫下番茄叶片保护酶活性的调控作用[J]. 应用生态学报,2009,20(3):586-590.
- [13] 徐呈祥. 提高植物抗寒性的机理研究进展[J]. 生态学报,2012,32(24):7966-7980.
- [14] 邓江明,简令成. 植物抗冻机理研究新进展:抗冻基因表达及其功能[J]. 植物学通报,2001,18(5):521-530.
- [15] 刘 建,项东云,周 坚. 桉树抗寒生理及分子机理研究进展[J]. 西南林学院学报,2006,26(5):81-85.
- [16] 黄 敏,陈杰忠. 果树抗寒性研究进展[J]. 亚热带植物科学,2011,40(1):80-84.
- [17] 尹 蓉. 苹果属植物幼苗对盐胁迫的耐性评价及生理响应[D]. 西北农林科技大学,2010,12(4):105-108.
- [18] 李合生. 植物生理生化试验原理和技术[M]. 北京:高等教育出版社,2000.
- [19] 程群科,罗庆熙,李利兰,等. 番茄抗冷性的研究进展[J]. 长江蔬菜学术版,2012(8):14-16.
- [20] 李天来,李 森,孙周平. 钙和水杨酸对亚高温胁迫下番茄叶片保护酶活性的调控作用[J]. 应用生态学报,2009,20(3):586-590.
- [21] 李长宁. 水分胁迫下外源脱落酸提高甘蔗抗旱性的机理研究[D]. 南宁:广西大学,2012.
- [22] 白 洁. 外源生长调节物质对亚低温下番茄幼苗生理特性的影响[D]. 北京:中国农业科学院,2007.
- [23] 陈 超. 喀斯特地区饲用灌木抗旱抗寒性的生理生态学机制研究[D]. 北京:中国农业大学,2014.
- [24] 曹云飞,张海娜,肖 凯. CBF 转录因子介导的植物低温信号转导研究进展[J]. 棉花学报,2007,19(4):304-311.
- [25] Chinnusamy V, Zhu J, Zhu J K. Salt stress signaling and mechanisms of plant salt tolerance[J]. Springer US, 2006(27):141-177.
- [26] 张丽丽,李景富,王傲雪. 转录激活因子 *CBF* 基因在植物抗冷分子机制中的作用[J]. 园艺学报,2008,35(5):765-771.