

盐诱导的依赖叶黄素循环的热耗散提高了小麦的耐盐性

王倩, 高雪, 彭建云, 王宝山*

山东师范大学生命科学学院逆境植物重点实验室, 济南 250014

摘要: 以小麦抗盐品种‘DK961’和盐敏感品种‘LM15’为材料, 探讨盐胁迫条件下叶黄素循环与膜脂过氧化的关系。结果表明: 200 mmol·L⁻¹ NaCl处理后二者地上部分鲜重、含水量、K⁺含量显著下降, Na⁺含量、Na⁺/K⁺比、丙二醛含量显著升高, 膜透性显著增大, ‘LM15’的变化幅度均明显大于‘DK961’, 而‘LM15’脱环氧化状态(A+Z)/(A+Z+V)的增加明显小于‘DK961’。这表明盐胁迫下‘DK961’通过增加依赖叶黄素循环的热耗散减轻了膜脂过氧化, 提高其耐盐性。

关键词: 小麦; 盐胁迫; 膜脂过氧化; 叶黄素循环; 耐盐性

Salt-Induced Xanthophyll Cycle-Dependent Thermal Dissipation Improved Salt Tolerance of Wheat (*Triticum aestivum* L.)

WANG Qian, GAO Xue, PENG Jian-Yun, WANG Bao-Shan*

Key Laboratory of Plant Stress Research, College of Life Sciences, Shandong Normal University, Jinan 250014, China

Abstract: In this paper, the relationship between lipid peroxidation and xanthophyll cycle was examined using salt-tolerant wheat (*Triticum aestivum*) variety ‘Dekang 961’ (‘DK961’) and salt-sensitive variety ‘Lumai 15’ (‘LM15’) under short-term NaCl stress. The results showed that the shoot fresh weight, water content and K⁺ content all significantly decreased in both cultivars treated with 200 mmol·L⁻¹ NaCl for 3 d, while Na⁺ content, Na⁺/K⁺ ratio, malondialdehyde (MDA) content as well as membrane permeability significantly increased. The changing degree in ‘LM15’ was much higher than that in ‘DK961’. However, deoxy cyclic state (A+Z)/(A+Z+V) increased more in ‘DK961’ than in ‘LM15’. These results suggested that ‘DK961’ is more salt-tolerant than ‘LM15’ partly via increasing a xanthophyll cycle-dependent thermal dissipation to maintain a low level of lipid peroxidation.

Key words: wheat; salt stress; lipid peroxidation; xanthophyll cycle; salt tolerance

盐胁迫是自然界中一种主要的非生物胁迫, 是影响作物产量的重要因素之一。盐胁迫条件下, 光系统II (PSII)氧化侧的放氧复合物的功能受到损害, 使它向PSII反应中心提供的电子数量减少(Sharkey和Badger 1982), 并能阻断PSII还原侧从中心质体醌Q_A向泛醌Q_B的电子传递。这些变化降低了植物对光量子的有效吸收、传递和利用, 从而降低了光能转化为生物化学能的效率, 产生过剩的激发能。这种光胁迫导致的过剩激发能会引发超氧阴离子和H₂O₂等活性氧的产生(Xu等2000), 启动膜脂过氧化(董发才等2002)、抑制光合作用等(王弋博等2005; Peng等2004; 赵可夫1993)。膜脂和膜蛋白是自由基攻击的对象。特别是膜脂, 由于含不饱和脂肪酸多, 容易导致自由基链式反应诱导不饱和脂肪酸过氧化, 导致细胞膜受损伤, 使质膜透性增大。

目前, 人们对光破坏防御机制的研究一方面是依靠叶黄素循环的能量耗散过程, 另一方面就是与D1蛋白周转有关的防御机制(张娟等2008)。洪双松和许大全(1997)提出依赖叶黄素循环的非辐射能量耗散是小麦防御光破坏的主要机制。Havaux等(1991)用二硫苏糖醇(DTT)抑制强光胁迫下的豌豆叶片中玉米黄质的生成, 结果脂类降解加重, 表明玉米黄质对脂类有保护作用。而缺失叶黄素循环的拟南芥突变体, 能在一定程度上增加类囊体膜的热稳定性。这些结果说明叶黄素循环组分玉米黄质直接或间接的耗能作用部分地避免过多自由基的

收稿 2010-07-15 修定 2010-08-19

资助 国家自然科学基金(30870138)和国家海洋“863”重点项目(2007AA091701)。

* 通讯作者(E-mail: bswang@sdu.edu.cn; Tel: 0531-86180197)。

产生,减轻对膜脂和膜蛋白的伤害,起到一定的保护和调节作用(吴长艾等 2001)。盐胁迫条件下,小麦是否通过依赖叶黄素循环的热耗散减少自由基的产生,减轻膜质及膜蛋白的伤害来提高自身的耐盐性尚未见报道。

本实验以耐盐性不同的小麦品种(抗盐品种‘DK961’和盐敏感品种‘LM15’)为材料,研究了盐胁迫下幼苗生长、丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量、叶黄素循环组分的变化及其与耐盐性之间的关系,表明短期盐诱导的依赖叶黄素循环的热耗散增加了小麦的耐盐性。这些结果为进一步研究叶黄素循环在小麦耐盐机理中的作用奠定了基础。

材料与amp;方法

1 材料与处理

供试材料为小麦(*Triticum aestivum* L.)耐盐品种‘德抗961’(‘DK961’),盐敏感品种‘鲁麦15’(‘LM15’)。

选取籽粒饱满的小麦种子,用流水冲洗干净后播种于装有干净细砂的塑料盆内,每盆16粒。萌发2 d后,每天9:00用1/2Hoagland溶液浇灌。待小麦幼苗长出2片真叶时,每盆保留10株长势一致的幼苗,分别用1/2Hoagland溶液(对照)和含200 mmol·L⁻¹ NaCl的1/2Hoagland溶液进行处理。NaCl处理每12 h递增50 mmol·L⁻¹,达到终浓度后每天9:00用200 mmol·L⁻¹浇灌,浇灌量为细砂持水量的3倍,过多的盐溶液从盆底部小孔渗出,以保持盆中处理液浓度的恒定。培养室的昼夜温度为白天(25±2)℃,晚上(20±2)℃,光照时间13 h·d⁻¹,白天最高光照强度约600 μmol·m⁻²·s⁻¹,相对湿度60%~80%。达终浓度后继续处理3 d,取样进行有关指标分析。

2 鲜重、干重及含水量的测定

取小麦地上部分,蒸馏水快速冲洗表面的灰尘,用吸水纸吸干表面水分后称量其鲜重,然后将称量完鲜重的材料放入信封中,于105℃杀青15 min,然后于80℃烘至恒重,分别称其干重。每个处理5个重复。计算含水量(%)=(鲜重-干重)/鲜重×100%。

3 叶片中Na⁺和K⁺含量的测定

参照王宝山和赵可夫(1995)的方法测定叶片中

Na⁺、K⁺和Cl⁻含量。分别称取不同处理的小麦幼苗叶片干材料各0.05 g,置于用双蒸水洗净的坩埚中,于高温电炉中500℃灰化12 h后,用少许浓硝酸溶解,双蒸水定容至50 mL,用火焰光度计(Cole-Parmer Instrument Company, Chicago, 2655-00)测定K⁺和Na⁺的含量。每个处理5个重复。

4 MDA及相对电导率的测定

采用硫代巴比妥酸(TBA)法(赵世杰等2002)测定MDA。将叶片剪成0.5 cm的小段,称取0.5 g放入研钵中,加入少许石英砂和2 mL 5%的三氯乙酸(TCA),研成匀浆,再用3 mL 5%的三氯乙酸分2次冲洗研钵,合并提取液于离心管中,3 000×g离心10 min后测上清体积,取上清2 mL,加0.67%硫代巴比妥酸2 mL,混匀,于100℃水浴中30 min,冷却后离心,取上清在450、532、600 nm波长下测吸光度。计算组织中MDA含量[μmol·g⁻¹(FW)]=[6.45(A₅₃₂-A₆₀₀)-0.56A₄₅₀]×V/G。式中,V为提取液体积(L);G为植物材料鲜重(g)。

采用相对电导率的方法(侯福林2004)测定叶片质膜相对透性。取功能叶片,用自来水冲洗干净并用吸水纸吸干,将叶片切成1 cm小段,用双蒸水迅速冲洗2次,并用吸水纸吸干,称取定量(0.2 g)样品放入青霉素小瓶中,加双蒸水(每0.1 g样品加2 mL双蒸水),真空渗透,抽放气3次,渗入后静置1~2 h使离子外渗,用电导率仪测定试管溶液的导电值(原电导值),将样品于高温水浴杀死(100℃,5 min),冷至室温,再测电导值(总电导值)。相对电导率(%)=原电导值/总电导值×100%。

5 叶黄素循环组分的测定

将叶片平行并列放好,用直径为0.5 cm的打孔器取叶圆片15个,放入研钵中,加3.5 mL 100%的丙酮、少许石英砂和CaCO₃,于弱光和低温(0~4℃)下研磨,在0~4℃下经10 000×g离心15 min后,取上清液,用高效液相色谱法(赵世杰等1995)分析紫黄质(violaxanthin, V)、花药黄质(antheraxanthin, A)、玉米黄质(zeaxanthin, Z)的含量,以(A+Z)/(A+Z+V)表示脱环氧化状态。

6 数据处理

所得数据均用Excel进行统计分析。

实验结果

1 盐胁迫对不同小麦品种幼苗生长和含水量的影响

由表1看出,与对照相比,200 mmol·L⁻¹ NaCl处理3 d,两个品种的地上部分鲜重和含水量都显著下降,‘LM15’分别下降了18.60%和1.07%,而‘DK961’仅下降了8.46%和0.75%。但是,200 mmol·L⁻¹ NaCl处理对两个品种地上部分干重却没

有显著影响。

2 盐胁迫对不同小麦品种幼苗叶片离子含量的影响

叶片Na⁺/K⁺比可以作为小麦等单子叶植物耐盐性强弱的重要指标。由表2可看出,与对照相比,200 mmol·L⁻¹ NaCl处理3 d,两个品种幼苗叶片的Na⁺和Na⁺/K⁺都显著升高,‘LM15’分别升高了4.28倍和16.58倍,‘DK961’分别为3.32倍和12.67倍;K⁺含量显著下降,‘LM15’和‘DK961’分别下降了

表1 NaCl处理对不同品种小麦幼苗生长和含水量的影响

Table 1 Effects of NaCl treatment on the growth and water content in seedlings of different wheat cultivars

品种	鲜重/g		干重/g		含水量/%	
	对照	NaCl处理	对照	NaCl处理	对照	NaCl处理
‘LM15’	1.72±0.13	1.40±0.05**	0.21±0.01	0.21±0.01	87.54±0.55	86.60±0.36**
‘DK961’	1.30±0.08	1.19±0.07*	0.16±0.01	0.15±0.01	88.02±0.26	87.36±0.65*

表中数据为5个重复的平均值±SD; *和**分别表示各处理与对照相比差异显著(P<0.05)和差异极显著(P<0.01)。表2、图1、图2同此。

表2 NaCl处理对不同品种小麦幼苗叶片Na⁺和K⁺含量及Na⁺/K⁺比的影响

Table 2 Effects of NaCl treatment on leaf Na⁺ and K⁺ contents and Na⁺/K⁺ ratio in seedlings of different wheat cultivars

品种	Na ⁺ 含量/mmol·g ⁻¹ (DW)		K ⁺ 含量/mmol·g ⁻¹ (DW)		Na ⁺ /K ⁺ 比	
	对照	NaCl处理	对照	NaCl处理	对照	NaCl处理
‘LM15’	0.18±0.02	0.95±0.07**	0.50±0.02	0.15±0.04**	0.36±0.04	6.33±0.64**
‘DK961’	0.19±0.03	0.82±0.04**	0.74±0.01	0.25±0.03**	0.24±0.01	3.28±0.19**

70.00%和66.22%。

3 盐胁迫对不同小麦品种幼苗叶片膜脂过氧化及膜透性的影响

MDA含量是膜脂氧化的主要指标。为了比较不同耐盐性小麦品种在盐胁迫后MDA含量和膜透性之间的关系,分析耐盐小麦品种‘DK961’和盐敏感品种‘LM15’在盐处理3 d后幼苗叶片MDA含量和质膜透性(图1)。与对照相比,‘LM15’在盐处理3 d后MDA含量和质膜透性均显著增加,分别增加了72.50%和22.90%,而‘DK961’的增加量分别为8.20%和10.10%。

4 盐胁迫对不同小麦品种幼苗叶黄素循环组分的影响

相同NaCl胁迫下耐盐小麦品种‘DK961’叶片MDA含量和质膜透性显著低于盐敏感品种‘LM15’,那么叶黄素循环组分是否发生适应性变化?由图2显示,盐胁迫3 d后,与对照相比,两个品种小麦脱环氧化状态(A+Z)/(A+Z+V)都显著增加,‘DK961’增加了53.30%,而‘LM15’仅增加21.96%,‘DK961’(A+Z)/(A+Z+V)的增加是‘LM15’的近2倍。A和Z的含量与能量耗散呈正相关,说明两个品种小麦能量耗散均显著增加,‘DK961’热耗散的增加比‘LM15’更为显著。

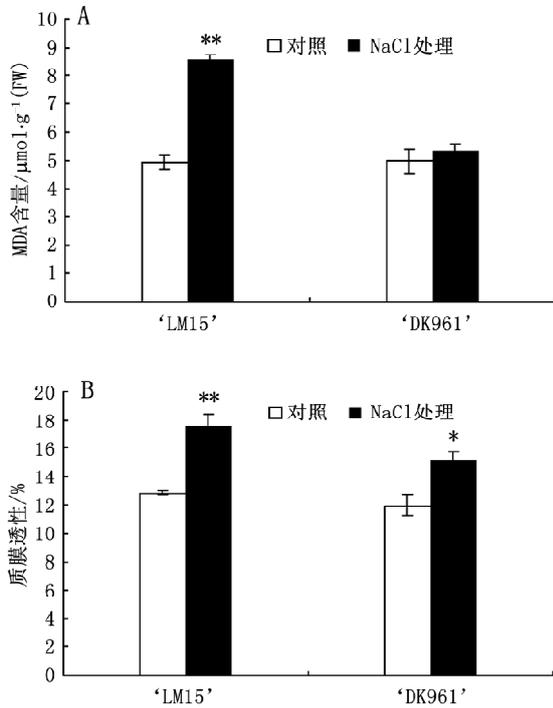


图1 NaCl处理对不同品种小麦幼苗叶片MDA含量(A)和质膜透性(B)的影响

Fig.1 Effects of NaCl treatment on leaf MDA content (A) and plasma membrane permeability (B) in seedlings of different wheat cultivars

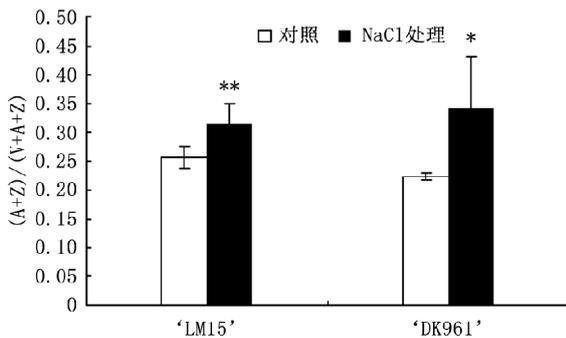


图2 NaCl处理对不同品种小麦幼苗叶片叶黄素循环组分的影响

Fig.2 Effects of NaCl treatment on leaf xanthophyll cycle components in seedlings of different wheat cultivars

讨论

盐胁迫干扰细胞离子平衡,使细胞丧失 Ca^{2+} 和 K^+ (Peng等2004),从而引起细胞内 Na^+ 浓度升高,导致植物生长抑制(赵可夫1993;王弋博等2005)。

小麦耐盐性强弱与叶片 Na^+ 浓度呈负相关,耐盐性大小取决于植株的拒 Na^+ 能力(Schachtman等1989; Schachtman和Munns1992)。200 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl胁迫下两个小麦品种的地上部分鲜重和含水量都显著下降(表1), Na^+ 含量和 Na^+/K^+ 比显著升高, K^+ 含量显著下降(表2)。说明盐胁迫对两个小麦品种的生长都产生了不同程度的抑制,并且干扰了其离子平衡。并且无论是生长抑制程度还是 Na^+/K^+ 比增加量, 'DK961'均明显小于'LM15'。说明在同样的盐胁迫条件下'DK961'比'LM15'更耐盐,这与我们之前的实验结果一致(彭建云等2008;王芳和王宝山2010)。

盐胁迫对植物的伤害与活性氧自由基引发的膜脂过氧化有关(柯玉琴和潘廷国1999;陈洁和林栖凤2003)。膜脂过氧化产物MDA的含量可在一定程度上反映膜损伤程度。本实验发现盐处理3d后两个小麦品种叶片细胞膜的稳定性均遭到破坏,MDA含量增多,膜透性增大(图1)。前人的研究表明类囊体膜中的类胡萝卜素可以通过猝灭单线态氧,清除自由基来减少脂类的过氧化作用(Krinsky1979; Burton和Ingold1984; Lim等1992)。叶黄素循环广泛存在于高等植物、蕨类、苔藓和一些藻类植物中,位于类囊体膜上(吴长艾等2001)。小麦主要通过依赖叶黄素循环的非辐射能量耗散来防御光破坏(洪双松等1997)。叶黄素循环有3种组分:紫黄质、花药黄质和玉米黄质(董高峰等1999)。植物在暗中和弱光下,叶黄素循环组分以紫黄质为主,当叶片吸收的光能超过光合作用所利用的量时,产生过剩光能,紫黄质两次脱环化分别形成花药黄质和玉米黄质,花药黄质和玉米黄质的含量与能量耗散呈正相关(Eskling等1997)。

对豌豆的研究发现,强光胁迫下光保护剂(玉米黄素)能抵御所产生的危害性物质并迅速向类囊体膜提供脂类和其他成分(Havaux等1991)。Sarry等(1994)发现,生长在23℃下的土豆叶片于3℃下进行光处理只产生很少量的玉米黄素,同时产生较多的乙烷;而在23℃下进行光处理产生大量的玉米黄素,乙烷则被强烈抑制,从而使膜脂过氧化作用降低。Tardy和Havaux(1997)用强光($100\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)处理大麦叶片诱导玉米黄质的生成,为类囊体膜迅速提供脂类,降低了膜的流动性,说明叶黄素循环组

分玉米黄质的增加与防止脂类过氧化有着密切的联系。本实验发现, 短期盐胁迫条件下两个小麦品种(A+Z)/(A+Z+V)都显著增加, ‘DK961’比对照增加了53.30%, 而‘LM15’只增加了21.96%, ‘DK961’依赖叶黄素循环的热耗散增加明显高于‘LM15’(图2)。而与‘DK961’相比, ‘LM15’在盐处理3 d后MDA含量和质膜透性增加更为显著, 分别为‘DK961’的8.84倍和2.27倍, 相同盐胁迫条件下‘DK961’膜损伤的程度更小。这些结果表明, 耐盐小麦‘DK961’通过增加叶黄素循环组分玉米黄质直接或间接地耗散部分过剩光能, 避免过多自由基的产生, 减轻了盐胁迫对膜脂和膜蛋白的伤害, 从而减少了MDA的产生, 起到了一定的保护作用, 提高了耐盐性。

参考文献

- 陈洁, 林栖凤(2003). 植物耐盐生理及耐盐机理研究进展. 海南大学学报(自然科学版), 1 (2): 177~182
- 董发才, 苗琛, 荆艳彩, 宋纯鹏, 杨惠娟, 安国勇(2002). 小麦根系过氧化氢的积累与耐盐性的关系. 武汉植物学研究, 20 (4): 293~298
- 董高峰, 陈贻竹, 蒋跃明(1999). 植物叶黄素与非辐射能量耗散. 植物生理学通讯, 35 (2): 141~144
- 洪双松, 许大全(1997). 小麦和大豆叶片荧光参数对强光响应的差异. 科学通报, 42 (7): 753~756
- 侯福林(2004). 植物生理学实验教程. 北京: 科学出版社, 90
- 柯玉琴, 潘廷国(1999). NaCl胁迫对甘薯叶片叶绿体超微结构及一些酶活性的影响. 植物生理学报, 25 (3): 229~233
- 彭建云, 綦翠华, 陈敏, 阎留华, 范海, 王宝山(2008). 盐处理对不同抗盐性小麦幼苗叶绿素荧光参数的影响. 安徽农业科学, 36 (10): 3970~3972
- 王宝山, 赵可夫(1995). 大麦叶片中Na⁺、K⁺提取方法的比较. 植物生理学通讯, 31: 50~52
- 王芳, 王宝山(2010). NaCl处理对耐盐性不同小麦胚芽鞘Na⁺、K⁺含量的影响. 延边大学农学报, 32 (1): 1~3
- 王弋博, 李勃, 未丽, 杨亚军, 李三相, 王建平(2005). 外源甜菜碱对两种玉米耐盐性影响的研究. 兰州大学学报(自然科学版), 41 (2): 34~37
- 吴长艾, 孟庆伟, 邹琦(2001). 叶黄素循环及其调控. 植物生理学通讯, 37: 1~5
- 张娟, 姜闯道, 平吉成(2008). 盐胁迫对植物光合作用影响的研究进展. 农业科学研究, 29 (3): 74~80
- 赵可夫(1993). 植物抗盐生理. 北京: 中国科学技术出版社, 230~232
- 赵世杰, 孟庆伟, 许长成, 韩红岩, 邹琦(1995). 植物组织中叶黄素循环组分的高效液相色谱分析法. 植物生理学通讯, 31: 438~442
- 赵世杰, 史国安, 董新纯主编(2002). 植物生理学实验指导. 北京: 中国农业科学技术出版社, 130~144
- Burton GW, Ingold KU (1984). β -Carotene: an unusual type of lipid antioxidant. Science, 224: 569~573
- Eskling M, Arvidsaon PO, Akerlund HE (1997). The xanthophyll cycle, its regulation and components. Plant Physiol, 100: 806~816
- Havaux M, Gmsrecki WI, Dupont I, Leblanc RM (1991). Increased heat emission and its relationship to the xanthophyll cycle in pea leaves exposed to strong light stress. J Photochem Photobiol B: Biol, 8: 361~370
- Krinsky NI (1979). Carotenoid protection against oxidation. Pure Appl Chem, 51: 649~660
- Lim BP, Nagao A, Yerao J, Tanaka K, Suzuki T, Takama K (1992). Antioxidant activity of xanthophylls on peroxy radical-mediated phospholipid peroxidation. Biochem Biophys Acta, 1126: 178~184
- Peng YH, Zhu YF, Mao YQ, Wang SM, Su WA, Tang ZC (2004). Alkali grass resists salt stress through high K⁺ and an endodermis barrier to Na⁺. J Exp Bot, 55: 939~949
- Sarry JE, Montillet JL, Sauvaire Y, Havaux M (1994). The protective function of the xanthophyll cycle in photosynthesis. FEBS Lett, 353: 147~150
- Schachtman DP, Bloom AJ, Dvorak J (1989). Salt-tolerant *Triticum*×*Lophopyrum* derivatives limit the accumulation of sodium and chloride ions under saline-stress. Plant Cell Environ, 12: 47~55
- Schachtman DP, Munns R (1992). Sodium accumulation in leaves of *Triticum* species that differ in salt tolerance. Aust J Plant Physiol, 19: 331~340
- Sharkey TD, Badger MR (1982). Effects of water stress on photosynthetic electron transport, photophosphorylation, and metabolite levels of *Xanthium strumarium* mesophyll cells. Planta, 156: 199~206
- Tardy F, Havaux M (1997). Thylakoid membrane fluidity and thermostability during the operation of the xanthophyll cycle in higher-plant chloroplasts. Biochim Biophys Acta, 1330: 179~193
- Xu CC, Li LB, Kuang TY (2000). The inhibited xanthophylls cycle is responsible for the increase insensitivity to low temperature photoinhibition in rice leaves fed with glutathione. Photosynth Res, 65 (2): 107~114
- Yamoto HY (1979). Biochemistry of the violaxanthin cycle in higher plants. Pure Appl Chem, 51: 639~648