二硫苏糖醇对海水胁迫下菠菜活性氧代谢及叶绿素荧光特性的影响

陈新斌, 孙 锦, 郭世荣*, 陆晓民, 何立中, 严 蓓

(南京农业大学园艺学院,农业部南方蔬菜遗传改良重点开放实验室,南京 210095)

摘 要:以耐海水菠菜品种'荷兰 3 号'为材料,采用水培方法,研究了二硫苏糖醇(DTT)对海水胁迫及甲基紫精(MV)诱导下菠菜活性氧代谢及叶绿素荧光特性的影响。结果表明,海水胁迫与 MV 处理一样,诱导菠菜叶片产生氧化胁迫,使超氧阴离子()产生速率、过氧化氢(H_2O_2)含量和丙二醛(MDA)含量显著上升,叶绿素 a (Chl.a)、叶绿素 b (Chl.b)、总叶绿素 [Chl.(a + b)] 和类胡萝卜素 (Car.)含量显著下降,最大光量子产量(F_v/F_m)、实际光量子产量(Yield)、电子传递速率(ETR)和光化学猝灭系数(Q_P)显著降低,而非光化学猝灭系数(NPQ/4)显著上升;海水胁迫与 MV 处理下,由叶柄导入叶黄素循环活性抑制剂 DTT,菠菜叶片活性氧(ROS)大量积累,导致光合色素降解加剧, F_v/F_m 、Yield、ETR、NPQ、 Q_P 进一步下降。上述结果表明,海水胁迫抑制了菠菜叶片叶黄素循环活性,降低了叶片非辐射能量耗散能力,加重了叶片 ROS 积累,从而导致光合色素含量降低,PSII 活性下降,电子传递速率降低,用于光化学反应的能量部分减少,光合作用受到严重影响,说明海水胁迫下叶黄素循环在保持菠菜叶片光合色素稳定和光合作用正常运转中发挥重要作用。

关键词: 菠菜;海水;二硫苏糖醇;叶黄素循环;活性氧;叶绿素荧光

中图分类号: S 636.1 文献标志码: A 文章编号: 0513-353X (2012) 12-2457-11

Effects of the Dithiothretiol on Activate Oxygen Metabolism and Chlorophyll Fluorescences in Spinach Leaves Under Seawater Stress

CHEN Xin-bin, SUN Jin, GUO Shi-rong*, LU Xiao-min, HE Li-zhong, and YAN Bei

(College of Horticulture, Nanjing Agricultural University; Key Laboratory of Southern Vegetable Crop Genetic Improvement, Ministry of Agriculture, Nanjing 210095, China)

Abstract: The effects of the dithiothretiol (DTT) on activate oxygen metabolism and chlorophyll fluorescences under seawater stress and methyl viologen (MV) induced oxidative stress in leaves of 'Helan 3' (seawater tolerant cultivar) were investigated by hydroponics. The results shown that production rate of superoxide radical (), content of hydrogen peroxide (H_2O_2) and malonaldehyde (MDA) were remarkably increased by seawater and MV which could induce oxidative stress on spinach leaves, whereas contents of chlorophyll a (Chl.a), chlorophyll b (Chl.b), total chlorophyll and carotenoid (Car.) remarkably decreased. Under the stress of seawater and treated with MV, maxmium quantum efficiency of

收稿日期: 2012 - 07 - 09; **修回日期:** 2012 - 10 - 12

基金项目: 教育部高校博士点基金项目(20100097120002),国家重点基础研究发展计划项目(2009CB119000),现代农业产业技术体系建设专项项目(CARS-25-C-03)

^{*} 通信作者 Author for correspondence (E-mail: srguo@njau.edu.cn)

photosystem II photochemistry $(F_{\rm v}/F_{\rm m})$, the effective PS II quantum yield (Yield), apparent electron transport rate (ETR) and coefficient of photochemical quenching $(q_{\rm P})$ were decrease significantly, coefficient of nonphotochemical quenching (NPQ/4) was increased significantly. Accumulation of reactive oxygen species (ROS), degradation of photosynthetic pigments, as well as decrease of $F_{\rm v}/F_{\rm m}$, Yield, ETR, NPQ, $q_{\rm P}$ were aggravated by introduction of dithiothreitol. Our results suggested that the inhibition of xanthophyll cycle under seawater stress decreased the dissipation of non-radiative energy, enhanced the accumulation of ROS, which were leading the degradation of photosynthetic pigments, decreation of activity of PS II and ETR, reduction of energy for photochemical reactions, and photosynthetic performances were affected significantly. Higher activity of xanthophyll cycle in seawater-tolerant spinach plays a major role in maintaining the stability of photosynthetic pigments and photosynthetic activity under seawater stress.

Key words: spinach; *Spinacia oleracea*; seawater; dithiothretiol; xanthophyll cycle; reactive oxygen species; chlorophyll fluorescence

植物的光能利用存在限度,当植物吸收的光能超过光合作用所能利用的量时,植株受到光抑制 伤害,光合机构受到破坏,光合效率和光合功能下降。盐胁迫加重植物光合作用的光抑制程度,植 株容易出现光氧化,形成大量活性氧(ROS),进而引起光合系统的损伤和失活(束胜 等,2010), 并打乱了叶绿素(Chl.)代谢进程,降低 Chl.含量(孙锦 等,2009),影响光能的吸收与利用。然 而,植物在进化过程中形成了一套光能耗散机制,使过剩光能以非辐射能量的形式加以耗散,避免 了过剩光能对植物光合器官的损伤。其中,依赖叶黄素循环的非辐射能量耗散是植物在长期进化过 程中形成的抵抗光破坏的主要机制之一。植物在遭受水分、盐分、营养、高温、低温等胁迫时,通 过增强叶黄素循环活性来耗散过剩光能,从而保护光合作用正常进行(Jahns & Holzwarth, 2012)。 王倩等(2010)研究发现,盐胁迫下小麦通过叶黄素循环的热耗散减少自由基的产生,减轻对膜质 及膜蛋白的伤害; Gruszecki 等(2006)认为较高的叶黄素循环活性可以降低叶绿体 ROS 的产生, 降低 ROS 对光合机构的损害。叶黄素循环是指叶黄素组分紫黄质(violaxanthin, V)、环氧玉米黄 质(antheraxathin, A)和玉米黄质(zeaxanthin, Z)在一定条件下通过环氧化(Z→A→V)和脱环 氧化(V→A→Z)反应相互转化的过程(张振贤 等,2001)。叶黄素循环受紫黄质脱环氧化酶(VDE) 的催化,二硫苏糖醇(DTT)作为 VDE 的专一性抑制剂,抑制 V 向 Z 的转化,从而抑制依赖叶黄 素循环的热耗散,因此 DTT 常用于逆境胁迫下叶黄素循环功能研究(Fernández-Marín et al.,2009; 贾永霞 等, 2011)。

海水是地球上分布范围最广、容量最大的水资源,有效利用海水资源进行作物栽培已经越来越多地引起了各国的重视(范美华等,2010)。研究表明,海水对作物的伤害主要是盐分含量过高造成的盐胁迫伤害(隆小华等,2004;孙锦等,2009)。海水胁迫下,植物受到离子毒害和氧化胁迫伤害(隆小华等,2004;孙锦等,2009;范美华等,2010;李洪燕等,2010)。海水胁迫下,菠菜叶片 Chl.含量降低及光合性能下降与 ROS 的累积密不可分,并且菠菜植株较高的叶黄素循环活性能够保持 Chl.稳定,缓解海水胁迫下光化学效率下降(孙锦等,2009; Sun et al.,2010)。然而,这些研究都没能进一步为叶黄素循环与 ROS 积累、光化学反应之间的关系提供直接试验证据。鉴于此,以耐海水菠菜品种'荷兰3号'为材料(孙锦,2009),通过 DTT 抑制叶黄素循环活性,研究海水胁迫下菠菜叶片叶黄素循环、ROS 积累和光化学反应之间的关系,为菠菜的海水栽培提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与处理

选用的菠菜(*Spinacia oleracea* L.)品种为耐海水品种'荷兰 3 号';海水取自江苏东台海域,总含盐量 26.64 g·L⁻¹, pH 7.8,基本离子组成: Na⁺ 349.98 mmol·L⁻¹、Cl⁻ 410.14 mmol·L⁻¹、Mg²⁺ 40.20 mmol·L⁻¹、SO₄²⁻ 21.15 mmol·L⁻¹、Ca²⁺ 7.61 mmol·L⁻¹、K⁺ 6.83 mmol·L⁻¹。

试验于 2011 年 8 月至 12 月在南京农业大学牌楼试验基地人工气候室内进行。菠菜种子在 15 ℃的去离子水中浸泡 12 h 后,置于 18 ℃的恒温箱中催芽。 芽长 2 mm 时播种于 128 孔穴盘中,每穴 2~3 粒种子。子叶展开真叶显露后,每 2 d 浇灌 1 次 1/2 剂量 Hoagland 营养液,期间浇 1 次清水。幼苗具有 5 片真叶时(苗龄 20 d)定植于栽培槽内(规格为 105 cm×55 cm×12 cm,栽培槽上覆盖与其开口相同大小的泡沫板,并开有密度为 6 cm×8 cm 的定植孔),每孔 2 株,营养液为 1/2 剂量的 Hoagland 营养液。试验期间,24 h 不间断用通气泵向营养液通气,温室内温度夜间最低 10 ℃,昼间最高 26 ℃,相对湿度 65%~90%,光照时间 8 h,营养液温度 18~20 ℃。

菠菜植株定植第 10 天,对部分植株进行海水胁迫处理。先将 24 L海水加入到栽培槽中,然后加入 20 L 清水,接着向栽培槽内加入 Hoagland 营养液母液 660 mL,最后再加入清水,使栽培槽内溶液体积达到 60 L,最终栽培槽内保持 1/2 剂量的 Hoagland 营养液,40%海水。

甲基紫精(MV)是一种触杀灭生性除草剂,通过诱发细胞产生过量的超氧化物自由基,从而导致多种有害的细胞学效应,是国内外研究氧化胁迫重要的内源诱导物(柯德森 等,2003; Kim et al.,2011)。为了研究海水胁迫诱导的氧化胁迫对菠菜植株相关生理响应的影响,采用 MV 处理菠菜叶片,以诱导植株产生氧化胁迫。

试验处理分 2 步进行:

- (1)海水处理的第 4 天,将海水处理植株和未用海水处理植株分为两组,一组用 1 μ mol·L⁻¹ MV 叶面喷施(配制时用 0.05% Tween 20 溶解),另外一组用等量的含 0.05% Tween 20 的清水叶面喷施,每株喷施用量为 2 mL。4 个处理分别表示为——①对照:1/2Hoagland 营养液;②MV:对照植株用 1 μ mol·L⁻¹ MV 叶面喷施;③S:40%海水处理;④S + MV:海水处理植株用 1 μ mol·L⁻¹ MV 叶面喷施。
- (2) MV 处理 24 h 后,取上述 4 个处理的菠菜植株完全展开的功能叶片在水中剪去一段叶柄,迅速将叶柄插入含 3 mmol · L ⁻¹ 二硫苏糖醇(DTT)的营养液或含 40%海水的营养液中,在室温 25 °C、30 μmol · m ⁻² · s ⁻¹ 弱光下处理 5 h,然后再于 2 000 μmol · m ⁻² · s ⁻¹ 的强光下处理 1 h(光源为荧光灯)。处理分别表示为——①对照:1/2Hoagland 营养液(用含 0.05% Tween 20 的清水叶面喷施);②DTT: 对照 +3 mmol · L ⁻¹ DTT;③MV: 对照 +1 μmol · L ⁻¹ MV;④MV + DTT: 对照 +1 μmol · L ⁻¹ MV + 3 mmol · L ⁻¹ DTT;⑤S:含 40%海水的 1/2Hoagland 营养液(用含 0.05% Tween 20 的清水叶面喷施);⑥S + DTT:S + 3 mmol · L ⁻¹ DTT;⑦S + MV:S + 1 μmol · L ⁻¹ MV;⑧S + MV + DTT:S + 1 μmol · L ⁻¹ MV + 3 mmol · L ⁻¹ DTT。

DTT 和 MV 的浓度由预备试验得到。取样测定菠菜叶片的 Chl.含量、超氧阴离子 () 产生速率、过氧化氢 (H_2O_2) 和丙二醛 (MDA) 含量、叶绿素荧光参数及叶黄素循环组分。处理第 15 天选取各处理植株,测定相关生长指标。上述试验均重复 3 次。

1.2 生长指标测定

选取各处理植株,用去离子水冲洗干净,吸干表面水分,测定地上部鲜样质量,再经115 ℃杀

青 15 min, 75 ℃烘至恒量,测定地上部干样质量;叶面积用叶面积扫描仪(EPSON EXPRESSION 1680)测量。

1.3 叶黄素循环组分测定

在真空冷冻干燥机里干燥冷冻待测叶片 8 h 后,冰浴研磨,精确称取 50.0 mg 样品放入 15 mL 试管中,加入 5 mL 100%的丙酮,在振荡器上混合均匀后,黑暗静置提取 2 h,然后在 4 $^{\circ}$ C下 10 000 × g 离心 10 min。

上清液用 FA 0.45 μ m 的微孔滤膜过滤,滤液在高效液相色谱仪上参照赵世杰等(1995)的方法测定叶黄素组分含量。色谱柱为: spherisorb C_{18} 5 μ m, Φ 4.0 mm × 250 mm;流动相流速为:1.5 mL·min⁻¹;梯度洗脱程序为:A 液洗脱 0 ~ 4 min,接着 2.5 min 的线性梯度洗脱,再换成 100% B 液。流动相 A 液为:乙腈:甲醇:Tris-HCl 缓冲液(0.05 mol·L⁻¹)为 72:8:3,pH 7.5;B 液为:甲醇:正己烷(5:1)。检测波长为 440 nm,柱温为 25 °C,OD 值范围为 0 ~ 0.05。

叶黄素循环的脱环氧化状态(De-epoxidation state, DES)的计算为 DES = (A+V)/(V+A+Z) (孙艳 等, 2005)。

1.4 产生速率、H₂O₂ 含量和 MDA 含量测定

产生速率按照王爱国和罗广华(1990)的羟胺反应法测定,以 nmol·min⁻¹·g⁻¹FW 表示; H_2O_2 含量的测定参照 Uchida 等(2002)的方法,以 μ mol·g⁻¹FW 表示; MDA 含量的测定按照 Heath 和 Packer(1968)的方法,以 nmol·g⁻¹FW 表示。

1.5 光合色素含量测定

按沈伟其 (1988) 的方法分别测定 A440、A645、A663 处的吸光值,并计算类胡萝卜素 (Car.)、叶绿素 a (Chl.a)、叶绿素 b (Chl.b) 和总叶绿素 [Chl.(a+b)]含量。

1.6 叶绿素荧光参数测定

利用 Imaging-PAM M-series 调制叶绿素荧光成像系统 (德国 WALZ 公司)测定叶绿素荧光参数。 检测前将叶片置于暗箱内适应 20 min,在每个叶圆片上选定一个直径为 1 cm 的测试目标区域 (AOI),测定时先用测量光(0.5 μ mol·m⁻²·s⁻¹)测定初始荧光 F_o ,饱和光脉冲 2 700 μ mol·m⁻²·s⁻¹(脉冲时间 0.8 s)诱导 F_m ,光化光强度为 111 μ mol·m⁻²·s⁻¹。在软件的 Kinetics 窗口检测各叶绿素荧光参数的动力学变化曲线,相应数据可直接从 Report 窗口导出。

相关的叶绿素荧光参数: $F_{\rm o}$ 为初始荧光强度; $F_{\rm v}/F_{\rm m}$ 为 PS II 最大原初光能转换效率; Yield 为 PS II 实际量子产量; $q_{\rm P}$ 为光化学猝灭系数; NPQ 为非光化学淬灭系数,为保证其变幅在 $0 \sim 1$ 之间,数值用(NPQ/4)表示。

以上参数的计算根据 Gray 等(1997)和 Schreiber 等(1986)的方法。PS II 非循环光合电子流速率(ETR)由系统通过公式: $ETR = Yield \times PAR \times 0.5 \times Abs$ 计算(Krall & Edward,1992),其中,PAR(Photosynthetically Active Radiation)指光化光强度; Abs,叶片的吸光系数,可以通过仪器自带的叶片吸收光测量功能推算每个 AOI 的吸收值; 0.5 是分配给 PS II 光能的比例。

1.7 数据分析

试验数据用 Microsoft Excel 2003 和 SAS 9.2 软件分析,用 Duncan's 新复极差法进行多重比较 (P < 0.05)。

2 结果与分析

2.1 海水胁迫对菠菜生长的影响

各处理下,菠菜干样质量、鲜样质量、叶面积较对照均有所降低,其中海水处理下降低幅度最小,干样质量、鲜样质量和叶面积分别为对照的 98.8%、96.4%和 97.8%(表 1)。

表 1 海水胁迫对菠菜生长的影响

Table 1 Effects of seawater stress on growth of spinach plants

处理	干样质量/g	鲜样质量/g	叶面积/cm²	
Treament	Dry weight	Fresh weight	Leaf area	
对照 Control	2.57 ± 0.25 a	34.03 ± 2.37 a	$66.43 \pm 4.20 \text{ a}$	
MV	2.07 ± 0.21 ab	$26.23 \pm 3.72 \text{ b}$	$55.78 \pm 3.40 \text{ b}$	
S	2.54 ± 0.38 a	32.82 ± 3.03 a	64.99 ± 4.43 a	
S + MV	$1.60 \pm 0.37 \text{ b}$	19.79 ± 4.26 c	44.27 ± 6.72 c	

注:数据以平均值 ± 标准差表示,重复3次;同列中含不同字母表示差异显著(P<0.05)。

Note: Data are means $\pm SD$ of 3 replicates; Different letters in the same row show significant difference at 0.05 level.

2.2 DTT 对海水胁迫及 MV 诱导下菠菜叶片叶黄素循环组分的影响

研究表明,植物 DES 可以更好地反映出植物叶黄素循环能力的大小,并与 NPQ 存在很好的线性关系 (Ramalho et al., 2003)。海水胁迫下菠菜叶片 DES 较对照显著上升,MV 处理下也有类似趋势;对照、MV、S 及 S+MV 处理下,由叶柄导入叶片 DTT 后,DES 显著下降(表 2)。

表 2 DTT 对海水胁迫及 MV 诱导下菠菜叶片叶黄素循环组分的影响

Table 2 Effects of DTT on xanthophyll cycle components in spinach leaves under seawater stress and methyl viologen-induced oxidative stress

处理	二硫苏糖醇/(μmol·L ⁻¹)	甲基紫精/(μmol·L ⁻¹)	海水浓度/%	脱环氧化状态
Treaments	Dithiothretiol	Methyl viologen	Seawater concentration	DES
对照 Control	0	0	0	0.2125 ± 0.0418 c
DTT	3	0	0	$0.1114 \pm 0.0232 d$
MV	0	1	0	$0.4570 \pm 0.0579 \text{ b}$
MV + DTT	3	1	0	0.2698 ± 0.0691 c
S	0	0	40	0.6128 ± 0.0569 a
S + DTT	3	0	40	0.2836 ± 0.0798 c
S + MV	0	1	40	0.4555 ± 0.0637 b
S + MV + DTT	3	1	40	0.2531 ± 0.0504 c

注: 营养液为 1/2Hoagland。数据以平均值 ± 标准差表示, 重复 3 次; 同列中含不同字母表示差异显著 (P<0.05)。下同。

Note: 1/2Hoagland nutrient solution. Data are means \pm SD of 3 replicates, different letters in the same row show significant difference at 0.05 level. The same below.

2.3 DTT 对海水胁迫及 MV 诱导下菠菜叶片 ROS 水平和膜质过氧化的影响

图 1 表明,海水胁迫显著提高了菠菜叶片中的 产生速率(图 1,A)、 H_2O_2 含量(图 1,B)和 MDA 含量(图 1,C),而 MV 处理进一步加剧了菠菜叶片中的 ROS 积累,加重了膜质过氧化伤害,说明海水胁迫与 MV 一样,都诱导菠菜叶片产生氧化胁迫。

海水胁迫和 MV 处理下,由叶柄导入叶片 DTT 后, 产生速率、 H_2O_2 和 MDA 含量均显著提高,而在对照条件下导入 DTT,对 ROS 累积和 MDA 含量影响较小,说明 DTT 通过抑制海水胁迫下菠菜植株的叶黄素循环活性,从而进一步加重菠菜叶片的氧化胁迫伤害程度。

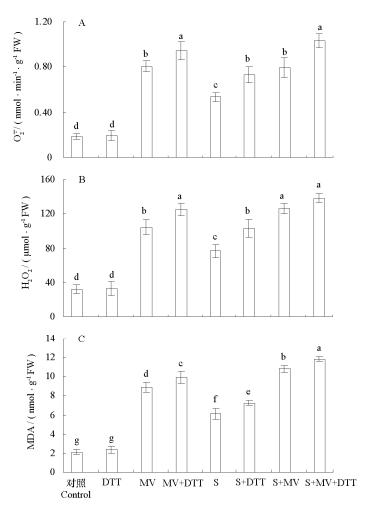


图 1 DTT 对海水胁迫及 MV 诱导下菠菜叶片 O_2 " 产生速率、 H_2O_2 含量和 MDA 含量的影响

 $Fig.~1~~Effects~of~DTT~on~production~rate~of~O_2{}^r~,~~H_2O_2~and~MDA~content~in~spinach~leaves~under~seawater~stress\\ and~methyl~viologen-induced~oxidative~stress$

2.4 DTT 对海水胁迫及 MV 诱导下菠菜叶片光合色素含量的影响

由表 3 可知,海水胁迫显著降低了菠菜叶片 Chl.a、Chl.b、Chl.(a+b)和 Car.含量,而 MV 处理进一步使其含量降低。海水胁迫和 MV 处理下,由叶柄导入叶片 DTT 后,菠菜叶片 Chl.a、Chl.b、Chl.(a+b)和 Car.含量进一步降低,而在对照条件下导入 DTT,对菠菜叶片光合色素含量的影响较

表 3 DTT 对海水胁迫及 MV 诱导下菠菜叶片光合色素含量的影响

Table 3 Effects of DTT on pigments content in leaves of spinach under seawater stress and methyl viologen-induced oxidative stress

处理 Treament	叶绿素 a/ (mg·g ⁻¹ FW) Chl.a	叶绿素 b/ (mg·g ⁻¹ FW) Chl.b	总叶绿素/ (mg·g ⁻¹ FW) Chl.(a+b)	类胡萝卜素/ (mg·g ⁻¹ FW) Car.	类胡萝卜素/叶绿素 Car. /Chl.(a + b)
对照 Control	1.2441 ± 0.0856 a	0.4004 ± 0.0155 a	1.6445 ± 0.1002 a	0.2458 ± 0.0151 a	$0.1496 \pm 0.0059 d$
DTT	1.2561 ± 0.1039 a	$0.4018 \pm 0.0189 a$	1.6579 ± 0.1228 a	0.2436 ± 0.0094 a	$0.1472 \pm 0.0052 d$
MV	0.9018 ± 0.0453 c	$0.3147 \pm 0.0206 \text{ cb}$	1.2166 ± 0.0659 c	0.1944 ± 0.0159 cb	0.1596 ± 0.0046 cbd
MV + DTT	$0.7107 \pm 0.0827 \ d$	0.2522 ± 0.0230 e	$0.9630 \pm 0.1050 \ d$	$0.2037 \pm 0.0148 \ b$	0.2121 ± 0.0078 a
S	$1.0414 \pm 0.0810 \ b$	$0.3407 \pm 0.0080 \ b$	$1.3821 \pm 0.0889 \ b$	$0.2165 \pm 0.0106 \text{ b}$	0.1568 ± 0.0057 cd
S + DTT	0.8693 ± 0.0377 c	0.2887 ± 0.0153 cd	1.1580 ± 0.0492 c	$0.2004 \pm 0.0126 \ b$	0.1729 ± 0.0036 cb
S + MV	$0.7264 \pm 0.0621 \ d$	0.2640 ± 0.0271 ed	$0.9903 \pm 0.0890 d$	0.1734 ± 0.0126 c	$0.1754 \pm 0.0092 \ b$
S + MV + DTT	0.5826 ± 0.0545 e	$0.2118 \pm 0.0175 \text{ f}$	0.7944 ± 0.0716 e	0.1730 ± 0.0068 c	0.2190 ± 0.0226 a

小,说明 DTT 通过抑制海水胁迫和 MV 处理下菠菜植株的叶黄素循环活性,从而进一步降低了菠菜叶片的光合色素含量。然而,在海水胁迫和 MV 处理下,由叶柄导入 DTT,菠菜叶片的 Car./Chl. 值显著升高,表明叶黄素循环被抑制的情况下,Chl.降解速度大于 Car.。

2.5 DTT 对海水胁迫及 MV 诱导下菠菜叶片叶绿素荧光特性的影响

由图 2 可知,海水胁迫下, F_o (图 2,A)略微降低,而 MV 处理使其显著提高,但在海水胁迫和 MV 处理下,DTT 均明显提高了菠菜叶片的 F_o 。海水胁迫下,菠菜叶片的 F_v/F_m (图 3,B)、Yield(图 2,C)、ETR(图 2,D)和 q_P (图 2,F)显著降低,但 NPQ/4(图 2,E)显著升高;而 MV 处理进一步降低了菠菜叶片的 F_v/F_m 、Yield、ETR 和 q_P ,并使 NPQ/4 进一步升高。海水胁迫和 MV 处理下,由叶柄导入叶片 DTT 后,菠菜叶片 F_v/F_m 、Yield、ETR 和 q_P 进一步降低,也使 NPQ/4 有所降低。然而,在对照条件下 DTT 对这些荧光参数均无明显影响。可见,海水胁迫与 MV 处理一样,通过降低菠菜叶片的电子传递速率,从而减少用于光化学反应的光能,进而降低实际光化学效率,DTT 通过抑制海水胁迫和 MV 处理下菠菜植株的叶黄素循环活性,使光化学效率显著降低。

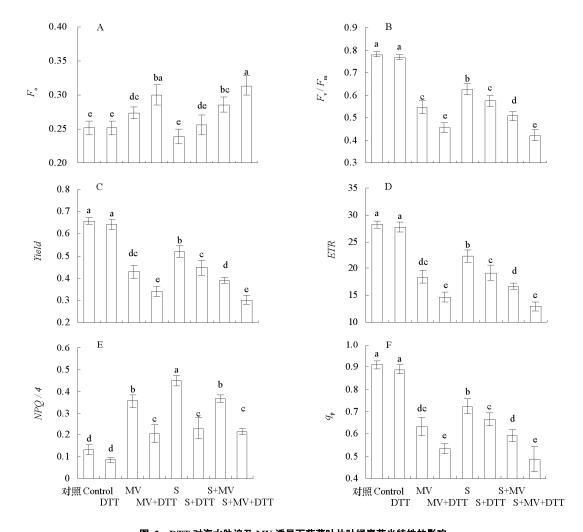


图 2 DTT 对海水胁迫及 MV 诱导下菠菜叶片叶绿素荧光特性的影响

Fig. 2 Effects of DTT on chlorophyll fluorescence parameters in spinach leaves under seawater stress and methyl viologen-induced oxidative stress

3 讨论

生物量是植物对盐胁迫响应的综合体现和反应,海水胁迫同盐胁迫一样显著抑制非盐生植物的生长(李洪燕 等,2010)。然而,李智海等(2009)的研究结果表明,耐性不同的菠菜品种,在海水胁迫下的生长情况不同,其中耐性强的菠菜品种,在海水胁迫下生长良好。本试验结果也表明,海水处理 20 d,耐海水品种'荷兰 3 号'在海水处理下生长良好。前期的研究结果表明(孙锦,2009),海水处理对菠菜综合品质没有明显的影响。因此,利用海水栽培耐盐性强的菠菜是可行的。

叶黄素循环参与植物耗散过量激发光能的过程,在保护光合机构免受过量光能伤害中起重要作用(贾永霞 等,2011)。叶黄素循环脱环氧化水平 DES 与 NPQ 存在很好的线性关系(Ramalho et al.,2003),可以反映出植物非辐射能量的耗散水平。研究发现盐胁迫下耐盐小麦品种 DES 显著上升,依赖叶黄素循环的热耗散的增加提高了小麦耐盐性(王倩 等,2010)。试验发现,海水胁迫下菠菜 DES 显著上升,因此菠菜的耐海水性可能与较高的叶黄素循环脱环氧化水平有关。DTT 是 VDE 的专一性抑制剂,抑制 V 向 A 的转化,从而抑制依赖叶黄素循环的热耗散(Fernández-Marín et al.,2009)。海水胁迫和 MV 处理下,DTT 的导入显著降低了 DES,降低了叶黄素循环活性,影响了菠菜的海水胁迫耐性。

光氧化胁迫(孙艳 等,2005)、盐胁迫(孙锦 等,2009)等逆境条件下,植物体内 ROS 大量累积,从而导致植物叶片 Chl.含量降低(Stenback & Jensen,2010),进而影响植物的光合性能(Gill & Tuteja,2010)。逆境胁迫下植物叶绿体是产生 ROS 的主要部位之一。叶绿体内部的类囊体膜中的 Chl.分子受光激发生成单线态叶绿素(1 Chl.),盐胁迫等逆境条件下影响 1 Chl.光化学反应激发,促使 1 Chl.会转化成三线态叶绿素(3 Chl.),激发能在 PS II 上传给 O_2 产生 1O_2 ,在光系统 I(PS I)上产生 ,进而转化成 H_2O_2 和 · OH,攻击类囊体膜,除了降低 Chl.含量外,还导致光系统 II(PS II)活性下降(Reinbothe & Reinbothe,1996)。本试验发现,海水胁迫诱导的氧化胁迫,导致菠菜叶片产生速率、 H_2O_2 显著升高,膜脂过氧化程度加剧,同时菠菜叶片 Chl.a、Chl.b 和 Chl.(a + b)含量显著下降。由此推测,海水胁迫下菠菜叶片 Chl.含量的下降可能是由氧化胁迫诱导的 ROS 累积造成的。许多研究也表明,盐胁迫加剧植株氧化胁迫水平,造成 1O_2 、 、 H_2O_2 等 ROS 的大量累积,影响 Chl.代谢相关基因的表达,扰乱 Chl.代谢过程,降低 Chl.含量(Tanaka & Tanaka,2006);光氧化条件下,ROS 累积导致的叶绿体膜脂过氧化,也可以加剧 Chl.降解; H_2O_2 大量累积可以激活叶绿素酶(Chlase)活性,进一步加速 Chl.降解进程(Sun et al.,2010)。本试验中,DTT 处理后,菠菜叶片叶黄素循环被抑制,ROS 大量积累,导致 Chl.含量进一步降低。

Car.作为叶绿体光合天线的辅助色素,能够吸收除长波长和短波长外的其他剩余波长的光,是光合作用中光传导途径和光反应中心的重要结构成分,对光合作用的顺利进行起重要作用;另外,Car.也是植物体重要的内源抗氧化剂,在逆境胁迫下吸收剩余光能,通过叶黄素循环,以非辐射的方式耗散 PS II 的过剩能量,并且参与 ROS 的猝灭,保护光合系统免受伤害,从而维持光合性能(Demmig-Adams & Adams,1996;赵昕等,2007)。海水胁迫与 MV 处理一样,诱导菠菜叶片产生氧化胁迫,使叶片积累 ROS,从而导致了菠菜叶片 Car.含量下降,对过剩光能的耗散和猝灭 ROS的能力降低,这进一步又加重过剩光能激发更多的 ROS,促进光合色素含量降低,对光合性能造成更加严重的影响。值得注意的是,海水胁迫和 MV 处理下,Car./Chl.比值没有明显变化,但 DTT 处理后,叶黄素循环被抑制,虽然 Car.含量也没有明显变化,但 Car./Chl.显著升高,说明叶黄素循环抑制对 Car.含量的降低作用小于 Chl.。

叶绿素荧光动力学技术是一种研究光合作用快速、无损伤的探针,能迅速、准确的反映盐胁迫

等逆境造成的光合系统损伤,具有反应内在性特点。 F_o 是原初电子受体 Q_A 全部氧化时的荧光水平,PS II 天线色素的热耗散常导致 F_o 降低,而 PS II 反应中心的破坏或可逆失活则可引起 F_o 增加。海水胁迫下,菠菜叶片 F_o 略有下降,这可能与植株启动依赖于叶黄素循环的非辐射能量耗散有关。然而,在海水胁迫和 MV 处理下,DTT 处理后,菠菜叶片的叶黄素循环被抑制,影响了叶片非辐射能量耗散, F_o 显著上升,致使过剩光能损伤了 PS II 系统,平邑甜茶在干旱胁迫下也有类似现象(曹慧等,2011)。NPQ 反映了 PS II 天线色素吸收的光能用于热耗散的部分,而热耗散是植物保护 PS II 的重要机制(张守仁,1999),研究认为叶黄素循环活性与 NPQ 呈线性相关(Johnson et al.,1993;Sun et al.,2010)。海水胁迫和 MV 处理下 NPQ 上升,菠菜启动光保护机制,以避免过剩光能激发的 ROS对光合器官的伤害,但 DTT 处理后,菠菜叶片的叶黄素循环被抑制,NPQ 显著下降,过剩光能无法及时耗散,ROS 大量累积,导致了光合色素含量降低、PS II 活性和电子传递速率也明显降低,显著影响了光合作用的正常进行。

 $F_{\rm v}/F_{\rm m}$ 反映的是 PS II 原初光能转化效率及 PS II 潜在活性,正常条件下该参数一般为 0.75 ~ 0.85 (何炎红 等,2005),而逆境胁迫常常导致 $F_{\rm v}/F_{\rm m}$ 显著降低。Yield 表示 PS II 的实际光能转化效率,与 PS II 的活性呈正相关 (Krall & Edward,1992);ETR 表示电子传递速率,与植物的光合速率呈线性关系(Koblížek et al.,2001)。 $q_{\rm P}$ 反映了 PS II 天线色素吸收的光能用于光化学反应的部分(张守仁,1999)。本试验表明,海水胁迫与 MV 诱导的氧化胁迫一样,都导致菠菜叶片 $F_{\rm v}/F_{\rm m}$ 、Yield、ETR 和 $q_{\rm e}$ 显著降低,说明海水胁迫诱导菠菜叶片产生氧化胁迫,导致 ROS 的累积,PS II 活性下降,电子传递速率降低,用于光化学反应的能量部分减少,光合性能受损。DTT 处理后,菠菜叶片的叶黄素循环被抑制,ROS 大量积累,PS II 活性和电子传递速率进一步降低,光合性能受损严重。

综上所述,海水胁迫下,抑制菠菜叶片叶黄素循环活性,降低了叶片非辐射能量耗散能力,加重了叶片 ROS 积累,从而导致光合色素含量降低,PSII活性下降,电子传递速率降低,用于光化学反应的能量部分减少,光合作用受到严重影响。这些结果说明,海水胁迫下,叶黄素循环在保护菠菜叶片光合色素和光合性能中发挥重要作用。

References

- Cao Hui, Wang Xiao-wei, Zou Yan-mei, Shu Huai-rui. 2011. Effects of exogenous nitric oxide on chlorophyll fluorescence parameters and photosynthesis rate in *Malus hupehensis* seedlings under water stress. Acta Horticulturae Sinica, 38 (4): 613 620. (in Chinese)
 - 曹 慧,王孝威,邹岩梅,束怀瑞. 2011. 外源 NO 对干旱胁迫下平邑甜茶幼苗叶绿素荧光参数和光合速率的影响. 园艺学报,38 (4): 613-620
- Demmig-Adams B, Adams W W. 1996. The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. Trends in Plant Science, 1:
- Fan Mei-hua, Shi Ge, Ying Ying, Ma Yu-xin, Cui Da-lian. 2010. Effect of CoCl₂ on the growth and antioxidant physiological indexes of rape seedling under seawater stress. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 30 (12): 2459 2465. (in Chinese)
 - 范美华,石 戈,应 英,马玉心,崔大练。2010. 海水胁迫下 $CoCl_2$ 对油菜生长和抗氧化生理指标的影响。西北植物学报,30 (12): 2459 2465.
- Fernández-Marín B, Balaguer L, Esteban R Becerril J M., Garcia-Plazaola J I. 2009. Dark induction of the photoprotective xanthophyll cycle in response to dehydration. Journal of Plant Physiology, 166: 1734 1744.
- Gill S S, Tuteja N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiology and Biochemistry, 48: 909 930.
- Gray G R, Chauvin L P, Sarhan F, Huner N P A. 1997. Cold acclimation and freezing tolerance: A complex interaction of light and temperature. Plant Physiology, 114: 464 474.
- Gruszecki W I, Grudzinski W, Gospodarek M, Patyra M, Maksymiec W. 2006. Xanthophyll-induced aggregation of LHCII as a switch between

- light-harvesting and energy dissipation systems. Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics, 1757: 1504 1511.
- Heath R L, Packer L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Archives of Biochemistry and Biophysics, 125: 189 198.
- He Yan-hong, Guo Lian-sheng, Tian You-liang. 2005. Photosynthetic rates and chlorophyll fluorescence of *Nitraria tangutorumat* different leaf water potentials. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 25 (11): 2226 2233. (in Chinese)
 - 何炎红,郭连生,田有亮. 2005. 白刺叶不同水分状况下光合速率及其叶绿素荧光特性的研究. 西北植物学报,25 (11): 2226-2233.
- Jahns P, Holzwarth A R. 2012. The role of the xanthophyllcycle and of lutein in photoprotection of photosystem II. Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics, 1817: 182 193.
- Jia Yong-xia, Sun Jin, Wang Li-ping, Shu Sheng, Guo Shi-rong. 2011. Thermal dissipation pathway in cucumber seedling leaves under hypoxia stress. Chinese Journal of Applied Ecology, 22 (3): 707 712. (in Chinese)
 - 贾永霞,孙 锦,王丽萍,束 胜,郭世荣. 2011. 低氧胁迫下黄瓜植株热耗散途径. 应用生态学报,22(3):707-712.
- Johnson G N, Young A J, Scholes J D, Horton P. 1993. The dissipation of excess excitation energy in British plant species. Plant Cell and Environment, 16: 673 679.
- Ke De-sen, Xu Zhi-fang, Sun Gu-chou. 2003. A preliminary study to evaluate the antioxidative capacity of banana by comparing the diameter of methyl viologen speckles. Acta Horticulturae Sinica, 30 (3): 319 321. (in Chinese)
 - 柯德森,徐志防,孙谷畴. 2003. 甲基紫精滴注法快速衡量香蕉抗氧化能力的初步试验. 园艺学报, 30(3): 319-321.
- Kim M D, Kim Y H, Kwon S Y, Jang B Y, Lee S Y, Yun D J, Cho J H, Kwak S S, Lee H S. 2011. Overexpression of 2-cysteine peroxiredoxin enhances tolerance to methyl viologen-mediated oxidative stress and high temperature in potato plants. Plant Physiology and Biochemistry, 49: 891 897.
- Koblížek M, Kaftan D, Nedbal L. 2001. On the relationship between the non-photochemical quenching of the chlorophyll fluorescence and the photosystem II light harvesting efficiency. A repetitive flash fluorescence induction study. Photosynthesis Research, 68: 141 152.
- Krall J P, Edward G E. 1992. Relationship between photosystem II activity and CO₂ fixation in leaves. Physiologia Plantarum, 86: 180 187.
- Li Hong-yan, Zheng Qing-song, Liu Zhao-pu, Li Qing. 2010. Effects of various concentration of seawater on the growth and physiological characteristics of *Lactuca indica* seedlings. Chinese Bulletin of Botany, 45 (1): 73 78. (in Chinese)
 - 李洪燕,郑青松,刘兆普,李 青. 2010. 海水胁迫对苦荬菜幼苗生长及生理特性的影响. 植物学报, 45 (1): 73-78.
- Li Zhi-hai, Sun Jin, Li Juan, Guo Shi-rong. 2009. Identification of seawater-tolerant spinach cultivar and selection of its form index. China Vegetables, (8): 11 17. (in Chinese)
 - 李智海,孙 锦,李 娟,郭世荣. 2009. 耐海水菠菜种质鉴定与形态指标选择. 中国蔬菜,(8): 11-17.
- Long Xiao-hua, Liu Zhao-pu, Liu Ling, Chen Ming-da, Zheng Qing-song. 2004. Effects of different concentrations of seawater on growths, developments and absorption of P of *Helianthus tuberosus* seedling. Bulletin of Botanical Research,24 (3): 331 334. (in Chinese) 隆小华, 刘兆普, 刘 玲, 陈铭达,郑青松. 2004. 不同浓度海水胁迫对菊芋幼苗生长发育及磷吸收的影响. 植物研究, 24 (3): 331 334
- Ramalho J C, Quartin V L, Leitao E, Campos P S, Carelli M L C, Fahl J I, Nunes M A. 2003. Cold acclimation ability and photosynthesis among species of the tropical *Coffea* genus. Plant Biology, 5: 631 641.
- Reinbothe S, Reinbothe C. 1996. The regulating of enzymes involved in chlorophyll biosynthesis. European Journal of Biochemistry, 237: 323 343.
- Schreiber U, Schliwa U, Bilger W. 1986. Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. Photosynthesis Research, 10: 51 62.
- Shen Wei-qi. 1988. Extraction of mixed solution for determination of chlorophyll content in rice leaf blade. Plant Physiology Communications, (3): 62 64. (in Chinese)
 - 沈伟其. 1988. 测定水稻叶片叶绿素含量的混合液提取法. 植物生理学通讯, (3): 62-64.
- Shu Sheng, Sun Jin, Guo Shi-rong, Li Juan, Liu Chao-jie, Wang Chang-yi, Du Chang-xia. 2010. Effects of exogenous putrescine on PS II photochemistry and ion distribution of cucumber seedlings under salt stress. Acta Horticulturae Sinica, 37 (7): 1065 1072. (in Chinese) 束 胜, 孙 锦, 郭世荣, 李 娟, 刘超杰, 王长义, 杜长霞. 2010. 外源腐胺对盐胁迫下黄瓜幼苗叶片 PS II 光化学特性和体内离子分

- 布的影响. 园艺学报, 37 (7): 1065 1072.
- Stenbaek A, Jensen P E. 2010. Redox regulation of chlorophyll biosynthesis. Phytochemistry, 71: 853 859.
- Sun Jin. 2009. Studies on physiological mechanism of spinach to seawater stress [Ph. D. Dissertation]. Nanjing: Nanjing Agricultural University. (in Chinese)
 - 孙 锦. 2009. 菠菜对海水胁迫响应的生理机制研究[博士论文]. 南京:南京农业大学.
- Sun Jin, Jia Yong-xia, Guo Shi-rong, Li Juan. 2009. Effects of seawater stress on metabolism of reactive oxygen species and chlorophyll in chloroplasts of spinach (*Spinacia olerancea* L.) . Acta Ecologica Sinica, 29 (8): 4362 4371. (in Chinese)
 - 孙 锦, 贾永霞, 郭世荣, 李 娟. 2009. 海水胁迫对菠菜 (*Spinacia oleracea* L.) 叶绿体活性氧和叶绿素代谢的影响. 生态学报, 29 (8): 4362 4371.
- Sun J, Jia Y X, Guo S R, Shu S. 2010. Resistance of spinach plants to seawater stress is correlated with higher of activity xanthophyll cycle and better maintenance of chlorophyll metabolism. Photosynthetica, 48: 567 579.
- Sun Yan, Fan Ai-li, Xu Wei-jun. 2005. Effects of salicylic acid and oxalate on photosynthetic system and xanthophyll cycle in cucumber leaves under photooxidative stress. Acta Horticulturae Sinica, 32 (6): 1034 1038. (in Chinese)
 - 孙 艳, 樊爱丽,徐伟君. 2005. 水杨酸和草酸对光氧化胁迫下黄瓜叶片光合机构及叶黄素循环的影响. 园艺学报,32 (6): 1034-1038.
- Tanaka A, Tanaka R. 2006. Chlorophyll metabolism. Current opinion in Plant Biology, 9: 248 255.
- Uchida A, Jagendorf AT, Hibino T, Takabe T, Takabe T. 2002. Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice. Plant Science, 163: 515 523.
- Wang Ai-guo, Luo Guang-hua.1990. Quantitative relation between the reaction of hydroxylamine and superoxide anion radicals in plants. Plant Physiology Communications, 26 (6): 55 57. (in Chinese)
 - 王爱国,罗广华. 1990. 植物的超氧自由基与羟胺反应的定量关系. 植物生理学通讯, 26 (6): 55-57.
- Wang Qian, Gao Xue, Peng Jian-yun, Wang Bao-shan. 2010. Salt-induced xanthophyll cycle-dependent thermal dissipation improved salt tolerance of wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant Physiology Communications, 46 (10): 1020 1024. (in Chinese)
 - 王 倩,高 雪,彭建云,王宝山. 2010. 盐诱导的依赖叶黄素循环的热耗散提高了小麦的耐盐性. 植物生理学通讯,46 (10): 1020-1024.
- Zhang Shou-ren. 1999. A discussion on chlorophyll fluorescence kinetics parameters and their significance. Chinese Bulletin of Botany, 6 (4): 444 448. (in Chinese)
 - 张守仁. 1999. 叶绿素荧光动力学参数的意义及讨论. 植物学通报, 6(4): 444-448.
- Zhang Zhen-xian, Ai Xi-zhen, Zhang Fu-man. 2001. Advance in photosynthesis of vegetable crop. Acta Horticulturae Sinica, 28 (Supplement): 627 632. (in Chinese)
 - 张振贤, 艾希珍, 张福墁. 2001. 蔬菜作物光合作用研究进展. 园艺学报, 28 (增刊): 627 632.
- Zhao Shi-jie, Meng Qing-wei, Xu Chang-cheng, Han Hong-yan, Zou Qi. 1995. Analysis of the xanthophyll cycle components in plant yissues by high per-formance liquid chromatography. Plant Physiology Communications, 31 (6): 438 442. (in Chinese)
 - 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 (6):438-442
- Zhao Xin, Wu Yu-xia, Zhao Min-gui, He Jian-xin. 2007. Response of photosynthesis function of salt cress and *Arabidopsis* to NaCl salt stress. Chinese Bulletin of Botany, 24 (2): 154 160. (in Chinese)
 - 赵 昕,吴雨霞,赵敏桂,何建新. 2007. NaCl 胁迫对盐芥和拟南芥光合作用的影响. 植物学通报,24(2): 154-160.