

油菜素内酯对 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 胁迫下黄瓜叶绿体 AsA-GSH 循环及叶黄素稳态的影响

袁凌云^{1,3}, 汪承刚^{1,3}, 黄兴学^{2,3}, 汤 玲¹, 侯金锋¹, 刘 凡¹, 汪 龙¹, 朱世东^{1,3,*}

(¹安徽农业大学园艺学院, 合肥 230036; ²安徽和县台湾农民创业园管委会, 安徽马鞍山 238200; ³皖江蔬菜产业技术研究院, 安徽马鞍山 238200)

摘 要: 研究了外源油菜素内酯 (24-表油菜素内酯, EBL) 对 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 胁迫下黄瓜光合器官的调控作用。在 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 胁迫条件下, 外源 EBL 显著提高了叶绿体中还原型抗坏血酸和谷胱甘肽的含量, 分别是对照的 2.44 倍和 1.40 倍。AsA-GSH 循环中的抗坏血酸过氧化物酶 (APX) 和谷胱甘肽还原酶 (GR) 活性比胁迫处理增加了 36.27% 和 105.83%。外源 EBL 的施用显著增加了紫黄质 (V)、玉米黄质 (Z) 和总叶黄素含量, 减少了花药黄质 (A) 的积累, 叶黄素脱环氧化态比胁迫处理增加了 9.60%。胁迫条件下, EBL 显著提高了植株叶片的非光化学猝灭 (NPQ), 缓解了 PS II 实际光化学效率 (Φ_{PSII}) 的下降。EBL 处理后, 叶绿体膜多种不饱和脂肪酸的水平比对照明显增加。试验结果表明, 外源 EBL 能够通过调控 AsA-GSH 循环及热耗散, 增强叶绿体抗氧化能力, 从而抵抗 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 胁迫。

关键词: 黄瓜; 24-表油菜素内酯; 叶黄素循环; 非光化学猝灭; AsA-GSH 循环; 脂肪酸; 叶绿体

中图分类号: S 642.2

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2017) 05-0881-10

The Regulation of 24-epibrassinolide on AsA-GSH Cycle and Xanthophylls Homeostasis in Chloroplast of Cucumber Under $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ Stress

YUAN Lingyun^{1,3}, WANG Chenggang^{1,3}, HUANG Xingxue^{2,3}, TANG Ling¹, HOU Jinfeng¹, LIU Fan¹, WANG Long¹, and ZHU Shidong^{1,3,*}

(¹College of Horticulture, Anhui Agricultural University, Hefei 230061, China; ²Hexian Taiwan Peasant Pioneer Park Management Committee, Maanshan, Anhui 238200, China; ³Wanjiang Vegetable Industry Research Institute, Maanshan, Anhui 238200, China)

Abstract: The objective of this study was to identify the regulation effects of exogenous brassinosteroids (BRs) on photosynthetic apparatus of cucumber (*Cucumis sativus* L. ‘Jinyou 4’) under $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (80 mmol · L⁻¹) stress. Exogenous 24-epibrassinolide (EBL) markedly increased the reduced ascorbate (AsA) and glutathione (GSH) levels in chloroplast, which were 2.44-fold and 1.40-fold to control. Enzymes activities of APX and GR in AsA-GSH cycle were enhanced by 36.27% and 105.83% respectively, compared to stress treatment. Application of EBL also changed the levels of xanthophyll

收稿日期: 2017-03-01; 修回日期: 2017-05-02

基金项目: 安徽高校自然科学基金项目 (KJ2017ZD15); 安徽省自然科学基金项目 (160805QC48)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: sdzhuaau@ahau.edu.cn)

cycle components, increasing V, Z and total xanthophylls levels and decreasing A level. The de-epoxidation state (DEPS) of xanthophyll cycle by EBL was increased by 9.60% compared to $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ -stressed plant. Under $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ stress, EBL enhanced the NPQ and alleviated the decrease of Φ_{PSII} . EBL resulted in increases of unsaturated FAs levels, which was favored to the lipid membrane fluidity. These results strongly suggested that exogenous EBL is capable of protecting the chloroplast function through regulating the AsA-GSH cycle and heat dissipation capacity under $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ stress.

Keywords: 24-epibrassinolide; xanthophyll cycle; NPQ; AsA-GSH cycle; fatty acids; chloroplast

设施蔬菜生产中过量施入氮肥 ($> 1\ 000\ \text{kg} \cdot \text{hm}^{-2}$) 的现象比较普遍 (He et al., 2007), 因此土壤次生盐渍化是设施作物生产的主要限制因子之一。研究表明, 次生盐渍化土壤中 Ca^{2+} 占阳离子总量可达 60% 以上, 而 NO_3^- 达 67% ~ 76% (童有为和陈淡飞, 1991), 因此, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 积累是土壤次生盐渍化的主要原因。此外, 逆境条件会引起活性氧的累积, 进而损伤植物细胞结构、细胞代谢、基因表达和蛋白功能 (Apel & Hirt, 2004), 最终都会引起光合速率下降。非生物胁迫引起光吸收和光利用之间的失衡, 抑制了卡尔文—本森循环的活性。植物体本身具有阻止活性氧形成和清除过量活性氧的能力, 包括将吸收的多余光能转化为热量进行耗散和低分子量抗氧化物及抗氧化酶的抗氧化作用 (Logan, 2007), 进而减少氧化伤害, 增强耐性。

有很多研究证明外源油菜素内酯 (Brassinosteroids) 能够缓解盐害、高/低温胁迫、干旱胁迫、重金属胁迫及病原菌入侵等伤害 (Xia et al., 2011)。外源油菜素内酯能够参与活性氧代谢的调控, 诱导或抑制特定抗氧化物质相关基因表达, 提高多种抗氧化酶活性 (Cao et al., 2005; Mazorra et al., 2011)。前期研究证实外源油菜素内酯处理黄瓜能够缓解 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 积累引起的光合能力下降和碳氮代谢紊乱, 在一定程度上提高植株的营养转化 (Yuan et al., 2012a, 2012b, 2013)。但外源油菜素内酯通过何种途径保护植株光反应中心, 增强光合能力, 尚不明确。

本研究中采用盐敏感型黄瓜作为试验材料, 以叶绿体为对象, 研究外源油菜素内酯 (24-表油菜素内酯) 对 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 胁迫下叶绿体抗氧化能力及热耗散能力的保护机制, 为探讨其抗逆作用提供更多的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料培养与处理

试验于 2016 年 3 月—10 月在安徽农业大学实验基地进行。试验材料为黄瓜 (*Cucumis sativus* L.) 盐敏感型品种 ‘津优 4 号’ (束胜 等, 2010)。选取籽粒饱满整齐一致的种子, 在 $29\ ^\circ\text{C}$ 下催芽 24 h。发芽后播种到育苗盘中育苗, 昼温 (28 ± 1) $^\circ\text{C}$, 夜温 (18 ± 1) $^\circ\text{C}$ 。光合有效辐射 (PPFD) $400 \sim 800\ \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 相对湿度维持在 60% ~ 70%。第 2 片子叶展开后, 选取生长整齐一致的幼苗定植于盛有 1/2 Hoagland 营养液的栽培箱中进行培养。营养液溶解氧浓度为 $6 \sim 8\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 6.3 ± 0.1 , EC 值 $2.3 \sim 2.4\ \text{mS} \cdot \text{cm}^{-1}$ 。营养液每 2 d 更换一次。待幼苗长至四叶一心期进行处理。

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 胁迫浓度及 24-表油菜素内酯 (EBL) 的施用浓度根据前期研究结果 (Yuan et al., 2012a) 而定。EBL (Sigma-Aldrich, USA) 用低浓度乙醇 (0.01%) 溶解后用纯水定容。所有工作液 (包括对照) 含有相同浓度的乙醇。

每个处理 60 株幼苗, 设置 3 次重复。

4 个处理见表 1。 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 处理于定植 2 d 后向营养液中添加 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 直至浓度达到 $80 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。每天早上 8 时对幼苗叶面喷施 EBL 至有水滴滴下。处理 9 d 后取不同处理植株叶片测定植株光合器官的抗氧化能力、叶黄素组分及脂肪酸水平。

表 1 黄瓜植株的试验处理方法
Table 1 Foliage application methods in cucumber plants

处理 Treatment	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ / ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	EBL/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
对照 Control	0	0
EBL	0	0.1
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	80	0
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ + EBL	80	0.1

1.2 完整叶绿体的提取

根据 Shu 等 (2013) 的方法提取分离完整叶绿体。取完全展开功能叶 (30 g)，加入 60 mL 提取液，用匀浆机多次重复匀浆至无明显碎片，4 层纱布过滤，将滤液离心 2 min ($600 \times g$)，得到的上清液继续离心 3 min ($1\,500 \times g$)，沉淀用悬浮液悬浮。采用 Percoll 梯度离心的方法获得完整叶绿体。提取液和悬浮液成分参考 Shu 等 (2013)。利用氧电极法检测到叶绿体被膜完整性可达 85%。

1.3 叶绿体中各指标的测定

根据 Shu 等 (2013) 的方法测定叶绿体中 O_2^- 产生速率。根据 Du 和 Bramlage (1992) 的方法测定叶绿体内 MDA 的含量。按照 Costa 等 (2002) 的方法测定总抗坏血酸和还原型抗坏血酸的含量。采用 Baker 等 (1990) 的方法测定氧化型谷胱甘肽 (GSSG) 和还原型谷胱甘肽 (GSH) 的含量。

根据 Jiang 和 Zhang (2001) 的方法提取 AsA-GSH 循环酶，分别参照 Nakano 和 Asada (1981)、Foyer 和 Halliwell (1976)、Hossain 等 (1984) 和 Nakano 和 Asada (1981) 的方法，测定抗坏血酸过氧化物酶 (APX, EC 1.11.1.11)、谷胱甘肽还原酶 (GR, EC 1.6.4.2)、单脱氢抗坏血酸还原酶 (MDAR, EC 1.6.5.4) 和脱氢抗坏血酸还原酶 (DHAR, EC 1.8.5.1) 的活性。根据 Yuan 等 (2014) 的方法，利用高效液相色谱 (1200, 安捷伦) 分析叶绿体内叶黄素循环主要色素物质紫黄质 (V)、花药黄质 (A) 和玉米黄质 (Z) 的含量。按照 $(Z + A) / (V + A + Z)$ 的比值计算叶黄素循环脱环氧化态 (DEPS)。

根据 Zhang 和 Tian (2010) 的方法分离叶绿体膜质脂肪酸并进行测定。膜质的不饱和度采用双键指数 (DBI) 表示。 $\text{DBI} = [(\text{三烯脂肪酸的摩尔百分数} \times 3) + (\text{二烯脂肪酸的摩尔百分数} \times 2) + (\text{单烯脂肪酸的摩尔百分数})] / \Sigma (\text{饱和脂肪酸的总摩尔百分数})$ 。

1.4 光响应曲线的测定

利用 PAM 叶绿素荧光仪 (Walz, Effeltrich) 测定 NPQ 和 Φ_{PSII} 的光响应曲线。根据 Perkins 等 (2006) 的方法，选取第 3 片完全展开的功能叶，用不同强度 (0、25、50、100、200、300、500、700、1 200、1 600、1 900 和 2 300 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) 的卤素灯照射，每个光强水平持续照射 20 s。

2 结果与分析

2.1 叶绿体内超氧阴离子的产生速率和丙二醛含量

如表 2 所示，在正常条件下，EBL 处理对叶绿体内超氧阴离子 (O_2^-) 产生速率和丙二醛 (MDA) 含量无显著影响。在 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 胁迫下 O_2^- 产生速率和 MDA 含量分别比对照显著

表 2 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 和 EBL 处理对叶绿体 O_2^- 产生速率和 MDA 含量的影响
Table 2 Effects of $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ and/or EBL on O_2^- formation rate and MDA content in cucumber chloroplast

处理 Treatment	O_2^- / ($\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)	MDA / ($\text{nmol} \cdot \mu\text{g}^{-1}$)
对照 Control	$1.80 \pm 0.06 \text{ c}$	$14.23 \pm 1.58 \text{ c}$
EBL	$1.77 \pm 0.09 \text{ c}$	$12.38 \pm 0.62 \text{ c}$
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	$5.17 \pm 0.23 \text{ a}$	$25.20 \pm 1.58 \text{ a}$
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ + EBL	$3.13 \pm 0.20 \text{ b}$	$18.38 \pm 0.34 \text{ b}$

增加了 187.0%和 77.2%。外源 EBL 处理降低了 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 胁迫条件下 O_2^- 产生速率,减少了 MDA 的积累。

2.2 叶绿体内的抗坏血酸和谷胱甘肽含量

在正常条件下,单独施加 EBL 显著增加总抗坏血酸 (AsA + DHA)、还原型抗坏血酸 (AsA) 和氧化型抗坏血酸 (DHA) 含量。与对照相比, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 胁迫处理 AsA + DHA、AsA 含量和 AsA/DHA 比值显著降低 (表 3)。在胁迫条件下,EBL 处理显著增加了上述指标,分别是胁迫处理的 1.44 倍、2.44 倍和 2.83 倍。 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 胁迫引起氧化型抗坏血酸 (DHA) 含量增加,是对照处理的 1.38 倍,而 EBL 处理则降低了 DHA 含量。

表 3 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 和 EBL 处理对黄瓜叶绿体内抗坏血酸含量的影响
Table 3 Effects of $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ and/or EBL on ascorbate levels in chloroplast

处理 Treatment	总抗坏血酸/ ($\text{nmol} \cdot \mu\text{g}^{-1}$) AsA + DHA	还原型抗坏血酸/ ($\text{nmol} \cdot \mu\text{g}^{-1}$) AsA	氧化型抗坏血酸/ ($\text{nmol} \cdot \mu\text{g}^{-1}$) DHA	AsA/DHA
对照 Control	8.56 ± 0.04 b	5.92 ± 0.14 b	2.64 ± 0.10 c	2.25 ± 0.14 a
EBL	10.01 ± 0.46 a	6.68 ± 0.31 a	3.27 ± 0.11 b	2.01 ± 0.02 a
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	5.65 ± 0.57 c	2.10 ± 0.16 d	3.65 ± 0.22 a	0.60 ± 0.04 c
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ + EBL	8.15 ± 0.13 b	5.12 ± 0.10 c	3.03 ± 0.09 bc	1.70 ± 0.06 b

注: Duncan's 多重比较,不同处理间不同小写字母表示差异达显著水平 ($P < 0.05$)。

Note: Letters indicate significant differences at $P < 0.05$ according to Duncan's multiple range tests.

在正常条件下,单独施用 EBL 处理明显增加了还原型谷胱甘肽 (GSH) 含量。在 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 胁迫下,氧化型谷胱甘肽 (GSSG) 和总谷胱甘肽 (GSH + GSSG) 比对照显著增加,而 GSH 含量和 GSH/GSSG 比值则比对照显著下降 (表 4)。在 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 胁迫条件下,外源 EBL 处理后总谷胱甘肽含量和 GSH 含量分别比 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 胁迫处理增加了 22.08%和 139.96%,GSH/GSSG 比值也明显升高。

表 4 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 和 EBL 处理对黄瓜叶绿体内谷胱甘肽含量的影响
Table 4 Effects of $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ and/or EBL on glutathione levels in chloroplast

处理 Treatment	总谷胱甘肽/ ($\text{nmol} \cdot \mu\text{g}^{-1}$) GSH + GSSG	还原型谷胱甘肽/ ($\text{nmol} \cdot \mu\text{g}^{-1}$) GSH	氧化型谷胱甘肽/ ($\text{nmol} \cdot \mu\text{g}^{-1}$) GSSG	GSH/GSSG
对照 Control	14.38 ± 0.31 c	12.52 ± 0.32 c	1.86 ± 0.05 b	6.74 ± 0.31 b
EBL	16.90 ± 0.71 c	14.73 ± 0.67 b	2.16 ± 0.04 b	6.79 ± 0.17 b
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	20.83 ± 0.75 b	9.76 ± 0.19 d	11.07 ± 0.60 a	0.89 ± 0.04 c
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ + EBL	25.43 ± 0.64 a	23.42 ± 0.63 a	2.01 ± 0.21 b	11.92 ± 1.26 a

注: Duncan's 多重比较,不同处理间不同小写字母表示差异达显著水平 ($P < 0.05$)。

Note: Letters indicate significant differences at $P < 0.05$ according to Duncan's multiple range tests.

2.3 叶绿体中 AsA-GSH 循环酶活性

如图 1 所示,在正常条件下,单独 EBL 处理显著提高了叶绿体 AsA-GSH 循环中抗坏血酸氧化酶 (APX)、谷胱甘肽还原酶 (GR) 和脱氢抗坏血酸还原酶 (DHAR) 的活性。 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 胁迫下,单脱氢抗坏血酸还原酶 (MDHAR) 和 DHAR 活性分别比对照下降 50.99%和 17.57%;APX 活性比对照增加 55.40%,而 GR 活性无明显变化。 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 胁迫条件下,外源 EBL 处理显著增加该循环中的 APX、GR、MDHAR 和 DHAR 的活性,分别比胁迫处理增加 36.27%、105.83%、83.15%和 67.93%。

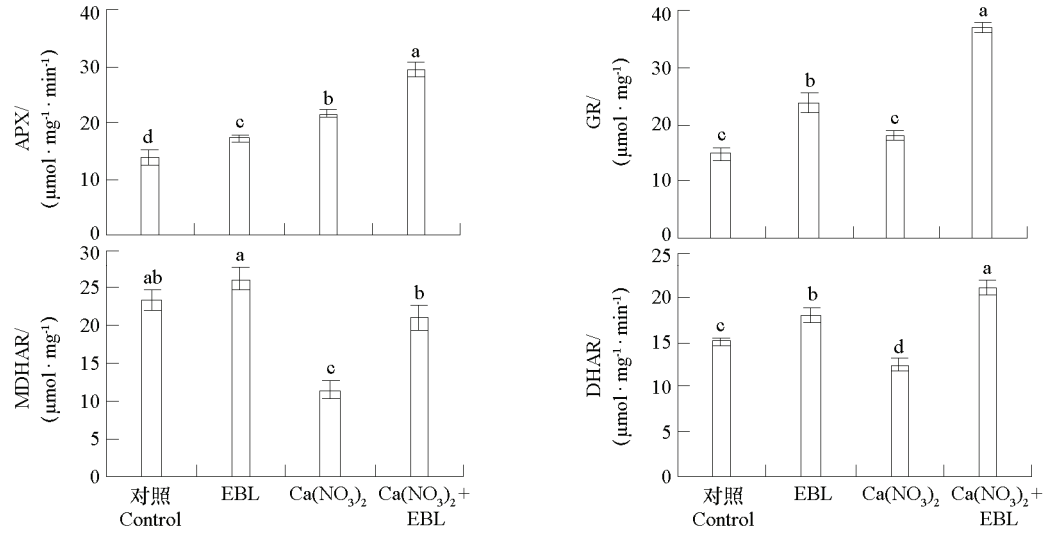


图 1 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 和 EBL 处理对黄瓜叶绿体内 AsA-GSH 循环酶活性的影响

Fig. 1 Effects of $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ and/or EBL on APX, GR, MDAR and DHAR activities in cucumber chloroplast

2.4 叶黄素循环组分和脱环氧化状态

如图 2 所示, 正常条件下, 单独 EBL 处理显著增加了叶黄素循环中紫黄质 (V)、玉米黄质 (Z) 和总叶黄素色素含量, 对花药黄质 (A) 无明显影响。与对照相比, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 胁迫导致 V、Z 和总

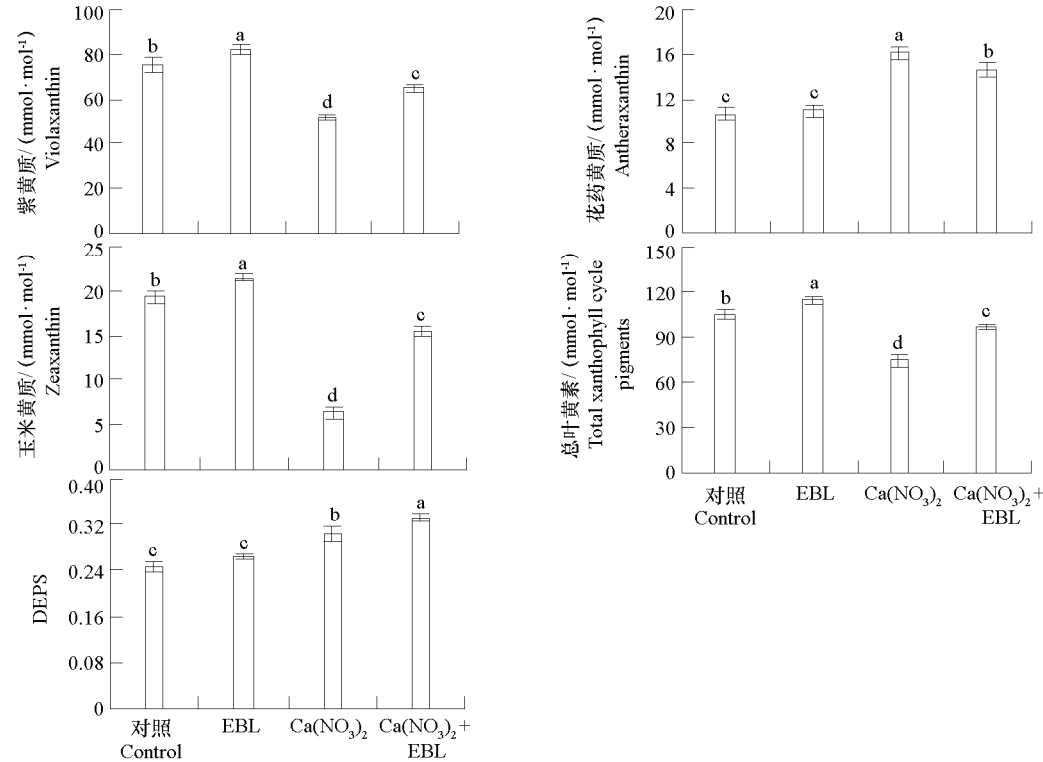


图 2 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 和 EBL 处理对黄瓜叶绿体内叶黄素组分和脱环氧化状态的影响

Fig. 2 Effects of $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ and/or EBL on xanthophyll cycle components and de-epoxidation state of xanthophyll cycle (DEPS) in cucumber chloroplast

叶黄素色素的含量显著下降,分别比对照减少了 30.70%、67.19%和 29.06%,而 A 含量上升了 51.72%。 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 胁迫下,外源 EBL 处理增加了 V、Z 和总叶黄素色素含量,减少了 A 的积累。

正常条件下,外源 EBL 单独处理对叶黄素脱环氧化状态 (DEPS),即 $(A + Z) / (A + Z + V)$ 无显著影响。 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 胁迫导致 DEPS 显著升高,比对照增加了 22.78%;外源 EBL 处理进一步增加了 DEPS,比胁迫处理增加了 9.60%。

2.5 NPQ 和 Φ_{PSII} 光响应曲线

所有处理植株叶片 NPQ 都随光照水平的升高而快速升高(图 3, A)。当达到一定光强时, NPQ 的增加速度减慢并逐渐达到稳定趋势。在低光强条件下 ($< 200 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$),所有处理的 NPQ 差异并不明显,与对照相比,单独 EBL 处理对 NPQ 没有影响。在较高光强下 ($> 200 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 胁迫下的 NPQ 值比对照显著减少。然而,不同光强 ($200 \sim 2300 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) 下,外源 EBL 处理显著增加了 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 胁迫下的 NPQ 。

与 NPQ 相反, Φ_{PSII} 随着光强度的增加表现出下降的趋势(图 3, B),在低光强条件下 ($< 200 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) 显著降低,随着光强的增加下降速率逐渐减缓,趋于平稳。与对照相比, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 处理显著降低了 Φ_{PSII} 。外源 EBL 处理缓解了 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 处理的下降,在较高的光照条件下 ($> 500 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) 效果更为明显。单独 EBL 处理对 Φ_{PSII} 没有影响。

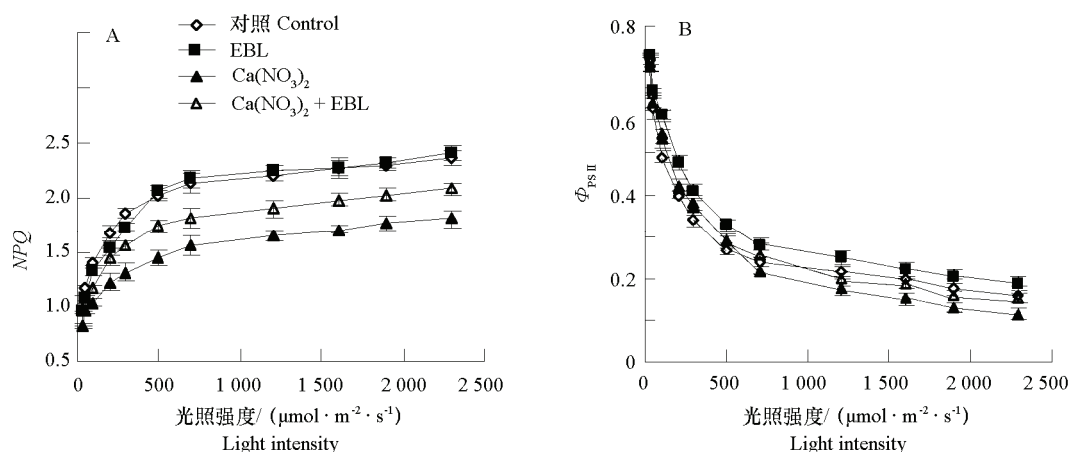


图 3 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 和 EBL 处理下黄瓜叶片 NPQ 和 Φ_{PSII} 的光响应曲线

Fig. 3 Light response curve for non-photochemical quenching (NPQ) and actual photochemical efficiency of PS II (Φ_{PSII}) of cucumber leaves exposed to $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ stress and/or EBL treatments

2.6 叶绿体膜系统中脂肪酸的变化

叶绿体膜系统的脂肪酸主要由棕榈酸 (C16:0)、十六烷酸 (C16:1)、硬脂酸 (C18:0)、油酸 (C18:1)、亚油酸 (C18:2) 和亚麻酸 (C18:3) 构成(表 5)。正常条件下,单独施加 EBL 处理使得不饱和脂肪酸油酸和亚油酸含量增加,进一步提高了膜质的不饱和度 (DBI)。与对照相比,在 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 胁迫下,叶绿体中极性脂质的不饱和脂肪酸十六烷酸、油酸、亚油酸和亚麻酸,以及 DBI 的水平显著降低,分别比对照减少了 64.59%、48.98%、34.58%、65.58%和 69.63%;而饱和脂肪酸棕榈酸和硬脂酸明显增加,分别是对照的 3.80 倍和 3.43 倍(表 5)。外源 EBL 处理将饱和脂肪酸转化为不饱和脂肪酸,从而提高了胁迫叶片的膜质不饱和度。

表 5 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 和 EBL 处理对黄瓜叶绿体膜质脂肪酸含量的影响
Table 5 Effects of $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ and/or EBL on fatty acid profile in chloroplast membrane

处理 Treatment	叶绿体膜质脂肪酸含量/% Fatty acid profile of polar lipids						膜质不饱和度 DBI
	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	
对照 Control	9.76 ± 0.73 c	8.50 ± 0.36 a	8.58 ± 0.22 c	12.27 ± 0.36 b	10.18 ± 0.35 c	50.72 ± 0.61 a	10.57 ± 0.37 b
EBL	8.20 ± 0.33 c	8.39 ± 0.29 a	7.54 ± 0.55 c	14.51 ± 0.22 a	13.02 ± 0.41 b	48.35 ± 1.37 a	12.43 ± 0.92 a
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	37.10 ± 0.74 a	3.01 ± 0.40 c	29.47 ± 0.71 a	6.26 ± 0.53 d	6.66 ± 0.46 d	17.46 ± 0.35 c	3.21 ± 0.35 d
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ + EBL	15.80 ± 1.14 b	5.31 ± 0.60 b	10.81 ± 0.33 b	8.09 ± 0.78 c	14.99 ± 0.42 a	45.04 ± 0.92 b	6.73 ± 0.24 c

3 讨论

本研究中, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 胁迫引起叶绿体膜质的氧化爆发, 释放大量的活性氧, 导致光合膜系统发生氧化伤害, 降低了光合器官 PS II 实际光化学效率。外源 EBL 处理显著缓解了 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 胁迫对叶绿体的氧化损伤。由此推论出, EBL 缓解叶绿体中的氧化胁迫主要通过 AsA-GSH 循环和叶黄素循环两种途径。

AsA-GSH 循环通过直接还原 O_2^- 的类囊体电子传递链复合体减少光合作用期间产生的活性氧。该循环作为抗氧化剂在氧化还原稳态中起关键作用, 以提高叶绿体抵抗非生物胁迫产生的氧化损伤 (Gullner et al., 2001)。在 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 胁迫下, 外源 EBL 处理增加了黄瓜叶绿体中的总抗坏血酸和谷胱甘肽水平, 特别是 AsA 和 GSH 含量。通过提高参与 AsA-GSH 循环的酶活性, 包括 APX、MDAR、DHAR 和 GR, 增加 AsA 和 GSH 的含量。EBL 处理增加的 AsA 能够直接清除 O_2^- , 并将 O_2^- 和 $\cdot\text{OH}$ 从生育酚自由基转化成生育酚 (Shao et al., 2007), 有效地减轻膜过氧化损伤。高水平的 GSH 作为抗氧化剂直接参与 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 胁迫产生的氧自由基的还原, 有利于降低氧化胁迫 (Srivalli & Khanna-Chopra, 2008)。在该循环中, GSH 不仅为 DHA 转化为 AsA 提供还原力, 而且对于 DNA 的合成和修复以及新合成蛋白质的折叠具重要作用 (Sečenji et al., 2010)。此外, 外源 EBL 处理增加的 AsA 和 GSH 也可能参与氧化胁迫下活性氧反应中次级产物的中和 (Asada, 2006)。除了叶绿体中 AsA 和 GSH 含量变化外, 这些分子的氧化还原态比值在各防御机制中也发挥关键作用。本研究中, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 胁迫抑制了抗氧化酶活性, 导致严重的氧化胁迫, GSH/GSSG 比值的下降可作为氧化胁迫的标志 (Mhamdi et al., 2010)。外源 EBL 通过增加 GSH 和 AsA 的含量, 减少 GSSG 和 DHA 的含量, 维持较高的 AsA/DHA、GSH/GSSG 比值。同时, GSH/GSSG 比值也可作为细胞内发生 DNA 复制信号传导的胁迫响应机制 (Russo et al., 2008)。该结果与 Szalai 等 (2009) 的研究结果一致。Szalai 等 (2009) 还发现, GSH/GSSG 和 AsA/GSH 的高比值可能是保护植物免受非生物胁迫产生的活性氧攻击的关键因素。

依赖叶黄素循环的非辐射能量耗散是植物长期进化过程中形成的抵抗光破坏、清除活性氧的一种主要途径 (陈新斌 等, 2012)。紫黄质、花药黄质和玉米黄质是类囊体膜蛋白复合体中叶黄素循环的主要成分。其主要功能是通过热耗散来保护叶绿体, 促进过剩能量及时转化 (Bukhov et al., 2001)。本研究中, 在 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 胁迫下, 施加外源 EBL 显著增加了紫黄质、花药黄质和玉米黄质库的总量, 特别是紫黄质和玉米黄质含量。EBL 处理显著增加了 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 胁迫下植株中玉米黄质的含量, 这可能是由于增加的紫黄质脱环氧活性, 从而增强紫黄质的脱环氧化 (Li et al., 2009)。紫黄质脱环氧化酶的活化可能是光合质子泵产生的高 ΔH^+ 激活了非光化学猝灭的产生 (García-Plazaola et al., 2012)。增加的玉米黄质含量可直接耗散过量的激发能或在不同的猝灭位点稳定放大 NPQ (Gruszecki et al., 2006; Jahns & Holzwarth, 2012)。外源 EBL 不仅增加了紫黄质、花药黄质和玉

米黄质库含量, 而且产生了较高的叶黄素脱环氧化态, 从而增强叶黄素循环活性耗散过剩光能, 从而保护光合作用正常进行。 NPQ 能在 PS II 中进行热耗散, 防止过量单线态激发叶绿素的形成 (Lavaud et al., 2002)。除此之外, EBL 处理提高的 NPQ 活性也可能使 LHC 和 PS II 反应中心中 $^1\text{O}_2$ 的含量下降 (Horton et al., 1994)。该结果由 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 胁迫条件下 EBL 处理的叶绿体缓解的氧化胁迫间接证明。

在植物体中, 膜结构及流动性受脂质组成和脂肪酸去饱和度的影响 (Mikami & Murata, 2003)。膜的流动性可影响膜质的双层透性、ATP 酶活性和介质转运。在本研究中, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 胁迫降低了膜质的不饱和度, 这是由于光氧化产生的活性氧可以损害膜完整性, 导致类囊体中不饱和脂肪酸链的过氧化 (Triantaphylides et al., 2008)。许多研究表明不饱和脂肪酸含量的增加可以提高植物对环境耐受性, 如冷、热和干旱的胁迫 (Sui et al., 2007; Liu et al., 2008)。本研究中, 外源 EBL 处理显著增加了叶绿体膜系统中的不饱和脂肪酸含量, 这降低了 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 胁迫下光合膜结构的氧化损伤。

总之, 研究表明外源 EBL 处理有效地增强了 AsA-GSH 循环抗氧化剂含量和抗氧化酶活性, 从而增加活性氧清除能力。同时, EBL 处理加速了叶黄素循环的去环氧化状态, 增强过量激发能的热耗散, 从而保护 PS II 反应中心免于过量激发能产生的氧化胁迫损伤。以上结果表明, EBL 处理增强的 AsA-GSH 循环与叶黄素循环发生协同作用以抵抗氧化胁迫, 保护膜质中的不饱和脂肪酸免于过氧化损伤, 在一定程度上维持了光合膜系统的完整性。

References

- Apel K, Hirt H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55: 373 - 399.
- Asada K. 2006. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology*, 141: 391 - 396.
- Baker M A, Cerniglia G J, Zaman A. 1990. Microtiter plate assay for the measurement of glutathione and glutathione disulfide in large numbers of biological samples. *Analytical Biochemistry*, 190: 360 - 365.
- Bukhov N G, Heber U, Wiese C, Shuvalov V A. 2001. Energy dissipation in photosynthesis: does the quenching of chlorophyll fluorescence originate from antenna complexes of photosystem II from the reaction center? *Planta*, 212: 749 - 758.
- Cao S, Xu Q, Cao Y, Qian K, An K, Zhu Y, Binzeng H, Zhao H, Kuai B. 2005. Loss of function mutation in DET2 gene lead to an enhanced resistance to oxidative stress in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 123: 57 - 66.
- Chen Xinbin, Sun Jin, Guo Shirong, Lu Xiaomin, He Lizhong, Yan Bei. 2012. Effects of the dithiothreitol on activate oxygen metabolism and chlorophyll fluorescences in spinach leaves under seawater stress. *Acta Horticulturae Sinica*, 39 (1): 2457 - 2467. (in Chinese)
- 陈新斌, 孙 锦, 郭世荣, 陆晓民, 何立中, 严 蓓. 2012. 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. *园艺学报*, 39 (12): 2457 - 2467.
- Costa H, Gallego S M, Tomaro M L. 2002. Effect of UV-B radiation on antioxidant defense system in sunflower cotyledons. *Plant Science*, 162: 939 - 945.
- Du Z, Bramlage W J. 1992. Modified thiobarbituric acid assay for measuring lipid peroxidation in sugar rich plant tissue extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40: 1566 - 1570.
- Foyer C H, Halliwell B. 1976. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta*, 133: 21 - 25.
- García-Plazaola J I, Esteban R, Fernándezmarín B, Kranner I, Porcarcastell A. 2012. Thermal energy dissipation and xanthophyll cycles beyond the *Arabidopsis* model. *Photosynthesis Research*, 113: 89 - 103.
- Gruszecki W I, Grudziński W, Gospodarek M, Patyra M, Maksymiec W. 2006. Xanthophyll-induced aggregation of LHCII as a switch between

- light-harvesting and energy dissipation system. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 1757: 1504 – 1511.
- Gullner G, Kómvics T, Rennenberg H. 2001. Enhanced tolerance of transgenic poplar plants overexpressing gamma-glutamylcysteine synthetase towards chloroacetanilide herbicides. *Journal of Experimental Botany*, 52: 971 – 979.
- He F F, Chen Q, Jiang R F, Chen X P, Zhang F S. 2007. Yield and nitrogen balance of greenhouse tomato (*Lycopersium esculentum* Mill.) with conventional and site-specific nitrogen management in northern China. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 77: 1 – 14.
- Horton P, Ruban A V, Walters R G. 1994. Regulation of light harvesting in green plants. Indication by nonphotochemical quenching of chlorophyll fluorescence. *Plant Physiology*, 106: 415 – 420.
- Hossain M A, Nakano Y, Asada K. 1984. Monodehydroascorbate reductase in spinach chloroplasts and its participation in the regeneration of ascorbate for scavenging hydrogen peroxide. *Plant and Cell Physiology*, 25: 385 – 395.
- Jahns P, Holzwarth A R. 2012. The role of xanthophyll cycle and of lutein in photoprotection of photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1817: 3 – 14.
- Jiang M, Zhang J. 2001. Effect of abscisic acid on active oxygen species, antioxidative defence system and oxidative damage in leaves of maize seedlings. *Plant and Cell Physiology*, 42: 1265 – 1273.
- Lavaud J, Rousseau B, van Gorkom H J, Etienne A L. 2002. Influence of the diadinoxanthin pool size on photoprotection in the marine planktonic diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Physiology*, 129: 1398 – 1406.
- Li Z R, Wakao S, Fischer B B, Niyogi K K. 2009. Sensing and responding to excess light. *Annual Review of Plant Biology*, 60: 239 – 260.
- Liu X Y, Li B, Yang J H, Sui N, Yang X M, Meng Q W. 2008. Overexpression of tomato chloroplast omega-3 fatty acid desaturase gene alleviates the photoinhibition of photosystems 2 and 1 under chilling stress. *Photosynthetica*, 46: 185 – 192.
- Logan B A. 2007. Oxygen metabolism and stress physiology // Robert R Wise, Kenneth J. Hoober. The structure and function of plastids. Verlag New York: Springer, 539 – 553.
- Mazorra L M, Holton N, Bishop G J, Núñez M. 2011. Heat shock response in tomato brassinosteroid mutants indicates that thermotolerance is independent of brassinosteroid homeostasis. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49: 1420 – 1428.
- Mhamdi A, Hager J, Chaouch S, Queval G, Han Y, Taconnat L, Saindrenan P, Gouia H, Issakidis-Bourguet E, Renou J P, Noctor G. 2010. Arabidopsis GLUTATHIONE REDUCTASE 1 plays a crucial role in leaf responses to intercellular H_2O_2 and in ensuring appropriate gene expression through both salicylic acid and jasmonic acid signaling pathways. *Plant Physiology*, 153: 1144 – 1160.
- Mikami K, Murata N. 2003. Membrane fluidity and the perception of environmental signals in cyanobacteria and plants. *Progress in Lipid Research*, 42: 527 – 543.
- Nakano Y, Asada K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, 22: 679 – 690.
- Perkins R G, Mouget J L, Lefebvre S, Lavaud J. 2006. Light response curve methodology and possible implications in the application of chlorophyll fluorescence to benthic diatoms. *Marine Biology*, 149 (4): 703 – 712.
- Russo M, Sgherri C, Izzo R, Navari-Izzo F. 2008. *Brassica napus* subjects to copper excess: phospholipases C and D and glutathione system in signaling. *Environmental and Experimental Botany*, 62: 238 – 246.
- Sečenji M, Hideg E, Bebes A, Györgyey J. 2010. Transcriptional differences in gene families of the ascorbate-glutathione cycle in wheat during mild water deficit. *Plant Cell Reports*, 29: 37 – 50.
- Shao H B, Guo Q J, Chu L Y, Zhao X N, Su Z L, Hu Y C, Cheng J F. 2007. Understanding molecular mechanism of higher plant plasticity under abiotic stress. *Colloids & Surfaces B Biointerfaces*, 54: 37 – 45.
- Shu Sheng, Sun Jin, Guo Shirong, Li Juan, Liu Chaojie, Wang Changyi, Du Changxia. 2010. Effects of exogenous putrescine on PSII 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 PSII 光化学特性和体内离子分布的影响. *园艺学报*, 37 (7): 1065 – 1072.
- Shu S, Yuan L Y, Guo S R, Sun J, Yuan Y H. 2013. Effects of exogenous spermine on chlorophyll fluorescence antioxidant system and ultrastructure of chloroplasts in *Cucumis sativus* L. under salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 63: 209 – 216.

- Srivalli S, Khana-Chopra R. 2008. Role of glutathione in abiotic stress to tolerance // Khan NA, Singh S, Umar S. Sulfur assimilation and abiotic stress in plants. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 207 - 225.
- Sui N, Li M, Zhao S J, Li F, Liang H, Meng Q W. 2007. Overexpression of glycerol-3-phosphate acyltransferase gene improves chilling tolerance in tomato. *Planta*, 226: 1097 - 1108.
- Szalai G, Kellos T, Galiba G, Kocsy G. 2009. Glutathione as an antioxidant and regulatory molecule in plants under abiotic stress conditions. *Journal of Plant Growth Regulation*, 28: 66 - 80.
- Tong Youwei, Chen Danfei. 1991. Study on the cause and control of secondary saline soils in greenhouse. *Acta Horticulturae Sinica*, 18 (2): 159 - 162. (in Chinese)
- 童有为, 陈淡飞. 1991. 温室土壤次生盐渍化的形成和治理途径研究. *园艺学报*, 18 (2): 159 - 162.
- Triantaphylides C, Krischke M, Hoeberichts F A, Ksas B, Gresser G, Havaux M, Van Breusegem F, Mueller M J. 2008. Singlet oxygen is the major reactive oxygen species involved in photooxidative damage to plants. *Plant Physiology*, 148: 960 - 968.
- Xia X J, Zhou Y H, Ding J, Shi K, Asami T, Chen Z, Yu J Q. 2011. Induction of systemic stress tolerance by brassinosteroid in *Cucumis sativus*. *New Phytologist*, 191: 706 - 720.
- Yuan L Y, Shu S, Sun J, Guo S R, Tezuka T. 2012a. Effects of 24-epibrassinolide on the photosynthetic characteristics, antioxidant system, and chloroplast ultrastructure in *Cucumis sativus* L. under $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ stress. *Photosynthesis Research*, 112: 205 - 214.
- Yuan L Y, Yuan Y H, Du J, Sun J, Guo S R. 2012b. Effects of 24-epibrassinolide on nitrogen metabolism in cucumber seedlings under $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 61: 29 - 35.
- Yuan L Y, Du J, Yuan Y H, Shu S, Sun J, Guo S R. 2013. Effects of 24-epibrassinolide on ascorbate-glutathione cycle and polyamine levels in cucumber roots under $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35: 253 - 262.
- Yuan Y H, Shu S, Li S H, He L Z, Li H, Du N S, Sun J, Guo S R. 2014. Effects of exogenous putrescine on chlorophyll fluorescence imaging and heat dissipation capacity in cucumber (*Cucumis sativus* L.) under salt stress. *Journal of Plant Growth Regulation*, 33: 798 - 808.
- Zhang C F, Tian S P. 2010. Peach fruit acquired tolerance to low temperature stress by accumulation of linolenic acid and N-acylphosphatidylethanolamine in plasma membrane. *Food Chemistry*, 120: 864 - 872.

征订

欢迎订阅《园艺学报》

《园艺学报》是中国园艺学会和中国农业科学院蔬菜花卉研究所主办的学术期刊,创刊于1962年,刊载有关果树、蔬菜、观赏植物、茶及药用植物等方面的学术论文、研究报告、专题文献综述、问题与讨论、新技术新品种以及园艺研究动态与信息,适合园艺科研人员、大专院校师生及农业技术推广部门专业技术人员阅读参考。

《园艺学报》是中文核心期刊,中国科技核心期刊;被英国《CAB文摘数据库》、美国CA化学文摘、日本CBST科学技术文献速报、俄罗斯AJ文摘杂志、CSCD中国科学引文数据库等多家数据库收录。《园艺学报》荣获“第三届全国期刊奖”及“新中国60年有影响力的期刊”、“中国国际影响力优秀学术期刊”、“百种中国杰出学术期刊”、“中国权威学术期刊”、“中国精品科技期刊”等称号。

《中国学术期刊影响因子年报》2016年公布的《园艺学报》复合总被引频次为11 045,复合影响因子为1.345。

《中国科技期刊引证报告》核心版2016年公布的《园艺学报》核心总被引频次为4 552,核心影响因子为1.060,均为学科第1位,在全国1 985种核心期刊中排名第8位。

《园艺学报》为月刊,每月25日出版。每期定价48元,全年576元。国内外公开发行,全国各地邮局办理订阅,国内邮发代号82-471,国外发行由中国国际图书贸易总公司承办,代号M448。漏订者可直接寄款至编辑部订购。编辑部地址:北京市海淀区中关村南大街12号中国农业科学院蔬菜花卉研究所《园艺学报》编辑部。

邮政编码:100081;电话:(010) 82109523。E-mail: yuanxuebao@126.com。网址: <http://www.ahs.ac.cn>。