

# 水杨酸对高温强光胁迫下小麦叶片光合机构的保护作用

王林华, 梁书荣, 吕淑敏, 赵会杰\*, 曲小菲, 刘魏魏  
(河南农业大学 生命科学学院 河南 郑州 450002)

**摘要:** 以 0.1、0.3、0.5 mmol/L 的水杨酸(SA)预先处理灌浆期的小麦叶片, 然后进行不同温度和光照处理, 探讨水杨酸对高温强光胁迫下小麦叶片 *psbA* 基因表达和 PS II 功能的影响。结果表明, 叶面喷施水杨酸可有效调节抗氧化酶 SOD、APX 的活性, 降低叶片 MDA 的含量, 维持较高的光合速率(*Pn*), 减轻逆境对光合机构的破坏。RT-PCR 分析结果也显示, 水杨酸可以促进小麦 *psbA* 基因的表达。其中, 以 0.3 mmol/L 的水杨酸效果最好。

**关键词:** 小麦; 水杨酸; 高温强光胁迫; *psbA* 基因; 光合作用

**中图分类号:** S512.1      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1004-3268(2010)04-0021-05

## Protective Effect of SA on Photosynthetic Apparatus of Wheat Leaves under Heat and High Irradiance Stress

WANG Lin-hua, LIANG Shu-rong, LÜ Shu-min, ZHAO Hui-jie\*, QU Xiao-fei, LIU Wei-wei  
(College of Life Sciences, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:** In order to elucidate the protective mechanism of salicylic acid (SA) on photosynthetic apparatus of wheat leaves under heat and high irradiance stress, the leaves of wheat were sprayed with solution of SA at grain-filling stage and exposed to different temperature and irradiance conditions. Afterwards, the effect of SA on *psbA* gene and photosystem II (PS II) performance of wheat leaves were studied. The results showed that pretreatment with SA enabled the wheat leaves to keep relatively high activities of superoxide dismutase (SOD) and ascorbate peroxidase (APX), lower malondialdehyde (MDA) content and higher *Pn*. Analysis of RT-PCR indicated that SA pretreatment can increase the expression of *psbA* gene. Comparatively, the concentration of 0.3 mmol/L of SA was the most efficient.

**Key words:** Wheat; SA; Heat and high irradiance stress; *psbA* gene; Photosynthesis

小麦属于喜凉作物, 然而, 在决定小麦产量和品质形成的灌浆期, 常常遭遇高温和强光的双重胁迫, 高温和强光导致小麦光合机构破坏, 叶片功能过早衰退, 有机营养匮乏, 籽粒发育受阻, 造成严重的产量下降和品质变劣<sup>[1]</sup>。关于小麦光合作用光抑制机制研究已有大量报道, 但如何采取防护措施来减轻或避免强光的破坏作用, 目前研究相对较少。水杨

酸(salicylic acid, SA)即邻羟基苯甲酸, 是一种简单的酚类化合物, 在植物体内参与多种代谢的调控, 被认为是一种新型的植物激素, 对提高植物抗逆性具有重要的作用<sup>[2,3]</sup>。一些试验结果表明, SA 不仅能诱导植物抵抗真菌、细菌和病毒等生物胁迫, 而且还可以诱导植物对高温、低温、水分亏缺、重金属和盐害等非生物胁迫产生一定的抗(耐)性<sup>[4]</sup>。因此,

收稿日期: 2009-12-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(30671214)

作者简介: 王林华(1977-), 女, 河南南阳人, 在读硕士研究生, 研究方向: 植物生理学。E-mail: wanglinhua1977@163.com

\*通讯作者: 赵会杰(1958-), 男, 河南尉氏人, 教授, 博士, 主要从事作物生理生态研究。

研究高温和强光胁迫下外施水杨酸对小麦光合机构的防护效应及其作用机制,可以为生产中采取抗逆应变技术提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试材料及处理

以小麦(*Tritivum aestivum*)品种豫农949为试验材料。采用盆栽方法培养,盆高40 cm,内径40 cm,盆内装入河南农业大学科教园区的耕层潮土20 kg。10月15日播种,播种后将盆埋入试验田土中,共240盆,出苗后每盆留苗3株。采取常规管理措施。于灌浆期(开花后20 d)以不同的喷液处理麦株,3 d后将盆带回实验室进行温、光处理。

试验设4个处理:(1)CK:喷水预处理植株;(2)SA1:以0.1 mmol/L的水杨酸预处理植株;(3)SA2:以0.3 mmol/L的水杨酸预处理植株;(4)SA3:以0.5 mmol/L的水杨酸预处理植株。人工气候室设2种温度和光强:适温中光(25℃, PFD为600  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ );高温强光(36℃, PFD为1800  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ )。

光照前各处理经过12 h的暗适应,高照度光由1000 W钨灯提供。在人工气候室中设置一铁架,放置10 cm厚的有机玻璃流动水槽(钨灯与材料之间),以避免灯下温度过高,通过调节材料与光源的距离,使小麦旗叶接收的光强达到设计要求。于高温强光处理的0 h(处理前)、1 h、2 h取旗叶作为样品,然后置于适温中光下暗恢复3 h,再次取样测定。每个处理重复5次,每个重复取3株,所取旗叶样品一部分用于生理指标测试,另一部分立即保存于液氮中用于随后的半定量RT-PCR检测。

### 1.2 半定量RT-PCR检测

1.2.1 引物设计与合成 为了使结果标准化,以小麦18S rRNA基因(NCBI登录号:AJ272181)的相对丰度作为内参。18S rRNA基因引物序列为18S rRNA-f: 5'-CAAGCCATCGCTCTGGATACATT-3'; 18S rRNA-r: 5'-CCTGTATTGCCTCAAACCTTCC-3'<sup>[4]</sup>。根据NCBI上小麦的*psbA*基因(NCBI登录号:NC002762)序列,利用DNASTar软件设计了1对特异性引物,序列如下,psbA-f: 5'-ACTAGCACTGAAAATCGTCT-3'; psbA-r: 5'-TTACGTTTCGTGCATTACTTC-3'。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2.2 总RNA的提取及纯化 将采集的旗叶用液氮研磨,参照Trizol试剂盒(购自Invitrogen公

司)说明书提取RNA并纯化,经1%琼脂糖凝胶电泳鉴定RNA的提取效果,260/280 nm吸光值测定RNA浓度和纯度。检测合格后的RNA用于其后的试验操作。

1.2.3 cDNA的合成 根据测定的RNA浓度结合电泳结果,准确调整反转录RNA的量。用Fermentas反转录试剂盒反转录合成cDNA第1链,cDNA合成总反应体系为20  $\mu\text{L}$ ,总RNA(1 g/L)2  $\mu\text{L}$ ,RNase free ddH<sub>2</sub>O 9  $\mu\text{L}$ ,random hexamer primer 1  $\mu\text{L}$ ,混匀后65℃反应5 min,然后迅速置冰上冷却,再加入dNTP mix(10 mmol/L)2  $\mu\text{L}$ ,RT缓冲液4  $\mu\text{L}$ ,RNase inhibitor 1  $\mu\text{L}$ (20 U/ $\mu\text{L}$ ),M-MuLV反转录酶(200 U/ $\mu\text{L}$ )1  $\mu\text{L}$ 。混匀,短暂离心,25℃反应5 min,42℃反应1 h,70℃反应5 min,终止反应。RT产物于立即进行PCR或于-20℃保存。

1.2.4 PCR反应 以合成的cDNA为模板用上述引物进行PCR,扩增程序为94℃预变性3 min;94℃变性30 s,60℃退火30 s,72℃延伸1 min,30个循环;72℃延伸10 min,4℃保存。18S rRNA和*psbA*基因转录本扩增的长度分别为658 bp和941 bp。PCR产物用1%琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭(EB)染色后,拍照,用UVBand紫外-可见分光光度计计算机软件对电泳条带进行灰度分析。

### 1.3 超氧化物歧化酶(SOD)活性的测定

SOD活性测定采用氮蓝四唑(NBT)光氧化还原法<sup>[6]</sup>,以抑制NBT光氧化还原50%的酶用量为1个酶活性单位。

### 1.4 抗坏血酸过氧化物酶(APX)活性的测定

APX活性测定采用紫外吸收法<sup>[7]</sup>,以每1 min OD<sub>290</sub>减少0.1为1个酶活性单位。

### 1.5 丙二醛(MDA)含量的测定

MDA含量用硫代巴比妥酸(TBA)反应法<sup>[8]</sup>测定。

### 1.6 光合速率(Pn)的测定

光合速率用Chlorolab-2氧电极系统(英国Hansatech公司产)测定<sup>[9]</sup>。上述测定均重复5次,取平均值进行结果分析。

### 1.7 数据统计分析

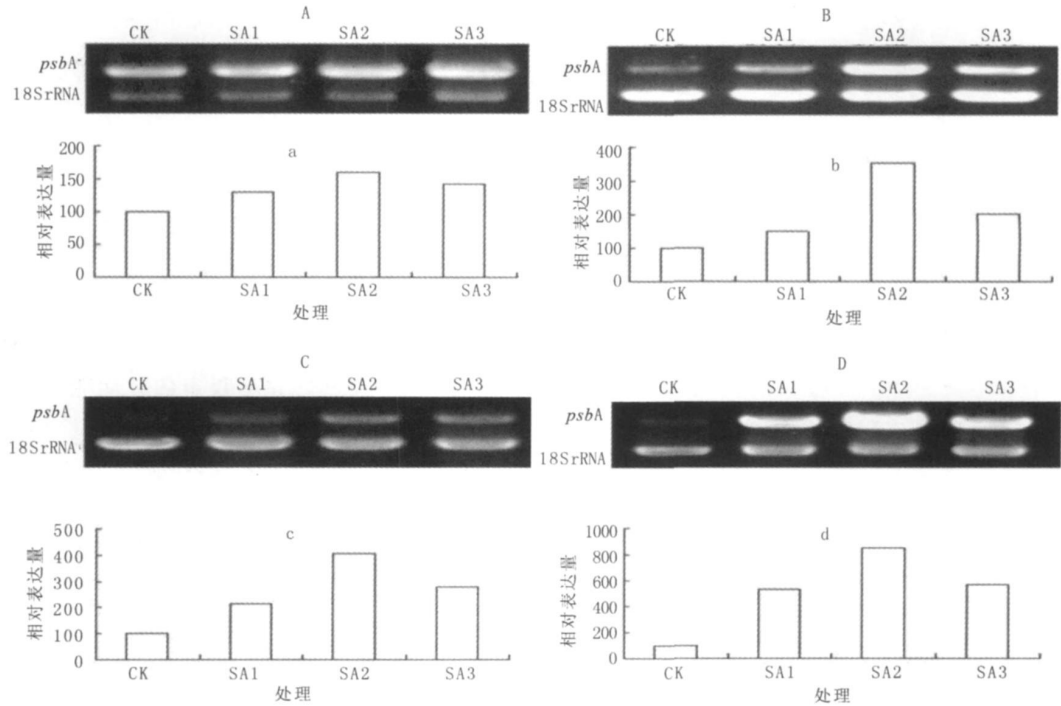
以Excel处理数据和绘制图表。用DPS(Data Processing System)软件进行方差分析。用UV-Band紫外-可见分光光度计计算机软件对RT-PCR结果进行相对定量分析。

2 结果与分析

2.1 水杨酸对高温强光胁迫下小麦叶片 *psbA* 基因表达的影响

由图 1 A、B、C 和 D 可以看出, 在适温中光下, SA1、SA2、SA3 *psbA* 基因表达量和 CK 相比差异不显著, 只略高于 CK 的表达; 在高温强光胁迫 1h 后, SA1、SA2、SA3 和 CK 的表达量都降低, CK 降低明显; 高温强光胁迫 2h 后, SA1、SA2、SA3 和 CK 的表达量进一步降低, CK 的表达量很微弱; 高温强光胁迫 2h 后再适温中光恢复 3h, SA1、SA2 和 SA3 的表达量有所回升, CK 的表达恢复不明显。定量

分析结果(图 1 a、b、c、d)表明, 适温中光下, SA1、SA2 和 SA3 的相对表达量比 CK 分别高 29.9%、59.8%和 42%; 高温强光 1h 后, SA1、SA2 和 SA3 的相对表达量比 CK 分别高 47.9%、253.4%和 102.6%; 高温强光 2h 后, SA1、SA2 和 SA3 的相对表达量比 CK 分别高 113.5%、306.2%和 179.0%; 高温强光 2h, 然后适温中光恢复 3h, SA1、SA2 和 SA3 的表达量比 CK 分别高 428.7%、752.0%和 468.2%。从以上分析可以得出, 在高温强光胁迫下, 水杨酸可以减缓 *psbA* 基因转录水平的降低, 适温中光恢复时, 水杨酸可加快恢复 *psbA* 基因的转录水平, 其中, 以喷施 0.3mmol/L 水杨酸的效果最好。



A. 适温中光下 *psbA* 基因的 RT-PCR; a. *psbA* 基因在适温中光下的相对表达量; B. 高温强光 1h 后 *psbA* 基因的 RT-PCR; b. *psbA* 基因在高温强光 1h 后的相对表达量; C. 高温强光 2h 后 *psbA* 基因的 RT-PCR; c. *psbA* 基因在高温强光 2h 后的相对表达量; D. 高温强光 2h, 然后暗恢复 3h *psbA* 基因的 RT-PCR; d. *psbA* 基因在高温强光 2h, 然后暗恢复 3h 的相对表达量

图 1 外源水杨酸对高温强光胁迫下 *psbA* 基因表达的影响

2.2 水杨酸对高温强光胁迫下小麦叶片 SOD 活性的影响

由图 2 可看出, 在高温强光胁迫下, SOD 活性都呈现出先增加后降低的趋势, 适温中光恢复 3h 后, SOD 活性又有所回升。叶面喷施 SA 在 SOD 活性上升阶段起促进的作用, 照光 2h 时, 由于部分酶蛋白因高温强光变性, SOD 活性开始下降, SA 处理小麦叶片有效抑制了 SOD 活性下降。适温中光恢复 3h 后, 叶面喷施 SA 的 SOD 活性均高于 CK, 有效清除了在高温强光逆境中产生的活性氧自由基。

其中, 以喷施 0.3mmol/L 水杨酸的效果最好。

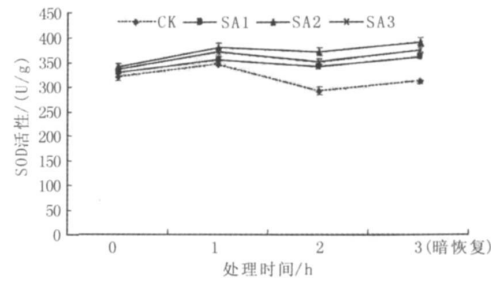


图 2 外源水杨酸对不同处理小麦叶片 SOD 活性的影响

2.3 水杨酸对高温强光胁迫下小麦叶片 APX 活性的影响

由图 3 可看出,在高温强光胁迫下,APX 活性呈现先增加后降低趋势,且增降幅度较大,适温中光 3h 恢复后 APX 活性又有所回升。叶面喷施水杨酸在 APX 活性上升阶段起促进作用,在 APX 活性下降阶段又起一定的抑制作用。适温中光恢复后,叶面喷施水杨酸的处理,APX 活性均比 CK 恢复快,已达 CK 水平。水杨酸处理通过调节高温强光胁迫下小麦叶片保护酶活性,增强了其在逆境条件下清除自由基的能力,且后效作用明显。其中,以喷施 0.3 mmol/L 的水杨酸的效果最好。

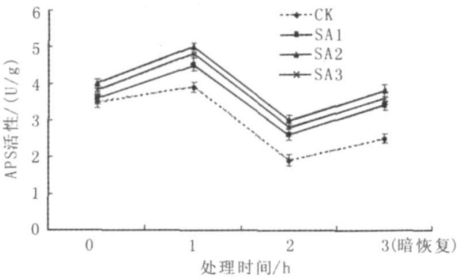


图 3 外源水杨酸对不同处理小麦叶片 APX 活性的影响

2.4 水杨酸对高温强光胁迫下小麦叶片 MDA 含量的影响

由图 4 看出,在高温强光下,MDA 含量随胁迫程度加深而剧烈增加,适温中光 3h 恢复后均有所下降。与 CK 相比,水杨酸的 MDA 含量一直较低,在高温强光胁迫下,照光 1h、2h 水杨酸预处理的 MDA 含量均低于 CK,差异显著( $P < 0.05$ )。叶面喷施水杨酸适温中光 3h 恢复后 MDA 含量迅速下降,水杨酸处理有效抑制了逆境所致的膜脂过氧化程度,降低了膜透性,减小了高温强光引起的质膜氧化损伤程度。其中,以喷施 0.3 mmol/L 的水杨酸的效果最好。

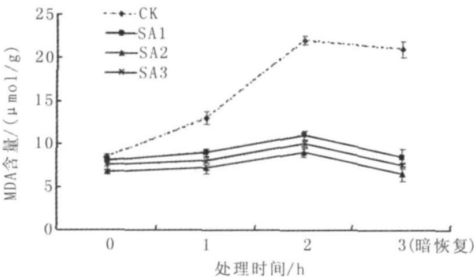


图 4 外源水杨酸对不同处理小麦叶片 MDA 含量的影响

2.5 水杨酸对高温强光胁迫下小麦叶片 Pn 的影响

由于光合机构在强光胁迫下受抑制,因此引起了 Pn 的变化。从图 5 可看出, Pn 含量均是先降低,胁迫 2h 时, Pn 的含量降低最快,适温中光恢复 3h 后都有所回升。与 CK 相比,喷水杨酸的降低趋势缓慢,其 Pn 均大于 CK,这说明水杨酸能有效抑制强光胁迫带来的负面影响,从而维持较高的 Pn。其中,以喷施 0.3 mmol/L 的水杨酸效果最好。

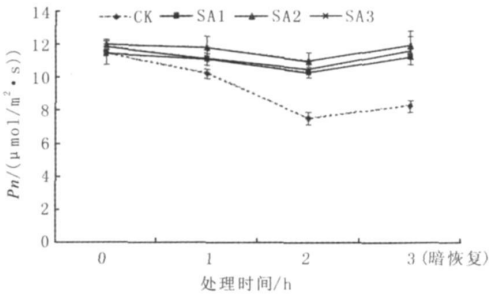


图 5 外源水杨酸对不同处理小麦叶片 Pn 的影响

3 结论与讨论

植物光合机构吸收太阳能,通过一系列复杂的光化学反应将其转化为稳定的化学能。然而,在很多情况下,植物光合机构所接受的能量都要超过其所能转化的能量<sup>[9]</sup>。因此,在强光下能导致光合作用的光抑制甚至是光破坏。光抑制可以导致活性氧的产生,它们不但可以破坏细胞膜增加其透性,还能作用于 PS II 反应中心,从而产生光抑制甚至光破坏。

许多研究表明,逆境对光合机构破坏的关键部位是叶绿体 PS II 反应中心<sup>[10]</sup>,其中又以 D1 蛋白最为敏感,位于 PS II 反应中心的 D1 蛋白不仅能够为各种辅助因子提供结合位点,维持 PS II 反应中心构象稳定,而且还和原初电荷分离和传递有关。D1 蛋白的破坏不仅会导致 PS II 反应中心构象变化,还会引起电子传递受阻,导致 PS II 反应中心破坏<sup>[11, 12]</sup>。而且,在强光照下,PS II 复合体的损伤主要在于 PS II 反应中心 D1 蛋白的降解,而损伤的速率直接与光强有关,因此, D1 蛋白翻译的调控受光强影响<sup>[13]</sup>。PS II 复合体的修复包括受损 D1 蛋白的降解以及新合成 D1 蛋白的插入<sup>[14, 15]</sup>,而 *psbA* 基因 mRNA 的翻译是 D1 蛋白合成的关键调控步骤<sup>[16-18]</sup>,所以 *psbA* 基因与 D1 蛋白的降解和合成有关。提高 *psbA* 基因的表达,有利于 D1 蛋白的合成。

本试验结果表明,外源水杨酸能够增强小麦的抗逆性,减轻高温强光逆境条件下小麦的光抑制。作为植物内源活性氧清除剂,SOD 和 APX 在清除活性氧自由基过程中发挥着极为重要的作用。与 CK 相比,喷施适宜的水杨酸可以使 SOD、APX 的活性提高,减小自由基对细胞的伤害,降低 MDA 的含量,维持较高的  $P_n$ ,提高 *psbA* 基因的表达,从而起到了对光和机构的保护作用。比较不同浓度水杨酸对增强小麦植株抗氧化活性和光合性能的效果可以看出,以 SA2 (0.3 mmol/L) 的效果较好。此外,在田间自然条件下,植物遇到的环境条件是极为复杂的,盆栽与大田生长的小麦生理状态也会存在一定差异。因此,能否在大田条件下通过施用外源水杨酸来防止或减轻光抑制现象,实现作物高产高效,尚需进行大量的试验研究。

#### 参考文献:

- [ 1 ] 刘福久. 小麦干热风与高温逼熟探析[ J ]. 现代农业科技, 2009(3): 206.
- [ 2 ] Chen Z, Silva H, Klessig D F. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid[ J ]. Science, 1993, 262: 1883-1886.
- [ 3 ] 何金环, 王文静, 王朋涛, 等. 过氧化氢参与水杨酸诱导的蚕豆气孔关闭过程观察[ J ]. 河南农业科学, 2009(3): 23-27.
- [ 4 ] 李国婧, 周燮. 水杨酸与植物抗非生物胁迫[ J ]. 植物学通报, 2001, 18(3): 295-302.
- [ 5 ] 孙永刚, 凌腾芳, 王家杰, 等. 外源一氧化氮供体硝普钠对小麦种子萌发早期 $\beta$ -淀粉酶及其亚细胞分布的影响[ J ]. 作物学报, 2008, 34(9): 1608-1614.
- [ 6 ] 邹琦. 植物生理学实验指导[ M ]. 北京: 中国农业出版社, 2003.
- [ 7 ] 中国科学院上海植物生理研究所, 上海市植物生理学会. 植物生理学试验指南[ M ]. 北京: 中国科学出版社, 1999: 314-315.
- [ 8 ] 赵世杰, 刘华山, 董新纯. 植物生理学实验指导[ M ]. 北京: 中国农业科技出版社, 1998: 161-163.
- [ 9 ] 张海波, 许大全. 光系统 II 蛋白磷酸化及其生理意义[ J ]. 植物生理与分子生物学学报, 2003, 29(6): 487-493.
- [ 10 ] Rintamaki E, Kettunen R, Aro E M. Differential D1 dephosphorylation in functional and photodamaged photosystem II centers[ J ]. Journal of Biological Chemistry, 1996, 271: 14870-14875.
- [ 11 ] Rockholm D C, Yamamoto H Y. Violaxanthin de-epoxidase[ J ]. Plant Physiology, 1999, 110: 697-703.
- [ 12 ] Critchley C, Russell A V. Photoinhibition of photosynthesis *in vivo*; the role of protein turn over in photosystem II[ J ]. Plant Physiology, 1994, 92: 188-196.
- [ 13 ] Mullet J E. Molecular biology of photosynthesis in higher plants[ M ]. England: Addison Wesley Longman Limited, 1997.
- [ 14 ] Aro E M, Virgin I, Andersson B. Photoinhibition of photosystem II: inactive, protein damage and turnover[ J ]. Biochim Biophys Acta, 1993, 1143(1): 113-134.
- [ 15 ] Zhang L, Aro E M. Synthesis, membrane insertion and assembly of the chloroplast-encoded D1 protein into photosystem II[ J ]. FEBS Letters, 2002, 512: 13-18.
- [ 16 ] Danon A, Mayfield S P. Light regulated translational activators: identification of chloroplast gene specific mRNA binding proteins[ J ]. EMBO J, 1991, 10(13): 3993-4001.
- [ 17 ] Staub J M, Maliga P. Translation of *psbA* mRNA is regulated by light via the 5'-untranslated region in tobacco plastids[ J ]. Plant J, 1994, 6(4): 547-553.
- [ 18 ] Hirose T, Sugiura M. Cis-acting elements and trans-acting factors for accurate translation of chloroplast *psbA* mRNA: development of an *in vitro* translation system from tobacco chloroplast[ J ]. EMBO J, 1996, 15(7): 1687-1695.