

水杨酸对高温强光胁迫下小麦叶绿体基因 *psbA* 表达的调节

赵鹏飞, 王林华, 赵会杰*, 梁书荣, 吕淑敏, 曲小菲, 汪月霞

河南农业大学生命科学学院, 郑州450002

摘要:以0.1、0.3和0.5 mmolL⁻¹的水杨酸预处理灌浆期的小麦叶片,测定在高温强光胁迫下小麦叶绿体基因 *psbA* 表达、D1蛋白含量和PSII功能。结果表明,叶面喷施SA不仅可减缓高温强光对 *psbA* 表达的抑制,而且可促进胁迫后在适宜光温条件下恢复表达的水平。

关键词:小麦; 水杨酸; 高温强光; *psbA* 基因; 光系统II

Regulation of Exogenous Salicylic Acid on Expression of Chloroplast Gene *psbA* in Wheat (*Triticum aestivum* L.) Leaves under Heat and High Irradiance Stress

ZHAO Peng-Fei, WANG Lin-Hua, ZHAO Hui-Jie*, LIANG Shu-Rong, LÜ Shu-Min, QU Xiao-Fei, WANG Yue-Xia
College of Life Sciences, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China

Abstract: Wheat leaves were sprayed with salicylic acid (SA) solution of three concentrations (0.1, 0.3, 0.5 mmol·L⁻¹) at grain-filling stage. The expression of chloroplast gene *psbA*, content of D1 protein and performance of photosystem II (PS II) under heat and high irradiance stress were investigated. The results showed that pretreatment with SA not only retarded inhibition to *psbA* expression caused by heat and high irradiance stress, but also promoted restoration of *psbA* expression level after stress under proper temperature and light condition.

Key words: wheat; salicylic acid; heat and high irradiance stress; *psbA*; photosystem II

一般来说,在植物的光合机构中,光系统II(PSII)反应中心是高温、干旱等多种逆境伤害的关键部位(Allahverdiev和Murata 2004),它受损伤的程度取决于逆境胁迫期间破坏和修复的平衡(Adir等2003;Murata等2007;Mohanty等2007)。PSII是1个多亚基蛋白复合体,由25种以上亚基构成,其中由叶绿体基因 *psbA* 编码的D1蛋白是许多逆境破坏的靶位,PSII的修复需要D1蛋白的快速周转(Yamamoto等2008)。强光胁迫下D1蛋白的周转途径已基本清楚。首先是受损D1蛋白在蛋白激酶的作用下,发生磷酸化作用,然后磷酸化的蛋白质向非堆叠区的基质类囊体转移,进而发生脱磷酸化和降解,最后受损蛋白被新合成D1蛋白取代。这些说明,D1蛋白周转的速率主要取决于D1蛋白的可逆磷酸化和D1蛋白的合成速率2个方面(Aro等2005;Lindahl等2000)。Yoshioka等(2006)报道,高温处理菠菜类囊体后,D1蛋白即降解为23 kDa和9 kDa片段,其降解模式与PSII受体侧光抑制相似。受破坏的D1蛋白如不能及时被新的拷贝

取代,就会抑制PSII的功能。Liu等(2006)的研究表明,在水分胁迫下,小麦的 *psbA* 基因表达水平下降,抗旱品种的下降幅度小于干旱敏感品种。Grennan和Ort(2007)认为低温下番茄D1蛋白减少主要是由于翻译过程中肽链延长受到干扰。水杨酸(salicylic acid, SA)是植物体内诱导防御机制的重要信号分子(Halim等2006)。Dat等(1998)首次报道了喷施SA可以改善芥菜的抗热性。随后,外源SA对植物抗热性的诱导作用在烟草(*Nicotiana tabacum*, Dat等2000)、豌豆(*Pisum sativum*, Pan等2006)、黄瓜(*Cucumis sativus*, Shi等2006)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*, Larkindale和Knight 2002)等植物中得到证实。我们实验室初步研究了外源SA对高温强光下小麦光合机构的保护效应,发现SA预处理小麦叶片,可以维持较高的D1蛋白含量和较强的

收稿 2010-01-11 修定 2010-04-01

资助 国家自然科学基金(30971725, 30671214)。

* 通讯作者(E-mail: zhaohj303@163.com; Tel: 0371-63555319)。

PSII 功能(马培芳等 2008)。本文研究了高温和强光协同胁迫下 *psbA* 基因表达及外源水杨酸的调节作用, 为进一步了解高温强光损伤光合机构的机制和设计防护措施时参考。

材料与amp;方法

以小麦(*Triticum aestivum* L.)品种‘豫农 949’为试验材料。用盆栽方法培养, 盆高 40 cm, 内径 40 cm, 盆内装入 20 kg 本校科教园区的耕层潮土。10 月 15 日播种, 播种后将盆埋入试验田土中, 出苗后每盆留苗 3 株, 共计 240 盆。按常规措施管理。于灌浆期(开花后 20 d)将试验材料分为 4 组, 进行不同的预处理。叶面分别喷施浓度为 0.1、0.3 和 0.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的水杨酸(记作 SA1、SA2 和 SA3), 以叶面喷水作为对照。3 d 后将盆带回实验室进行不同的温度和光照处理。人工气候室设 2 种温度和光强, 分别为适温中光[25 $^{\circ}\text{C}$, PFD (量子通量密度)为 600 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$]和高温强光(36 $^{\circ}\text{C}$, PFD 为 1 800 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)。

照光前各处理先经 12 h 的暗适应, 高照度光由 1 000 W 钨灯提供。在人工气候室中设置一铁架, 钨灯与材料之间放置 10 cm 厚的有机玻璃流动水槽, 以避免光下温度过高, 通过调节材料与光源的距离, 控制小麦旗叶接收的光强。于高温强光处理前和处理后 1 h、2 h 取旗叶。高温强光 2 h 处理的植株置于适温中光下恢复 3 h, 再次取样测定。每个处理重复 5 次, 每个重复取 3 株, 所取的旗叶一部分用于荧光参数和光合速率的测定, 另一部分立即保存到液氮中备用。

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, 经由 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 的质量, 260/280 nm 吸光值测定 RNA 浓度和纯度。质量检测合格后的 RNA 用于其后的实验操作。用 Fermentas 反转录试剂盒反转录合成 cDNA 第一链, cDNA 合成总反应体系为 20 μL , 含有 2 μL 总 RNA ($1 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), 9 μL 无 RNA 酶双蒸水, 1 μL 随机六聚体引物(random hexamer primer), 混匀后于 65 $^{\circ}\text{C}$ 下放置 5 min 后, 迅速置于冰上冷却, 再加入 2 μL dNTP mix ($10 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 4 μL RT 缓冲液, 1 μL RNA 酶抑制剂($20 \text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), 1 μL M-MuLV 反转录酶($200 \text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$)。混匀, 短暂离心,

于 25 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 5 min, 42 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 1 h, 70 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 5 min, 终止反应。RT 产物立即进行 PCR 或于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

为了做到结果标准化, 以 *18S rRNA* 基因(GenBank 登录号为 AJ272181)的相对丰度作为内参。内参及 *psbA* 基因(GenBank 登录号为 NC002762)引物由上海生工生物工程公司合成, 名称与序列分别为: *18S rRNA*-f: 5' CAAGCCATCGCTCTGGAT-ACATT 3'; *18S rRNA*-r: 5' CCTGTATTGCCTCAAA-CTTC 3'; *psbA*-f: 5' ACTAGCACTGAAAATCGTCT 3'; *psbA*-r: 5' TTACGTTCTGTCATTACTTC 3'。以 cDNA 为模板用上述引物进行 PCR, 扩增程序为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。*18S rRNA* 基因和 *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, 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。

测定类囊体膜 D1 蛋白含量时, 参照郭军伟等(2006)、Tripathy 和 Mohanty (1980)文中的方法提取不同处理叶片的类囊体膜。得到的样品按 Arnon (1949)的方法测定叶绿素含量, 然后储存于液氮中备用。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和 Western Blotting 分析参照杜林方等(1995)和 Rintamäki 等(1996)文中的方法进行, SDS-PAGE 采用 12% 含 6 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尿素的分离胶(pH 8.8)和 5% 浓缩胶(pH 6.8)。Western Blotting 分析的一抗为叶绿体 D1 蛋白多克隆抗体(Agrisera 公司提供), 二抗为碱性磷酸酶标记抗体 IgG(H+L)(中杉金桥公司)。显色系统为 BCIP/NBT 显色浓缩液。图片采用凝胶成像系统照相并进行定量分析。

用 FMS-2 型脉冲调制式叶绿素荧光分析仪(英国 Hansatech 公司)测定叶绿素荧光参数, 测定前叶片暗适应 15 min, 作用光强度为 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 饱和脉冲光强度为 8 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。 F_v/F_m (PSII 潜在光化学效率) = $(F_m - F_o)/F_m$, 其中 F_o 为初始荧光, F_m 为最大荧光, F_v 为可变荧光。 Φ_{PSII} (PSII 实际光化学效率) = $(F_m' - F_i)/F_m'$, 其中 F_i 为稳态荧光, F_m' 为稳态最大荧光。净光合速率(P_n)用 Chlorolab-2 氧电极系统(英国 Hansatech 公司)测定。

以 EXCEL 处理数据, 结果以 5 次测定的平均值 \pm 标准差(mean \pm SD)表示。

结果与讨论

1 水杨酸对小麦叶绿体基因 *psbA* 表达的影响

由图1可以看出, 高温强光对*psbA*的表达有明显的抑制, SA 预处理可以促进此基因表达。分析各处理的相对表达量(资料未列出), 适温中光下, SA1、SA2 和 SA3 的*psbA* 表达量比 CK 分别高 29.9%、59.8% 和 42.0%; 高温强光处理 1 h 后, SA1、SA2和SA3的*psbA*表达量比CK分别高47.9%、

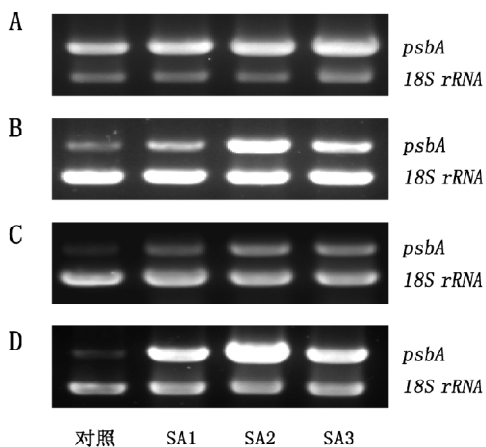


图1 外源水杨酸对不同光温条件下小麦叶绿体基因 *psbA* 表达的影响

Fig.1 Effect of exogenous SA on expression of chloroplast gene *psbA* in wheat leaves under different temperature and light conditions

A: 适温中光下 *psbA* 基因的 RT-PCR; B: 高温强光 1 h 后 *psbA* 基因的 RT-PCR; C: 高温强光 2 h 后 *psbA* 基因的 RT-PCR; D: 高温强光 2 h, 然后适温中光下恢复 3 h 后 *psbA* 基因的 RT-PCR。

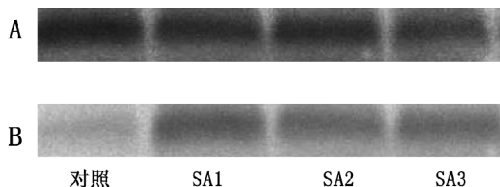


图2 外源水杨酸对不同光温条件下小麦叶绿体D1蛋白的影响

Fig.2 Influence of exogenous SA on D1 protein in wheat chloroplasts under different temperature and light conditions

A: 适温中光; B: 高温强光 2 h 后。

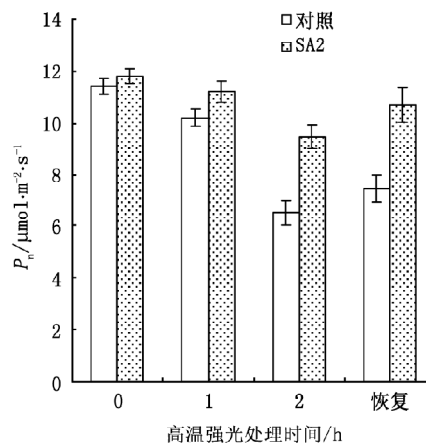
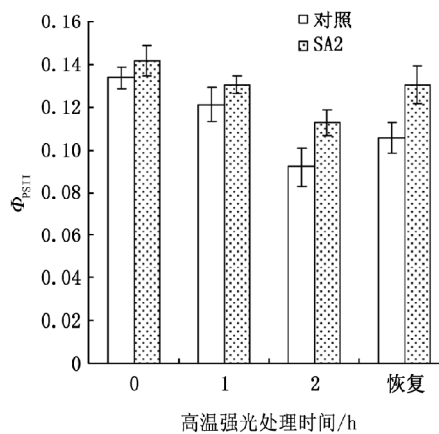
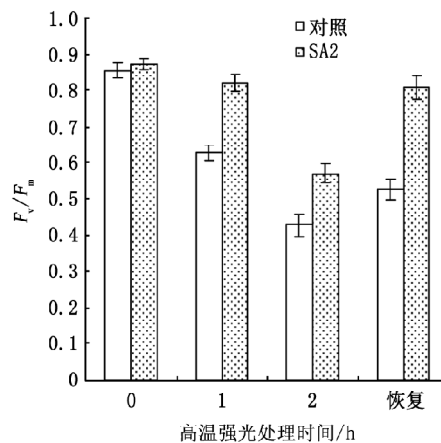


图3 外源水杨酸对不同光温条件下小麦叶片 F_v/F_m 、 Φ_{PSII} 和净光合速率(P_n)的影响

Fig.3 Influence of exogenous SA on F_v/F_m 、 Φ_{PSII} and net photosynthetic rate (P_n) in wheat leaves under different temperature and light conditions

0: 适温中光处理(对照); 1: 高温强光 1 h 后; 2: 高温强光 2 h 后; 恢复: 高温强光 2 h, 然后适温中光下恢复 3 h 后。

253.4%和102.6%;高温强光处理2 h后, SA1、SA2和SA3的 $psbA$ 表达量比CK分别高113.5%、306.2%和179%;高温强光2 h后将各处理材料置于适温中光下3 h后, SA1、SA2和SA3的 $psbA$ 表达量比CK分别高428.7%、752%和468.2%。这些表明外源SA不仅可以减缓高温强光对 $psbA$ 基因转录的抑制,而且可促进胁迫后适宜条件下基因表达的恢复。其中,以 $0.3\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA的效果最好。

2 水杨酸对小麦叶绿体 D1 蛋白含量的影响

图2显示,在适温中光条件下,各处理的D1蛋白含量差异不大。高温强光处理2 h后,各处理的D1蛋白含量均明显下降,但SA1、SA2、SA3的D1蛋白含量均高于对照,表明外源SA预处理可有效抑制高温强光导致小麦叶片中D1蛋白含量的减少。其中以喷施浓度为 $0.1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA的效果较好。D1蛋白的含量高低,一方面取决于其合成速率,另一方面取决于其降解速率。要想全面了解D1蛋白变化的原因,尚需进一步研究。

3 水杨酸对小麦叶片 F_v/F_m 、 Φ_{PSII} 和 P_n 的影响

图3显示,高温强光导致 F_v/F_m 、 Φ_{PSII} 和净光合速率(P_n)持续降低,但这种胁迫造成的伤害是可逆的,小麦叶片经高温强光2 h后,再置于适温中光下,光合功能可以部分恢复。与对照相比,水杨酸预处理可以减缓高温强光下 F_v/F_m 、 Φ_{PSII} 和 P_n 的下降,并可促进回到适温中光下光合功能的恢复。

参考文献

马培芳, 李利红, 杨亚军, 赵会杰, 付晓记, 张超男(2008). 水杨酸对高温强光胁迫下小麦叶绿体D1蛋白磷酸化及光系统II功能的影响. *应用生态学报*, 19 (12): 2632~2636

杜林方, 孙逊, 潘用华, 林宏辉, 梁厚果(1995). 钙离子对光系统II放氧反应的影响. *中国科学(B辑)*, 25 (2): 144~150

郭军伟, 魏慧敏, 吴守锋, 杜林方(2006). 低温对水稻类囊体膜蛋白磷酸化及光合机构光能分配的影响. *生物物理学报*, 22 (3): 197~202

Adir N, Zer H, Shochat S, Ohad I (2003). Photoinhibition: a historical perspective. *Photosynth Res*, 76: 343~370

Allakhverdiev SI, Murata N (2004). Environmental stress inhibits the synthesis *de novo* of proteins involved in the photodamage-repair cycle of photosystem II in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochim Biophys Acta*, 1657: 23~32

Arnon DI (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol*, 24: 1~15

Aro E-M, Suorsa M, Rokka A, Allahverdiyeva Y, Paakkarinen V, Saleem A, Battchikova N, Rintamäki E (2005). Dynamics of photosystem II: a proteomic approach to thylakoid protein

complexes. *J Exp Bot*, 56 (411): 347~356

Dat JF, Lopez-Delgado H, Foyer CH, Scott IM (1998). Parallel changes in H_2O_2 and catalase during thermotolerance induced by salicylic acid or heat acclimation in mustard seedlings. *Plant Physiol*, 116: 1351~1357

Dat JF, Lopez-Delgado H, Foyer CH, Scott IM (2000). Effects of salicylic acid on oxidative stress and thermotolerance in tobacco. *J Plant Physiol*, 156: 659~665

Grennan AK, Ort DR (2007). Cool temperatures interfere with D1 synthesis in tomato by causing ribosomal pausing. *Photosynth Res*, 94: 375~385

Halim VA, Vess A, Scheel D, Rosahl S (2006). The role of salicylic acid and jasmonic acid in pathogen defence. *Plant Biol*, 8: 307~313

Larkindale J, Knight MR (2002). Protection against heat stress-induced oxidative damage in *Arabidopsis* involves calcium, abscisic acid, ethylene, and salicylic acid. *Plant Physiol*, 128: 682~695

Lindahl M, Spetea C, Hundal T, Oppenheim AB, Adam Z, Andersson B (2000). The thylakoid FtsH protease plays a role in the light-induced turnover of the photosystem II D1 protein. *Plant Cell*, 12: 419~431

Liu W-J, Yuan S, Zhang N-H, Lei T, Duan H-G, Liang H-G, Lin H-H (2006). Effect of water stress on photosystem 2 in two wheat cultivars. *Biol Plant*, 50 (4): 597~602

Mohanty P, Allakhverdiev SI, Murata N (2007). Application of low temperatures during photoinhibition allows characterization of individual steps in photodamage and repair of photosystem II. *Photosynth Res*, 94: 217~224

Murata N, Takahashi S, Nishiyama Y, Allakhverdiev SI (2007). Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. *Biochim Biophys Acta*, 1767: 414~421

Pan Q, Zhan J, Liu H, Zhang J, Chen J, Wen P, Huang W (2006). Salicylic acid synthesized by benzoic acid 2-hydroxylase participates in the development of thermotolerance in pea plants. *Plant Sci*, 171: 226~233

Rintamäki E, Kettunen R, Aro E-M (1996). Differential D1 dephosphorylation in functional and photodamaged photosystem II centers. *J Biol Chem*, 271 (25): 14870~14875

Shi Q, Bao Z, Zhu Z, Ying Q, Qian Q (2006). Effects of different treatments of salicylic acid on heat tolerance, chlorophyll fluorescence, and antioxidant enzyme activity in seedlings of *Cucumis sativa* L. *Plant Growth Regul*, 48: 127~135

Tripathy BC, Mohanty P(1980). Zinc-inhibited electron transport of photosynthesis in isolated barley chloroplasts. *Plant Physiol*, 66: 1174~1178

Yamamoto Y, Aminaka R, Yoshioka M, Khatoon M, Komayama K, Takenaka D, Yamashita A, Nijo N, Inagawa K, Morita N, et al (2008). Quality control of photosystem II: impact of light and heat stresses. *Photosynth Res*, 98: 589~608

Yoshioka M, Uchida S, Mori H, Komayama K, Ohira S, Morita N, Nakanishi T, Yamamoto Y (2006). Quality control of photosystem II: cleavage of reaction center D1 protein in spinach thylakoids by FtsH protease under moderate heat stress. *J Biol Chem*, 281: 21660~21669