

高盐和高温胁迫下外源脯氨酸对PSII颗粒的保护作用

邱念伟^{1,*}, 杨翠翠^{1,*}, 付文诚¹, 胡胜¹, 周峰^{2,**}

¹曲阜师范大学生命科学学院, 山东曲阜273165; ²南京晓庄学院生物化工与环境工程学院, 南京211171

摘要: 为研究脯氨酸在植物耐盐性和耐热性中的作用, 提取菠菜叶片的PSII颗粒, 进行高盐(100~800 mmol·L⁻¹ NaCl)、高温(30和40 °C)以及盐和热交叉胁迫处理。PSII最大光化学效率(F_v/F_m)的测定结果表明, 0 °C下, 高盐胁迫处理对PSII颗粒伤害较小; 无盐胁迫下, 30 °C处理对PSII伤害不明显, 40 °C高温处理则显著降低PSII活性; 盐和热交叉胁迫加剧了对PSII的伤害。在PSII颗粒的保存液中加入脯氨酸(100~800 mmol·L⁻¹)能显著提高PSII在高盐胁迫以及盐和热交叉胁迫下的活性, 但未能提高其在高温胁迫下的活性。这一结果为脯氨酸提高植物耐盐性及对盐和热交叉胁迫抗性方面的功能研究提供了直接证据。

关键词: 脯氨酸; 光系统II; 高盐胁迫; 高温胁迫; PSII最大光化学效率

Protective Effect of Exogenous Proline on PSII Particles under High Salinity and High Temperature Stresses

QIU Nian-Wei^{1,*}, YANG Cui-Cui^{1,*}, FU Wen-Cheng¹, HU Sheng¹, ZHOU Feng^{2,**}

¹College of Life Sciences, Qufu Normal University, Qufu, Shandong 273165, China; ²School of Biochemical and Environmental Engineering, Nanjing Xiaozhuang University, Nanjing 211171, China

Abstract: To explore the role of proline in salt tolerance and heat tolerance of plants, photosystem II (PSII) BBY particles prepared from spinach (*Spinacia oleracea*) leaves were treated with different concentrations of NaCl (100–800 mmol·L⁻¹), different temperatures (30 and 40 °C) and cross treatments of NaCl and high temperature. Then maximal efficiency of PSII photochemistry (F_v/F_m) was determined by plant efficiency analyser (PEA). The results showed that single salt-treatment caused slight damage to PSII at 0 °C, and 30 °C treatment almost had no damage to PSII under 0 mmol·L⁻¹ NaCl condition, but PSII activity (F_v/F_m) decreased markedly at 40 °C. While under cross treatments of salt and high temperature, PSII activity decreased more significantly than under the single stress. Addition of 100–800 mmol·L⁻¹ proline in store buffer could greatly increase the activity of PSII under salt stress and cross stress of salt and high temperature, but could not increase the activity of PSII under high temperature stress. These results above provide direct evidence that accumulation of proline can enhance salt tolerance and cross-tolerance to salt and high temperature in plants.

Key words: proline; photosystem II; high salinity stress; high temperature stress; maximal efficiency of PSII photochemistry

脯氨酸(proline)是植物体内重要的渗透保护物质之一, 凡是引起细胞脱水的胁迫如干旱、高温、盐渍、低温、冰冻、强光、重金属、营养不良、病害等均会造成脯氨酸的积累, 尤其是水分胁迫和盐胁迫时脯氨酸的含量可以增加数十倍甚至上百倍(全先庆等2007; Verbruggen和Hermans 2008)。大部分文献认为脯氨酸在胁迫下不仅可以调节细胞的渗透平衡, 还具有维持蛋白质、生物膜和亚细胞结构稳定, 调节细胞pH值以及清除活性氧等作用(Kavi Kishor等2005; Trovato等2008; Szabados和Savoure 2010; Hayat等2012), 脯氨酸累积量与植物的抗逆能力呈正相关(赵勇等2005;

Misra和Gupta 2005; Hayat等2012)。但也有不少文献对脯氨酸的抗逆功能提出异议, 认为虽然脯氨酸的合成过程对各类胁迫极为敏感, 但脯氨酸的累积浓度往往不足以起到渗透调节的作用, 逆境条件下脯氨酸大量合成的意义主要在于维持细胞的代谢平衡(Hare和Cress 1997), 满足细胞内的能量需求和NAD(P)/NAD(P)H比的稳定。因此, 脯氨

收稿 2013-03-18 修定 2013-04-24

资助 作物生物学国家重点实验室开放课题(2011KF07)和江苏省自然科学基金青年基金项目(BK2012073)。

* 同等贡献。

** 通讯作者(E-mail: zfibcas@163.com)。

酸可看作是植物抵御逆境伤害过程中的氮代谢产物(Hare和Cress 1997; Hare等1998)。Song等(2005)则发现脯氨酸的积累量以及脯氨酸合成酶活性与小麦幼苗的耐盐性、耐热性及盐热交叉抗性均无相关性,可把脯氨酸的积累看作是植物受到胁迫伤害或者抵御逆境的表征。如在盐胁迫下,两种烟草脯氨酸的积累量反而与其耐盐性相反(Celik和Atak 2012)。

分子生物学实验结果显示,外源喷施或者通过基因工程措施提高植物细胞内脯氨酸含量仅能微幅提高植物的耐逆性(Hare等1998)。大量积累脯氨酸的拟南芥突变体甚至对盐胁迫更敏感(Liu和Zhu 1997),Lv等(2011)也发现大量积累脯氨酸的转基因拟南芥对热胁迫更敏感。因此,脯氨酸在植物抗逆性中的作用还不明确。目前,关于脯氨酸在逆境中保护蛋白质、生物膜及亚细胞结构的功能研究多是间接观察,缺乏直接的生物化学证据。本文用对各种逆境均非常敏感的菠菜PSII颗粒为实验材料,离体分析了高盐和高温胁迫对光系统II (photosystem II, PSII)颗粒的伤害以及脯氨酸存在条件下对PSII颗粒的保护作用,为分析脯氨酸在植物抗逆性中的作用提供参考。

材料与方 法

1 PSII颗粒的提取

选取健康的菠菜(*Spinacia oleracea* L.)成熟叶片,用双蒸水漂洗,于4℃下暗适应2 h以上,然后参照Yamamoto等人(2011)的方法提取PSII颗粒,提取过程中实验材料均保存在黑暗(小于 $2\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)和0~4℃下。提取的PSII颗粒用保存液[20 mmol·L⁻¹ 2-(*N*-吗啡啉)乙磺酸(pH 6.5)、400 mmol·L⁻¹蔗糖、35 mmol·L⁻¹ NaCl]匀浆,并将叶绿素浓度调至3.0 mg·mL⁻¹,分装后用液氮速冻,置-70℃超低温冰箱中保存备用。叶绿素浓度的测定参照张其德(1985)的方法。

2 PSII颗粒的盐处理和高温处理

取上述超低温冰箱保存的菠菜PSII颗粒1 mL,50 000×g离心5 min,沉淀PSII颗粒,然后分别用3 mL含有不同浓度脯氨酸和NaCl的保存液[含20 mmol·L⁻¹ 2-(*N*-吗啡啉)乙磺酸(pH 6.5)]悬浮,保存液中NaCl和脯氨酸浓度梯度均为0、100、200、400、800 mmol·L⁻¹(交叉组合配制成各种保存液)。

悬浮后PSII颗粒的叶绿素浓度均在1.0 mg·mL⁻¹左右。将各种保存液悬浮的PSII颗粒迅速放入0、30、40℃的水浴中保温30 min。实验材料均在暗处或微弱绿光(小于 $2\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)和0~4℃下。

3 PSII的活性测定

用植物效率分析仪(Plant Efficiency Analyser, Handy PEA; Hansatech Instrument Ltd., UK)测定PSII最大光化学效率(maximal efficiency of PSII photochemistry, F_v/F_m),表示PSII的活性。测定光源为3个发光二极管产生的650 nm的红光,光强设定为3 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,荧光信号的记录时程为2 s。迅速取出上述各处理保温后的样品,倒入液体测定管中,暗中室温测定PSII活性,每个处理5次重复。

实验结果

1 高盐和高温胁迫对PSII活性的影响

用含有不同浓度NaCl但不含脯氨酸等渗透保护物质的保存液悬浮菠菜PSII颗粒,在0、30、40℃下保温30 min,然后快速测定PSII的 F_v/F_m 。结果显示,在0℃下,100~800 mmol·L⁻¹ NaCl对PSII颗粒的伤害较轻,与不含NaCl的保存液相比(F_v/F_m 为0.805),100和200 mmol·L⁻¹ NaCl处理对PSII活性的影响不显著($P>0.05$), F_v/F_m 分别为0.798和0.791;400和800 mmol·L⁻¹ NaCl处理对PSII活性产生显著影响($P<0.05$),分别使PSII的 F_v/F_m 下降到0.788和0.753。用无NaCl和脯氨酸的保存液悬浮的PSII颗粒,在30℃下的活性与0℃下的相比差异不显著($P>0.05$);40℃高温处理30 min则导致PSII活性显著下降, F_v/F_m 下降为0.677,说明离体的PSII颗粒对40℃高温非常敏感(图1)。

高盐和高温胁迫同时存在会加剧对PSII颗粒的伤害,伤害程度超过了两种胁迫单独存在时的总和。以0℃下0 mmol·L⁻¹ NaCl处理为对照,0℃下800 mmol·L⁻¹ NaCl处理使PSII的 F_v/F_m 下降6.5%,40℃下0 mmol·L⁻¹ NaCl处理使PSII的 F_v/F_m 下降了15.9%,而40℃下800 mmol·L⁻¹ NaCl处理使PSII的 F_v/F_m 下降了76.5%(图1)。这说明高盐和高温两种胁迫同时存在对PSII的伤害具有增倍效应。

2 高温胁迫下外源脯氨酸对PSII活性的影响

图2显示,无盐条件下,与不加脯氨酸的对照相比,添加不同浓度脯氨酸能轻微增大PSII的光化学活性,但统计结果差异不显著($P<0.05$)。如在0

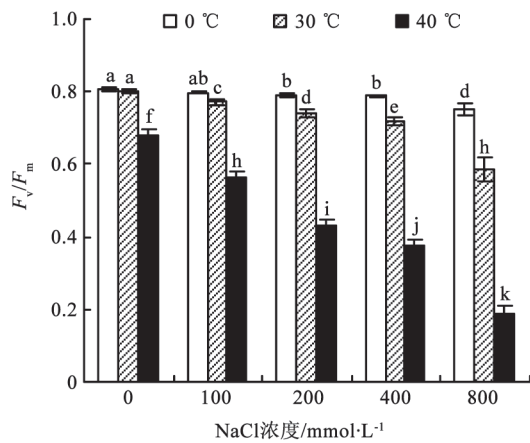


图1 NaCl与高温处理对PSII活性的影响

Fig.1 The effect of NaCl and high temperature on PSII activity

图中数据为5个重复的平均值 \pm 标准差;不同处理间数据的差异显著性用Duncan检验进行分析,标有不同小写字母表示达到 $P<0.05$ 显著水平。图2~4同此。

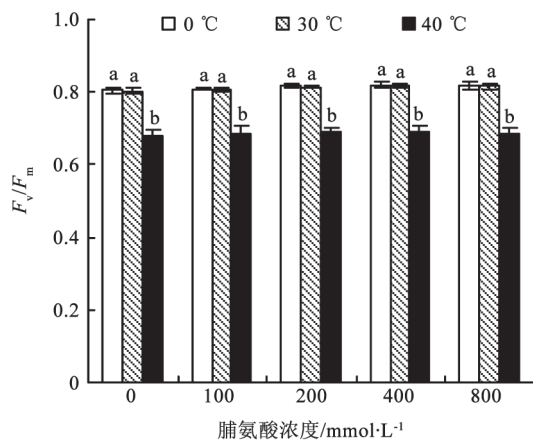


图2 高温胁迫下外源脯氨酸对PSII活性的影响(0 mmol \cdot L $^{-1}$ NaCl)

Fig.2 The effect of exogenous proline on PSII activity under high temperature stress (0 mmol \cdot L $^{-1}$ NaCl)

和30 °C处理下,添加100~800 mmol \cdot L $^{-1}$ 脯氨酸可使PSII的 F_v/F_m 从0.805增加到0.818,但脯氨酸浓度高于200 mmol \cdot L $^{-1}$ 后, F_v/F_m 几乎不再增加。40 °C高温下,不同浓度的脯氨酸也均未表现出对PSII颗粒的保护效应。由此推测,脯氨酸并不能提高PSII的耐热性。

3 高盐胁迫下外源脯氨酸对PSII活性的影响

由图1可见,在0 °C和无脯氨酸等渗透保护物质条件下,只有高浓度NaCl (400、800 mmol \cdot L $^{-1}$)显著抑制PSII最大光化学活性。因此,图3只分析了在

400和800 mmol \cdot L $^{-1}$ NaCl条件下脯氨酸对PSII的保护作用。结果显示,在保存液中添加100~800 mmol \cdot L $^{-1}$ 的脯氨酸能显著增加PSII的耐盐性($P<0.05$)。当保存液中无脯氨酸时,400和800 mmol \cdot L $^{-1}$ NaCl处理后PSII颗粒的 F_v/F_m 分别下降到0.788和0.753;添加800 mmol \cdot L $^{-1}$ 脯氨酸, F_v/F_m 分别增加到0.812和0.794。这说明脯氨酸在高盐胁迫下对PSII具有显著的保护作用。

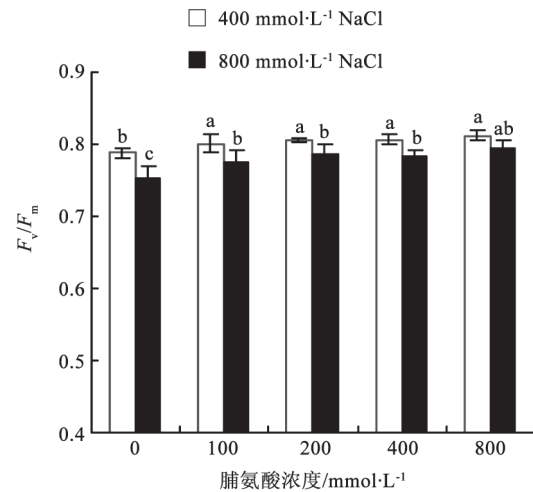


图3 高盐胁迫下外源脯氨酸对PSII活性的影响(0 °C)

Fig.3 The effect of exogenous proline on PSII activity under high salinity stress (0 °C)

4 高温和高盐交叉胁迫下外源脯氨酸对PSII活性的影响

虽然高盐和高温交叉处理加重了对PSII的伤害,但在保存液中添加脯氨酸后对PSII颗粒的保护效果更为显著。如当保存液中不含脯氨酸时,40 °C下用400和800 mmol \cdot L $^{-1}$ NaCl处理30 min,PSII的 F_v/F_m 分别下降至0.367和0.179;加入800 mmol \cdot L $^{-1}$ 脯氨酸使 F_v/F_m 值分别增加到0.442和0.391,分别增加17.5%和118.3% (图4),在盐热交叉胁迫下PSII活性显著提高,但未恢复到对照水平。

讨论

活体植物中的PSII对环境胁迫的敏感性表现不同。如玉米叶片的PSII对盐胁迫敏感(Sheng等2008),西红柿叶片的PSII对热胁迫敏感(Willits和Peet 2001);而盐生植物碱蓬的PSII在400 mmol \cdot L $^{-1}$ NaCl盐胁迫下仍保持稳定活性(Lu等2003);在42 °C

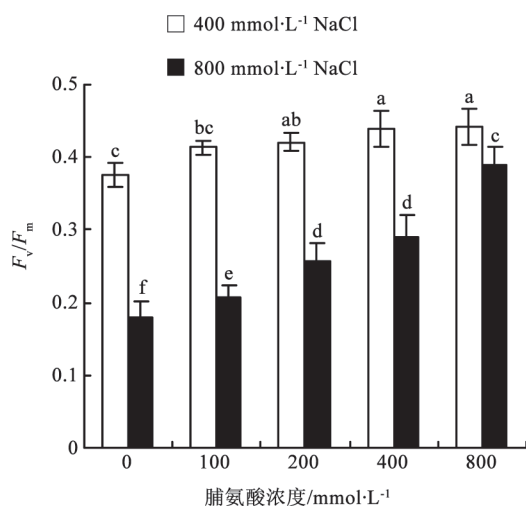


图4 高盐(400和800 mmol \cdot L $^{-1}$ NaCl)和高温(40 °C)交叉胁迫下外源脯氨酸对PSII活性的影响

Fig.4 The effect of exogenous proline on PSII activity under cross stress of high salinity and high temperature (40 °C)

高温下, 高粱的PSII最大光化学活性仍不受影响(Havaux 1992)。但离体PSII对盐胁迫和热胁迫均比较敏感(Srivastava等1997; 王戈博等2005)。本文结果也表明, 盐胁迫和高温胁迫均对离体PSII颗粒产生明显伤害(图1)。说明碱蓬和高粱在盐胁迫和热胁迫下启动了PSII保护机制。脯氨酸是否增加PSII的耐盐性和耐热性还缺乏直接的证据。关于脯氨酸的抗逆功能研究也多从体外喷施和内源含量与植物耐逆性的关系角度进行分析, 由于活体植物的抗逆性或者代谢活性受多因素影响, 因此很难准确判断植物的抗逆性与脯氨酸具有直接关系。

本研究中, 在PSII颗粒的保存液中加入不同浓度的脯氨酸, 然后进行高盐和高温处理, 可直接分析脯氨酸对PSII颗粒的保护作用。结果表明, 100~800 mmol \cdot L $^{-1}$ 的脯氨酸能显著增加PSII的耐盐性(图3), 但并未显著增加PSII的耐热性(图2)。这一结果与喷施脯氨酸增加活体植物PSII耐热性的研究结果相反(刘书仁等2010), 说明活体植物内存在着其他抗高温机制, 如Pospisil和Dau (2000)用离体实验证明甜菜碱和蔗糖可以增加PSII耐热性。不过, 在高盐和高温双重胁迫下, 脯氨酸对PSII的保护效果极为显著, 并且脯氨酸浓度越高, 保护效果越好(图4)。活体植物对盐和热胁迫的交叉适应现象也较为普遍, 如盐生植物碱蓬和滨藜在高盐

处理后PSII的耐热性增强(Qiu和Lu 2003; Lu等2003), 干旱预处理也可提高高粱PSII的耐热性(Havaux 1992)。由于干旱、盐渍和高温等胁迫下, 脯氨酸积累是植物的普遍反应(全先庆等2007; Verbruggen和Hermans 2008), 所以脯氨酸可能参与了植物对高盐和高温胁迫的耐性。脯氨酸在水溶液中对蛋白质的保护机制是与蛋白质结合, 在蛋白质周围形成水化层, 增强蛋白质的水合作用, 增加蛋白质的可溶性和减少水溶性蛋白质的沉淀, 从而保护蛋白质等生物大分子的稳定(Szabados和Savoure 2010; Hayat等2012)。这一保护机制可以减少蛋白质与高浓度Na $^{+}$ 离子的接触, 但无法阻止蛋白质与高温的接触。这很可能是脯氨酸能够显著增加PSII在高盐胁迫下的活性, 而不能提高其对高温耐受能力的重要原因。

自然环境复杂多变, 植物经常同时面临多种环境胁迫, 如在炎热干旱的夏季, 植物会同时受到干旱、高温和强光的三重胁迫, 提高作物对多重胁迫的抗性具有重要意义。本文结果表明, 脯氨酸虽然未能显著提高PSII对高温胁迫的抗性, 但显著提高了PSII的耐盐性, 在盐和热双重胁迫下对PSII的保护效果尤为突出。这一结果为研究脯氨酸在植物抗逆中的功能提供了直接证据。但由于本研究中所用的盐浓度和脯氨酸浓度均高于植物组织中的实际浓度, 脯氨酸在活体细胞中的抗逆功能尚需进一步验证。

参考文献

- 刘书仁, 郭世荣, 程玉静, 刘超杰, 王丽萍, 束胜(2010). 外源脯氨酸对高温胁迫下黄瓜幼苗叶片AsA-GSH循环和光合荧光特性的影响. 西北植物学报, 30 (2): 309~316
- 全先庆, 张渝洁, 单雷, 毕玉平(2007). 高等植物脯氨酸代谢研究进展. 生物技术通报, (1): 14~18
- 王戈博, 王建平, 李勃, 杨亚军, 安黎哲(2005). NaCl胁迫对菠菜PSII颗粒荧光特性的影响. 草业学报, 14 (1): 69~72
- 张其德(1985). 测定叶绿素的几种方法. 植物学通报, 3 (5): 60~64
- 赵勇, 马雅琴, 翁跃进(2005). 盐胁迫下小麦甜菜碱和脯氨酸含量变化. 植物生理与分子生物学学报, 31 (1): 103~106
- Celik O, Atak C (2012). The effect of salt stress on antioxidative enzymes and proline content of two Turkish tobacco varieties. Turk J Biol, 36: 339~356
- Hare PD, Cress WA (1997). Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. Plant Growth Regul, 21: 79~102
- Hare PD, Cress WA, Van Staden J (1998). Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. Plant Cell Environ, 21: 535~553

- Havaux M (1992). Stress tolerance of photosystem II *in vivo*. Antagonistic effects of water, heat, and photoinhibition stresses. *Plant Physiol*, 100: 424-432
- Hayat S, Hayat Q, Alyemeni MN, Wani AS, Pichtel J, Ahmad A (2012). Role of proline under changing environments: a review. *Plant Signal Behav*, 7 (11): 1-11
- Kavi Kishor PB, Sangam S, Amrutha RN, Sri Laxmi P, Naidu KR, Rao KRSS, Rao S, Reddy KJ, Theriappan P, Sreenivasulu N (2005). Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Curr Sci*, 88: 424-438
- Liu JP, Zhu JK (1997). Proline accumulation and salt-stress-induced gene expression in a salt-hypersensitive mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 114: 591-596
- Lu CM, Qiu NW, Wang BS, Zhang JH (2003). Salinity treatment shows no effects on photosystem II photochemistry, but increases the resistance of photosystem II to heat stress in halophyte *Suaeda salsa*. *J Exp Bot*, 54 (383): 851-860
- Lv WT, Lin B, Zhang M, Hua XJ (2011). Proline accumulation is inhibitory to *Arabidopsis* seedlings during heat stress. *Plant Physiol*, 156: 1921-1933
- Misra N, Gupta AK (2005). Effect of salt stress on proline metabolism in two high yielding genotypes of green gram. *Plant Sci*, 169: 331-339
- Pospisil P, Dau H (2000). Chlorophyll fluorescence transients of photosystem II membrane particles as a tool for studying photosynthetic oxygen evolution. *Photosynth Res*, 65: 41-52
- Qiu N, Lu C (2003). Enhanced tolerance of photosynthesis against high temperature damage in salt-adapted halophyte *Atriplex centralasiatica* plants. *Plant Cell Environ*, 26: 1137-1145
- Sheng M, Tang M, Chen H, Yang BW, Zhang FD, Huang YH (2008). Influence of arbuscular mycorrhizae on photosynthesis and water status of maize plants under salt stress. *Mycorrhiza*, 18: 287-296
- Song SQ, Lei YB, Tian XR (2005). Proline metabolism and cross-tolerance to salinity and heat stress in germinating wheat seeds. *Russ J Plant Physiol*, 52: 897-904
- Srivastava A, Guissé B, Grippin H, Strasser RJ (1997). Regulation of antenna structural and electron transport in photosystem II of *Pisum sativum* under elevated temperature probed by the fast polyphasic chlorophyll a fluorescence transients: OKJIP. *Biochim Biophys Acta*, 1320: 95-106
- Szabados L, Savoure A (2010). Proline: a multifunctional amino acid. *Trends Plant Sci*, 15: 89-97
- Trovato M, Mattioli R, Costantino P (2008). Multiple roles of proline in plant stress tolerance and development. *Rend Lincei*, 19: 325-346
- Verbruggen N, Hermans C (2008). Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids*, 35: 753-759
- Willits DH, Peet MM (2001). Measurement of chlorophyll fluorescence as a heat stress indicator in tomato: laboratory and greenhouse comparisons. *J Amer Soc Hort Sci*, 126 (2): 188-194
- Yamamoto Y, Leng J, Shen JR (2011). Isolation of photosystem II-enriched membranes and the oxygen-evolving complex subunit proteins from higher plants. *Methods Mol Biol*, 684: 1-10