

外源一氧化氮对镉胁迫下番茄幼苗叶绿体保护作用的光谱学分析

生吉萍, 刘开朗, 申琳*

中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083

摘要 镉(Cd)是重要的重金属污染源,一氧化氮(NO)是近年来发现的一种普遍存在于生物界的信使分子,研究表明其参与了植物对Cd胁迫的应答反应调控。文章用硝普纳(SNP)作为NO供体,向番茄幼苗喷洒 $100 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SNP 1 d后加入 $50 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd处理7 d,取完全展开叶片,提取叶绿体进行光谱学研究,分别测定了叶绿体室温吸收光谱、叶绿体低温荧光光谱和DCPIP电子传递效率等指标,研究外源NO缓解Cd对叶绿体毒性的影响。结果发现,Cd对叶绿素a、叶绿素b和类胡萝卜素含量都有不同程度的降低,NO处理缓解了Cd的影响,使叶绿体室温吸收光谱的吸收率提高;Cd导致686 nm处峰(PSII)偏移4 nm,峰值降低33%,734 nm处峰值降低23%,外源NO缓解了Cd对光合系统的影响,使得叶绿体低温荧光光谱在686和734 nm的峰值分别仅下降17%和10%;以DCPIP为人工电子受体,Cd处理的叶绿体中DCPIP还原速率较慢,光合电子传递($\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{DCPIP}$)速率降低1.5倍,外源NO处理显著缓解了Cd对电子传递链的抑制,使其光合电子传递速率恢复到对照的水平。该研究可为NO处理增强植物对Cd胁迫的抗性提供理论依据。

关键词 一氧化氮;镉;叶绿体;光合作用;重金属污染

中图分类号: S641 **文献标识码**: A **DOI**: 10.3964/j.issn.1000-0593(2009)03-0762-03

引言

镉(Cd)是一种在土壤、空气、水和生物系统中以微量存在的重金属,现代工业的发展和人类自身活动的增加,三废的排放,矿产的开发和利用,污水灌溉以及农药、除草剂和化肥的使用等活动造成了土壤的Cd污染^[1]。Cd经过植物吸收,进入食物链,是Cd污染危害人类健康的主要途径,Cd进入体内,可导致对骨骼系统和肾脏等器官不同程度的损伤,还具有致癌、致畸和致突变作用^[2]。因此,研究Cd的植物毒性机制,以及植物对Cd胁迫的应答反应,对于提高植物对Cd的抗性,改善粮食作物品质,降低Cd从植物进入食物链的危险性,都具有重要的意义,成为人们关注的热点。

一氧化氮(NO)是一种普遍存在于动物、植物和微生物体内的新的胞内和胞间信使分子,近来的研究表明NO参与了植物对Cd胁迫的应答反应调控^[3]。Laspina等^[4]的研究表明,在向日葵植株中,在Cd处理前施加外源NO能够显著缓解Cd导致的氧化胁迫,提高细胞中谷胱甘肽(GSH)和抗坏血酸(ASC)含量。叶绿体是光合作用的场所,叶绿素含量

的测定在作物估产、农情检测等方面具有重要意义^[5,6]。Cd对光合作用的抑制可能与Cd改变叶绿体内的氧化还原状态有关^[7]。外源NO能够缓解Cd诱导的脂类和蛋白质氧化程度,暗示NO可能改变Cd对叶绿体结构和功能的负面影响。为了研究外源NO对于Cd在叶绿体毒性的影响,我们分别测定叶绿体室温吸收光谱、叶绿体低温荧光光谱和DCPIP电子传递效率等,以期对揭示NO对叶绿体保护作用的机制提供理论依据。

1 实验部分

1.1 植物材料与处理

选取饱满、大小一致的番茄种子(品种为丽春),用0.1%的 HgCl_2 灭菌5 min后,用蒸馏水冲洗干净,(25 ± 2)下蒸馏水浸种催芽24 h,播于盛有幼苗基质的花盆中,于(28 ± 2)光照培养箱内培养。以4周龄番茄幼苗为材料,部分幼苗喷洒 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SNP 1 d后加入 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd处理7 d,取完全展开叶片提取叶绿体,分别在室温下测定荧光光谱,77 K下测定荧光光谱,以及室温下测定DCPIP还原速率。

收稿日期: 2007-08-10, 修订日期: 2007-11-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(30671471, 30571291)和公益性行业(农业)科技专项项目(nyhyzy07-007)资助

作者简介: 生吉萍,女,1967年生,中国农业大学食品科学与营养工程学院副教授 *通讯联系人 e-mail: pingshen@cau.edu.cn

1.2 叶绿体的提取

参照 Gomez 等^[8]的方法并稍作修改。5 g 叶片加 30 mL 提取缓冲液冰浴研磨, 四层纱布过滤; 3 000 g 离心 10 min, 沉淀用 2 mL 提取缓冲液悬浮, 置于 30% Percoll 梯度上, 15 800 g 离心 20 min; 吸取下层完整叶绿体, 用悬浮缓冲液(含 50 mmol · L⁻¹ 磷酸钾缓冲液, pH 7.5, 0.33 mol · L⁻¹ 山梨醇, 2 mmol · L⁻¹ EDTA, 1 mmol · L⁻¹ MgCl₂, 1 mmol · L⁻¹ MnCl₂, 1 mmol · L⁻¹ DTT) 稀释 10 倍, 3 000 g 离心 10 min, 沉淀即为叶绿体。

1.3 叶绿体荧光光谱测定

参 Martin 等^[9]的方法, 略有改动。测定样品的叶绿素浓度均为 10 μg · mL⁻¹, 采用 HITACHI F-4500 荧光分光光度计测定样品在室温和低温(77 K)下的荧光激发光谱和荧光发射光谱, 低温(77 K)荧光光谱在液氮中进行测定(测定前最好加入 50% 的甘油, 以防止玻璃管破裂)。扫描速度为 100 nm · min⁻¹, 分辨率为 2 nm。所有操作均在暗中进行。

1.4 DCPIP 测定

参照 Nedunchezian 等^[10]的方法, 略加改动。20 mL 反应体系中包括 0.1 mol · L⁻¹ sucrose, 20 mmol · L⁻¹ Tricine, 50 mmol · L⁻¹ KCl, 5 mmol · L⁻¹ MgCl₂, 1 mg · mL⁻¹ BSA, 100 μmol · L⁻¹ DCPIP(Sigma, USA), 500 μg · mL⁻¹ 叶绿素, 调节 pH 为 8.0。在 20 °C, 以光强为 500 μW · m⁻² · s⁻¹ 的白炽灯照射开始反应, 每 1 min 取出 1 mL, 采用 Uvikom-xL 分光光度计测定 600 nm 处吸光值, 直至稳定; 设定对照为暗处理。结果表示为: $[(A_0 - A_t)/A_0] \times 100$, 其中: A_0 和 A_t 分别为起始和测定中吸光值读数。

2 结果与分析

2.1 叶绿体室温吸收光谱

叶绿体室温吸收光谱测定表明, Cd 对叶绿素 a、叶绿素 b 和类胡萝卜素含量都有不同程度的影响。与对照相比, 436 nm 处峰偏移 4 nm、峰值下降 36%, 480 nm 处吸收峰消失(436 和 480 nm 峰主要来自类胡萝卜素), 670 nm 处峰下降 48% (主要来自叶绿素)。SNP 预处理显著缓解了 Cd 对叶绿体室温吸收光谱的影响, 与对照相比, 436 和 480 nm 处峰值分别仅下降 14% 和 16% (图 1)。

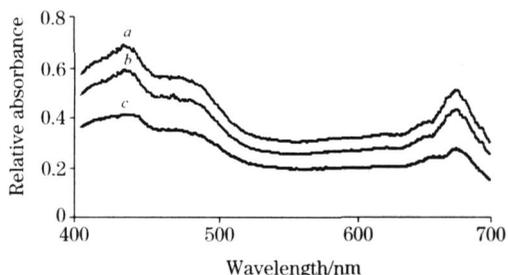


Fig 1 NO alleviates effect of Cd on absorption spectra of chloroplast

a: Control; b: 100 μmol · L⁻¹ SNP + 50 μmol · L⁻¹ Cd;
c: 100 μmol · L⁻¹ Cd

2.2 叶绿体低温荧光光谱

叶绿体低温荧光光谱数据表明, 外源 NO 缓解了 Cd 对光合系统的影响。如图 2 所示, 与对照相比, Cd 导致 686 nm 处峰(PSII)偏移 4 nm, 峰值降低 33%, 734 nm 处峰值降低 23%。与此相反, SNP 预处理使得叶绿体低温荧光光谱在 686 和 734 nm 的峰值分别仅下降 17% 和 10%。这些结果表明外源 NO 处理有助于缓解 Cd 对番茄幼苗中光合系统结构的影响。

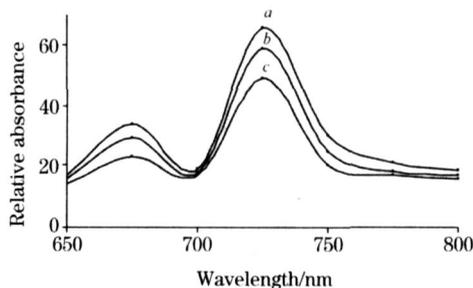


Fig 2 NO alleviates effect of Cd on fluorescence spectra spectra of chloroplast

a: Control; b: 100 μmol · L⁻¹ SNP + 50 μmol · L⁻¹ Cd;
c: 100 μmol · L⁻¹ Cd

2.3 DCPIP 反应

在本研究中, 以 DCPIP 为人工电子受体, 比较 Cd 和外源 NO 预处理对于叶绿体中光合电子传递系统功能的影响。结果如图 3 所示, 与对照相比, Cd 处理番茄幼苗中叶绿体 DCPIP 还原速率较慢, 在反应后 16~24 min 之间更加明显。线性分析表明, 对照中光合电子传递速率比 Cd 处理幼苗高 1.5 倍, Cd 处理抑制了番茄幼苗中叶绿体光合电子传递(H₂O → DCPIP)。与此相反, 外源 SNP 处理显著缓解了 Cd 对电子传递链的抑制, 线性分析表明其速率与对照没有显著差别($p < 0.05$)。以上结果说明外源 SNP 处理有助于缓解 Cd 对光合电子传递的抑制。

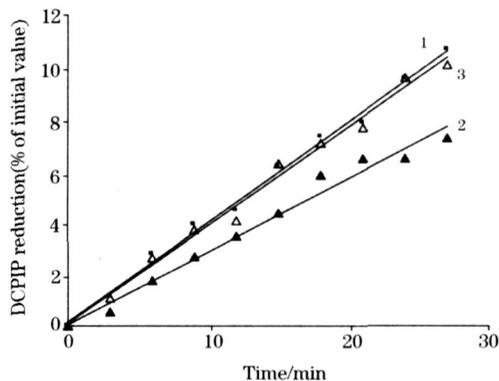


Fig 3 NO restores the rate of photosynthetic electrontransport in chloroplasts

1: Control; 2: SNP + Cd; 3: Cd

3 讨论

NO 有助于缓解 Cd 胁迫对叶绿体结构和功能的影响,

其作用机制可能与 NO 的抗氧化功能有关。研究表明 Cd 胁迫对光合作用的抑制与其对叶绿体内氧化还原平衡的影响有关。叶绿体是 Cd 胁迫下 ROS 积累的主要细胞器之一^[11]。Cd 处理改变了番茄叶片叶绿体的室温吸收光谱和低温荧光发射光谱的光谱特性,降低了 PSI 和 PSII 相关荧光强度,表明 Cd 胁迫导致 PSI 和 PSII 结构发生变化,其中 PSII 变化最为显著。Cd 处理导致 PSII 中组成蛋白 D1, D2, CP43 和 CP47 含量不同程度的下降^[7]。PSII 的破坏,导致叶绿体内光合电子传递受阻,这得到了 DCPIP 试验结果的证明。

外源 NO 处理不仅部分缓解了 Cd 对叶绿体光谱特征的影响,而且减轻了 Cd 对光合电子传递的抑制。NO 的作用模式可能有两种:一种是直接与 ROS 作用,生成活性较低的分子。其次,由于 Rubisco 等蛋白质的氧化是 Cd 抑制光合作用的重要机制,NO 对蛋白质分子的硝化修饰,可能有助于降低 Cd 诱导的蛋白质氧化水平,从而有助于维持叶绿体内蛋

白质分子的正常结构和功能^[3,7]。

4 结 论

叶绿体室温吸收光谱测定结果发现,Cd 对叶绿素 a、叶绿素 b 和类胡萝卜素含量都有不同程度的降低,NO 处理缓解了 Cd 的影响,使叶绿体室温吸收光谱的吸收率提高。叶绿体低温荧光光谱测定发现,外源 NO 缓解了 Cd 对光合系统的影响,使得叶绿体低温荧光光谱在 686 和 734 nm 的峰值分别下降减少了 16% 和 13%。以 DCPIP 为人工电子受体,Cd 处理的叶绿体中 DCPIP 还原速率较慢,光合电子传递 ($H_2O \rightarrow DCPIP$) 速率降低 1.5 倍,外源 NO 处理显著缓解了 Cd 对电子传递链的抑制,使其光合电子传递速率恢复到对照的水平。本研究可为 Cd 的植物毒性机制研究以及 NO 处理增强植物对 Cd 胁迫的抗性机制提供理论依据。

参 考 文 献

- [1] di Toppi L S, Gabbriellini R. Environmental and Experimental Botany, 1999, 41(2) : 105.
- [2] Johnson M D, Kenney N, Stoica A, et al. Nature Medicine, 2003, 9(8) : 1081.
- [3] Delledonne M, Zeier J, Marocco A, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2001, 98 : 13454.
- [4] Laspina N V, Groppa M D, Tomaro M L, et al. Plant Sci., 2005, 169(2) : 323.
- [5] JIANG Huang-yu, YING Yi-bin(蒋焕煜, 应义斌). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2007, 27(3) : 499.
- [6] JI Hai-yan, WANG Peng-xin, YAN Tai-lai(吉海彦, 王鹏新, 严泰来). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2007, 27(3) : 514.
- [7] Shintinawy F. Photosynthetica. 1999, 36: 171.
- [8] Gomez J M, Jimenez A, Olmos E, et al. J. Experimental Botany, 2004, 55: 119.
- [9] Martin B, Matersson O, Oquist G. Physiologia Plantarum, 1978, 44: 102.
- [10] Nedunchezian N, Kulandaivelu G. Photosynthetica. 1991, 25: 431.
- [11] Romero H M, Berlett B S, Jensen P J, et al. Plant Physiology, 2004, 136: 3784.

Effects of Exogenous Nitric Oxide on Chlorophyll in Cadmium-Induced Tomato Seedlings

SHENG Ji-ping, LIU Kai-lang, SHEN Lin*

College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China

Abstract Cadmium (Cd) is an important heavy metal pollution, and NO is a bioactive molecule, which was found to participate in the reaction of plant to Cd. Leaves from tomato seedlings pretreated with $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ sodium nitroprusside (SNP, as NO donor) 1 day prior to being treated with $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd for 7 days were used as materials, and chloroplasts were isolated from the leaves to study the effects of NO on the spectroscopic characteristics of chlorophyll. The results of absorption spectra of chloroplasts showed that NO alleviated the effects of Cd on absorption spectra of chloroplast by raising the relative absorbance at 436 nm, 480 nm and 470 nm, which caused lower contents of carotenoid and chlorophyll. Fluorescence emission spectra of chloroplasts indicated that NO alleviated effect of Cd, and the relative absorbance at 686 nm and 734 nm decreased 17% and 10% respectively, while they decreased 33% and 23% respectively in chloroplasts treated with Cd. DCPIP analysis results showed that NO alleviated the inhibition of photosynthetic electron transport by Cd, and consequently the electron transport rate reached the same level of control.

Keywords Nitric oxide; Cadmium; Chloroplast; Photosynthesis; Heavy metal pollution

* Corresponding author

(Received Aug. 10, 2007; accepted Nov. 20, 2007)