

光谱分析和延迟荧光检测研究外源水杨酸对拟南芥光合作用的影响

陈志强^{1, 2}, 陈文利^{1, 2*}, 阳成伟¹

1 华南师范大学生命科学学院, 广东省植物发育生物工程重点实验室, 广东 广州 510631

2 华南师范大学激光生命科学教育部重点实验室, 广东 广州 510631

摘要 外源水杨酸在影响植物活性氧代谢以及光合作用等方面起着重要作用。该文以野生型拟南芥和胁迫条件下内源水杨酸含量较高的 *cpr5* 突变体和内源水杨酸含量较低的 *eds4* 突变体为材料, 采用光谱分析和延迟荧光检测分析手段, 研究了不同浓度的外源水杨酸对三种拟南芥离体叶片光合能力的影响, 实验发现 100 和 300 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 较低浓度的外源水杨酸对野生型拟南芥离体叶片, *eds4* 叶片的光合作用都有一定的促进作用, 而对 *cpr5* 叶片的光合会产生抑制, 形成一种胁迫。500 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 较高浓度的外源水杨酸对三种拟南芥离体叶片均形成了一种胁迫, 进而阻抑和降低了叶片的光合效能。DCF(dichloro fluorescein) 标记活性氧检测了外源水杨酸作用下叶片活性氧产生量的变化, 发现在 500 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 外源水杨酸作用下 60 min 内叶片组织中活性氧产生了明显的积累。

关键词 水杨酸; 拟南芥; 荧光发射光谱; 延迟荧光; 活性氧

中图分类号: Q945.1 文献标识码: A DOI: 10.3964/j.issn.1000-0593(2009)08-2208-05

引言

水杨酸是植物体内产生的普遍存在于植物体内的一种简单酚类物质, 被视为是一种植物内源信号分子^[1, 2]和新的植物激素^[3]。植物体内产生的水杨酸在植物的抗病性和抗热性以及抗盐性等方面都起着重要作用^[4-6]。而外源水杨酸在植物活性氧代谢、抑制膜脂过氧化、气孔功能、产热、离子吸收等方面亦起着重要作用^[7]。本实验以野生型拟南芥和胁迫条件下内源水杨酸含量较高的 *cpr5* 突变体和内源水杨酸含量较低的 *eds4* 突变体为材料, 以外源水杨酸作为影响因子, 采用光谱分析和延迟荧光检测分析手段, 研究了不同浓度外源水杨酸对三种拟南芥离体叶片光合能力的影响, 得到了一些较为满意的实验结果。

1 材料与方法

1.1 实验材料

拟南芥种子为哥伦比亚野生型, 突变体 *cpr5* 和突变体 *eds4*, 于 4 °C 春化 3 d, 在人工培养室培养, 培养条件为 16 h

光照, 8 h 黑暗, 光照强度 120 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, 温度 22 °C, 相对湿度 82%。幼苗长至 40 d 大小时取叶片为材料进行相关实验。

1.2 实验方法

1.2.1 荧光光谱的测量

用 Lambda35 U V/V is 型分光光度计对经过水杨酸浸泡处理的三种拟南芥叶片叶绿体荧光特性进行测定, 每隔 10 min 测定一次, 观察光谱中光系统 I (730 nm) 和光系统 II (680 nm) 峰值以及经 DCF 标记后活性氧产生量 (即 525 nm 峰值) 在水杨酸处理后 60 min 内的变化情况。将拟南芥叶片置于比色杯中放于专用架上固定后进行测定, 计算机会自动记录每次测量的数据, 在计算机上出现一系列随激发波长增长而变化的曲线。具体参数设置为: 激发波长 488 nm, 激发狭缝 10 nm, 发射狭缝 8.5 nm, 扫描速度 200 $\text{nm} \cdot \text{min}^{-1}$, 扫描波长范围 600~800 nm 或 500~800 nm (DCF 标记条件下)。

1.2.2 延迟荧光测量系统与延迟荧光测量

延迟荧光测量系统装置如图 1 所示。系统主要由激光光源、温度控制、探测传感器、数据采集及处理系统和便于活体伸入的暗室等部分组成。其技术细节及原理请参看文献

收稿日期: 2008-10-18, 修订日期: 2009-01-22

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30570165, 30470494), 广东省省科技攻关项目 (2007A020300008-6), “863”项目 (2007AA10Z204) 和华南师范大学激光生命科学省部共建教育部重点实验室开放课题基金项目资助

作者简介: 陈志强, 1982 年生, 华南师范大学生命科学学院在读硕士研究生 e-mail: czqczq@163.com

* 通讯联系人 e-mail: chenwl@snu.edu.cn

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

[8, 9]。

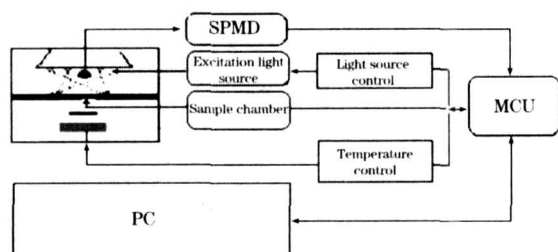


Fig 1 Diagram of experimental setup for delayed fluorescence measurement

2 结果与讨论

2.1 外源水杨酸处理条件下三种拟南芥离体叶片实时荧光光谱分析

实验发现在 100 和 300 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 较低浓度的水杨酸处理下野生型拟南芥离体叶片荧光发射光谱的 680 nm 峰值从处理开始后 60 min 内下降仅为 0.5% ~ 18% 图 2(a) 和 0.4% ~ 16% 图 3(a), 表明较低浓度水杨酸对野生型拟南芥离体叶片的光合效能在短时间内并无明显影响。拟南芥 eds4 叶片在 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 外源水杨酸处理下其荧光发射光谱的 680

nm 峰值从处理开始后 60 min 内下降 2.9% ~ 19% 图 2(c), 显示 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的外源水杨酸对 eds4 叶片的光合电子传递及叶片光合效能并无明显影响; 而在 300 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的外源水杨酸处理情况下其相应的 680 nm 峰值明显下降, 从处理开始后 60 min 内下降 14% ~ 86% 图 3(c), 显示 300 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的外源水杨酸对 eds4 叶片光合作用有一定的促进作用, 可使叶片的光合效能较好的维持并有所提升。拟南芥 cpr5 叶片的荧光发射光谱的 680 nm 峰值在 100 和 300 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 水杨酸处理情况下均大幅升高, 从处理开始后 60 min 内升高分别为 46% ~ 89% 图 2(b) 和 25% ~ 92% 图 3(b), 这表明外源水杨酸的施用对于 cpr5 叶片的光合作用产生了强烈的抑制, 使得光合电子传递紊乱, 光合效能降低, 光谱特征曲线对应的 680 nm 峰值大幅升高, 显示 100 和 300 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 外源水杨酸对 cpr5 叶片的光合作用形成了一种胁迫。实验用 500 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 外源水杨酸处理三种拟南芥叶片并测定相应的荧光发射光谱发现, 从处理开始后 60 min 内, 野生型拟南芥离体叶片, cpr5 叶片和 eds4 叶片的 680 nm 峰值增加幅度分别为: 67% ~ 79% 图 4(a), 8.1% ~ 43% 图 4(b) 和 14% ~ 44% 图 4(c)。结果显示了 500 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 较高浓度的外源水杨酸对三种拟南芥离体叶片形成了一种胁迫, 进而阻抑了光合过程中的电子传递, 降低了叶片光合作用效能。

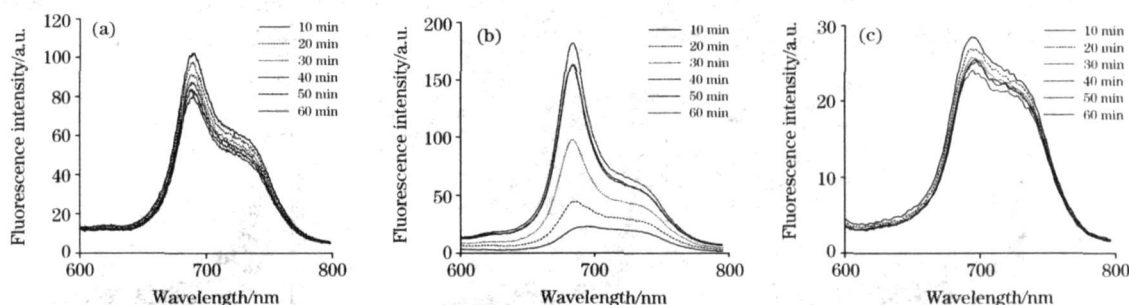


Fig. 2 Fluorescence emission spectra of three different *Arabidopsis* leaves with 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SA treatment along with the time

The fluorescence spectra of the WT *Arabidopsis* leaf(a), the fluorescence spectra of the cpr5 leaf (b) and the fluorescence spectra of the eds-4 leaf (c)

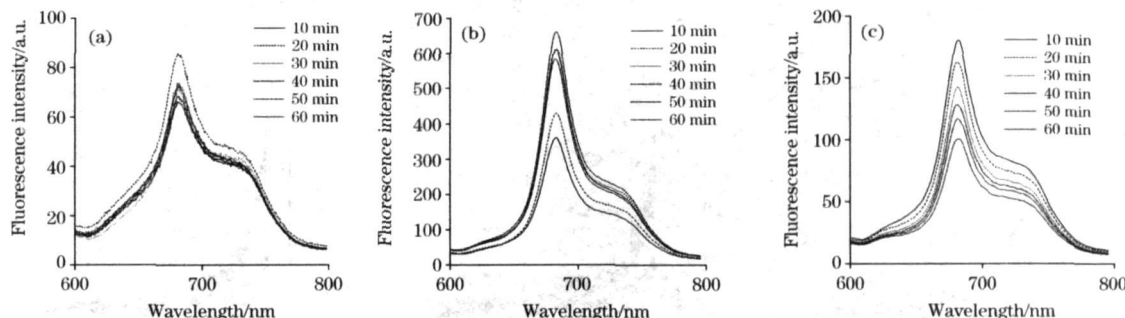


Fig. 3 Fluorescence emission spectra of three different *Arabidopsis* leaves with 300 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SA treatment along with the time

The fluorescence spectra of the WT *Arabidopsis* leaf(a), the fluorescence spectra of the cpr5 leaf (b) and the fluorescence spectra of the eds-4 leaf (c)

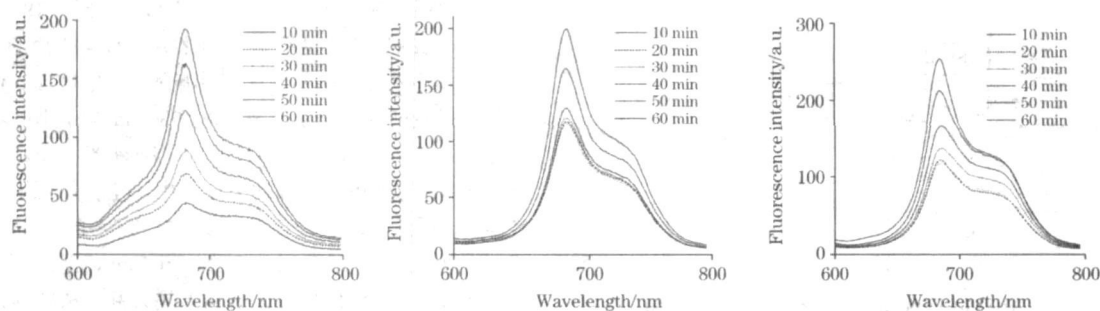


Fig 4 Fluorescence emission spectra of three different *Arabidopsis* leaves with $500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SA treatment along with the time

The fluorescence spectra of the WT *Arabidopsis* leaf (a), the fluorescence spectra of the *cpr5* leaf (b) and the fluorescence spectra of the *eds4* leaf (c)

2.2 外源水杨酸处理条件下三种拟南芥离体叶片实时延迟荧光变化分析

针对上述荧光发射光谱的实验结果,我们利用自制的延迟荧光仪做了对比测定。实验结果发现在 $300 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 水杨酸处理情况下野生型拟南芥离体叶片延迟荧光强度在处理 60 min 没有明显变化图 5(a),表明低浓度水杨酸对野生型拟南芥离体叶片的光合效能特别是 PS II 反应中心的光化反应效率在短时间内并无明显影响; *eds4* 叶片在 $300 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 外源水杨酸处理后其相应延迟荧光强度明显升高,从处理开始后 60 min 内升高了 40%~60% 图 5(c),显示出 $300 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的外源水杨酸对 *eds4* 叶片光合作用有一定的促进作用,可使叶片的光合效能较好的维持并有所提升;而

cpr5 叶片在 $300 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 水杨酸处理后其相应延迟荧光强度明显下降,从处理开始后 60 min 内下降了 8.3%~66.7% 图 5(b),这显示 $300 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的外源水杨酸对 *cpr5* 叶片的光合作用产生了强烈的抑制,使得其光合电子传递紊乱,光合效能降低,显示 $300 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的外源水杨酸处理对 *cpr5* 叶片意味着一种胁迫。当用 $500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 外源水杨酸处理三种拟南芥叶片并测定相应的延迟荧光强度变化时发现,从处理开始后 60 min 内,野生型拟南芥离体叶片, *cpr5* 叶片和 *eds4* 叶片的延迟荧光强度均有不同程度的下降,下降幅度分别为: 22%~66.7% 图 6(a), 9%~70% 图 6(b) 和 2.9%~70.1% 图 6(c),表明 $500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的外源水杨酸对三种拟南芥离体叶片均形成了一种胁迫,进而阻抑和降低了叶片

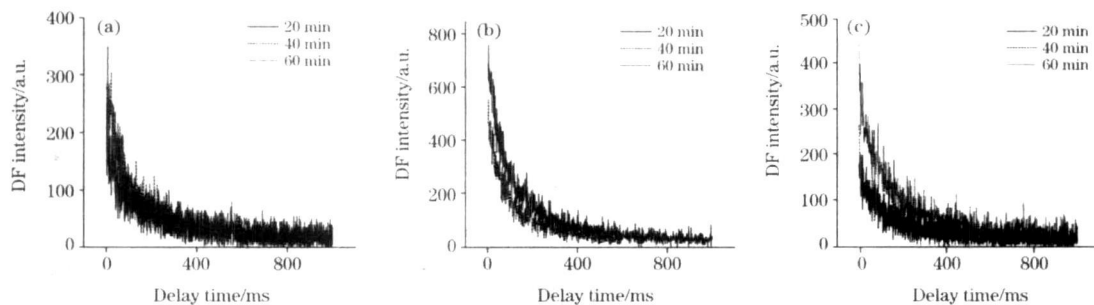


Fig. 5 Changes in DF intensity of three different *Arabidopsis* leaves with $300 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SA treatment along with the time

The change in DF intensity of the WT *Arabidopsis* leaf (a), the change in DF intensity of the *cpr5* leaf (b) and the change in DF intensity of the *eds4* leaf (c)

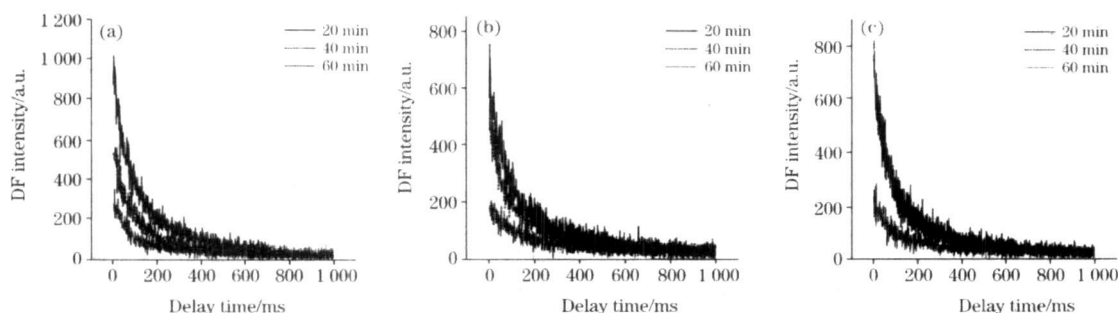


Fig. 6 Changes in DF intensity of three different *Arabidopsis* leaves with $500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SA treatment along with the time

The change in DF intensity of the WT *Arabidopsis* leaf (a), the change in DF intensity of the *cpr5* leaf (b) and the change in DF intensity of the *eds4* leaf (c)

光合作用效能。这些结果与荧光发射光谱实验所得结果相互吻合,进一步证实了我们的结论。同时也进一步证实了延迟荧光作为光合器官生理状态内在的高灵敏探针,评价植物光合作用性能的良好指标的正确性。

2.3 叶片活性氧产生量即叶片荧光光谱 525 nm 与 680 nm 峰值相关性变化分析

通过 DCF 标记活性氧检测了外源水杨酸作用下叶片活性氧产生量的变化,比较发现叶片在 $500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 外源水杨酸作用下 60 min 内其 525 nm 峰值随着时间推移逐渐升高,即叶片组织中活性氧产生了明显的积累(图 7),而三种拟南芥叶片的 525 nm 峰值变化不尽相同,野生型拟南芥离体叶片 525 nm 峰值变化较为平稳,随时间推移每 10 min 增

加 25% 图 7(a); eds4 叶片 525 nm 峰值从处理开始后 40 min 内变化较为平稳,而后急剧升高,变化幅度为 30% ~ 90% 图 7(b); cpr5 叶片的 525 nm 峰值从处理开始后 30 min 内变化较为平稳,随后大幅升高,变化幅度为 20% ~ 40% 图 7(c)。另外,实验发现 $500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 外源水杨酸作用下野生型拟南芥离体叶片的 525 nm 峰值变化与 680 nm 峰值变化表现出较好的正相关性($r = 0.99732$) 图 7(e),二者在 $500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 外源水杨酸作用下 60 min 内均随着时间推移逐渐升高,且趋势相同,升高幅度分别为 21.4% ~ 64.3%, 23.7% ~ 76.3% 图 7(d),表明较高浓度的外源水杨酸使拟南芥叶片组织活性氧产生了积累的同时使得光合电子传递受到抑制,从而降低了叶片光合作用中 PS II 的光合性能。

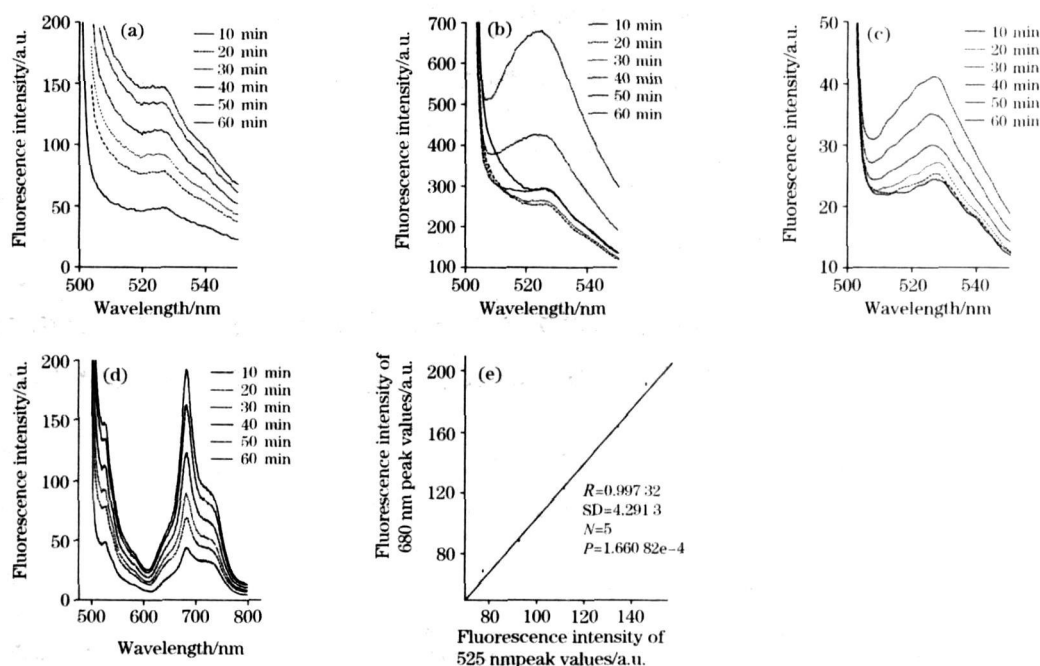


Fig 7 Changes in the 525 nm and the 680 nm peak values of the fluorescence emission spectra of the *Arabidopsis* leaves with $500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SA treatment along with the time

Changes in the 525 nm peak values of the WT *Arabidopsis* leaf (a), changes in the 525 nm peak values of the cpr5 leaf (b), changes in the 525 nm peak values of the eds4 leaf (c), the correlative change in the 525 nm and the 680 nm peak values of the WT *Arabidopsis* leaf (d) and the correlative change analysis of the 525 nm and the 680 nm peak values (e)

3 结 论

光谱分析技术拥有分析速度快、效率高、无损伤、成本低等优点。近年来光谱分析技术在作物品种鉴别,质量评价以及生长信息检测等方面的应用也得到了重视和长足发展^[10]。延迟荧光是光合器官生理状态内在的高灵敏探针,是 PS II 作用中心光化反应效率的内在探针,是评价植物光合作用性能的良好指标,延迟荧光技术是一门新兴技术,不少学者对其与光合速率的相关性以及环境胁迫条件下植物光合作用中相应延迟荧光的变化进行了研究^[11-15]。光谱分析和延迟荧光技术相结合,有望成为一套实时监测植物胁迫生理、快速评价植物抗性的可靠的技术系统。另外,本实验通过 DCF

标记活性氧检测了外源水杨酸作用下叶片活性氧产生量的变化,光谱分析发现拟南芥叶片在 $500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 外源水杨酸处理后 60 min 内其 525 nm 峰值随着时间推移逐渐升高,即叶片组织中过氧化氢等活性氧产生了明显的积累,这种积累必然会使得叶片组织中形成较高水平的过氧化氢,这不仅会对叶绿体光合电子传递以及光合效率产生影响,而其极易引起的过氧化伤害也会对叶片的光合机构形成一种破坏。我们通过实验证实了外源水杨酸与活性氧的积累以及叶片光合作用中 PS II 反应中心的电子传递、光合效能之间存在相关性的变化。过氧化氢在植物抗病反应中的作用虽然已被证实,然而水杨酸诱导形成的过氧化氢等活性氧积累的具体调节机制和作用方式则有待于更进一步的深入研究。

参 考 文 献

- [1] Jones A M. Science, 1994, 263: 183.
- [2] Klessing D F, Mamay J. Plant Molecular Biology, 1994, 26(5): 1439.
- [3] Raskin I. Plant Physiology, 1992, 99(3): 799.
- [4] Delaney T P, Uknes S, Vernooij B, et al. J. Science, 1994, 266: 1247.
- [5] ZHANG Shigong, GAO Jiyin, SONG Jingzhi(张士功, 高吉寅, 宋景芝). Acta Phytophysiological Sinica(植物生理学报), 1998, 25(2): 159.
- [6] Raskin I. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1992, 43: 439.
- [7] Larkindale J, Knight M R. Plant Physiology, 2002, 128(2): 682.
- [8] Wang Junsheng, Xing Da, Zhang Lingrui, et al. Biosensors & Bioelectronics, 2007, 22(12): 2861.
- [9] Zhang Lingrui, Xing Da, Wang Junsheng. Sensors, 2007, 7(1): 52.
- [10] LI Xiaoli, TANG Yueming, HE Yong, et al(李晓丽, 唐月明, 何勇, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2008, 28(3): 578.
- [11] WANG Chenglong, XING Da, ZENG Lizhang(王成龙, 邢达, 曾礼漳). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2006, 26(1): 6.
- [12] Li Qiang, Xing Da, Jia Li, et al. Journal of Photochemistry and Photobiology B, 2007, 87(33): 183.
- [13] Zhang Lingrui, Xing Da. Photochemical & Photobiological Sciences, 2008, 7(3): 352.
- [14] Zhang Lingrui, Xing Da, Wang Junsheng, et al. Photochemical & Photobiological Sciences, 2007, 6: 635.
- [15] Zhang Lingrui, Xing Da. Plant and Cell Physiology, 2008, 49(7): 1092.

Effects of Exogenous Salicylic Acid on Photosynthesis in *Arabidopsis* Leaves Based on Fluorescence Spectra and Delayed Fluorescence Technique

CHEN Zhiqiang^{1, 2}, CHEN Weirui^{1, 2*}, YANG Chengwei¹

1. College of Life Science, Guangdong Key Lab of Biotechnology for Plant Development, South China Normal University, Guangzhou 510631, China
2. MOE Key Laboratory of Laser Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China

Abstract Salicylic acid plays an important role in the active oxygen metabolism and the photosynthesis of the plant. Wild type *Arabidopsis thaliana* (ecotype *Columbia*) and its two different mutants were used as experimental material: one is the *cpr5* mutant which has an abundant endogenous SA level under stress conditions, and the other is the *eds4* mutant which has a lacking endogenous SA level under stress conditions. The leaves of those three different *Arabidopsis* were treated with 100, 300, and 500 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ concentrations of salicylic acid, respectively. The fluorescence emission spectra and the delayed fluorescence were detected respectively. The authors found that there was a slight elevation in the photosynthetic efficiency of PS II of the WT and *eds4* leaves with 100 and 300 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SA treatment. However, there was a decrease in the photosynthetic efficiency and even a stress of the *cpr5* leaves with 100 and 300 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SA treatment. It was also showed that there came to be an obvious stress of the leaves of all three different kinds of *Arabidopsis* with 500 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SA treatment and the photosynthetic efficiency of them decreases sharply. The generation of active oxygen was also detected with the DCF labeling under 500 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SA treatment. The authors found that there was an obvious accumulation of active oxygen along with the time under SA treatment.

Keywords Salicylic acid; *Arabidopsis*; Fluorescence; Active oxygen

Keywords Salicylic acid; *Arabidopsis*; Fluorescence emission spectra; Delayed fluorescence; Active oxygen

(Received Oct. 18, 2008; accepted Jan. 22, 2009)

* Corresponding author