

## 低温胁迫对木薯叶片叶绿素荧光参数及 PS II 相关蛋白表达水平的影响

安飞飞<sup>1,2</sup>, 李庚虎<sup>1,2</sup>, 陈霆<sup>1,2</sup>, 李开绵<sup>1,2\*</sup>

(1.中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所, 海南 儋州 571737; 2.农业部木薯种质资源保护与利用重点实验室, 海南 儋州 571737)

**摘要:**以木薯栽培种华南8号(cv. SC8)盆栽苗为材料,研究5℃低温胁迫7d期间叶片叶绿素含量及荧光参数、光系统II(PS II)相关蛋白表达水平的动态变化。结果表明:随着胁迫时间的延长,叶绿素a和叶绿素b含量均先下降后缓慢升高,且均在处理2d后达到最低;低温胁迫期间,最大光合效率( $F_v/F_m$ )、光化学量子效率( $\Phi_{PSII}$ )、光化学淬灭系数( $q_p$ )、非光化学淬灭系数( $NPQ$ )及光合电子传递速率( $ETR$ )均显著下降,其中 $F_v/F_m$ 持续下降, $\Phi_{PSII}$ 、 $q_p$ 和 $ETR$ 在胁迫2d后达到最低后缓慢上升, $NPQ$ 在胁迫5d后达到最低;叶绿素含量、叶绿素荧光参数显著下降表明,胁迫后PS II反应中心捕光能力、开放程度及光化学转化效率显著下降,从而抑制了叶片的光合速率;PS II中D1、D2、放氧复合体(OEC)及核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶(Rubisco)的表达水平均在低温胁迫2d后达到最低水平,且D1蛋白下调显著;PS II中相关蛋白表达水平下调,也在蛋白质水平上验证了低温胁迫抑制叶片的光合速率。

**关键词:**木薯;低温胁迫;叶绿素荧光;蛋白质

中图分类号:S533.01 文献标志码:A 文章编号:1007-1032(2014)02-0148-05

## Influence of low temperature stress on chlorophyll fluorescence parameters and expression levels of proteins in PS II of cassava

AN Fei-fei<sup>1,2</sup>, LI Geng-hu<sup>1,2</sup>, CHEN Ting<sup>1,2</sup>, LI Kai-mian<sup>1,2\*</sup>

(1.Tropical Crops Genetic Resources Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou, Hainan 571737, China; 2.Key Laboratory of Ministry of Agriculture for Germplasm Resources Conservation and Utilization of Cassava, Danzhou, Hainan 571737, China)

**Abstract:** Potting seedling of cassava cultivar SC8 was used as materials to investigate the changes of leave chlorophyll content, chlorophyll fluorescence parameters and the expressions of proteins in PS II of cassava seedlings exposed to low temperature (5 °C) for 7 days. The results show that during the stress, chlorophyll a and chlorophyll b contents were both decreased first and then slowly increased, reaching the minimum 2 days after stress; maximum photochemical efficiency ( $F_v/F_m$ ), photochemical quantum efficiency of photosystem ( $\Phi_{PSII}$ ), photochemical quenching ( $q_p$ ), non-photochemical quenching ( $NPQ$ ) and electron transport rate ( $ETR$ ) were significantly decreased with  $F_v/F_m$  continuously declined, while  $\Phi_{PSII}$ ,  $q_p$  and  $ETR$  first decreased to minimum level 2 days after stress, and then slowly rose, and  $NPQ$  decreased to minimum level 5 days after stress. The significant decrease of chlorophyll content and chlorophyll fluorescence parameters indicate that the light-harvesting ability, openness and photochemical conversion rate in PSII reaction center were decreased significantly, which inhibiting the photosynthetic efficiency of cassava leaves. The expression level of D1, D2, OEC and Rubisco reached the lowest 2 days after stress with D1 decreased significantly. The down-regulation of the

收稿日期: 2013-08-15

基金项目: 国家“973”计划项目(2010CB126606); 国家自然科学基金国际合作 NSFC-CG 项目(31361140366); “十二·五”农村领域国家科技计划课题(2012AA101204-2); 中央级公益性科研院所基本科研业务专项(PZS-062)

作者简介: 安飞飞(1985—), 女, 河北保定人, 硕士, 主要从事木薯蛋白质组学研究, aff85110@163.com; \*通信作者, likaimian@sohu.com

expression of proteins in PS II verifies at protein level that low temperature inhibits photosynthesis of leaves.

**Key words:** cassava; low temperature stress; chlorophyll fluorescence; proteins

木薯 (*Manihot esculenta* Crantz) 为大戟科 (Euphorbiaceae) 作物, 原产于南美热带地区, 具有高生物量、高淀粉、抗旱、耐贫瘠等诸多优良特性<sup>[1]</sup>。目前, 木薯主要种植于南北纬 30° 间, 海拔 2 km 以下, 年均气温 18 °C、无霜期在 8 个月以上的地区<sup>[2]</sup>。木薯最适生长温度为 25 ~ 29 °C。当温度为 14 °C 时生长会受到抑制, 10 °C 以下时停止生长, 并受寒害<sup>[3]</sup>。木薯受到低温胁迫后, 叶片脯氨酸含量增幅提高, 叶绿素含量下降变慢<sup>[4]</sup>, 可溶性淀粉、丙二醛及保护酶活性<sup>[5]</sup>也受影响。在低温胁迫后的恢复过程中, 木薯的脯氨酸、叶绿素含量增加较快<sup>[4]</sup>。木薯耐寒性与细胞膜透性、SOD 和 POD 活性、MDA、脯氨酸、可溶性糖和可溶性蛋白含量息息相关<sup>[6]</sup>。

到目前为止, 木薯应对低温胁迫的耐寒机理尚未清楚, 低温胁迫对木薯叶片光合效率及相关蛋白质表达水平的影响少见报道。本研究以国内推广较多的高产、高淀粉栽培种华南 8 号 (cv. SC8) 盆栽苗为材料, 进行 5 °C 低温处理, 测定低温处理 7 d 内叶绿素含量及叶绿素荧光参数的变化, 并利用 Western Blot 技术检验 D1、D2、OEC 及 Rubisco 的表达水平, 旨在为揭示木薯的耐寒机理和耐寒育种提供参考数据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

木薯 SC8 来自中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所国家木薯种质资源圃。选取生长 40 d 左右、长势大体一致的盆栽苗置于恒温恒湿箱内, 在 (25±1) °C、3 000 lx, 16 h/8 h (光/暗) 光照周期条件下培养 1 d。培养箱内温度基本稳定后, 收集叶片作为未处理样品, 后将培养箱温度设置为每分钟下降 0.03 °C 直至 5 °C, 其他条件不变。待温度刚刚降到 5 °C 时, 收集叶片 (设为 0 天), 之后每隔 1 d 收集叶片用于检测。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 叶绿素含量的测定

参照文献<sup>[7]</sup>提取叶绿素。称取 0.1 g 木薯叶片,

剪碎, 加入 10 mL 95% 的乙醇, 避光浸泡提取至叶片无绿色。吸取叶绿素提取液, 以 95% 的乙醇为对照, 分别在波长 663 nm 和 645 nm 处测定吸光度。按下面的公式分别计算叶绿素 a、叶绿素 b 及总叶绿素含量。

叶绿素 a 含量 (mg/g) =  $(12.63 \times A_{663 \text{ nm}} - 2.52 \times A_{645 \text{ nm}}) \times V / (1000 \times W)$  ;

叶绿素 b 含量 (mg/g) =  $(20.47 \times A_{645 \text{ nm}} - 4.73 \times A_{663 \text{ nm}}) \times V / (1000 \times W)$  ;

叶绿素 a、b 的总含量 (mg/g) =  $(7.90 \times A_{663 \text{ nm}} + 17.95 \times A_{645 \text{ nm}}) \times V / (1000 \times W)$ 。

式中:  $V$  为提取液用量 (mL);  $W$  为样品质量 (g)。

#### 1.2.2 叶绿素荧光参数的测定

于 2013 年 5 月 20 日至 28 日定时 (10:00) 将木薯植株暗适应约 20 min, 进行周期性饱和脉冲 ( $6000 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , 脉冲时间 0.8 s) 后, 用便携式调制叶绿素荧光仪 PAM-2500 (WALZ, German) 直接放在植株叶片上测定  $F_v/F_m$ 、 $\Phi_{\text{PSII}}$ 、 $q_p$ 、 $NPQ$  及  $ETR$ 。

#### 1.2.3 PS II 相关蛋白表达的分析

参照 Carvalho 等<sup>[8]</sup>的方法, 取 0.5 g 木薯叶片, 经丙酮沉淀后得到蛋白质。用 Western Blot 分析 D1、D2、OEC 及 Rubisco 的表达水平。

#### 1.2.4 数据分析

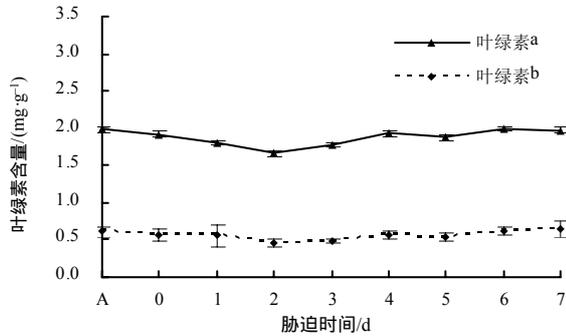
采用 Excel 2003 和 DPS v7.55 统计软件对数据进行分析, 差异显著性标准采用新复极差法 (Duncan)。

## 2 结果与分析

### 2.1 低温胁迫对木薯叶片叶绿素含量的影响

由图 1 可以看出, 在低温处理过程中, 随着时间的延长, SC8 叶片叶绿素 a 和叶绿素 b 含量均呈先下降、后缓慢升高、最终恢复低温处理前的水平的规律。低温处理前期, 叶绿素 a 和叶绿素 b 含量呈下降趋势, 且叶绿素 a 下降速度较快。由此可见, 低温处理对叶绿素的影响主要表现为对叶绿素 a 的影响。在低温处理 1 d 后, 叶绿素 a 和叶绿素 b 含量分别为 1.80 和 0.55 mg/g, 显著低于处理前的 1.99 和 0.61 mg/g, 且差异达到极显著水平 ( $P < 0.01$ ); 低

温处理 2 d 后,叶绿素 a 含量和叶绿素 b 含量均达到最低值,分别为 1.66 和 0.46 mg/g;之后随着时间的延长,叶绿素 a 和叶绿素 b 含量缓慢上升,但在低温处理 5 d 后又出现下降;低温处理 7 d 后,叶绿素 a 和叶绿素 b 含量基本恢复到处理前的水平,分别为 1.97 和 0.64 mg/g。



A 示胁迫前 1 d。

图 1 低温胁迫下木薯叶片叶绿素的含量

Fig. 1 Chlorophyll content of cassava leaves under low temperature

## 2.2 低温胁迫对木薯叶绿素荧光参数的影响

由表 1 可知,低温胁迫后不同时间点收集的叶片的  $F_v/F_m$  有显著性差异,且随着胁迫时间的延长,其值也持续下降,在处理 7 d 后达到最低值 0.273。表明低温胁迫显著降低了木薯叶片 PS II 的潜在光合效率。低温胁迫 2 d 内,  $\Phi_{PSII}$  显著下降,在 2 d 后达到最低值 0.004,表明此时 PS II 反应中心的光能捕获效率最低。低温胁迫后  $q_p$  及  $ETR$  均表现出和  $\Phi_{PSII}$  相同的变化规律,低温胁迫 2 d 后,  $q_p$  为 0.023,  $ETR$  为 7.67,显著低于处理前的水平,表明此时 PS II 反应中心的开放程度最低,光合电子传递速率均达到最低。随着低温胁迫时间的延长,  $NPQ$  显著下降,在 5 d 后达到最低值,后缓慢上升,表明低温胁迫后,木薯耗散过剩光能能力下降,光保护能力降低,胁迫 5 d 达到最低值后,光保护能力缓慢得到恢复。

表 1 低温胁迫下木薯叶片的叶绿素荧光动力学参数

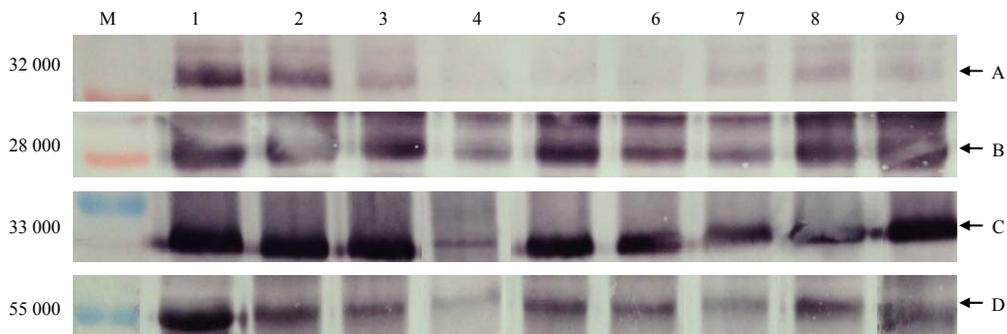
Table 1 Chlorophyll fluorescence kinetic parameters of cassava leaves under low temperature

时间/d	$F_v/F_m$	$\Phi_{PSII}$	$q_p$	$ETR$	$NPQ$
胁迫前	1 (0.718±0.008)A	(0.064±0.003)A	(0.143±0.009)A	(32.33±1.528)A	(2.154±0.173)A
胁迫后	0 (0.663±0.006)B	(0.018±0.003)BC	(0.047±0.006)CD	(24.67±0.577)B	(1.213±0.125)B
	1 (0.611±0.013)C	(0.012±0.002)C	(0.032±0.005)DE	(12.67±1.155)DE	(0.865±0.013)C
	2 (0.514±0.014)D	(0.004±0.002)D	(0.023±0.003)E	(7.67±0.577)E	(0.699±0.090)C
	3 (0.499±0.005)DE	(0.012±0.002)C	(0.044±0.004)CD	(12.33±0.577)E	(0.187±0.044)D
	4 (0.462±0.022)EF	(0.014±0.002)C	(0.056±0.002)C	(16.33±1.528)D	(0.167±0.013)D
	5 (0.441±0.017)F	(0.013±0.001)C	(0.048±0.002)C	(16.00±1.732)DE	(0.107±0.013)D
	6 (0.345±0.034)G	(0.016±0.001)BC	(0.059±0.011)C	(20.33±1.155)C	(0.214±0.045)D
	7 (0.273±0.018)H	(0.021±0.004)B	(0.076±0.007)B	(24.33±3.055)B	(0.268±0.013)D

## 2.3 低温胁迫对 PS II 相关蛋白表达水平的影响

利用 Western Blot 技术对低温胁迫 7 d 内 D1、D2、OEC 及 Rubisco 表达水平进行分析,结果见图

2。低温胁迫后, D1 蛋白的表达水平显著下调,且在胁迫 2 d 后基本不表达,表明此时 D1 蛋白降解速率远大于合成速率,后随着胁迫时间的延长缓慢



M 蛋白 Marker (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, Fermentas 公司); 1 胁迫前 1 d 样品; 2 胁迫后 0 d 样品; 3~9 胁迫后 1~7 d 样品; A、B、C、D 分别为 D1、D2、OEC、Rubisco 的检测结果。

图 2 D1、D2、OEC 及 Rubisco 蛋白的 Western Blot 分析结果

Fig. 2 Western Blot analysis of proteins D1, D2, OEC and Rubisco

上调,此时其合成速率大于降解速率。D2 蛋白的表达水平在胁迫后下调,且胁迫 2 d 时达到最低,胁迫 7 d 后恢复到低温处理前的水平。OEC 在胁迫过程中表达水平下调较缓,在胁迫 2 d 时达到最低,此时 PS II 的放氧能力较低,7 d 后恢复到低温处理前的水平。Rubisco 的表达水平在低温胁迫前期下调明显,胁迫 2 d 时最低,后缓慢上升,5 d 时又下降,之后上升。这些蛋白表达水平的变化与叶绿素荧光参数  $\Phi_{PSII}$  的变化相一致,在蛋白质水平上验证了低温胁迫抑制叶片的光合作用。

### 3 结论与讨论

叶片中的色素含量是反映植物光合能力的一个重要指标,叶绿素在光能吸收和转换中起着非常重要的作用<sup>[9]</sup>。低温常常引起叶绿素含量变化。白青华等<sup>[10]</sup>发现,低温胁迫后辣椒幼苗叶绿素 a、叶绿素 b 及总叶绿素含量均下降。温度越低,叶绿素 a 及总叶绿素含量下降幅度越大<sup>[11-12]</sup>。Liu 等<sup>[13]</sup>研究发现,随着低温处理时间的延长,患白化病小麦的叶绿素含量逐渐降低。高丽慧等<sup>[14]</sup>、Zhou 等<sup>[15]</sup>也有类似的研究结论。本试验中,低温胁迫初期的木薯叶片叶绿素 a、b 含量均呈现下降趋势,后随着时间延长缓慢上升。低温引起木薯叶片叶绿素含量下降的原因可能是低温胁迫导致光系统发生不可逆的变化,进而影响到叶绿素含量<sup>[16]</sup>。此外,低温会导致叶绿素合成障碍<sup>[17]</sup>,从而使得叶绿素含量急剧下降。

植物叶片中叶绿素荧光与光合作用中光系统对光能的吸收、传递、耗散和分配等反应紧密相连,各种因素对光合作用的影响都可通过叶绿素荧光参数的变化反映出来<sup>[18]</sup>。许多胁迫因子,如干旱、热害和冷害等都可以使 PS II 光能利用效率下降。本研究中,低温胁迫后  $F_v/F_m$  显著下降,表明 PS II 已经受到低温胁迫的损害,这与周建<sup>[19]</sup>、吴雪霞<sup>[20]</sup>、刘慧英<sup>[21]</sup>等的研究结果一致,其值的下降可能是低温胁迫导致 PS II 反应中心失活引起。在逆境胁迫下,PS II 反应中心失活将严重影响光化学反应<sup>[21]</sup>。本试验中,随着温度的降低, $\Phi_{PSII}$ 、 $q_p$ 、 $NPQ$  和  $ETR$  均显著下降,表明 PS II 反应中心失活使得天线色素原初捕光能力减弱,吸收光能减少,光合电子传递能力减弱,因此,低温胁迫降低了 PS II 的光能

捕获能力与光合电子传输能力,进而降低了木薯叶片光合效率。低温导致光合速率下降在马铃薯中也有类似的结果<sup>[22]</sup>。

D1、D2 蛋白是组成 PS II 的重要组分<sup>[23]</sup>,温度会诱导其构象发生变化,从而抑制 PS II 的电子传递。D1 对温度特别敏感,正常条件下,D1 的合成和降解处于动态平衡,一旦受到胁迫,D1 的降解速率会超过合成速率,导致 PS II 反应中心遭受破坏<sup>[24]</sup>。本试验中,D1 在胁迫后表达水平急剧下降,此时 D1 蛋白大量降解,这可能与胁迫环境中产生的大量活性氧有关<sup>[25]</sup>。低温胁迫常常使相对分子质量为 33 000 的外来蛋白从 PS II 复合体中释放或松散地与 PS II 结合,使光合放氧过程不稳定<sup>[26]</sup>,进而使 OEC 的表达水平下调。本试验的结果也表明,在低温胁迫后 OEC 的表达水平下调。Rubisco 活性与光合速率有很好的相关性<sup>[27]</sup>。本研究中,低温胁迫降低了木薯叶片 Rubisco 活性,这可能是导致叶片光合速率下降的主要原因。

### 参考文献:

- [1] 陈冠喜,李开绵,叶剑秋,等. 6 个木薯品种生长发育及产量性状的初步研究[J]. 热带农业科学, 2009, 29(6): 26-29.
- [2] 张振文,陆小静,叶剑秋,等. 木薯种植对土壤肥力影响的研究进展[J]. 广西农业科学, 2008, 39(5): 639-643.
- [3] 黄洁,闫庆祥,李开绵,等. 木薯嫩茎枝快繁种茎技术[J]. 广西农业科学, 2005, 36(6): 506-508.
- [4] 周玉飞,曾长英,陈新,等. 低温驯化对木薯耐寒性形态、生理特性的影响[J]. 热带农业科学, 2011, 31(6): 31-36.
- [5] 秦翠鲜,杨翠芳,郭元元,等. 低温胁迫对木薯腋芽部分生理指标的影响[J]. 热带作物学报, 2011, 32(5): 911-914.
- [6] Luo X L, Huang Q F. Studies on the cold resistance of cassava[J]. Journal of Agricultural Science, 2012, 4(6): 104-119.
- [7] 孔祥生. 植物生理学实验技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2008.
- [8] Carvalho L J C B, Lippolis J, Chen S, et al. Characterization of carotenoid-protein complexes and gene expression analysis associated with carotenoid sequestration in pigmented cassava (*Manihot esculenta* Crantz) storage root[J]. The Open Biochemistry Journal, 2012, 6: 116-130.
- [9] Diter von Wettstein, Simon Gough, Kannangara G

- Chlorophyll biosynthesis[J]. *The Plant Cell*, 1995, 7(7): 1039-1057.
- [10] 白青华, 郭晓冬, 王萍, 等. 低温对辣椒幼苗叶片氮及叶绿素含量的影响[J]. *甘肃农业大学学报*, 2009, 44(6): 49-51.
- [11] 王晶, 徐志英, 盛云燕. 低温对绿萝幼苗叶片氮素及叶绿素含量的影响[J]. *现代农业科技*, 2011 (15): 208-209.
- [12] 王宁, 吴军, 夏鹏云, 等. 低温胁迫对大叶冬青生理特性的影响[J]. *河南农业大学学报*, 2011, 45(4): 407-410.
- [13] Liu X G, Xu H, Zhang J Y, et al. Effect of low temperature on chlorophyll biosynthesis in albinism line of wheat (*Triticum aestivum*) FA85[J]. *Physiologia Plantarum*, 2012, 145(3): 384-394.
- [14] 高丽慧, 易津, 李菲. 三种禾本科牧草低温胁迫的生理响应[J]. *中国草地学报*, 2011, 33(3): 107-111.
- [15] Zhou C Y, Yang C D, Zhan L. Effect of low temperature stress on physiological and biochemical characteristics of podocarpus nagi[J]. *Agriculture Science and Technology*, 2012, 13(3): 533-536.
- [16] Kudoh H, Sonoike K. Irreversible damage to photosystem I by chilling in the light: Cause of the degradation of chlorophyll after returning to normal growth temperature [J]. *Planta*, 2002, 215(4): 541-548.
- [17] 刘东奇. 浅谈低温对绿色植物叶片中叶绿素含量的影响[J]. *中学生物学*, 2011, 27(9): 6-7.
- [18] Roháček K, Barták M. Technique of the modulated chlorophyll fluorescence: Basic concepts, useful parameters, and some application[J]. *Photosynthetica*, 1999, 37(3): 339-363.
- [19] 周建, 杨立峰, 郝峰鸽, 等. 低温胁迫对广玉兰幼苗光合及叶绿素荧光特性的影响[J]. *西北植物学报*, 2009, 29(1): 136-142.
- [20] 吴雪霞, 陈建林, 查丁石. 低温胁迫对茄子幼苗叶片叶绿素荧光特性和能量耗散的影响[J]. *植物营养与肥料学报*, 2009, 15(1): 164-169.
- [21] 刘慧英, 朱祝军, 史庆华. 低温胁迫下嫁接对西瓜光合特性及叶绿素荧光参数影响的研究[J]. *石河子大学学报: 自然科学版*, 2007, 25(2): 163-167.
- [22] 秦玉芝, 陈珏, 邢铮, 等. 低温逆境对马铃薯叶片光合作用的影响[J]. *湖南农业大学学报: 自然科学版*, 2013, 39(1): 26-30.
- [23] Ort D R, Yocum C F. Vol 4 Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions[M]. New York: Springer-Dordrecht, 1996: 1-9.
- [24] Anderson J M, Park Y I, Chow W S. Photoinactivation and photoprotection of photosystem II in nature[J]. *Physiologia Plantarum*, 1997, 100(2): 214-223.
- [25] Barker M, de Vries R, Nield J, et al. The deg proteases protect *Synechocystis* sp. PCC 6803 during heat and light stresses but are not essential for removal of damaged D1 protein during the photosystem two repair cycle[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(41): 30347-30355.
- [26] 李利红. 水杨酸、Ca<sup>2+</sup>和 NO 对高温强光胁迫下小麦叶绿体 D1 蛋白和 PS II 功能的调节作用[D]. 郑州: 河南农业大学生命科学院, 2010.
- [27] Lange O L, Nobel P S, Osmond C B, et al. Encyclopedia of Plant Physiology, NS, Vol. 12A: Interaction with the Physical Environment[M]. New York: Springer-Verlag, 1981: 57-107.

责任编辑: 罗 维

英文编辑: 罗 维