

光质对黄瓜叶片衰老与抗氧化酶系统的影响

王虹¹, 姜玉萍¹, 师恺¹, 周艳虹¹, 喻景权^{1,2}

(¹浙江大学园艺系, 杭州 310029; ²农业部园艺植物生长发育与生物技术重点开放实验室, 杭州 310029)

摘要: 【目的】明确不同光质对黄瓜叶片衰老的作用及其机制。【方法】以黄瓜为材料, 研究白光(W)、紫光(P)、蓝光(B)、绿光(G)、黄光(Y)和红光(R)等不同光质对叶片叶绿素、可溶性蛋白及丙二醛(MDA)的含量和CAT、G-POD、APX等抗氧化酶的活性及基因表达的影响。【结果】紫光和蓝光诱导了抗氧化酶基因的表达及活性的上升, 延缓了叶绿素和可溶性蛋白含量的下降, 并且使MDA的含量保持相对较低的水平, 从而延缓了植株的衰老。绿光、黄光和红光则抑制了抗氧化酶的活性, 导致黄瓜植株叶绿素和可溶性蛋白含量的不断下降及MDA含量的持续上升, 加速了植株的衰老进程。【结论】紫光和蓝光可以使叶片维持较高的抗氧化酶水平, 从而延缓了植株的衰老。

关键词: 黄瓜; 光质; 抗氧化酶; 衰老

Effects of Light Quality on Leaf Senescence and Activities of Antioxidant Enzymes in Cucumber Plants

WANG Hong¹, JIANG Yu-ping¹, SHI Kai¹, ZHOU Yan-hong¹, YU Jing-quan^{1,2}

(¹Department of Horticulture, Zhejiang University, Hangzhou 310029; ²Key Laboratory of Horticultural Plant Growth, Development and Biotechnology, Ministry of Agriculture, Hangzhou 310029)

Abstract: 【Objective】 To investigate the mechanism involved in the different responses of leaf senescence to light qualities, cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings were exposed to white (W), purple (P), blue (B), green (G), yellow (Y), and red (R) lights for 15 d. 【Method】 The contents of chlorophyll, soluble proteins and MDA together with the expression and activities of antioxidant enzymes were measured. 【Result】 P and B increased the transcript levels and activities of antioxidant enzymes, the contents of chlorophyll, soluble proteins and MDA. In contrast, G, Y and R decreased the activities of antioxidant enzymes, the contents of chlorophyll, soluble proteins and MDA. 【Conclusion】 These results indicate that P and B prevented senescence by maintaining high levels of antioxidant enzymes.

Key words: *Cucumis sativus* L; light quality; antioxidant enzymes; senescence

0 引言

【研究意义】植物的衰老过程受温度和光照等环境因子的影响。迄今为止有关光照与植物叶片衰老的研究多集中在光照强度上^[1-2], 针对光质对叶片衰老的影响研究较少。研究不同光质对植物衰老的影响并阐明其机制, 对优质、高效现代农业的发展具有重要的理论和现实意义。【前人研究进展】许多研究表明,

叶片衰老引起光合效率的降低、叶绿素、蛋白的降解及代谢水平的下降等反应^[3-4]。植物体可以通过多种酶促和非酶促反应来避免活性氧可能对植株造成的伤害^[5], 从而延缓植株的衰老。一些学者认为抗氧化能力的下降及活性氧的大量累积是加速衰老的重要原因之一^[6]。研究表明, 光照强度与植物叶片的抗氧化能力密切相关, 强光引起抗氧化酶活性的升高, 而弱光则降低了抗氧化酶活性^[7-8]。在玉米叶片中, *Cat3* 可以

收稿日期: 2009-05-06; 接受日期: 2009-07-20

基金项目: 国家“973”项目(2009CB119000)、国家科技支撑项目(2008BADA6B02)

作者简介: 王虹, 博士。E-mail: wanghong3052@yahoo.com.cn。通信作者喻景权, 教授。Tel: 0571-86971120; E-mail: jqyu@zju.edu.cn

被蓝光和紫外光的光受体所诱导^[9], 这表明光质有可能也参与了植物抗氧化代谢的调控, 但仍需进一步明确不同光质的作用机理。增加光照中远红光 (far-red) 的比例可以显著减少叶绿素含量、叶片的重量及硝酸还原酶的活性, 从而诱导植株的衰老^[10]。这种现象可以被过量表达的 *PHYA* 所抑制, 说明光敏色素参与了植物光信号诱导的植物衰老过程的调控^[11]。大麦中的研究表明, 植物的光受体隐花色素参与了衰老进程的调控^[12]。【本研究切入点】尽管这些研究表明植物的光受体参与了对植物叶片衰老的调控, 但对于不同光质所引起的衰老机理尚不明了。【拟解决的关键问题】本文以种植面积较广的园艺作物黄瓜为材料, 分别进行不同光质处理。通过对黄瓜叶片叶绿素、可溶性蛋白、丙二醛含量和抗氧化酶的活性及基因表达等进行分析, 以明确不同光质在植物衰老过程中所起的作用。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

试验在人工气候室内进行。相对湿度控制在 75%—95%, 光周期 12 h。供试黄瓜品种为津优 1 号 (*Cucumis sativus* L. cv. Jinyou 1)。种子播种在草炭、蛭石和珍珠岩 (体积比为 6:3:1) 的混合基质中, 第一片真叶充分展开时移入装有同样基质的 5 L 盆中, 每盆 1 株, 每天用日本园式配方的营养液浇灌, 四叶一心时处理。

1.2 试验设计

试验共设 6 个处理, 分别为白光(W)、紫光(P)、蓝光(B)、绿光(G)、黄光(Y)和红光(R)处理。试验所用白炽灯由南京灯泡厂提供, 功率为 100 W, 单波光源为 LED 灯, 由日本日亚公司提供。不同光的光谱和光强采用中国产的 STC 4000 光谱分析系统及美国 Li-Cor 公司生产的量子传感器测定, 各光源的光谱见图 1。各光照处理用反光布隔开, LED 灯置于钢架顶部, 高度可调, 通过调节光源与幼苗的距离, 使光强保持在 $350 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。温度为 $30^\circ\text{C}/20^\circ\text{C}$, 相对湿度控制在 60%左右。每处理 10 株植株, 3 次重复, 采用随机排列的方式, 植株的摆放以不相互遮阴为原则。于处理前、处理的第 5、10 和 15 天取样, 用液氮固定样品, 置于 -80°C 的超低温冰箱保存。

1.3 试验方法

1.3.1 叶绿素含量的测定 将叶片置于 10 mL 90% 的丙酮中遮光浸泡测定, 按 Arnon 的方法计算其叶绿素含量^[13]。

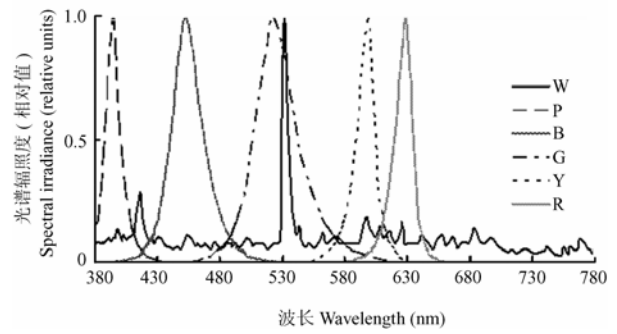


图 1 不同 LED 灯及白光的光谱分布图

Fig. 1 Relative spectral distribution of the LEDs and white light

1.3.2 酶液的提取及 CAT、SOD、APX、G-POD 活性和 MDA、可溶性蛋白含量的测定 取 0.5 g 叶片加 3 mL pH 7.8 $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液 (含 1%PVP, $0.2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA) 及少量石英砂 (测定 APX 时, 在提取液中加入 $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ AsA), 于冰浴中研磨提取, 匀浆液于 $15\ 000 \text{ g}$ 下 4°C 离心 20 min。上清液用于酶活性的测定及丙二醛和可溶性蛋白含量的测定。参照 Patra 的方法测定过氧化氢酶 (CAT) 活性^[14], 参照 Nakano 和 Asada 的改进方法测定抗坏血酸过氧化物酶 (APX) 活性^[15], 参照 Cakmak 和 Marschner 的改进方法测定愈创木酚过氧化物酶 (G-POD) 活性^[16], 参照 Giannopolitis 和 Ries 的改进方法测定超氧化物歧化酶 (SOD) 活性^[17]。按 Heath 的方法测定丙二醛 (MDA) 含量^[18]。用 Bradford 法测定可溶性蛋白含量^[19]。

1.3.3 荧光实时定量 PCR (qRT-PCR) 分析 采用 qRT-PCR 的方法分析黄瓜叶片中的抗氧化酶的转录水平。不同光质处理 3 d 后, 取叶片样品迅速用液氮保存后进行 RNA 提取和基因表达的分析。总 RNA 用 Trizol 提取液提取, 所得的总 RNA 用 DEPC 水溶解。用 Primer 5.0 设计引物, *Actin* 的引物: 上游 5'-AAAGATGACGCAGATAAT-3', 下游 5'-GAGATGGCTGGAATAG-3'。*CAT* 的引物: 上游 5'-TGGA CTCTGGTGATGGTGTGA-3', 下游 5'-CAATGAGGG ATGGCTGGAAAA-3'。*cAPX* 的引物: 上游 5'-ATGGG AAAGTGCTACCCTGTT-3', 下游 5'-ACAATGTCTGTGCCGAAAG-3'。*POD* 的引物: 上游 5'-AGTGCTTGT CCAGGAGTTGA-3', 下游 5'-AGGGATGAAGTGGGATAAAG-3'。*Fe-SOD* 的引物: 上游 5'-ATGAAAACAT ACAA AAAAGG-3', 下游 5'-ATGGACTCCCAGAGA

AAATC-3'。

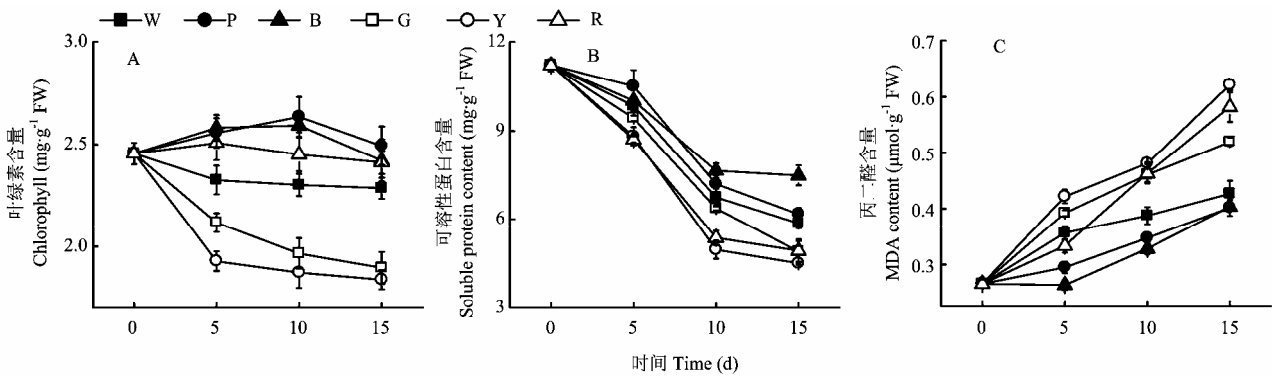
用 Qiagen 公司的 RNA 纯化试剂盒进行纯化，用 Fermentas 公司的反转录试剂盒合成 cDNA 的第一条链，以此作为 qRT-PCR 的模板。qRT-PCR 的体系 (20 μ L)：10 μ L iQ SYBR Green Supermix，1 μ L 稀释的 cDNA，0.1 μ mol·L⁻¹ 的上下游引物。qRT-PCR 在 Bio-Rad 公司的 iQ Multicolor 实时定量 PCR 检测系统中进行。95 $^{\circ}$ C 3 min 预变性，PCR 循环：95 $^{\circ}$ C 变性 10 s，58 $^{\circ}$ C 退火 45 s，共 40 个循环，在 58 $^{\circ}$ C 这一步采集荧光。以黄瓜看家基因 *actin* 的荧光值作为计算时的内标，相对基因表达水平的计算参照 Livak 和 Schmittgen 的 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 法^[20]。

1.3.4 数据处理 采用 ANOVA (analysis of variance) 软件进行相关数据的统计分析。

2 结果

2.1 不同光质处理黄瓜叶片中叶绿素、可溶性蛋白及丙二醛含量的动态变化

由图 2 所示，不同光质处理后黄瓜叶片的叶绿素、可溶性蛋白及丙二醛的含量发生明显的变化。与对照白光相比，绿光和黄光处理的植株的叶绿素含量均呈现明显的下降。在整个试验过程中，紫光、蓝光和红光处理的植株的叶绿素含量高于白光处理的植株 (图 2-A)。可溶性蛋白在处理的过程中呈现下降的趋势，处理结束后可溶性蛋白的含量依次为：蓝光>紫光>白光>红光>绿光>黄光 (图 2-B)。丙二醛 (MDA) 是膜脂过氧化产物之一，是反映细胞膜伤害程度的重要指标。随着处理时间的延长，叶片的 MDA 含量持续上升，且黄光>红光>绿光>白光>紫光>蓝光 (图 2-C)。



W: 白光; P: 紫光; B: 蓝光; G: 绿光; Y: 黄光; R: 红光。下同
W: White light; P: Purple light; B: Blue light; G: Green light; Y: Yellow light; R: Red light. The same as below

图 2 不同光质处理对黄瓜叶片叶绿素、可溶性蛋白及丙二醛含量的影响

Fig. 2 Effects of different light qualities on the contents of chlorophyll, soluble protein and MDA in cucumber leaves

2.2 不同光质处理对黄瓜叶片中抗氧化酶活性影响

作为植物体内的活性氧清除酶系统的重要保护酶 CAT、APX、G-POD、SOD 活性的增加可以有效阻止活性氧的积累，防止膜脂过氧化产生，从而延缓植株的衰老进程。由图 3 所示，白光、紫光、蓝光处理的植株叶片的 CAT 活性先上升，处理 10 d 后再下降。而绿光、黄光、红光处理的植株叶片的 CAT 活性均呈下降趋势。到处理的第 15 天时，与对照的白光相比，紫光和蓝光的处理分别提高了 6.9% 和 12.9%，而绿光、黄光、红光的处理分别降至白光的 66.3%、66.0% 和 72.5%。不同光质处理后，APX、G-POD、SOD 的活性在整个处理期间的变化趋势类似。以 G-POD 为例，

与对照白光相比，在整个处理期间，紫光和蓝光处理的植株的 G-POD 活性较高，而绿光、黄光和红光均降低了该酶的活性。处理结束后，紫光、蓝光、绿光、黄光、红光下的 G-POD 活性分别为白光的 128.9%、96.4%、60.0%、69.6% 和 80.3%。

2.3 不同光质处理对黄瓜叶片抗氧化酶基因表达的影响

为了从基因表达水平上研究不同光质对抗氧化酶的调控机理，采用 qRT-PCR 的方法对活性氧代谢中的重要保护酶 CAT、cAPX、POD、SOD 的基因表达进行了分析。图 4 的数据表明，紫光和蓝光均促进了这 4 个基因的表达。其中，蓝光处理 3 d 后，CAT、

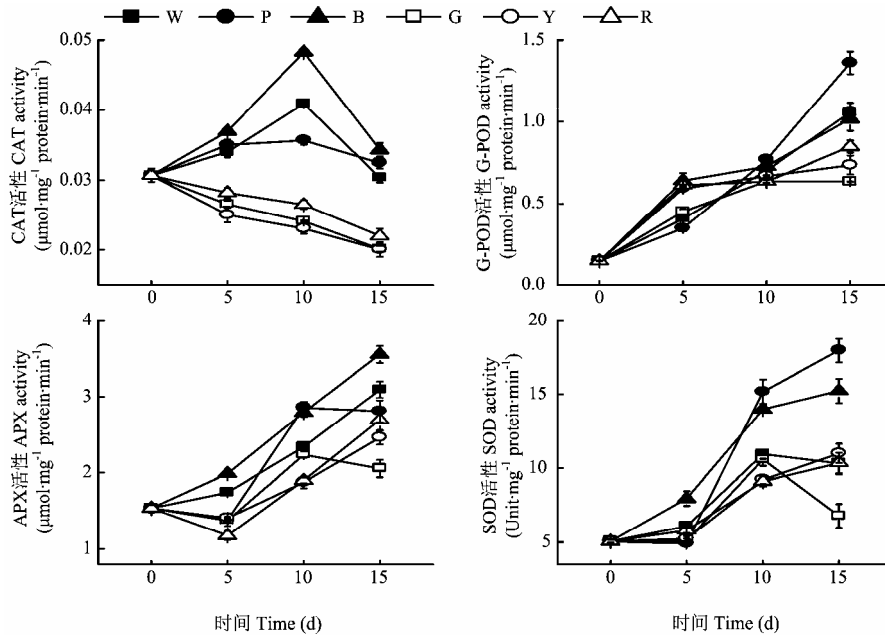


图 3 不同光质处理对黄瓜叶片中 CAT、APX、SOD 和 G-POD 活性的影响

Fig. 3 Effects of different light qualities on the activities of CAT, APX, SOD and G-POD in cucumber leaves

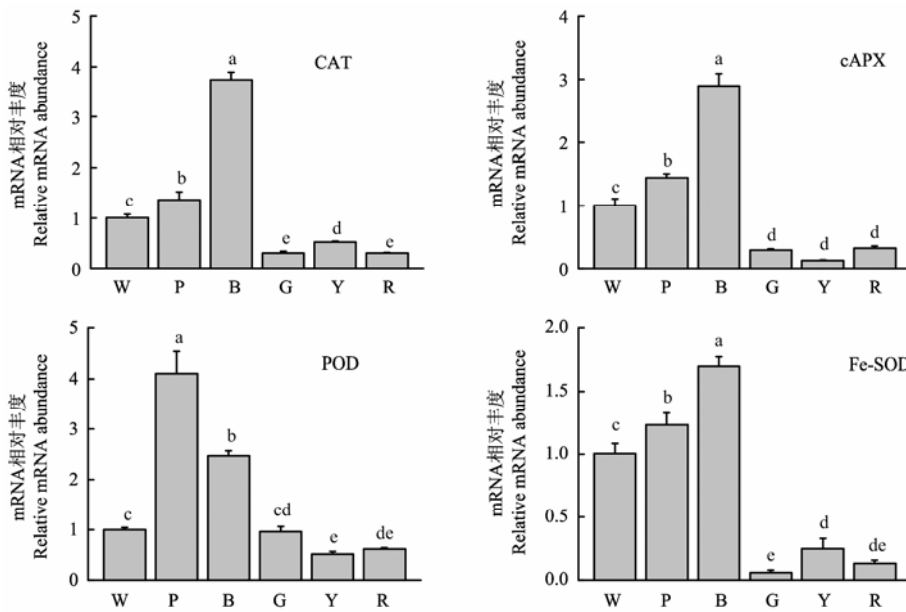


图 4 不同光质处理对黄瓜叶片中基因转录水平的影响

Fig. 4 Effects of different light qualities on the transcripts abundance in cucumber leaves

cAPX、POD、Fe-SOD 的表达量分别提高为白光的 3.74、2.89、2.46、1.7 倍。绿光、黄光、红光均在一定程度上降低了这 4 种抗氧化酶的基因表达量。如黄光处理 3 d 后, CAT、cAPX、POD、Fe-SOD 的表达量分别降低至白光的 0.51、0.12、0.51、0.25 倍。

3 讨论

许多研究表明, 植物叶片的衰老表现为叶绿素及可溶性蛋白的降解^[21-22]。本试验中, 随着处理天数的延长, 各处理的叶绿素及可溶性蛋白的含量都发生了

不同程度的减少。与白光相比,紫光和蓝光缓解了叶绿素及可溶性蛋白的降解,绿光、黄光和红光则加速了叶绿素及可溶性蛋白的降解。叶绿素是植物进行光合作用的物质基础,其含量的高低直接影响植株的光合速率^[23]。可溶性蛋白的降解标志着以 Rubisco 为主的各类酶的含量不断降低。所有这些结果与早先报道的紫光和蓝光处理后叶片的光合能力较强相一致^[24]。说明紫光和蓝光可能更有利于同化产物的积累,从而延缓了植株的衰老进程。

已有研究表明,植物叶片的衰老还伴随着活性氧代谢的失调^[6],SOD、APX 等酶活性的升高和 CAT 活性的降低,从而造成了过氧化氢的累积^[4]。活性氧的积累通常被认为直接或者间接导致叶片中叶绿素的降解^[25],因此叶片中较高的叶绿素含量及较低的活性氧水平将延缓植株的衰老进程。本研究表明,在不同光质处理的过程中,与对照的白光相比,紫光和蓝光处理后叶片的 SOD、APX 等酶活性呈上升趋势,并伴随着 CAT 酶活性的上升,从而加强了叶片对活性氧和自由基的清除能力,减少了 MDA 的累积,延缓了叶片的衰老。因此,紫光和蓝光的一个重要作用可能是通过提高 CAT 的活性和基因表达来调节活性氧代谢,减少 MDA 的累积,从而延缓衰老。而绿光、黄光和红光处理则降低了植株中抗氧化酶活性及基因的表达,引起植株中活性氧的累积和膜质过氧化作用增强,从而引起叶绿素和可溶性蛋白的降解,导致叶片的衰老。但是,本文的研究与杜建芳等^[26]、蒲高斌等^[27]在油菜及番茄上得出的结论有所不同,这可能与光源的光谱范围及供试作物不同有关。同时,本研究进一步表明,紫光和蓝光不仅增加植株抗氧化酶的活性还促进了这 4 种酶在 mRNA 水平上的表达,基因表达的上调诱导了抗性相关酶活性的上升,从而说明蓝紫光的光受体可能在植物的衰老中起重要作用。需要说明的是,植物体内有 3 种 SOD 同功酶^[28],限于黄瓜相关基因序列信息匮乏,本文只能对已知序列的 Fe-SOD 基因表达进行分析,但其它植物上的研究表明,逆境下 Fe-SOD、Mn-SOD 及 Cu/Zn-SOD 基因表达具有一定的相似性。此外,Causin 等在小麦中的研究表明,蓝光处理后植株的衰老还与细胞分裂素有着重要的联系^[29],因此不同光质如何协调植物的激素代谢,调控植物的衰老进程,还需要深入研究。

4 结论

紫光和蓝光通过提高抗氧化酶 CAT、APX 等酶活

性及其基因表达,延缓了处理过程中叶绿素和可溶性蛋白的降解以及膜质过氧化的发生,从而缓解植株的衰老进程。

References

- [1] Prochazkova D, Wilhelmova N. Changes in antioxidative protection in bean cotyledons during natural and continuous irradiation-accelerated senescence. *Biologia Plantarum*, 2004, 48: 33-39.
- [2] Weaver L M, Amasino R M. Senescence is induced in individually darkened Arabidopsis leaves but inhibited in whole darkened plants. *Plant Physiology*, 2001, 127: 876-886.
- [3] Gan S, Amasino R M. Making sense of senescence (molecular genetic regulation and manipulation of leaf senescence). *Plant Physiology*, 1997, 113: 313-319.
- [4] Pastori G M, DelRio L A. Natural senescence of pea leaves - An activated oxygen-mediated function for peroxisomes. *Plant Physiology*, 1997, 113: 411-418.
- [5] Kaiser W. The effect of hydrogen peroxide on CO₂ fixation of isolated intact chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1976, 440: 476-482.
- [6] Prochazkova D, Sairam R K, Srivastava G C, Singh D V. Oxidative stress and antioxidant activity as the basis of senescence in maize leaves. *Plant Science*, 2001, 161: 765-771.
- [7] 李美茹, 王以柔, 刘鸿先, 林植芳. 光照强度调控 4 种亚热带森林植物叶片的抗氧化能力. *植物生态学报*, 2001, 25(4): 460-464.
Li M R, Wang Y R, Liu H X, Lin Z F. The regulation of light intensity on leaf antioxidative ability in four subtropical forest species. *Acta Phytoecologica Sinica*, 2001, 25(4): 460-464. (in Chinese)
- [8] 李美茹, 曾纪晴, 王以柔, 刘鸿先, 林植芳. 光强对木本植物叶绿体中活性氧产生的调控作用. *热带亚热带植物学报*, 2001, 9 (3): 256-261.
Li M R, Zeng J Q, Wang Y R, Liu H X, Lin Z F. The regulation of light intensity in active oxygen production of chloroplasts in woody plants. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*, 2001, 9 (3): 256-261. (in Chinese)
- [9] Polidoros A N, Scandalios J G. Response of the maize catalases to light. *Free Radical Biology and Medicine*, 1997, 23: 497-504.
- [10] Guiamet J J, Willemoes J G, Montaldi E R. Modulation of progressive leaf senescence by red: far-red ratio of incident light. *Botanical Gazette*, 1989, 150: 148-151.
- [11] Biswal U C, Biswal B. Photocontrol of leaf senescence. *Photochemistry and Photobiology*, 1984, 39: 875-879.
- [12] Rodenas M J Q, Moreno J C, García S S. Contribution to the knowledge of the mechanism of light action in the retardation of leaf

- senescence. *Anales de Edafologia y Agrobiologia*, 1988, 47: 1635-1642.
- [13] Arnon D I. Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenoloxidase in *beta vulgaris*. *Plant Physiology*, 1949, 24: 1-15.
- [14] Patra H K, Kar M, Mishra D. Catalase activity in leaves and cotyledons during plant development and senescence. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen*, 1978, 172: 385-390.
- [15] Nakano Y, Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, 1981, 22: 867-880.
- [16] Cakmak I, Marschner H. Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, and glutathione reductase in bean leaves. *Plant Physiology*, 1992, 98: 1222-1227.
- [17] Giannopolitis C N, Ries S K. Superoxide dismutases: I. occurrence in higher plants. *Plant Physiology*, 1977, 59: 309-314.
- [18] Hodges D M, DeLong J M, Forney C F, Prange R K. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*, 1999, 207: 604-611.
- [19] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72: 248-254.
- [20] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 2001, 25: 402-408.
- [21] Martin C, Thimann K V. The role of protein synthesis in the senescence of leaves I. the formation of protease. *Plant Physiology*, 1972, 49: 64-71.
- [22] 王旭军, 徐庆国, 杨知建. 水稻叶片衰老生理的研究进展. *中国农学通报*, 2005, 21 (3): 187-190, 210.
- Wang X J, Xu Q G, Yang Z J. Advances of research on rice leaf senescence physiology. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2005, 21 (3): 187-190, 210. (in Chinese)
- [23] Green B R, Durnford D G. The chlorophyll-carotenoid proteins of oxygenic photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1996, 47: 685-714.
- [24] Wang H, Gu M, Cui J X, Shi K, Zhou Y H, Yu J Q. Effects of light quality on CO₂ assimilation, chlorophyll-fluorescence quenching, expression of Calvin cycle genes and carbohydrate accumulation in *Cucumis sativus*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2009, 96: 30-37.
- [25] del Rio L, Pastori G M, Palma J M, Sandalio L M, Sevilla F, Corpas F J. The activated oxygen role of peroxisomes in senescence. *Plant Physiology*, 1998, 116: 1195-2000.
- [26] 杜建芳, 廖祥儒, 叶步青, 李 萌. 光质对油菜幼苗生长及抗氧化酶活性的影响. *植物学通报*, 2002, 19(6): 743-743.
- Du J F, Liao X R, Ye B Q, Li M. Effect of light quality on the growth and antioxidant enzyme activities of rape seedling. *Chinese Bulletin of Botany*, 2002, 19(6): 743-745. (in Chinese)
- [27] 蒲高斌, 刘世琦, 张 珍, 任丽华. 光质对番茄幼苗生长及抗氧化酶活性的影响. *中国蔬菜*, 2005(9): 21-23.
- Pu G B, Liu S Q, Zhang Z, Ren L H. Effects of light qualities on activity of antioxidant enzymes in leaves of tomato seedling. *China Vegetables*, 2005(9): 21-23. (in Chinese)
- [28] Gómez J M, Jiménez A, Olmos E, Sevilla F. Location and effects of long-term NaCl stress on superoxide dismutase and ascorbate peroxidase isoenzymes of pea (*Pisum sativum* cv. Puget) chloroplasts. *Journal of Experimental Botany*, 2004, 55: 119-130.
- [29] Causin H F, Jauregui R N, Barneix A J. The effect of light spectral quality on leaf senescence and oxidative stress in wheat. *Plant Science*, 2006, 171: 24-33.

(责任编辑 曲来娥)