

海水胁迫对菠菜 (*Spinacia oleracea* L.) 叶绿体 活性氧和叶绿素代谢的影响

孙 锦^{1,2}, 贾永霞¹, 郭世荣^{1,*}, 李 娟¹

(1. 南京农业大学园艺学院, 南京 210095; 2. 甘肃省农业科学院蔬菜研究所, 兰州 730070)

摘要:以海水敏感品种圆叶菠菜和耐海水品种‘荷兰 3 号’为试材, 采用水培方法, 研究了海水胁迫对菠菜 (*Spinacia oleracea* L.) 叶绿体活性氧 (ROS) 和叶绿素 (Chl) 代谢的影响。结果表明, 海水胁迫下, 2 个菠菜品种叶绿体内超氧阴离子 ($O_2^{\cdot-}$) 产生速率、过氧化氢 (H_2O_2) 和丙二醛 (MDA) 含量显著升高, 并且圆叶菠菜的提高幅度大于‘荷兰 3 号’; 圆叶菠菜叶绿体内的超氧化物歧化酶 (SOD)、抗坏血酸过氧化物酶 (APX)、谷胱甘肽还原酶 (GR) 活性和抗坏血酸 (AsA)、还原型谷胱甘肽 (GSH) 含量均低于‘荷兰 3 号’, 而过氧化物酶 (POD) 活性高于‘荷兰 3 号’; 光氧化剂甲基紫精 (MV) 进一步使 2 个菠菜品种叶绿体内 $O_2^{\cdot-}$ 产生速率加快、 H_2O_2 含量提高、膜质过氧化加重, 活性氧清除剂 AsA 明显降低了菠菜叶绿体内 ROS 水平, 缓解了由 MV 造成的严重的膜质过氧化伤害。海水胁迫下, 2 个菠菜品种叶片叶绿素 b (Chlb)、叶绿素 a (Chla) 及其合成前体物质原叶绿素酸 (Pchl)、镁原卟啉 IX (Mg-protoIX)、原卟啉 IX (ProtoIX) 和尿卟啉原 III (UroIII) 含量明显降低, 而胆色素原 (PBG) 和 δ -氨基酮戊酸 (ALA) 积累, Chl 合成受到阻碍, 并且圆叶菠菜的受阻程度大于‘荷兰 3 号’; MV 进一步加剧了这种受阻程度, 而 AsA 部分缓解了由海水胁迫和 MV 造成的阻碍作用。海水胁迫明显提高了圆叶菠菜叶片叶绿素酶 (Chlase) 活性而对‘荷兰 3 号’没有影响, MV 处理对圆叶菠菜 Chlase 活性的影响程度大于‘荷兰 3 号’, 但 AsA 对 2 个品种叶片 Chlase 活性没有明显影响。上述结果说明, 海水胁迫下, 菠菜叶绿体内 ROS 与 Chl 代谢密切相关, 不仅通过叶绿体膜的氧化伤害使 Chl 降解, 而且使 Chl 合成的 PBG 向 UroIII 转化步骤受阻。耐海水品种‘荷兰 3 号’叶绿体清除 ROS 主要通过 SOD 和 AsA-GSH 循环系统, 清除能力较强, 减轻了 ROS 对叶绿体膜的氧化损伤和 Chl 合成的受阻程度, 并且海水胁迫对其 Chlase 活性的影响较小; 而海水敏感品种圆叶菠菜叶绿体清除 ROS 主要依赖于 SOD 和 POD, 对 ROS 的清除能力有限, 从而导致了 ROS 大量积累, 叶绿体膜的氧化损伤和 Chl 合成的受阻程度严重, 并且海水胁迫显著提高了 Chlase 活性, 加剧了 Chl 降解。

关键词:海水; 菠菜 (*Spinacia oleracea* L.); 叶绿体; 活性氧; 叶绿素

文章编号: 1000-0933(2009)08-4361-11 中图分类号: Q143, Q945, Q948 文献标识码: A

Effects of seawater stress on metabolism of reactive oxygen species and chlorophyll in chloroplasts of spinach (*Spinacia oleracea* L.)

SUN Jin^{1,2}, JIA Yong-Xia¹, GUO Shi-Rong^{1,*}, LI Juan¹

1 College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

2 Vegetable Institute, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730070, China

Acta Ecologica Sinica, 2009, 29(8): 4361 ~ 4371.

Abstract: The effects of seawater stress on metabolism of reactive oxygen species (ROS) and chlorophyll (Chl) in chloroplast of two spinach cultivars, Yuanye spinach (seawater sensitive cultivar) and Helan No. 3 (seawater tolerant cultivar) were investigated by hydroponics. The results showed that production rate of superoxide radical ($O_2^{\cdot-}$), content of hydrogen peroxide (H_2O_2) and malonaldehyde (MDA) in chloroplast of two spinach cultivars were remarkably increased by seawater with higher rate in cv. Yuanye; Under the stress of seawater, the activity of anti-oxidation enzyme such as superoxide dismutase (SOD), ascorbic acid peroxidase (APX) and glutathione reductase (GR), and the content of

基金项目:国家高校博士点科研基金资助项目(20050307031);江苏省自然科学基金资助项目(BK2006140)

收稿日期: 2008-05-09; 修订日期: 2008-12-10

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: srguo@njau.edu.cn

antioxidant such as ascorbic acid (AsA) and glutathione reduced (GSH) in chloroplast of cv. Yuanye were lower than those of cv. Helan No.3, while peroxidase (POD) activity in chloroplast of cv. Yuanye was higher than that of cv. Helan No.3; The supplement of methyl viologen (MV), the photo-oxidant, enhanced the production rate of O_2^- , the content of H_2O_2 and MDA in chloroplast of two spinach cultivars, while the addition of AsA, the eliminator for ROS, decreased ROS level and alleviated oxidization of plasmolemma. The content of chlorophyll b (Chlb), chlorophyll a (Chla) and precursor of Chl such as protochlorophyll (Pchl), Mg-protoporphyrin IX (Mg-ProtoIX), protoporphyrin IX (Proto IX) and uroporphyrinogen III (Uro III) was remarkably decreased, but the content of porphobilinogen (PBG) and δ -aminolevulinic acid (ALA) was increased by the stress of seawater, which lead to inhibition for Chl synthesis, and the inhibition was aggravated by MV and eliminated by AsA. Chlorophyllase (Chlase) activity in the leaves of cv. Yuanye was improved while it was not influenced in the leaves of Helan No.3 under seawater stress. The Chlase activity in the leaves of cv. Yuanye was more greatly affected by MV treatment than that of Helan No.3, however, Chlase activity of two cultivars was not influenced by AsA. These results suggest that ROS is closely related to Chl metabolism, which not only injure plasmolemma but also inhibit the process of transformation of PBG to Uro III as a result of Chl decomposition. In seawater tolerant cultivar (cv. Helan No.3), the ROS elimination is mainly depended on SOD and AsA-GSH system, which could alleviate oxidation injury of ROS to chloroplast membrane and inhibition of Chl synthesis, and Chlase activity was less influenced by seawater stress; while in seawater sensitive cultivar (cv. Yuanye), it is mainly depended on SOD and POD, which has limited ability to eliminate ROS and lead to accumulate mass ROS to severe oxidation injury of chloroplast membrane and inhibition of Chl synthesis, and Chlase activity was significantly improved by seawater stress, which enhanced Chl decomposition.

Key Words: seawater; spinach (*Spinacia olerancea* L.); chloroplast; reactive oxygen species; chlorophyll

叶绿素(Chl)是地球上最重要的光合色素,不仅可以吸收大量光能,而且还构成光系统及光系统反应中心^[1]。植物体内 Chl 含量的高低取决于 Chl 合成与降解的动态平衡^[2]。Chl 生物合成^[3]的任何一步步骤出现障碍,都会影响 Chl 的合成,从而引起 Chl 含量降低;Chl 降解包括酶促降解和光氧化降解两种反应类型,其中叶绿素酶(Chlase)与 Chl 降解的关系密切^[4];活性氧(ROS)也可引起 Chl 降解^[5],Yuzo 等^[6]认为 ROS 可能参与了对 Chl 4-吡咯环的破坏,从而加速 Chl 降解。植物在低温^[7]、 SO_2 ^[8]、 NO_2 ^[9]、水分胁迫^[5]、衰老^[10]等条件下,Chl 降解与 ROS 代谢有关;盐胁迫下,ROS 是否参与 Chl 降解和阻抑 Chl 合成以及阻抑位点都尚不明了。叶绿体是产生 ROS 的重要细胞器^[11],盐胁迫下叶绿体内 ROS 大量积累^[12,13],叶绿体被膜发生过氧化反应,光合色素降解,影响了植物光合作用。海水胁迫下,菠菜(*Spinacia olerancea* L.)叶片 Chl 含量降低^[14],其光合速率的降低完全是由于 Chl 含量降低所致^[15]。因此,研究海水胁迫下菠菜叶绿体 ROS 与 Chl 代谢的关系,对阐明海水胁迫对作物生理生化的影响具有重要参考价值。本试验采用水培方法,研究了海水胁迫对菠菜叶绿体 ROS 与 Chl 代谢的影响,以期阐明叶绿体 ROS 与 Chl 代谢的关系,为海水栽培作物提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验选用的菠菜品种为海水敏感品种圆叶菠菜和耐海水品种‘荷兰3号’^[14];海水取自中国江苏东台海域,总含盐量为 $26.64 g \cdot L^{-1}$, pH 为 7.8,基本离子与组成为: Na^+ : $349.98 mmol \cdot L^{-1}$; Cl^- : $410.14 mmol \cdot L^{-1}$; Mg^{2+} : $40.20 mmol \cdot L^{-1}$; SO_4^{2-} : $21.15 mmol \cdot L^{-1}$; Ca^{2+} : $7.61 mmol \cdot L^{-1}$; K^+ : $6.83 mmol \cdot L^{-1}$ 。

1.2 处理设置

试验于 2007 年 8 月至 11 月在南京农业大学自控温室内进行。菠菜植株培育同前文^[14],试验分 2 部分进行:①海水胁迫对菠菜叶绿体 ROS 代谢的影响:2 个品种分别设 2 个处理,即 1/2 Hoagland 营养液(对照区,EC 值 $0.14 ds \cdot m^{-1}$, pH 7.3)和含 40% 海水的 1/2 Hoagland 营养液(处理区,EC 值 $1.77 ds \cdot m^{-1}$, pH 7.6),分别表示为:Y:圆叶菠菜对照;H:‘荷兰3号’对照;Y+S:圆叶菠菜处理;H+S:‘荷兰3号’处理。定植第 10

天,将处理植株转入含 40% 海水的 1/2 Hoagland 营养液中,处理第 3 天和第 6 天选取植株自生长点之下的第 4 或第 5 叶片提取完整叶绿体,测定相关指标;② 海水胁迫下甲基紫精(MV)和抗坏血酸(AsA)对菠菜叶片 Chl 代谢的影响。2 个品种分别设 8 个处理:1/2 Hoagland 营养液(对照区,CK);1/2 Hoagland 营养液 + $1\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MV(CK + MV);1/2 Hoagland 营养液 + $5\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ AsA(CK + AsA);1/2 Hoagland 营养液 + $1\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MV + $5\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ AsA(CK + MV + AsA);含 40% 海水的 1/2 Hoagland 营养液(T);含 40% 海水的 1/2 Hoagland 营养液 + $1\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MV(T + MV);含 40% 海水的 1/2 Hoagland 营养液 + $5\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ AsA(T + AsA);含 40% 海水的 1/2 Hoagland 营养液 + $1\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MV + $5\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ AsA(T + MV + AsA)。海水处理后第 2 天,分别用 $1\mu\text{mol}$ MV 和 $5\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ AsA 叶面喷施,MV 配制时用体积分数为 0.05% Tween 20 溶解,对照用加体积分数为 0.05% Tween 20 的清水处理;24 h 后 MV 处理的一半植株用 $5\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ AsA 叶面喷施,另一半植株用等量清水叶面喷施,72 h 后选取植株自生长点之下的第 4 或第 5 叶片进行 Chl 前体物质含量和叶绿体内超氧阴离子(O_2^-)产生速率、过氧化氢(H_2O_2)和丙二醛(MDA)含量以及 Chlase 活性的测定,并计算 O_2^- 产生速率、 H_2O_2 和 MDA 含量的相对值(相对值 = 处理值/对照值)。上述 2 项试验均重复 3 次,完全随机排列。

1.3 测定指标及方法

1.3.1 完整叶绿体的提取

参考 Takeda 等^[16]的方法。为保证叶绿体纯度,用 Percol 试剂在 1500g 下梯度离心 2 ~ 3min,将提取出的叶绿体转移到悬浮介质中,使叶绿体浓度达到 $1\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$,测定叶绿体的完整性,完整率达到 90%。

1.3.2 O_2^- 产生速率、超氧化物歧化酶(SOD)活性、过氧化物酶(POD)活性

用 $0.05\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、pH 7.8 的磷酸缓冲液(PBS)稀释叶绿体 2 ~ 5 倍后,蛋白质(protein)含量采用考马斯亮蓝法; O_2^- 产生速率采用王爱国等^[17]的方法测定,单位为 $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{Chl}$;SOD 活性采用王爱国等^[18]的方法,以抑制氮蓝四唑(NBT)光氧化还原 50% 的酶量为 1 个活力单位(U),以 $\text{U}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{protein}$ 表示;POD 活性采用愈创木酚法^[19],以 1 min 每克蛋白质催化的 470 nm 下 OD 值变化为一个酶活力单位(U),单位为 $\text{U}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{protein}$ 。

1.3.3 H_2O_2 含量

用 $0.2\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 HClO_4 稀释叶绿体 3 倍,参照 Uchida 等^[20]的方法测定,以 $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{Chl}$ 表示。

1.3.4 MDA 含量

用 5% 的三氯乙酸(TCA)稀释叶绿体 3 倍,参照 Heath 和 Packer^[21]的方法测定,以 $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{Chl}$ 表示。

1.3.5 抗坏血酸过氧化物酶(APX)、谷胱甘肽还原酶(GR)活性

用 $0.05\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 $\text{K}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液(pH7.0)稀释叶绿体 2 ~ 5 倍,APX 活性采用 Nakano 和 Asada^[22]方法测定,酶活性以 $\mu\text{mol AsA}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{protein}$ 表示;GR 活性参照 Foyer 和 Halliwell^[23]的方法,酶活性以 $\mu\text{mol NADPH}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{protein}$ 表示。

1.3.6 抗坏血酸(AsA)含量

按体积分数 1:5 的比例用 5% 的 TCA 稀释叶绿体,参照文献^[24]所述方法测定,以 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{Chl}$ 表示。

1.3.7 还原型谷胱甘肽(GSH)和氧化型谷胱甘肽(GSSG)含量

用 5% 磺基水杨酸稀释叶绿体 3 倍,参照 Ellman^[25]的方法测定,单位以 $\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{Chl}$ 表示。

1.3.8 Chl 合成前体物质含量

叶绿素 a(Chla)、叶绿素 b(Chlb)含量用丙酮提取法测定^[26],单位表示为 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{FW}$;原卟啉 IX(Proto IX)、镁原卟啉 IX(Mg-ProtoIX)、原叶绿素酸(Pchl)采用 Hodgins 和 Van Huystee 的方法^[27],尿卟啉原 III(Uro III)和胆色素原(PBG)测定采用 Bogorad 的方法^[28], δ -氨基酮戊酸(ALA)测定参照喻敏方法^[29],单位均表示为 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{FW}$ 。

1.3.9 Chlase 活性

以菠菜 Chl 为反应底物,参照 Margaret^[30]方法测定,单位为 $\mu\text{molChl}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{FW}$ 。

1.4 数据分析

试验数据用 Microsoft Excel 和 SPSS 10.0 软件分析,用 Duncan's 新复极差法进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 海水胁迫对菠菜叶绿体 O_2^- 产生速率、 H_2O_2 和 MDA 含量的影响

海水胁迫下,两个菠菜品种叶绿体 O_2^- 产生速率(图 1)、 H_2O_2 含量(图 1)在处理第 3 天迅速升高,第 6 天略有下降但仍显著高于相应对照,并且圆叶菠菜的升高幅度大于‘荷兰 3 号’。如处理第 6 天圆叶菠菜分别提高 40.98% 和 32.82%,‘荷兰 3 号’分别提高 15.35% 和 20.93%。海水胁迫下,2 个菠菜品种叶绿体 MDA 含量(图 1)的变化规律与 O_2^- 产生速率和 H_2O_2 含量相似。可见,海水胁迫下,菠菜叶绿体 O_2^- 产生速率加快, H_2O_2 大量积累,导致膜脂过氧化产物 MDA 含量增加,叶绿体膜受到了伤害;但耐海水品种‘荷兰 3 号’ O_2^- 产生速率和 H_2O_2 含量较低,MDA 含量相应较少,叶绿体膜伤害程度较小。

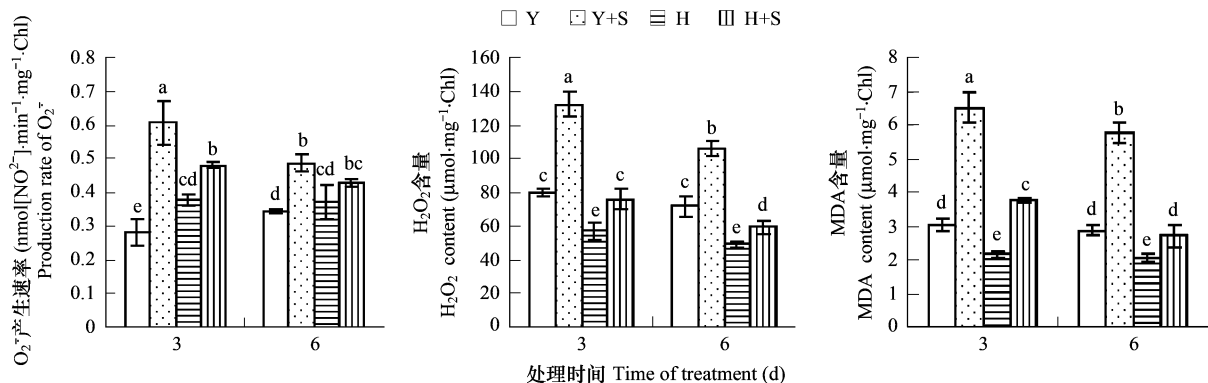


图 1 海水胁迫对菠菜叶绿体 O_2^- 产生速率、 H_2O_2 和 MDA 含量的影响

Fig. 1 Effects of seawater stress on production rate of O_2^- , content of H_2O_2 and MDA in chloroplasts of spinach

Y: 圆叶菠菜对照, control of Yuanye spinach; Y+S: 圆叶菠菜 40% 海水浓度处理, 40% concentration of seawater treatment of Yuanye spinach; H: 荷兰 3 号对照, control of Helan No. 3; H+S: 荷兰 3 号 40% 海水浓度处理, 40% concentration of seawater treatment of Helan No. 3; 图中相同字母表示差异不显著 ($P < 0.05$), Same letters meant no significant difference at $P < 0.05$ level within the charts

2.2 海水胁迫对菠菜叶绿体 SOD、POD 活性的影响

海水胁迫第 3 天, 圆叶菠菜和‘荷兰 3 号’叶绿体内 SOD 活性(图 2)分别比相应对照提高 21.35% 和 14.11%; 胁迫第 6 天, 圆叶菠菜比对照显著降低 49.78%, 而‘荷兰 3 号’比对照显著提高 30.12%。海水胁迫下, 圆叶菠菜叶绿体内 POD 活性(图 2)持续升高, 胁迫第 3 天比对照提高 54.38%, 胁迫第 6 天比对照提高 118.23%; 而‘荷兰 3 号’在胁迫第 3 天较对照显著提高 89.49%, 胁迫第 6 天又明显降低, 仅比对照提高 21.21%。可见, 海水胁迫下, 耐海水品种‘荷兰 3 号’始终保持较高的 SOD 活性, 对 O_2^- 清除能力大于圆叶菠菜, 而 POD 活性在处理第 6 天下降, 对 H_2O_2 清除能力小于圆叶菠菜。

2.3 海水胁迫对菠菜叶绿体内 APX、GR 活性的影响

海水胁迫下, 圆叶菠菜叶绿体 APX 活性(图 3)显著下降, 第 3 天和第 6 天分别较对照降低 66.90% 和 75.76%, 而‘荷兰 3 号’叶绿体 APX 活性显著升高, 第 3 天和第 6 天分别较对照提高 86.03% 和 75.52%; GR 活性(图 3)与 APX 相似, 圆叶菠菜叶绿体 GR 活性较对照降低, 而‘荷兰 3 号’较对照提高。可见, 海水胁迫下, ‘荷兰 3 号’叶绿体较高的 APX 和 GR 活性, 对 H_2O_2 清除能力较强; 而圆叶菠菜叶绿体 APX 和 GR 活性下降, 对 H_2O_2 清除能力较弱, 从而导致 H_2O_2 在叶绿体内大量积累。

2.4 海水胁迫对菠菜叶绿体 AsA、GSH 含量和 GSH/GSSG 比值的影响

海水胁迫下, 圆叶菠菜叶绿体 AsA 含量(图 4)在处理第 3 天和第 6 天分别较对照显著降低 36.14% 和 48.19%, 而‘荷兰 3 号’在胁迫第 3 天与对照差异不显著, 第 6 天较对照显著降低 25.52%; GSH(图 4)与 AsA

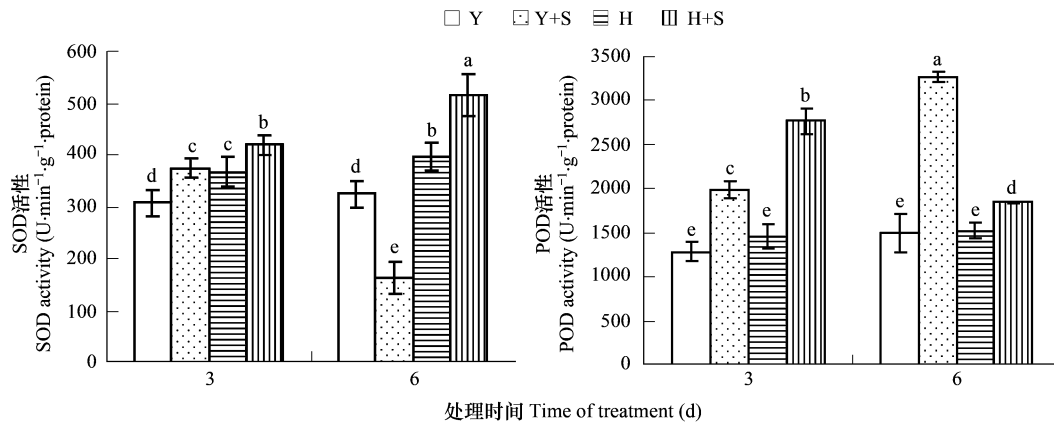


图2 海水胁迫对菠菜叶绿体内 SOD 和 POD 活性的影响

Fig. 2 Effects of seawater stress on activity of SOD and POD in chloroplasts of spinach

Y:圆叶菠菜对照, control of Yuanye spinach; Y + S:圆叶菠菜 40% 海水浓度处理, 40% concentration of seawater treatment of Yuanye spinach; H: 荷兰 3 号对照, control of Helan No. 3; H + Y: 荷兰 3 号 40% 海水浓度处理, 40% concentration of seawater treatment of Helan No. 3; 图中相同字母表示差异不显著 ($P < 0.05$), Same letters meant no significant difference at $p < 0.05$ level within the charts

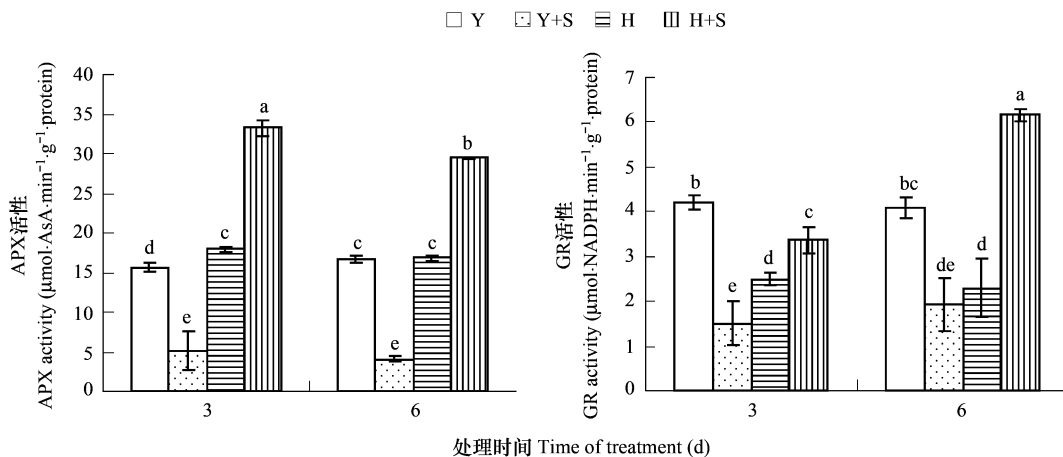


图3 海水胁迫对菠菜叶绿体内 APX 和 GR 活性的影响

Fig. 3 Effects of seawater stress on activity of APX and GR in chloroplasts of spinach

Y:圆叶菠菜对照, control of Yuanye spinach; Y + S:圆叶菠菜 40% 海水浓度处理, 40% concentration of seawater treatment of Yuanye spinach; H: 荷兰 3 号对照, control of Helan No. 3; H + Y: 荷兰 3 号 40% 海水浓度处理, 40% concentration of seawater treatment of Helan No. 3; 图中相同字母表示差异不显著 ($P < 0.05$), Same letters meant no significant difference at $P < 0.05$ level within the charts.

相似,圆叶菠菜叶绿体内 GSH 含量在处理第 3 天和第 6 天分别较对照降低 21.61% 和 37.06%, 而‘荷兰 3 号’第 3 天与对照差异不显著,第 6 天较对照降低 19.97%;圆叶菠菜叶绿体 GSH/GSSG 比值(图 4)在处理第 3 天和第 6 天分别较对照显著降低 72.22% 和 74.06%, 而‘荷兰 3 号’在处理第 6 天与对照差异不显著。可见,海水胁迫下,‘荷兰 3 号’叶绿体 AsA 和 GSH 含量的降低幅度明显小于圆叶菠菜,并且 GSH/GSSG 比值变化不明显,维持了 GSH 与 GSSG 之间的平衡。

2.5 海水胁迫下 MV 和 AsA 对菠菜叶绿体 O_2^- 产生速率、 H_2O_2 和 MDA 含量相对值的影响

图 5 结果显示,海水胁迫下 2 个菠菜品种叶绿体 O_2^- 产生速率、 H_2O_2 和 MDA 含量相对值均大于 1;对照条件下, MV 处理的菠菜叶绿体 O_2^- 产生速率、 H_2O_2 和 MDA 含量的相对值也大于 1, 但 AsA 处理的相对值小于 1, 而 MV + AsA 处理较单纯 MV 处理低;海水胁迫下, MV、AsA 和 MV + ASA 处理的情况与对照相似。说明海水胁迫使菠菜叶绿体内 ROS 水平提高,膜质过氧化程度加重;MV 处理进一步使 ROS 增加,膜质过氧化程度加

剧,而 AsA 可以清除部分 ROS,使膜质过氧化程度降低。

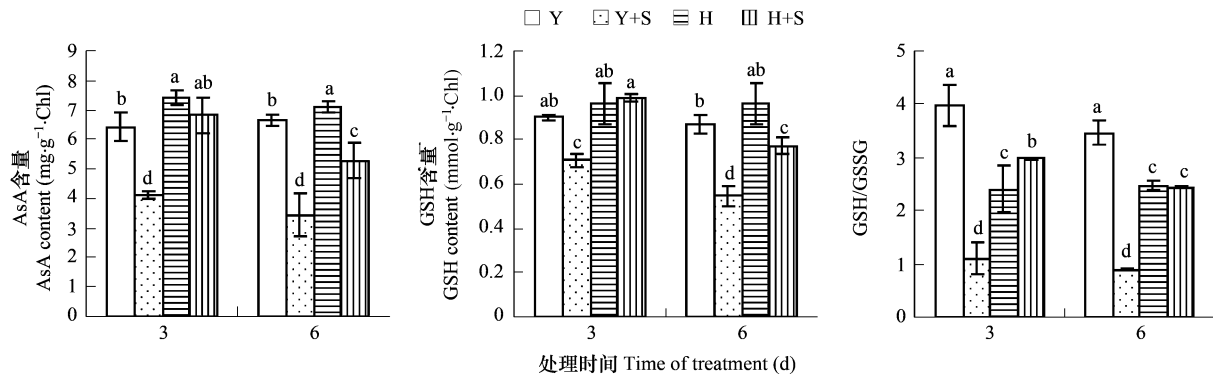


图4 海水胁迫对菠菜叶绿体 AsA、GSH 含量和 GSH/GSSG 的影响

Fig. 4 Effects of seawater stress on the content of AsA and GSH, the ratio of GSH/GSSG in chloroplasts of spinach

Y: 圆叶菠菜对照, control of Yuanye spinach; Y + S: 圆叶菠菜 40% 海水浓度处理, 40% concentration of seawater treatment of Yuanye spinach; H: 荷兰 3 号对照, control of Helan No. 3; H + Y: 荷兰 3 号 40% 海水浓度处理, 40% concentration of seawater treatment of Helan No. 3; 图中相同字母表示差异不显著 ($P < 0.05$), Same letters meant no significant difference at $P < 0.05$ level within the charts

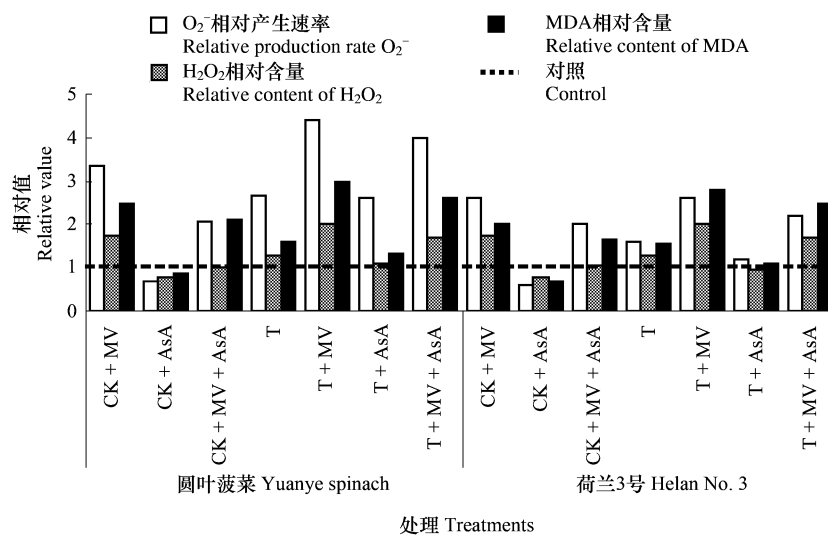


图5 海水胁迫下 MV、AsA 对菠菜叶绿体 O_2^- 产生速率、 H_2O_2 和 MDA 含量相对值的影响

Fig. 5 Effects of MV and AsA on relative value of production rate of O_2^- , content of H_2O_2 and MDA in chloroplasts of spinach under seawater stress

CK: 1/2 Hoagland 营养液 (对照), 1/2 Hoagland solution (control); MV: $1\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甲基紫精, $1\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ methyl viologen; AsA: $5\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 抗坏血酸, $5\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ascorbic acid; T: 含 40% 海水的 1/2 Hoagland 营养液, 40% concentration of seawater in 1/2 Hoagland solution

2.6 海水胁迫下 MV、AsA 对菠菜叶片 Chlb、Chla 及前体物质 Pchl、Mg-protoIX、ProtoIX、UroⅢ、PBG 和 ALA 含量的影响

表 1 结果表明,海水胁迫使 2 个菠菜品种叶片的 Chlb、Chla、Pchl、Mg-protoIX、ProtoIX、UroⅢ 含量均比相应对照降低,而 PBG 和 ALA 含量升高,其中‘荷兰 3 号’叶片 UroⅢ 含量的降低幅度小于圆叶菠菜,分别降低 12.50% 和 25.34%,说明海水胁迫下 2 个菠菜品种的 Chl 合成受阻,并且‘荷兰 3 号’的受阻程度小于圆叶菠菜。在对照条件下,MV 处理对 Chl 前体物质含量的影响与海水处理相似,但 MV 的阻抑程度大于海水处理;AsA 处理使圆叶菠菜 Chl 前体物质含量较‘荷兰 3 号’影响明显;MV + AsA 使 2 个菠菜品种叶片 Chlb、Chla、Pchl、Mg-protoIX、ProtoIX、UroⅢ 含量较单纯 MV 处理有所提高,而使 PBG 和 ALA 含量降低。海水胁迫下,各处理对 Chl 前体物质含量的影响与对照基本相似。可见,海水胁迫使菠菜叶片 Chl 合成受到阻碍,‘荷兰 3

号’受阻程度小于圆叶菠菜;MV 进一步加剧了受阻程度,AsA 部分缓解了这种阻碍作用。

2.7 海水胁迫下 MV、AsA 对菠菜叶片 Chlase 活性的影响

海水胁迫显著提高圆叶菠菜叶片 Chlase 活性(图 6),而对‘荷兰 3 号’没有明显影响。在对照和海水胁迫下,MV 和 MV + AsA 处理显著提高圆叶菠菜叶片 Chlase 活性,而 AsA 对其没有明显影响。‘荷兰 3 号’在对照条件下,MV、AsA 和 MV + AsA 处理均对 Chlase 活性没有明显影响;海水处理下,MV 和 MV + AsA 显著提高 Chlase 活性,而 AsA 对其没有明显影响。

表 1 海水胁迫下 MV、AsA 对菠菜叶片叶绿素合成前体物质含量的影响
Table 1 Effects of MV and AsA on Chl precursors content of spinach leaves under seawater stress

处理 Treatments	Chlb		Chla		Pchl		Mg-ProtoIX		ProtoIX		UroⅢ		PBG		ALA	
	(mg·g ⁻¹ FW)		(mg·g ⁻¹ FW)		(μg·g ⁻¹ FW)		(μg·g ⁻¹ FW)		(μg·g ⁻¹ FW)		(μg·g ⁻¹ FW)		(μg·g ⁻¹ FW)		(μg·g ⁻¹ FW)	
	Y	H	Y	H	Y	H	Y	H	Y	H	Y	H	Y	H	Y	H
CK	0.202b	0.350a	0.537b	0.815a	0.379b	0.475b	0.250b	0.265b	0.646b	0.639b	13.423b	14.831a	10.558d	10.161f	0.782d	0.835f
CK + MV	0.144d	0.250d	0.428e	0.695d	0.263d	0.402d	0.141d	0.197d	0.398d	0.520d	3.624e	6.607e	12.806c	12.145d	3.454a	5.543a
CK + AsA	0.253a	0.358a	0.648a	0.804a	0.418a	0.480b	0.309a	0.267b	0.721a	0.753a	15.613a	15.079a	11.346d	10.825ef	2.483b	1.546e
CK + MV + AsA	0.157e	0.301c	0.467cd	0.772b	0.301c	0.470b	0.192c	0.245c	0.488c	0.553cd	6.593d	9.409d	11.219d	11.484de	3.031ab	4.948b
T	0.165c	0.296c	0.482c	0.727bc	0.265d	0.436c	0.141d	0.241c	0.365e	0.578c	10.022c	12.977b	13.633bc	13.600c	1.523c	1.298d
T + MV	0.106e	0.256d	0.322f	0.679d	0.209e	0.303f	0.118f	0.211d	0.316f	0.467e	4.321e	7.220e	15.716a	17.832a	3.560a	3.811c
T + AsA	0.193b	0.338b	0.556b	0.759b	0.253d	0.551a	0.139e	0.286a	0.382d	0.642b	12.868b	14.758a	14.836ab	13.972bc	2.448b	1.564d
T + MV + AsA	0.143d	0.291c	0.456d	0.719c	0.247d	0.389e	0.149d	0.248b	0.360e	0.553cd	6.593d	10.162c	13.997b	14.526b	2.515b	3.432c

Y: 圆叶菠菜, Yuanye spinach; H: 荷兰 3 号, Helan NO.3; Chlb: 叶绿素 b, chlorophyll b; Chla: 叶绿素 a, chlorophyll a; Pchl: 原叶绿素酸, protochlorophyll; Mg-protolIX: 镁原卟啉 IX, Mg-protoporphyrin IX; Proto IX: 原卟啉 IX, protoporphyrin IX; Uro Ⅲ: 尿卟啉原 Ⅲ, uroporphyrinogen Ⅲ; PBG: 胆色素原, porphobilinogen; ALA: δ-氨基酮戊酸, δ-aminolevulinic acid

表中同列相同字母表示差异不显著($P < 0.05$) Same letters meant no significant difference at $P < 0.05$ level in same line within the table

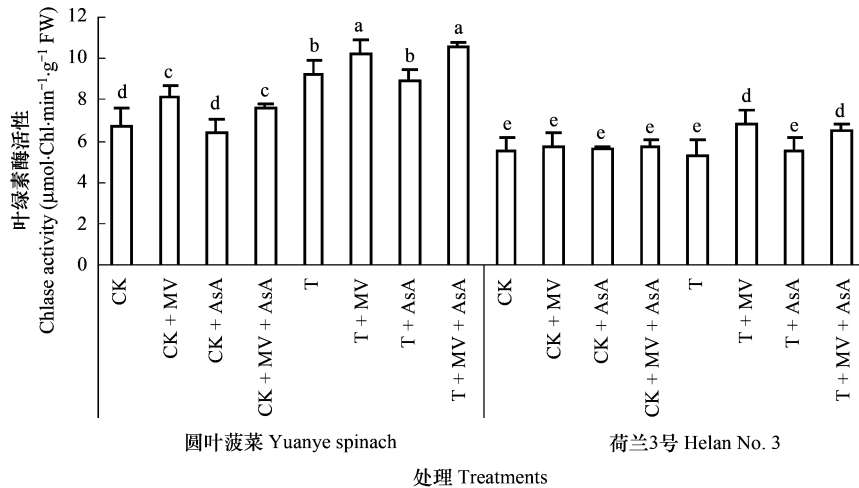


图 6 海水胁迫下 MV、AsA 对菠菜叶片 Chlase 活性的影响

Fig.6 Effects of MV and AsA on Chlase activity of spinach leaves under seawater stress

CK: 1/2 Hoagland 营养液(对照), 1/2 Hoagland solution (control); MV: 1μmol·L⁻¹甲基紫精, 1μmol·L⁻¹ methyl viologen; AsA: 5mmol·L⁻¹ 抗坏血酸, 5mmol·L⁻¹ ascorbic acid; T: 含 40% 海水的 1/2 Hoagland 营养液, 40% concentration of seawater in 1/2 Hoagland solution

3 讨论

在光合电子传递过程中,当光系统 I(PSI)将电子传递给分子氧而不是传递给铁氧还蛋白时,将会产生 O₂⁻,并由此产生其他 ROS 如 H₂O₂、羟自由基(·OH)和单线态氧(¹O₂)等,对光合器官、蛋白质等造成伤害^[31]。

在正常情况下,植物细胞内 ROS 的产生与清除处于动态平衡,而当植物处于逆境胁迫下,这种平衡遭到破坏,导致 ROS 大量累积,膜脂过氧化作用启动,生物功能分子如 Chl、核酸等^[32]被破坏,而 MDA 含量是反映这种伤害的有效指标^[33]。海水胁迫下,2 个菠菜品种的叶绿体内 O_2^- 产生速率加快, H_2O_2 大量积累,叶绿体膜受到伤害,导致膜脂过氧化产物 MDA 含量增加,叶绿体膜受到氧化胁迫。为防御 ROS 的毒害作用,植物体内存在着抗氧化剂和抗氧化酶防御系统,起到保护作用。在植物体内 SOD 可将 O_2^- 歧化生成 H_2O_2 和 O_2 ,然后由 POD、CAT、APX 等分解生成 H_2O ,从而缓解 ROS 伤害。SOD 的过量表达可加速 O_2^- 的歧化,导致 H_2O_2 的大量产生,如果清除 H_2O_2 酶的活性不能相应提高,生成的 H_2O_2 可与剩余的 O_2^- 反应产生活性更强的 $OH^\cdot$ ^[34],导致植物体严重的氧化损伤。由于叶绿体中不含 CAT,清除 H_2O_2 主要依赖于抗坏血酸清除系统^[35]。海水胁迫下,‘荷兰 3 号’始终保持较高的 SOD 活性,能够有效清除 O_2^- ,并且 APX 和 GR 活性显著提高,对 H_2O_2 具有较强的清除能力,进一步减轻了 H_2O_2 与剩余 O_2^- 反应产生 $OH^\cdot$ 的可能,从而使叶绿体膜氧化损伤较轻,MDA 含量增加幅度较低;而圆叶菠菜在海水胁迫第 6 天 SOD 活性下降,对 O_2^- 的清除能力降低,同时,APX 和 GR 活性也下降,但 POD 活性在胁迫第 3 天和第 6 天均显著升高,清除 H_2O_2 主要依赖于 POD。由于 POD 是在氧化相应基质(如酚类化合物)时清除低浓度的 H_2O_2 ^[13],因而对大量 H_2O_2 的清除能力有限,从而导致 H_2O_2 与剩余 O_2^- 反应产生 $OH^\cdot$,使叶绿体膜氧化损伤加重,MDA 含量增加幅度较大。研究认为 POD 的作用具双重性能,一方面具有保护作用,另一方面参与 Chl 的降解、ROS 的产生,并能引发膜脂过氧化,是植物衰老到一定阶段的产物,是一种伤害性反应^[36]。可见,圆叶菠菜叶绿体 POD 活性相对较高,在清除 ROS 的同时也可能引起 Chl 降解。上述结果表明,海水胁迫下,耐海水品种‘荷兰 3 号’叶绿体内清除 ROS 主要依赖于 SOD、APX 和 GR,对 ROS 的清除能力较强;而海水敏感品种圆叶菠菜主要依赖 SOD 和 POD,对 ROS 的清除能力有限,从而造成 ROS 大量积累,对叶绿体膜质伤害较大。

AsA 是叶绿体内重要的抗氧化剂,能够直接或间接地清除 ROS,并且高浓度的 AsA 能够保证 APX 有足够的底物,促进叶绿体内 H_2O_2 的清除^[37]。GSH 是植物体内重要的抗氧化物质及信号分子^[23],也是 AsA 合成关键酶——双脱氢抗坏血酸还原酶(DHAR)的底物^[38]。海水胁迫下,圆叶菠菜叶绿体内 AsA 和 GSH 含量显著下降,而‘荷兰 3 号’只有在处理后第 6 天才明显下降并且下降幅度较圆叶菠菜低,说明‘荷兰 3 号’在海水胁迫下能够维持较高水平的 AsA,保证了 APX 有足够的底物,使 APX 活性保持在较高水平;同时,GR 活性较高,使 GSSG 还原形成较高含量的 GSH^[39],GSH 为 DHAR 提供了充足的底物,使 AsA 再合成,促进了 AsA-GSH 循环系统的运转,直接和间接清除了 O_2^- 、 H_2O_2 等 ROS,进一步减小了 ROS 对叶绿体膜的伤害。可见,‘荷兰 3 号’叶绿体内 AsA、GSH、GR、APX 的协调作用,保证了 AsA-GSH 循环系统的高效运转。此外,植物体内较高的 GSH/GSSG 比值有利于维持逆境胁迫下植物体内合适的氧化还原环境,提高其耐性^[40]。海水胁迫下,圆叶菠菜叶绿体内 GSH/GSSG 显著下降,适宜的氧化还原环境被破坏,耐性降低;而‘荷兰 3 号’变化不明显,GSSG 还原为 GSH 运转正常,维持了叶绿体内合适的氧化还原环境,提高了其耐性。

Chl 的生物合成,从谷氨酸(Glu)→ALA→PBG→Uro Ⅲ→Proto IX→Mg-Proto IX→Pchl→Chla→Chlb,是一系列酶学催化过程,如果某一步合成出现障碍的话,障碍以前的前体物质会积累,而其后的前体物质会减少^[29]。本试验结果表明,海水胁迫下,2 个菠菜品种叶片的 ALA、PBG 含量较对照提高,而 Uro Ⅲ和其之后的前体物质 Proto IX、Mg-Proto IX、Pchl 和 Chla、Chlb 含量均降低,说明菠菜叶片 Chl 的合成受阻位点在 PBG 向 Uro Ⅲ的转化,相似的结果在小麦^[41]、冬小麦^[29]上曾有报道。Santos 等^[42]认为,盐胁迫下向日葵 Chl 含量下降由 ALA 形成受阻所致,造成这种差异的原因可能与所采用的作物种类不同有关。MV 是一种触杀灭生性除草剂,其作用机理是诱发细胞产生过量的超氧化物自由基,从而导致多种有害的细胞学效应^[43],国内外大量关于植物氧化胁迫的研究都以 MV 作为内源诱导物;AsA 是一种重要的抗氧化剂,可以清除 O_2^- 和 H_2O_2 ,抑制脂质过氧化^[37]。MV 处理加剧了 ALA 和 PBG 的积累,进一步降低了 Uro Ⅲ、Proto IX、Mg-Proto IX、Pchl 和 Chla、Chlb 含量,说明由 MV 诱发的 ROS 使菠菜 Chl 合成步骤的 PBG 向 Uro Ⅲ转化的受阻程度加重,从而导致 Chl 含量进

一步降低,而 AsA 通过清除 ROS 缓解了这种受阻程度,Chl 含量有所上升。可见,海水胁迫引起菠菜叶绿体内 ROS 积累,引起 Chl 合成受阻,是导致 Chl 含量降低的重要原因之一,并且攻击部位在 PBG 向 UroⅢ 转化,由于‘荷兰 3 号’叶片清除 ROS 的能力较强,受阻程度比圆叶菠菜轻。研究表明,从 PBG 到 UroⅢ 的反应需要胆色素原脱氢酶(PBGD)和尿卟啉原Ⅲ合酶(UROS)两个酶的参与,PBGD 活性的降低与 Chl 合成受阻有关^[44]。由此可见,海水胁迫下,ROS 在菠菜叶绿体内通过抑制 PBGD 活性,从而引起 PBG 向 UroⅢ 转化受阻,进一步降低了 Chl 含量。

Chl 降解代谢与 Chlase 有着密切的关系,在 Chl 降解的“PaO”途径的第一步起主要作用^[4]。研究表明,Chlase 具有潜伏性,底物与酶空间上的分隔可能是引起潜伏性的原因之一^[45],并且植物在衰老过程中 Chlase 的翻译后修饰才可能是 Chl 降解过程中的限速步骤之一^[46],而植物衰老与叶绿体瓦解相伴发生;同时,植物体内 H₂O₂与衰老密切相关,是启动植物衰老的决定因子^[36]。本试验结果表明,海水胁迫下,圆叶菠菜叶片 Chlase 活性显著高于对照,而‘荷兰 3 号’叶片 Chlase 活性没有明显变化;并且 2 个菠菜品种叶绿体内 H₂O₂ 积累,MV 加剧了 H₂O₂ 进一步积累,而 AsA 清除部分 H₂O₂,但圆叶菠菜叶绿体内 H₂O₂ 相对含量在对照和处理条件下都高于‘荷兰 3 号’,说明海水胁迫造成圆叶菠菜叶绿体内 H₂O₂ 大量积累,启动了植株的衰老进程,导致叶绿体瓦解,Chlase 活性升高,加剧了 Chl 降解;而‘荷兰 3 号’叶绿体内具有强大的 AsA-GSH 循环系统,对 H₂O₂ 的清除能力强,植株衰老进程延后,并保持了完整的叶绿体结构,从而使 Chlase 活性没有明显变化,但在海水胁迫下,MV 和 MV + ASA 处理使‘荷兰 3 号’Chlase 活性显著升高,可能与大量 ROS 积累造成叶绿体瓦解有关。可见,海水胁迫诱导了圆叶菠菜植株衰老进程,从而促进 Chlase 活性升高,Chl 分解加剧,而海水胁迫对‘荷兰 3 号’叶片 Chlase 活性的影响较小。

Chl 降解包括 Chl 酶促降解和 Chl 光氧化两种反应类型^[4]。上述分析中,不管是 ROS 引起 Chl 合成受阻还是通过 Chlase 活性提高而导致 Chl 含量降低,都属于酶促降解,光氧化如何引起 Chl 降解,目前尚无相关报道。研究认为,盐胁迫下光合电子传递受阻,过剩光能使 Chl 转变为三线态(Chl³),Chl³通过电子传递把能量传递给 O₂产生¹O₂等 ROS,从而破坏蛋白质及膜脂,进一步引起 Chl 降解^[47]。如上所述,海水胁迫下,2 个菠菜品种叶绿体膜受到了氧化胁迫,Chl 含量也相应降低,表明氧化胁迫也是造成菠菜叶片 Chl 降解的重要因素之一。但在海水胁迫下,菠菜叶片 Chl 含量降低是由合成受阻、Chlase 活性提高还是光氧化降解的哪一方面发挥主导作用,以及 ROS 如何降解 Chl,目前这方面的报道极少,这也将是我们以后主要的研究方向。

综上所述,海水胁迫下,菠菜叶绿体内 ROS 与 Chl 代谢密切相关,不仅通过叶绿体膜的氧化伤害使 Chl 降解,而且使 Chl 合成的 PBG 向 UroⅢ 转化步骤受阻。耐海水品种‘荷兰 3 号’叶绿体内清除 ROS 主要通过 SOD 和 AsA-GSH 循环系统,清除能力较强,减轻了 ROS 对叶绿体膜的氧化损伤和 Chl 合成的受阻程度,并且海水胁迫对 Chlase 活性的影响较小;而海水敏感品种圆叶菠菜叶绿体内清除 ROS 主要依赖于 SOD 和 POD,对 ROS 的清除能力有限,从而导致了 ROS 大量积累,叶绿体膜的氧化损伤和 Chl 合成的受阻程度严重,并且海水胁迫显著提高了 Chlase 活性,加剧了 Chl 降解。

References:

- [1] Mathis J N, Burkey K O. Light intensity regulates the accumulation of the major light-harvesting chlorophyll-protein in greening seedlings. *Plant Physiology*, 1989, 90(2):560—566.
- [2] Jacob-Wilk D, Holland D, Goldschmidt E E. *et al.* Chlorophyll breakdown by erioroohyllase: isolation and functional expression of the Chlase lgene from ethylene-treated Citrus fruit and its regulation during development. *The Plant Journal*, 1999, 20(60):653—661.
- [3] Gopal K, Pattanayak G K, Biswal A K, *et al.* Light-dependent regulation of chlorophyll b biosynthesis in chlorophyllide a oxygenase over expressing tobacco plants. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, 326: 466—471.
- [4] Fernandez-lopez J A, Almela L, Sole-dad-almansa M, *et al.* Partial purification and properties of chlorophyllase from chlorotic Citrus limon leaves. *Photochemistry*, 1992, 31:447—449.
- [5] Jiang M Y, Yang W Y, Xu J, *et al.* Active oxygen damage effect of chlorophyll degradation in rice seedlings under osmotic stress. *Acta Botanica Sinica*, 1994, 36:289~295.

- [6] Yuzo S, Yasuo T, Keishi S. Enzymatic degradation of chlorophyll in chenopodium album. *Plant and Cell Physiology*, 1991, 32: 87—93.
- [7] Wise R R, Naylor A W. Chilling enhanced photo-oxidation. Evidence for the role of singlet oxygen and superoxide in the breakdown of pigments and endogenous antioxidants. *Plant Physiology*, 1987, 83: 278—282.
- [8] Shimazaki K I, Sakaki T, Kondo N *et al.* Active oxygen participation in chlorophyll destruction and lipid peroxidation in SO₂ fumigated leaves of spinach. *Plant and Cell Physiology*, 1980, 21: 1193—1204.
- [9] Li L, Yu S W. Studies on the mechanism of NO₂ injury to the Spinach. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 1988, 14(3): 263—268.
- [10] Kar R K, Choudhuri M A. Possible mechanisms of light-induced chlorophyll degradation in senescing leaves of *Hydrilla Verticillata*. *Plant Physiology*, 1987, 70: 729—734.
- [11] Cheeseman J M. Mechanism of salinity tolerance in plants. *Plant Physiology*, 1988, 87: 547—550.
- [12] Hua C, Wang R L. Responses of protection system in chloroplasts of rice seedlings to salt stress. *Acta Bot Boreal-Occident Sin.*, 2004, 24(1): 136—140.
- [13] Chen Q, Liu Y L. Effect of glutathione on active oxygen scavenging system in leaves of Barley seedlings under salt stress. *Acta Agronomica Sinica*, 2000, 26(3): 365—371.
- [14] Sun J, Li J, Guo S H R, *et al.* Physiological response of difference tolerance spinach to seawater stress. *Acta Bot. Boreal.-Occident. Sin.*, 2008, 28(4): 0737—0744.
- [15] Zhu X G, Zhang Q D. Advances in the research on the effects of NaCl on photosynthesis. *Chinese Bulletin of Botany*, 1999, 16(4): 332—338.
- [16] Takeda K, Otaubo T, Konda N. Participation of hydrogen peroxide in the inactivation of Calvin-cycle GSH enzyme in so₂-fumigated spinach leaves. *Plant and Cell Physiology*, 1982, 23: 1009—1018.
- [17] Wang A G, Luo G H. Quantitative relation between the reaction of hydroxylamine and superoxide anion radicals in plants. *Plant Physiology Communications*, 1990, 16(6): 55—57.
- [18] Wang A G, Luo G H, Shao C B, *et al.* A study on the superoxide dismutase of soybean seeds. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 1983, 9(1): 78—83.
- [19] Chen Y Z, Patterson B D. The effect of chilling temperature on the level of superoxide dismutase, catalase and hydrogen peroxide in some plant leaves. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 1988, 14: 323—328.
- [20] Uchida A, Andre T J, Takashi H. Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice. *Plant Science*, 2002, 163: 515—523.
- [21] Heath R L, Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts, kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry & Biophysics*, 1968, 125: 189—198.
- [22] Nakano Y, Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, 1981, 22: 867—880.
- [23] Foyer C H, Halliwell B. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta*, 1976, 133: 21—25.
- [24] Plant Physiology Institute, Shang Hai, Chinese Science Academy. Modern experimentation direction for plant physiology. Beijing: Science Press, 1999: 315—316.
- [25] Ellman G L. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry & Biophysics*, 1959, 82: 70—77.
- [26] Li H S. Experimentation principle and technology for plant physiology and biochemistry. Beijing: Higher Education Press, 2001. 260—261.
- [27] Hodgins R, van Huystee R B. Rapid simultaneous estimation of protoporphyrin and Mg-protophyrins in higher plants. *Journal of Plant Physiology*, 1986, 125: 311—323.
- [28] Bogorad L. Porphyrin synthesis. In: *Methods in enzymology*. New York: New York Academic Press, 1962. 885—891, 885—895.
- [29] Yu M, Hu C X, Wang Y H. Effects of Molybdenum on the precursors of Chlorophyll biosynthesis in winter wheat cultivars under low temperature. *Scientia Agricultura Sinica*, 2006, 39(4): 702—708.
- [30] Margaret H. The breakdown of chlorophyll by chlorophyllase. *Journal of Biochemistry*, 1961, 78: 359.
- [31] Yang G D, Zhu Z H J. Effects of magnesium deficiency on growth and active oxygen scavenging system in cucumber under different light intensities. *Acta Horticulturae Sinica*, 2001, 28(5): 430—434.
- [32] Liang Y C, Hu F, Yang M C, *et al.* Antioxidative defenses and water deficit-induced oxidative damage in rice (*Oryza sativa* L.) growing on non-flooded paddy soils with ground mulching. *Plant and Soil*, 2003, 257: 407—416.
- [33] Qian Q Q, Zai W S, Zhu Z H J, *et al.* Effects of exogenous Silicon on active oxygen scavenging systems in Chloroplasts of Cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings under salt stress. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 2006, 32(1): 107—112.
- [34] ZHu H J, Wang R G, CHen S H L *et al.* Genotypic differences between *Populus euphratica* and *P. Popularis* in antioxidative ability and salt tolerance under NaCl stress. *Acta Ecologica Sinica*, 2007, 27(10): 4113—4121.
- [35] Cakmak I. Activity of ascorbate-dependent H₂O₂ scavenging enzymes and leaf chlorosis are enhanced in magnesium and potassium deficient leaves,

- but not in phosphorus deficient leaves. *Journal of Experiment Botany*, 1994, 45:1259 — 1266.
- [36] Yang S S, Gao J F. Influence of active oxygen and free radicals on plant senescence. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2001, 21(2):215 — 220.
- [37] Asada K. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1999, 50:601 — 639.
- [38] Foryer C H, Descourvi res P, Kunert K J. Protection against oxygen radicals: an important defense mechanism studied in transgenic plants. *Plant Cell Environ*, 1994, 17:507 — 523.
- [39] Tang CH F, Liu Y G, Li CH F, *et al.* Effects of Cadmium stress on active oxygen generation, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in radish seedlings. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 2004, 30(4):469 — 474.
- [40] Ruan H H, Shen W B, Xu L L Nitric oxide modulates the activities of plasma membrane ATPase and PPase in wheat seedling roots and promotes the salt tolerance against salt stress. *Acta Botanica Sinica*, 2004, 46(4):415 — 422.
- [41] Wang B L, Guo A G, Wang P H. Changes of Chlorophyll metabolism during the Albinic stage of a wheat mutant. *Acta Botanica Sinica*, 1996, 38(7):557 — 562.
- [42] Santos C V. Regulation of chlorophyll biosynthesis and degradation by salt stress in sunflower leaves. *Scientia Horticulture*, 2004, 103:93 — 99.
- [43] Halliwell B. Oxygen-derived species and herbicide action. *Plant Physiology*, 1984, 15:21 — 24.
- [44] Cheng D M, Fang S H, Liu X L, *et al.* Purification and sequence analysis of cDNA coding region for Porphobilinogen deaminase from a stage albinism line of Wheat. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2006, 22(12):973 — 978.
- [45] Matile P and Schellenberg M. The cleavage of pheophorbide is located in the envelope of barley gerontoplasts. *Plant Physiology and Biochemistry*, 1996, 34:55 — 59.
- [46] Yang X T, Zhang ZH Q, Xv L Y, *et al.* Plant Chlorophyll degradation. *Plant Physiology Communications*, 2008, 44(1):7 — 13.
- [47] Reinbothe S and Reinbothe C. The regulating of enzymes involved in chlorophyll biosynthesis. *European Journal of Biochemistry*, 1996, 237:323 — 343.

参考文献:

- [5] 蒋明义, 杨文英, 徐江, 等. 渗透胁迫下水稻幼苗中叶绿素降解的活性氧损伤作用. *植物学报*, 1994, 36:289 ~ 295.
- [9] 李犁, 余叔文. NO₂对菠菜的伤害机理的研究. *植物生理学报*, 1988, 14(3):263 ~ 268.
- [13] 陈沁, 刘友良. 谷胱甘肽对盐胁迫大麦叶片活性氧清除系统的保护作用. *作物学报*, 2000, 26(3):365 ~ 371.
- [14] 孙锦, 李娟, 郭世荣, 等. 不同菠菜品种对海水胁迫的生理响应差异. *西北植物学报*, 2008, 28(4):0737 ~ 0744.
- [15] 朱新广, 张其德. NaCl对光合作用影响的研究进展. *植物学通报*, 1999, 16(4):332 ~ 338.
- [17] 王爱国, 罗广华. 植物的超氧化物自由基与羟胺反应的定量关系. *植物生理学通讯*, 1990, 16(6):55 ~ 57.
- [18] 王爱国, 罗广华, 邵从本, 等. 大豆种子超氧化物歧化酶的研究. *植物生理学报*, 1983, 9(1):78 ~ 83.
- [19] 陈贻竹, 帕特森. 低温对植物超氧化物歧化酶、过氧化物酶和过氧化氢水平的影响. *植物生理学报*, 1988, 14:323 ~ 328.
- [24] 中国科学院上海植物生理所编. 现代植物生理学实验指南. 北京: 科学出版社, 1999. 315 ~ 316.
- [26] 李合生. 植物生理生化实验原理与技术. 北京: 高等教育出版社, 2001. 260 ~ 261.
- [29] 喻敏, 胡承孝, 王运华. 低温条件下钼对冬小麦叶绿素合成前体的影响. *中国农业科学*, 2006, 39(4):702 ~ 708.
- [31] 杨广东, 朱祝军. 不同光照条件下缺镁对黄瓜生长及活性氧清除系统的影响. *园艺学报*, 2001, 28(5):430 ~ 434.
- [33] 钱琼秋, 宰文珊, 朱祝军, 等. 外源硅对盐胁迫下黄瓜幼苗叶绿体活性氧清除系统的影响. *植物生理与分子生物学学报*, 2006, 32(1):107 ~ 112.
- [34] 朱会娟, 王瑞刚, 陈少良, 等. NaCl胁迫下胡杨(*Populus euphratica*)和群众杨(*P. popularis*)抗氧化能力及耐盐性. *生态学报*, 2007, 27(10):4113 ~ 4121.
- [36] 杨淑慎, 高俊凤. 活性氧、自由基与植物的衰老. *西北植物学报*, 2001, 21(2):215 ~ 220.
- [39] 汤春芳, 刘云国, 曾光明, 等. 镉胁迫对萝卜幼苗活性氧产生、脂质过氧化和抗氧化酶活性的影响. *植物生理与分子生物学学报*, 2004, 30(4):469 ~ 474.
- [41] 王保莉, 郭嵩光, 汪沛洪. 小麦突变体返白系返白阶段叶绿素代谢的变化. *植物学报*, 1996, 38(7):557 ~ 562.
- [44] 程冬梅, 范三红, 刘香莉, 等. 小麦返白系胆色素原脱氨酶纯化及编码 cDNA 序列分析. *中国生物化学与分子生物学学报*, 2006, 22(12):973 ~ 978.
- [46] 杨晓棠, 张昭其, 徐兰英, 等. 植物叶绿素的降解. *植物生理学通讯*, 2008, 44(1):7 ~ 13.