

低温驯化对冬小麦叶绿素荧光特性及抗氧化酶活性的影响

王秀田, 卢秋巍, 苍晶*, 包雨卓, 孟德义, 于晶, 徐庆华, 赵虎, 李想, 相智也, 谢波

东北农业大学生命科学学院, 哈尔滨150030

摘要: 为探究不同抗寒性冬小麦品种不同生长发育期的光合特性, 以强抗寒性冬小麦品种‘东农冬麦1号’(‘DN1’)和弱抗寒性冬小麦品种‘济麦22’(‘JM22’)为试验材料, 在大田自然降温与室内模拟低温驯化条件下, 从三叶期开始测定其叶绿素荧光参数、色素含量、抗氧化酶活性等相关生理指标, 同时对自然生长条件下小麦幼苗编码光合相关蛋白的基因表达模式进行分析, 探讨和揭示冬小麦叶绿素荧光特性对低温驯化的响应。结果表明: 大田自然降温下, ‘DN1’通过明显增加的NPQ、较高的色素含量和抗氧化酶活性以及较低的MDA含量, 来适应温度变化对其光合特性的影响; 而‘JM22’则对该时期温度变化不敏感, 各项指标较为恒定; 室内模拟低温驯化下, ‘DN1’与自然条件下有类似的表现, 且在昼夜温度4°C/0°C条件下驯化效果更明显。qPCR结果表明: 两个小麦品种的叶绿素a/b结合蛋白基因(*TaCP3*、*TaCP5*), 在测定的各时期均有较高表达, 与色素含量变化相对应; 参与光化学淬灭的基因*TaNpq4* ‘DN1’均保持了较高的表达量, 与其较高的NPQ变化相对应。综上所述, 在该实验检测时期内强抗寒性‘DN1’能较早感受温度的降低而维持其光合系统的稳定, 进而适应后期更低温度的胁迫。

关键词: 冬小麦; 叶绿素荧光; 抗氧化酶活性; 叶绿素结合蛋白基因

温度是决定作物光合作用最关键的自然资源之一。研究表明, 植物干重的90%来自光合作用, 而光合作用对低温最为敏感(姜籽竹等2015)。低温驯化即让植物在零上低温条件下, 使其获得抗寒性, 从而增强越冬能力的过程, 这是越冬植物共有的适应特征(刘志英等2015)。在对不同抗寒紫花苜蓿的研究中发现: 经过抗寒锻炼后, 在低温胁迫下非秋眠型苜蓿 F_v/F_m 、 Φ_{PSII} 和ETR显著下降而秋眠型苜蓿各荧光参数变化不大(陈世茹等2011)。目前, 关于低温胁迫对冬小麦叶绿素荧光参数的影响, 前人已做了部分研究(王晓楠等2009), 而对于‘东农冬麦1号’(‘DN1’)的研究多集中在低温封冻期, 这促使我们去探讨低温驯化期对小麦幼苗叶绿素荧光参数的影响, 以便了解低温驯化下光合特性的相关机理。活体状态下, 叶绿素荧光提供的信息能够反应PSII对激发能的利用和耗散情况, 因此, 叶绿素荧光是植物光合特性的有效探针(刘书仁等2010)。低温条件下, 活性氧(ROS)的产生不仅会破坏植物膜系统结构, 还会影响植物的光合系统, 破坏PSII反应中心活性, 过度光照会导致光抑制, 而当温度降低时, 即使弱光条件也会发生光抑制, 从而产生ROS, 降低植物对冷胁迫的耐受能力(刘鹏等2001)。植物对低温和氧化胁迫的抗性活性氧清除能力的大小密切相关。低温条件下, 较高活性的ROS清除酶类(SOD、POD等)可起到保护PSII的作用, 在一定程度上减轻过量光能引起的光抑制损伤。

本研究以东北农业大学培育的自主知识产权的强抗寒冬小麦新品种‘DN1’以及不能在黑龙江省越冬的‘济麦22’(‘JM22’)为材料, 探究冬小麦叶绿素荧光特性及抗氧化酶活性对低温驯化响应, 对于进一步探索‘DN1’强抗寒的生理分子机理具有重要的理论意义和较大的应用前景。

材料与方法

1 试验材料及种植

试验材料为冬小麦(*Triticum aestivum* L.)品种‘东农冬麦1号’(简称‘DN1’), 返青率大于85%, 是我国首例可在黑龙江高寒地区安全越冬的冬小麦品种。对照品种‘济麦22’(简称‘JM22’), 为山东省农科院作物研究所选育, 该品种在黑龙江省返青率<2%。冬小麦种子于2015年9月7日播种于东北农业大学实验基地, 小区种植, 行长2 m, 行距0.5 m, 小区间隔0.5 m, 常规田间管理。同时在光照培养箱内(GXZ智能型)盆栽种植两冬小麦品种, 花盆直径约30 cm, 每盆种植15~20株幼苗, 且模拟低温驯化处理。

2 培养条件及取样

大田自然条件下, 从三叶期(9月24日)开始至分蘖期结束(10月29日), 进行田间测定和取样。该

收稿 2016-09-06 修定 2016-10-27

资助 国家自然科学基金(31471423)、国家自然科学基金人才培养基金科研训练项目(J1210069)和黑龙江省自然科学基金(C201418)。

* 通讯作者(E-mail: cangjing2003@163.com)。

时期气温变化如图1所示(箭头指示为叶绿素荧光参数检测点),在11月6日后有冬雪覆盖。室内种植材料从三叶期开始, (1) 20°C/16°C (昼/夜)以每72 h降低4°C的变化处理12 d降低到4°C/0°C; (2)在4°C/0°C条件下生长7 d; (3)在昼夜温度-4°C/-10°C

低温下处理72 h (光周期为昼/夜16 h/8 h, 湿度为65%~70%, 光强为750~850 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)。大田及室内幼苗均选取顶部2片成熟叶片进行检测。每个品种随机选取长势一致的麦苗50株, 将样品叶片剪成约1 cm长的片段, 混匀, 分装, 置-80°C冰箱贮存。

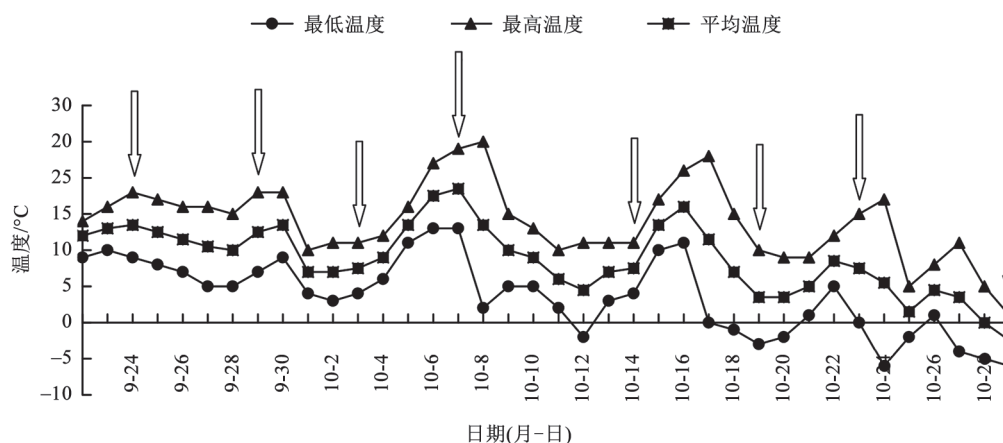


图1 2015年9月24日~10月29日温度变化情况

Fig.1 Temperature change trend from Sep. 24, 2015 to Oct. 29, 2015

箭头指示叶绿素荧光参数检测时间点。

3 实验方法

3.1 测定指标及方法

叶绿素荧光参数的测定采用德国Walz公司生产的便携式荧光仪PAM-2500和相应的软件PamWin。大田样品与室内样品均在上午进行, 样品均经过30 min暗处理检测最大光化学效率(F_v/F_m), 打开Act Light (光化光)进行实际光合量子产量(Φ_{PSII})、光化学淬灭系数(q_p)、非光化学淬灭系数(NPQ)、相对电子传递速率(ETR)的检测(PAR为102 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), 每组样品均检测5株幼苗以及每株幼苗从上到下数的第一或第二片成熟叶片的两次重复。叶绿素含量测定采用分光光度法; 超氧化物歧化酶(SOD)活性测定采用氮蓝四唑(NBT)法、过氧化物酶(POD)活性测定采用愈创木酚法; 丙二醛(MDA)含量测定采用硫代巴比妥酸法; 抗坏血酸过氧化物酶(APX)活性测定采用张以顺等(2009)的方法。各生理指标的测定每组样品均设3组重复。

3.2 Real-Time PCR

总RNA按照TRIzol说明书中方法提取。总RNA的反转录利用Reverse Transcriptase M-MLV (RNase H⁻)试剂盒, 按照操作说明进行; 定量检测利

用STBR试剂盒(宝生物工程有限公司, 大连)。以Actin为内参基因(袁伟等2012)对反转录产物cDNA样品进行归一化。用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 算法计算待测基因的相对表达量(Livak和Schmittgen 2001)。每个样品2个生物重复, 每个反应各设一个空白对照(cDNA模板空白), 所用引物由哈尔滨博仕生物有限公司合成(表1)。

3.3 数据处理

用WPS2016和SPSS17.0进行统计分析和制图, 计算各处理性状的平均数, 制作柱状图。

实验结果

1 低温驯化对叶绿素荧光参数的影响

F_v/F_m 为PSII最大光化学效率, 即植物的光合潜能。大田自然降温条件下, 两冬小麦品种的 F_v/F_m 在9月24日、10月23日与10月29日均达到显著差异; 在10月29日两冬小麦品种 F_v/F_m 均有明显下降且均达到最低值, 与10月23日相比‘JM22’的下降幅度大于‘DN1’, 两品种降幅分别为27.8%和14.9% (图2-A)。室内模拟低温驯化条件下 F_v/F_m 与自然状态下有类似的表现趋势, 只是在昼夜温度-4°C/-10°C条件下有明显的降低(图2-B)。

表1 荧光定量PCR所用引物序列
Table 1 Reaction sequences of primers used in real-time PCR

基因名(GenBank序列号)	基因家族	引物序列(5'→3')	核苷酸长度/bp
<i>TaNPQ4</i> (AK221702.1)	photosystem II subunit S	F: TGCTTACTTCAGGCGTCACC R: TGCTCTTCGGCTTCTCAACC	223
<i>TaCP3</i> (FJ797428.1)	chlorophyll a/b-binding protein	F: ACCATCCACCAGTTCATCTCAC R: AGGTACTTGGGACGGTCAGG	221
<i>TaCP5</i> (FJ797430.1)	chlorophyll a/b-binding protein	F: ATCCTGTCCAAGAACGGCATC R: CCATGAGCACCACCTGAACC	157
<i>Taactin</i> (352987)	β -actin	F: CCTTAGTACCTTCCAACAGATGT R: CCAGACAACTCGCAACTTAGA	120

四个基因的退火温度均为60℃, PCR循环数均为40次。

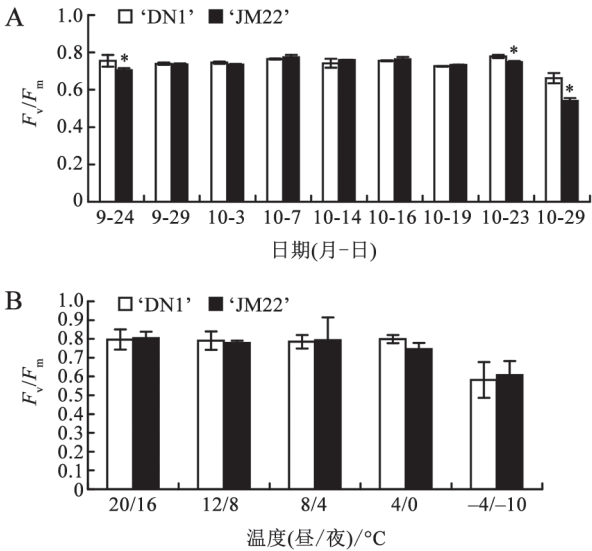


图2 两冬小麦品种最大光化学效率(F_v/F_m)变化
Fig.2 Changes in maximal photochemical efficiency (F_v/F_m) of two winter wheat

A: 大田自然降温条件下; B: 室内模拟低温处理。*和**分别表示各温度处理条件下两品种间差异达0.05和0.01显著水平, 下同。

Φ_{PSII} 是光系统II实际光合量子产量, 反映了植物实时的光化学效率, Φ_{PSII} 值越大, 表明植物将光能转化为化学能的能力越强。大田自然降温条件下, 两冬小麦品种的 Φ_{PSII} 随温度的变化也有较大的变化, 在9月24日、10月7日、16日、19日和23日 Φ_{PSII} ‘JM22’高于‘DN1’, 而在10月14日‘DN1’高于‘JM22’; 到10月29日两品种 Φ_{PSII} 均达到最低值, 且与10月23日相比‘DN1’下降幅度小于‘JM22’, 两品种分别下降了63.2%和76.3% (图3-A); 室内低温驯化下, 在昼夜温度20℃/16℃时‘JM22’高于‘DN1’, 而在昼夜温度12℃/8℃、8℃/4℃时‘DN1’高于‘JM22’。两

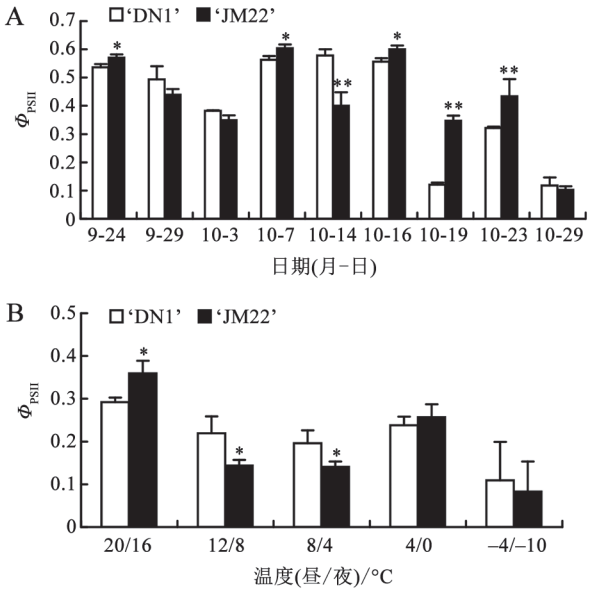


图3 两冬小麦品种实际光合量子产量(Φ_{PSII})变化
Fig.3 Changes in effective quantum yield of photosystem II (Φ_{PSII}) of two winter wheat

冬小麦品种的 Φ_{PSII} 均随温度降低而下降, 在昼夜温度-4℃/-10℃条件下‘DN1’与‘JM22’均达到最低值, 与昼夜温度4℃/0℃时相比两品种分别下降了54.2%和67.7% (图3-B)。两个冬小麦品种在大田自然降温条件下的 Φ_{PSII} 都较室内幼苗的 Φ_{PSII} 高, 即大田自然降温条件下冬小麦的光合效率都高于室内低温驯化条件下麦苗的光合效率。

NPQ为非光化学猝灭系数, 反映了植物耗散过剩光能为热的能力。大田自然降温条件下, 10月14日之前(日平均温度12℃) NPQ值均有所变化, 但两品种间无显著差异; 而10月16日之后检测点(日平均温度5℃) ‘DN1’的NPQ值显著高于‘JM22’ (图4-A);

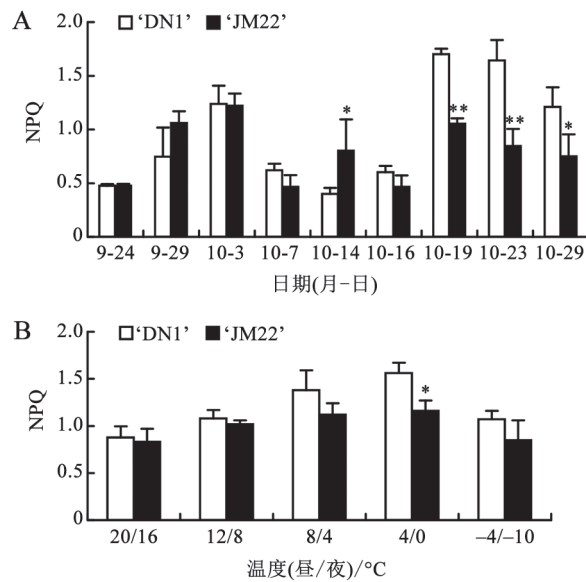


图4 两冬小麦品种非光化学淬灭系数(NPQ)变化
Fig.4 Changes in non-photochemical quenching (NPQ) of two winter wheat

在10月19日达到峰值。室内低温驯化, 两品种冬小麦的NPQ值都表现为先升高后降低, 昼夜温度4°C/0°C时达到峰值, 且'DN1'的NPQ值高于'JM22'。但在昼夜温度20°C/16°C到昼夜温度12°C/8°C期间, 两冬小麦品种的NPQ值差异不显著; 昼夜温度4°C/0°C时, 'DN1'的NPQ值明显高于'JM22' (图4-B), 表明随着低温的到来, 'DN1'的热耗散变化更加明显。

q_p 是光化学反应猝灭系数, 反映了PSII反应中心的开放程度, 即植物光合活性的高低, 其值越大, 说明PSII的光合活性越大。大田自然降温条件下, 两冬小麦品种的 q_p 与 Φ_{PSII} 有相似地表现, 同样在10月19日、10月23日两品种达到显著差异(图5-A); 到10月29日'JM22'达到最低值且与10月23日相比下降了78.3%, 而10月29日'DN1' q_p 值与10月23日相比下降了55.7%; 室内低温驯化处理 q_p 呈现先下降后上升再下降的趋势(图5-B), 在昼夜温度-4°C/-10°C时'DN1'与'JM22'均达到最低值, 与昼夜温度20°C/16°C时相比的两品种分别下降了55.4%和81.8%。

ETR为相对电子传递效率。随温度变化, 两冬小麦品种的ETR均有明显波动, 但在10月14日前两品种并无显著差异; 与'JM22'相比, 'DN1'在10月14、19和23日ETR值较低, 但从10月23日到10月29日随温度的继续降低, 'JM22'下降更显著, 'DN1'

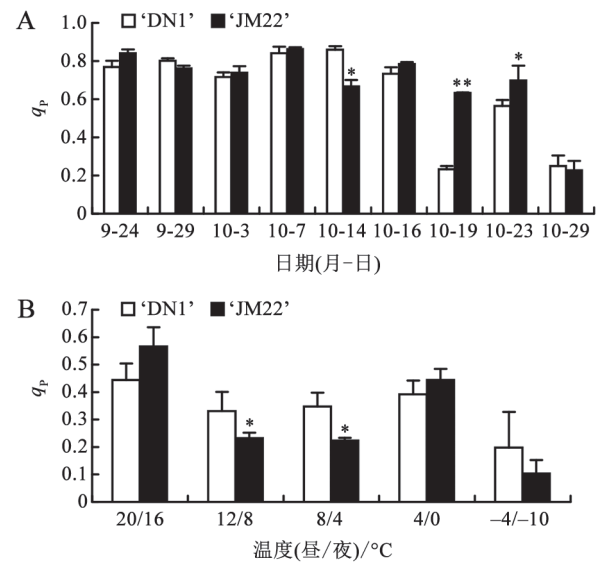


图5 两冬小麦品种光化学淬灭系数(q_p)变化
Fig.5 Changes in photochemical quenching (q_p) of two winter wheat

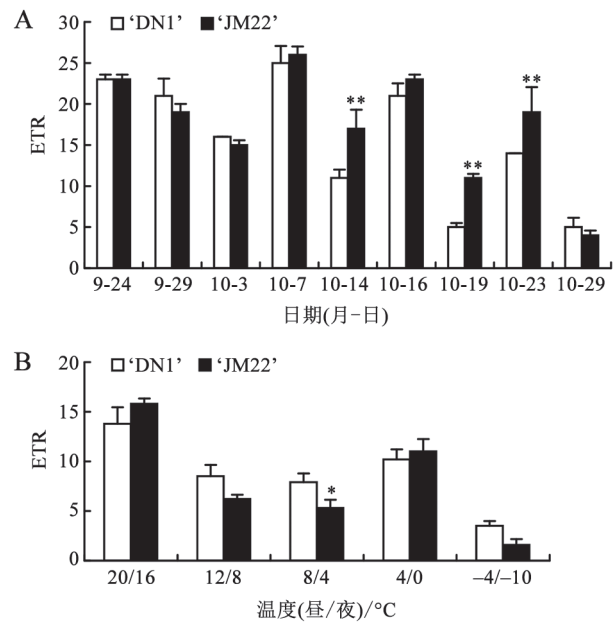


图6 两冬小麦品种电子传递速率(ETR)变化
Fig.6 Changes in photosynthetic electron transport rate (ETR) of two winter wheat

和'JM22'分别下降了64.3%和78.9% (图6-A); 室内低温驯化处理, 两冬小麦品种ETR呈现先下降后上升再下降趋势, 两品种在昼夜温度8°C/4°C时达到显著差异。两冬小麦品种ETR在昼夜温度-4°C/-10°C均下降到最低值, 相比昼夜温度4°C/0°C时, 'JM22'和'DN1'的ETR分别下降了85.5%和65.7% (图6-B)。

2 低温驯化对冬小麦色素含量的影响

在大田自然降温条件下, 叶绿素a和叶绿素b含量除10月3日外‘DN1’均保持了较高的值且在10月29日与‘JM22’达到显著差异(图7-A、B); 类胡萝卜素含量除10月3日与10月23日外其他检测时期‘DN1’均高于‘JM22’且在10月29日两品种达到显著差异(图7-D); 两冬小麦的叶绿素a/b值总体变化稳定且无显著差异(图7-C)。室内低温驯化发现, 在昼夜温度4°C/0°C、-4°C/-10°C时‘DN1’较‘JM22’有更高的叶绿素a含量以及类胡萝卜素含量

(图7-E、H), 而在昼夜温度20°C/16°C, 12°C/8°C时‘JM22’与‘DN1’相比有更高的叶绿素b含量(图7-F)。叶绿素a/b分别在昼夜温度4°C/0°C和-4°C/-10°C时达到显著差异(图7-G), 表明随温度的降低‘DN1’叶绿素a增加更明显, 而‘JM22’则是叶绿素b增加更明显。

3 低温驯化对小麦叶片MDA含量的影响

丙二醛(MDA)普遍被认为是活性氧启动膜脂过氧化过程中的主要产物之一, 其含量高低可用来衡量植物受活性氧伤害程度的大小。由图8-A可见,

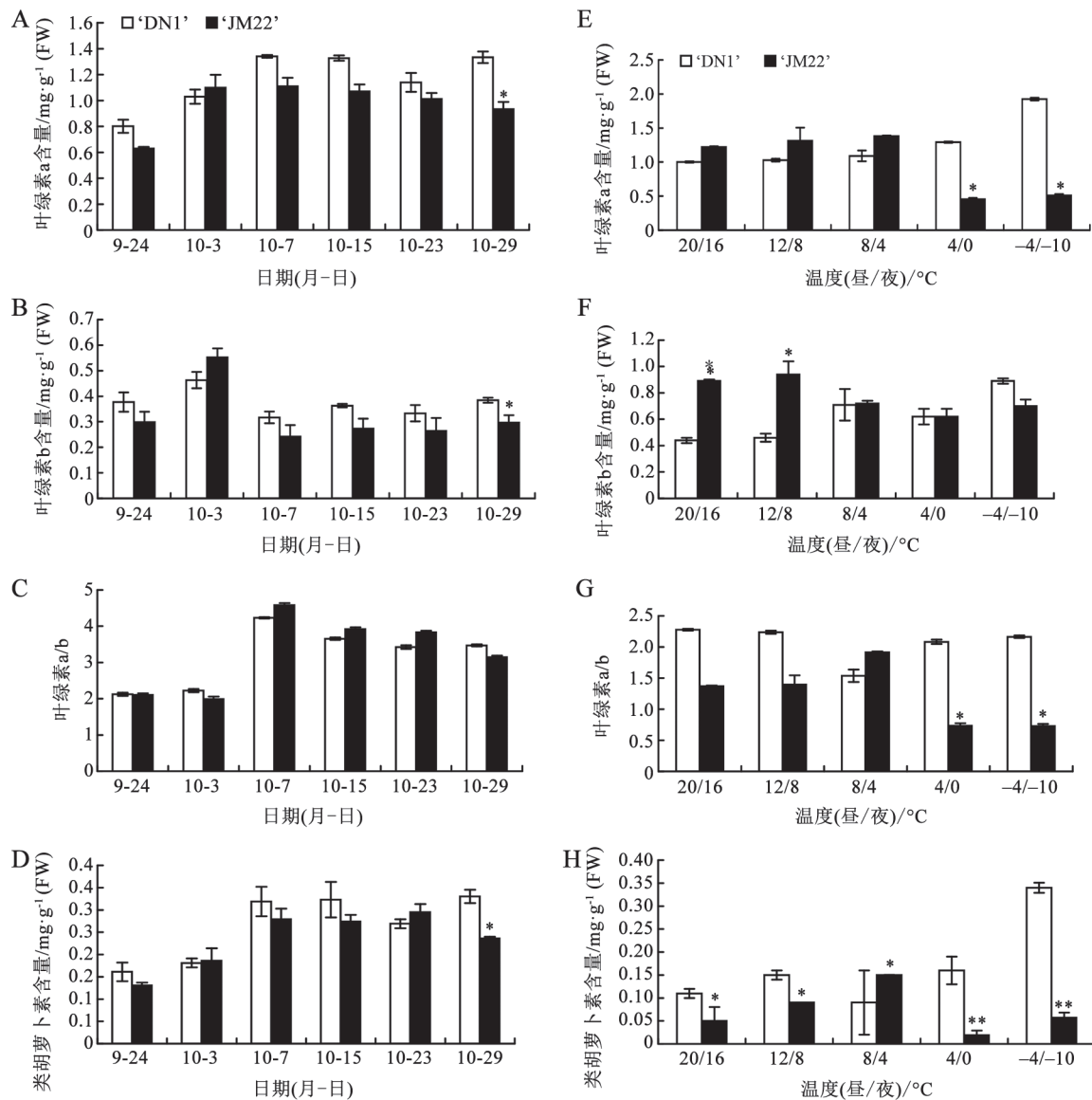


图7 低温驯化条件下两冬小麦品种色素含量变化

Fig.7 Changes in pigment contents in two winter wheat under cold acclimation

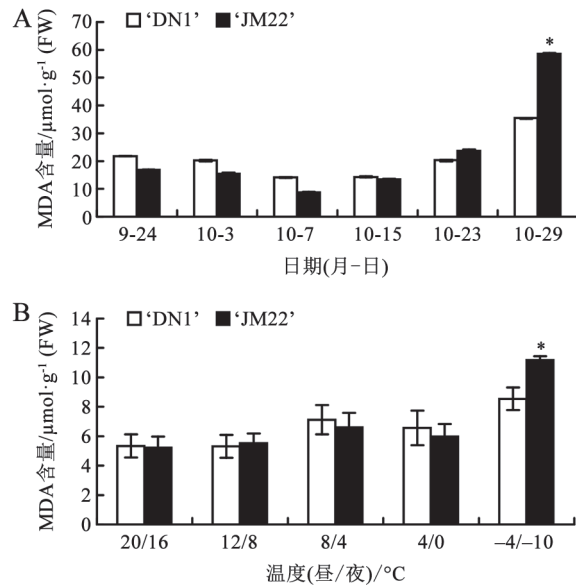


图8 两冬小麦品种叶片MDA含量变化

Fig.8 Changes in MDA content of two winter wheat

大田自然降温条件下,除10月29日外低温驯化并未使'DN1'或'JM22'遭受更强的活性氧伤害,10月23日之前(平均温度10°C)两冬小麦品种的MDA含量无显著差异。在10月29日'JM22'的MDA含量显著高于'DN1',表明'DN1'的抗低温能力较'JM22'强。室内低温驯化发现,两冬小麦MDA含量在各温度条件下无显著差异,只有在昼夜温度-4°C/-10°C胁迫下'JM22'中MDA含量明显增高,与昼夜温度4°C/0°C相比增高了43.4%(图8-B)。两种处理条件对比可见,大田自然降温下幼苗的MDA含量更高,表明复杂的自然条件会导致植物遭受更多的膜损伤。

4 低温驯化对SOD活性的影响

大田自然降温条件下,两冬小麦品种的SOD活性均随温度降低呈先下降后升高趋势(图9-A), 'DN1'与'JM22'均有较高的活性,除10月3日'DN1'显著高于'JM22'外其他检测时期内两品种未达到显著差异;室内低温驯化处理发现,两冬小麦品种表现了先上升后下降的趋势,在昼夜温度4°C/0°C条件下两品种均达到峰值,且'DN1'的SOD活性高于'JM22',与昼夜温度20°C/16°C时相比两品种的SOD活性分别提高了40.6%和36.1%(图9-B)。

5 低温驯化对POD活性的影响

大田自然降温下,POD活性在各个检测时期均表现为'DN1'高于'JM22'(图10-A),且在10月3、

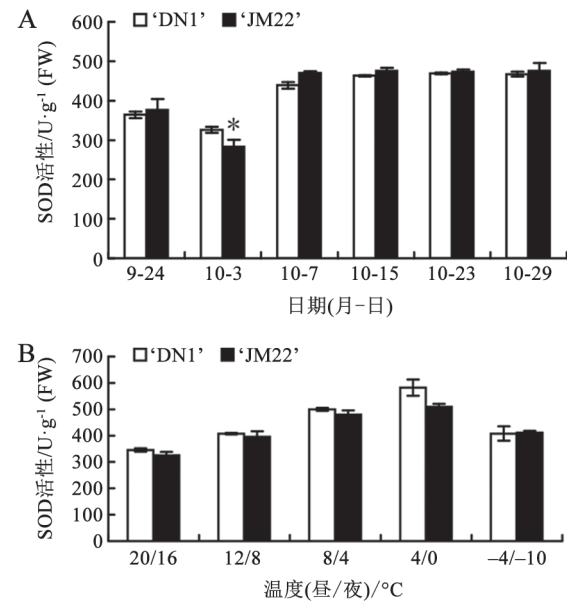


图9 两冬小麦品种SOD活性变化

Fig.9 Changes in SOD activity of two winter wheat

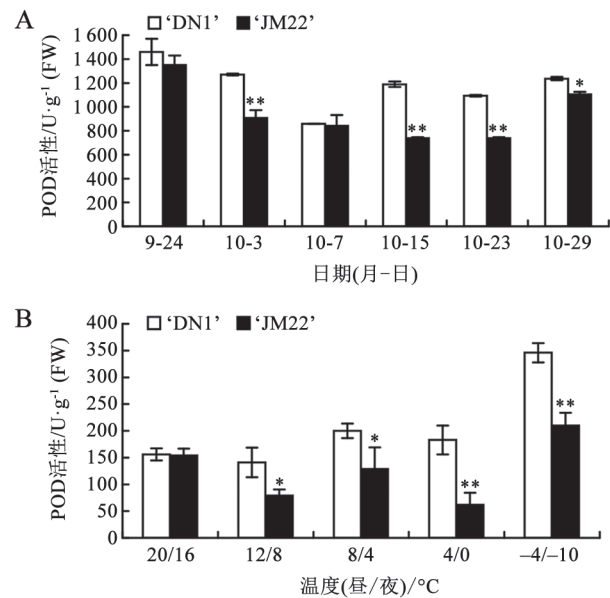


图10 两冬小麦品种POD活性变化

Fig.10 Changes in POD activity of two winter wheat

15、23日达到极显著差异。室内低温驯化条件下,POD活性变化规律与大田自然降温情况相似,即'DN1'的POD活性均高于'JM22',且在昼夜温度4°C/0°C和-4°C/-10°C时达到极显著差异(图10-B)。大田自然降温条件下,两冬小麦品种的POD活性都显著高于室内低温驯化处理下的POD活性。

6 低温驯化对APX活性的影响

大田自然降温条件下,随着温度的降低,‘JM22’与‘DN1’的APX活性呈现先降后缓慢升高的趋势,‘DN1’均稍高于‘JM22’,且10月3日、15日和23日两品种间达到显著差异水平;而两品种的APX活性最高值均出现在9月24日(图11-A)。室内低温驯化条件下,‘DN1’的APX活性同样均高于‘JM22’,且昼夜温度4°C/0°C时两品种均达到峰值,同时在该温度条件下两品种达到显著差异(图11-B)。

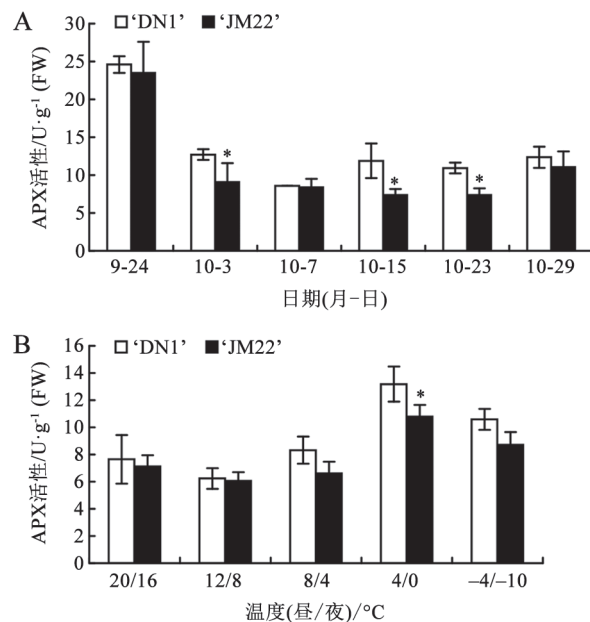


图11 两冬小麦品种APX活性变化

Fig.11 Changes in APX activity of two winter wheat

7 TaCP3、TaCP5和TaNPQ4的表达模式分析

叶绿素a/b结合蛋白TaCP3和TaCP5是光系统II的重要组分,对其进行qPCR分析发现,‘DN1’在各测定期的相对表达量均高于‘JM22’,‘DN1’ TaCP3的表达量在10月23日达到峰值, TaCP5的表达量在10月15日达到峰值,10月23日‘DN1’ TaCP3的表达量与该时期‘JM22’相比增高了3.1倍,10月15日‘DN1’ TaCP5的表达量与该时期‘JM22’的表达量相比增高了约2.5倍(图12-A、B); NPQ4是高等植物光系统II (PSII)普遍存在的编码PSII-S (CP22)相关联的色素结合蛋白,参与非光化学淬灭。9月24日到10月23日期间,‘DN1’较‘JM22’有更高的表达量,10月7日达到峰值,与‘JM22’相比‘DN1’ NPQ4的表达量增高了约3倍;但在10月29日,与‘JM22’

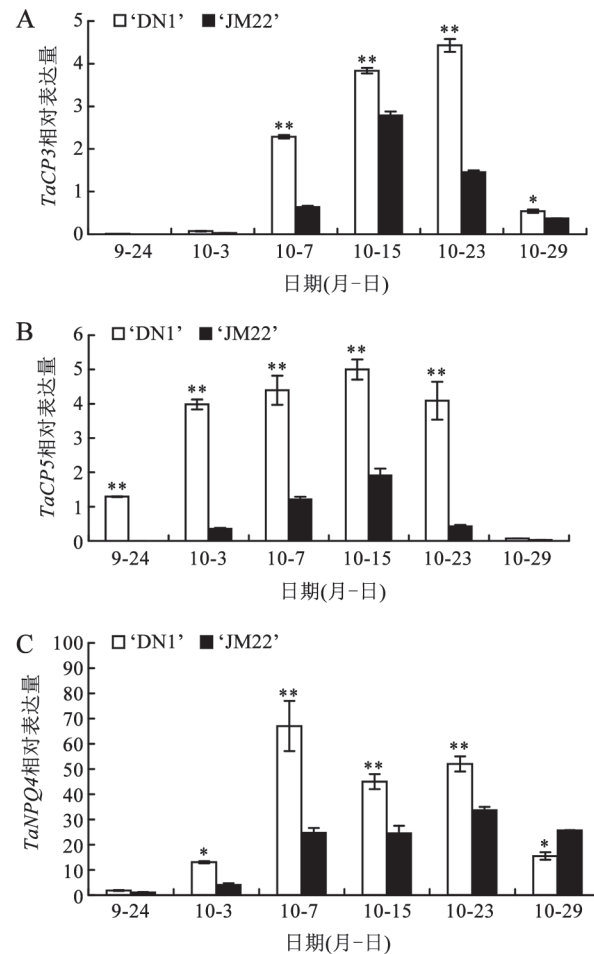


图12 大田自然降温条件下TaCP3 (A)、TaCP5 (B)和TaNPQ4 (C)的相对表达量变化

Fig.12 Expression of the complex proteins TaCP3 (A), TaCP5 (B) and TaNPQ4 (C) from PSII in different time

相比,‘DN1’ NPQ4的相对表达量较低且差异显著(图12-C)。

讨 论

低温驯化对越冬植物有极其重要的作用。植物在受到低温胁迫时,会产生适应、伤害、修复以及补偿等不同阶段性反应,在不同的反应阶段各种生理指标的变化也不同(赵丽英等2005)。叶绿素荧光可快速检测完整植株在胁迫下光合作用的真实行为,可用来评价光合机构的功能以及环境胁迫对其影响(尹贇鹏等2011)。NPQ反映的是光系统II吸收的光能不能用于光合电子传递而以热的形式耗散掉的光能部分,对光合机构有一定的保护作用。研究发现低温胁迫会降低叶片 q_P 与

Φ_{PSII} , 反而增加NPQ, 且叶片的 Φ_{PSII} 与冷害指数呈极显著负相关(颌建明等2011)。本实验中大田自然降温条件下, 10月14日前(平均温度约12°C)随温度的先降低后升高, 两品种的 q_p 、ETR、 Φ_{PSII} 也表现先降低后升高的趋势, 而NPQ则表现先升高后降低; 在10月16日后(平均温度约为5°C)随温度的连续降低, ‘DN1’较早的感受到温度的降低提高了NPQ的值, 而其光化学反应 q_p 、ETR、 Φ_{PSII} 值就会相应减小, 而‘JM22’未能较早感受到温度降低, 其NPQ值没有明显增加; 至10月29日(平均温度约为-3°C)由于‘DN1’适应了温度的变化, 保护了光系统免受损坏, 减少了 Φ_{PSII} 、 q_p 与ETR明显下降, 从而减少了光抑制; F_v/F_m 在9月24日、10月23日和29日‘DN1’显著高于‘JM22’, 其他检测时期两品种间未达到显著差异。室内模拟低温驯化发现, 两冬小麦品种4°C/0°C前随温度的降低, F_v/F_m 、 Φ_{PSII} 、ETR、 q_p 整体均有所下降, 与‘JM22’相比‘DN1’下降幅度较小, 比较缓和且在昼夜温度4°C/0°C时有所回升; NPQ则随温度的降低先增加后降低, 在昼夜温度4°C/0°C时达到峰值, 与‘JM22’相比‘DN1’NPQ变化更加明显。昼夜温度4°C/0°C作为各参数变化的转折点, 表明前期有规律的温度降低, 以及在昼夜温度4°C/0°C更多时长的培养达到了低温驯化的目的, 使两冬小麦幼苗在该时期达到了适应的状态。Yin等(2010)对高温胁迫下水稻叶片光系统II的光化学反应、光抑制作用以及叶黄素循环的研究中表明, 当温度高于35°C时, F_v/F_m 变化不明显; Φ_{PSII} 有所下降, q_p 变化不显著; NPQ显著升高, 与本研究结果相似。通过室内低温驯化与大田自然降温下对比实验验证: ‘DN1’能够较早感受温度的降低, 显著增加NPQ值保护光系统的免受损坏, 为后期耐受更低的温度提供保障。

光系统指的是光合作用中吸收光能的单位, 叶绿素a主要存在于光系统的核心复合物中, 叶绿素b则主要存在于光系统的天线组分中, 而叶绿素a/b比值的变化可以反映出光系统中各组分对低温的敏感性和响应程度。类胡萝卜素普遍被认为可参与植物光合机构中过剩光能的耗散, 抑制脂质过氧化从而稳定膜结构(李敏敏等2016)。Bonnecarrère等(2011)在对水稻抗冷性研究中发现抗寒性较好的粳稻与冷敏感的籼稻相比能够积累

更多的叶绿素及总胡萝卜素, 且通过高水平抗氧化酶活性和较低的电解质渗漏来应对冷胁迫。本实验中大田自然降温条件下, 与‘JM22’相比‘DN1’更多时期内保持了较高的叶绿素a、b和类胡萝卜素含量, 且均在10月29日达到差异显著水平, 而叶绿素a/b则无显著差异; 表明较高的叶绿素含量能够维持光合效率的稳定。在室内低温驯化条件下, ‘DN1’在昼夜温度20°C/16°C和12°C/8°C下有较低叶绿素b含量, 而在昼夜温度4°C/0°C和-4°C/-10°C下叶绿素a、类胡萝卜素含量和叶绿素a/b均显著高于‘JM22’, 推测低温可能干扰了叶绿素的构成, 即叶绿素a的合成对低温胁迫更为敏感; 两种处理条件下均有较高的类胡萝卜素则可以耗散过剩的光能, 这也可能与‘DN1’有较高的NPQ值相联系。这一结果与郑春芳等(2016)关于烯效唑能够显著提高低温胁迫下秋茄幼苗的叶绿素含量和叶绿素a/b的结果相类似。大田与室内对比试验证明, 无论是单一的低温处理还是复杂自然环境下的低温, ‘DN1’均能够保持较高的色素含量, 维持光合作用的效率, 减少更低温度对光合作用的胁迫影响。

当温度降低, 即使弱光条件也会发生光抑制, 进而产生更多的活性氧(ROS)。ROS的产生会影响植物的光合系统, 破坏PSII反应中心活性, 主要对色素分子、蛋白质和类囊体膜有很大的破坏性(王以柔等1986)。郑春芳等(2016)发现低温胁迫降低了红树植物秋茄叶片的SOD、POD活性, 增加了过氧化产物MDA含量抑制了幼苗光合色素合成, 植物光合能力受阻。查倩等(2016)也表明高温处理下葡萄幼树的SOD活性增长不明显, 而POD、CAT活性以及过氧化产物MDA含量表现了较强的增长。本实验发现, 大田自然降温条件下随温度降低两冬小麦品种的MDA含量开始保持较低的水平, 之后随温度降低明显增加, 在10月29日达显著差异; 室内模拟低温处理MDA含量测定显示‘升-降-升’趋势, 且在昼夜温度-4°C/-10°C时‘JM22’有明显的增加, 表明‘DN1’在更低的温度条件下膜稳定性较强。大田自然降温条件下POD、APX活性随温度降低先下降之后呈上升趋势, 且峰值均在9月24日; SOD活性先下降并在10月7日后一直保持较高的活性; 这也证明了SOD是低温

胁迫下清除自由基最有效的活性酶的结论(Baek等2006)。与‘JM22’相比‘DN1’的POD活性在10月3日及10月15日后均有较高的活性且达到显著差异,同时‘DN1’在10月15日后也有较高的APX活性;室内模拟低温处理与自然条件下有相似的表现,‘DN1’的POD、APX活性均比‘JM22’高,且POD活性表现更多显著差异;同时发现大田自然状态下的幼苗与室内幼苗相比POD、APX活性更高,推测POD、APX对不利的复杂环境条件更敏感;室内外对比试验表明低温能够促进植物保持较高的SOD活性,而POD、APX对低温变化敏感,且在活性氧的清除过程中起到关键作用,能够有效的减少MDA含量和细胞膜透性。

考虑到光合特性对于低温驯化的重要性(Ramvalho等2003),对有关光系统II蛋白组分的几个基因*TaCP3*、*TaCP5*和*TaNPQ4*进行了研究,这些基因可以被用于探测植物对低温胁迫的耐性(Kovács等2006)。Batista-Santos等(2011)在探讨低温对多种基因型咖啡光合作用的影响时发现,高度耐冷性咖啡品种(‘Icatu’)在低温下,其叶绿素a/b结合蛋白基因*CaCP22*等呈上调表达;野生型拟南芥及其*npq4*突变体随UV-B辐照时间的延长,叶绿素荧光参数及叶绿素含量均下降,但*npq4*突变体下降更显著(游晶晶等2011)。本实验中低温胁迫下,强抗寒冬小麦品种‘DN1’的*TaCP3*、*TaCP5*比弱抗寒冬小麦品种‘JM22’的表达量高,与前述研究结果相一致,证明*TaCP3*和*TaCP5*的表达有利于维持光系统II的稳定性,从而维护了光合机构的高效性。在9月24日到10月23日之间(日平均温度11℃),‘DN1’的*TaNPQ4*表达量均高于‘JM22’,与其较高的NPQ值相一致,即‘DN1’通过将过剩的光能以热的形式耗散掉,进而维护光系统免受损坏。而10月29日(日平均温度为-3℃),‘JM22’的*TaNPQ4*表达量高于‘DN1’,表明‘JM22’可能在该温度条件下才能刚刚启动光系统应急保护机制,而‘DN1’已先于‘JM22’启动了应急机制。可见,‘DN1’*TaNPQ4*的表达比‘JM22’对温度敏感,先于‘JM22’启动了光系统II的保护机制,以应对进一步的低温胁迫。

综上所述,在低温驯化期内昼夜温差较大的温度变化对小麦的叶绿素荧光参数有明显的影

响。抗寒性品种‘DN1’在低温驯化期能够通过提高NPQ、增加叶绿体色素含量、提高POD和APX抗氧化酶活性等多条途径的生理生化变化,以及增强*TaCP3*、*TaCP5*和*TaNPQ4*等光系统蛋白组分的分子生物学变化,更早的启动响应温度变化的机制,维护光合系统免受破坏,保证光合作用,为适应随后到来的更低温度做出调整,为实现安全越冬提供必要保障。

参考文献

- Baek KH, Skinner DZ (2006). Differential expression of manganese superoxide dismutase sequence variants in near isogenic lines of wheat during cold acclimation. *Plant Cell Rep*, 25: 223–230
- Batista-Santos P, Lidon FC, Fortunato A, Leitão AE, Lopes E, Partelli F, Ribeiro AI, Ramalho JC (2011). The impact of cold on photosynthesis in genotypes of *Coffea* spp.—Photosystem sensitivity, photoprotective mechanisms and gene expression. *J Plant Physiol*, 168: 792–806
- Bonnecarrère V, Borsani O, Díaz P, Capdevielle F, Blanco P, Monza J (2011). Response to photooxidative stress induced by cold in *japonica* rice is genotype dependent. *Plant Sci*, 180: 726–732
- Chen SR, Yu LQ, Yi J, Wu RN, Ji RH, Liu SN (2011). Influence of chlorophyll fluorescence characteristics on alfalfa seedlings under cryogenic stress. *Acta Agres Sin*, 19 (4): 596–600 (in Chinese with English abstract) [陈世茹, 于林清, 易津, 乌日娜, 吉仁花, 刘曙娜(2011). 低温胁迫对紫花苜蓿叶片叶绿素荧光特性的影响. 草地学报, 19 (4): 596–600]
- Jiang ZZ, Zhu HG, Zhang Q, Song BG, Meng LJ, Yang DG (2015). Progress of influence of low temperature on plant photosynthesis. *Crops*, (3): 23–28 (in Chinese with English abstract) [姜籽竹, 朱恒光, 张倩, 宋北光, 孟丽君, 杨德光(2015). 低温胁迫下植物光合作用的研究进展. 作物杂志, (3): 23–28]
- Jie JM, Yu JH, Huang GB, Feng Z (2011). Correlations between changes of absorption and transformation of light energy by PSII in pepper leaves and the variety tolerance under low temperature and weak light. *Sci Agric Sin*, 44 (9): 1855–1862 (in Chinese with English abstract) [颀建明, 郁继华, 黄高宝, 冯致(2011). 低温弱光下辣椒叶片PSII光能吸收和转换变化与品种耐性的关系. 中国农业科学, 44 (9): 1855–1862]
- Kovács L, Damkjær J, Kereiche S, Iliaia C, Ruban AV, Boekema EJ, Jansson S, Horton P (2006). Lack of the light-harvesting complex CP24 affects structure and function of the grana membranes of higher plant chloroplasts. *Plant Cell*, 18: 3106–3120
- Li MM, Li ZF, Wang XN, Fu LS, Song YC, Wang L (2016). Differences of organization structure in different winter wheat varieties at over-wintering stage in cold region. *J Triticeae Crops*, 36 (6): 795–800 (in Chinese with English abstract) [李敏敏, 李卓夫, 王晓楠, 付连双, 宋永超, 王璐(2016). 寒地冬小麦不同品种越冬期组织结构的差异. 麦类作物学报, 36 (6): 795–800]
- Liu P, Meng QW, Zhao SJ (2001). Chilling-induced photoinhibition and biochemical protective mechanism of chilling-sensitive

- plants. *Plant Physiol Commun*, 37 (1): 36–82 (in Chinese with English abstract) [刘鹏, 孟庆伟, 赵世杰(2001). 冷敏感植物的低温光抑制及其生化保护机制. *植物生理学通讯*, 37 (1): 36–82]
- Liu SR, Guo SR, Cheng YJ, Liu CJ, Wang LP, Shu S (2010). Effects of exogenous proline on the ascorbat-glutathione cycle and photosynthetic fluorescence characteristics in leaves of cucumber seedlings under high temperature stress. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 30 (2): 309–316 (in Chinese with English abstract) [刘书仁, 郭世荣, 程玉静, 刘超杰, 王丽萍, 束胜(2010). 外源脯氨酸对高温胁迫下黄瓜幼苗叶片AsA-GSH循环和光合荧光特性的影响. *西北植物学报*, 30 (2): 309–316]
- Liu ZY, Li XL, Li F, Wang ZL, Sun QZ (2015). Mechanisms underlying the effects of fall dormancy on the cold acclimation and winter hardiness of *Medicago sativa*. *Chin J Plant Ecol*, 39 (6): 635–648 (in Chinese with English abstract) [刘志英, 李西良, 李峰, 王宗礼, 孙启忠(2015). 紫花苜蓿秋眠性对低温驯化过程与越冬耐寒适应的作用机理. *植物生态学报*, 39 (6): 635–648]
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. *Methods*, 25 (4): 402–408
- Ramvalho JC, Quartin V, Fahl JI, Carelli ML, Leitão AE, Nunes MA (2003). Cold acclimation ability of photosynthesis among species of the tropical *Coffea* genus. *Plant Biol*, 5: 631–641
- Wang XN, Fu LS, Li ZF, Yang F, Sun YL, Liu C, Wang JW, Chen YX (2009). Comparison of chlorophyll fluorescence parameters between two winter wheat cultivars during cold acclimation and frozen period. *J Triticeae Crops*, 29 (1): 83–88 (in Chinese with English abstract) [王晓楠, 付连双, 李卓夫, 杨方, 孙艳丽, 刘灿, 王金伟, 陈禹兴(2009). 低温驯化及封冻阶段不同冬小麦品种叶绿素荧光参数的比较. *麦类作物学报*, 29 (1): 83–88]
- Wang YR, Liu HX, Li P, Zeng SX, Zhen LP, Guo JY (1986). The effect of chilling stress on membrane-lipid peroxidation of photosynthetic apparatus in rice seedlings in the dark and light. *Plant Physiol J*, 12 (3): 244–251 (in Chinese with English abstract) [王以柔, 刘鸿先, 李平, 曾韶西, 甄立平, 郭俊彦(1986). 在光照和黑暗条件下低温对水稻幼苗光合器官膜脂过氧化作用的影响. *植物生理学报*, 12 (3): 244–251]
- Yin Y, Li SM, Liao WQ, Lu QT, Wen XG, Lu CM (2010). Photosystem II photochemistry, photoinhibition, and the xanthophyll cycle in heat-stressed rice leaves. *J Plant Physiol* 167: 959–966
- Yin ZP, Liu XM, Shang ZW, Ren J, Song XC (2011). Response of photosynthesis and chlorophyll II fluorescence parameters to different drought stress in *Cerasus humilis* Bunge. *Plant Physiol J*, 47 (5): 452–458 (in Chinese with English abstract) [尹贇鹏, 刘雪梅, 商志伟, 任静, 宋兴舜(2011). 不同干旱胁迫下欧李光合及叶绿素荧光参数的响应. *植物生理学报*, 47 (5): 452–458]
- You JJ, Ma JB, Wang JR, Yao YA (2011). Chlorophyll fluorescence characteristics of *Arabidopsis* mutant *npq4*, *vtc2*, *ndr1* under UV-B radiation. *J Mount Agric Biol*, 30 (3): 203–210 (in Chinese with English abstract) [游晶晶, 马金彪, 王君汝, 姚银安(2011). UV-B 辐照下拟南芥突变体 $npq4$ 、 $vtc2$ 、 $ndr1$ 叶绿素荧光特性研究. *山地农业生物学报*, 30 (3): 203–210]
- Yuan W, Wan HJ, Yang YJ (2012). Characterization and selection of reference genes for real-time quantitative RT-PCR of plants. *Chin Bull Bot*, 47 (4): 427–436 (in Chinese with English abstract) [袁伟, 万红建, 杨悦俭(2012). 植物实时荧光定量PCR内参基因的特点及选择. *植物学报*, 47 (4): 427–436]
- Zha Q, Xi XJ, Jiang AL, Tian YH, Huang J (2016). Effects of heat stress on chlorophyll fluorescence characteristics and anti-oxidant activity in grapevines (*Vitis vinifera* L. cv. Xiahei). *Plant Physiol J*, 52 (4): 525–532 (in Chinese with English abstract) [查倩, 奚晓军, 蒋爱丽, 田益华, 黄健(2016). 高温胁迫对葡萄幼树叶叶绿素荧光特性和抗氧化酶活性的影响. *植物生理学报*, 52 (4): 525–532]
- Zhang YS, Huang X, Chen YF (2009). *Plant Physiological Experiments Tutorial*. Beijing: Higher Education Press, 133–135 (in Chinese) [张以顺, 黄霞, 陈云凤(2009). *植物生理学实验教程*. 北京: 高等教育出版社, 133–135]
- Zhao LY, Deng XP, Shan L (2005). Effects of osmotic stress on chlorophyll fluorescence parameters of wheat seedling. *Chin J Appl Ecol*, 16 (7): 1261–1264 (in Chinese with English abstract) [赵丽英, 邓西平, 山仑(2005). 渗透胁迫对小麦幼苗叶绿素荧光参数的影响. *应用生态学报*, 16 (7): 1261–1264]
- Zheng CF, Chen JN, Qiu JB, Liu WC, Zhang CN, Peng X (2016). Effect of uniconazole on photosynthesis and antioxidant system in *Kandelia obovata* seedlings under low temperature stress. *Plant Physiol J*, 52 (1): 109–116 (in Chinese with English abstract) [郑春芳, 陈继浓, 仇建标, 刘伟成, 张呈念, 彭欣(2016). 烯效唑对低温胁迫下秋茄幼苗光合作用与抗氧化系统的影响. *植物生理学报*, 52 (1): 109–116]

Effects of cold acclimation on chlorophyll fluorescence characteristics and antioxidant enzyme activity in winter wheat

WANG Xiu-Tian, LU Qiu-Wei, CANG Jing*, BAO Yu-Zhuo, MENG De-Yi, YU Jing, XU Qing-Hua, ZHAO Hu, LI Xiang, XIANG Zhi-Ye, XIE Bo

School of Life Sciences, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China

Abstract: To explore the different photosynthetic characteristics of winter wheat in different growth and development period, two winter wheat cultivars freeze-tolerant ‘Dongnongdongmai 1’ (‘DN1’) and freeze-sensitive ‘Jimai 22’ (‘JM22’) were used in this study. Chlorophyll fluorescence parameters, chlorophyll content, MDA content, antioxidant enzyme activity were analyzed at the beginning of three-true leaf period under natural growth condition and low temperature indoors. Gene expression analysis of encoding related proteins of photosystem II in nature condition also was measured. The results are as follows: in natural conditions, ‘DN1’ adapt to temperature changes in chlorophyll fluorescence characteristics by a significant increase in NPQ, higher pigment content and antioxidant enzyme activity and lower MDA content; but ‘JM22’ was insensitive to temperature and chlorophyll fluorescence indicators is still relatively constant. Under low temperature indoors, ‘DN1’ have similar performance to natural conditions and in 4°C/0°C (day/night) acclimation is more effective. qPCR results show: chlorophyll a/b-binding protein gene (*TaCP3*, *TaCP5*) have a higher expression of two wheat in each period, and corresponding changes of pigments; *TaNpq4* involved in photochemical quenching have maintained a relatively high expression levels with the corresponding of higher NPQ in ‘DN1’. In summary it shows that ‘DN1’ can earlier feel the temperature decrease and maintain the stability of the photosynthetic system, then adapt to lower temperature stress of the late.

Key words: winter wheat; chlorophyll fluorescence; antioxidant enzyme activity; chlorophyll binding protein gene

Received 2016-09-06 Accepted 2016-10-27

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 31471423), the National Natural Science Fund Research and Training Projects (Grant No. J1210069), and Natural Science Foundation of Heilongjiang Province of China (Grant No. C201408).

*Corresponding author (E-mail: cangjing2003@163.com).