小麦苗期叶片膜脂组成对低氮胁迫的响应及其与耐低氮的关系

齐凌云[1,3], 殷俐娜[1,2,3,*], 张梅娟[2,3,4], 曹蓓蓓[1,3], 王仕稳[1,2,3], 邓西平[2,3]

[1]西北农林科技大学资源环境学院, 陕西杨陵712100; [2]中国科学院水利部水土保持研究所, 黄土高原土壤侵蚀与旱地农业国家重点实验室, 陕西杨陵712100; 西北农林科技大学[3]水土保持研究所, [4]生命科学学院, 陕西杨陵712100

摘要: 本研究以‘濮麦9号’和‘宁麦14号’为试验材料, 探究低氮胁迫对小麦(*Triticum aestivum*)苗期中下部叶片膜脂组成的影响。结果表明低氮处理后‘濮麦9号’生物量下降幅度明显低于‘宁麦14号’, 胁迫后‘濮麦9号’的叶绿素含量、光系统II (PSII)最大光化学效率和光合速率都显著高于‘宁麦14号’。低氮胁迫下, 两个小麦品种叶片中的单半乳糖甘油二酯(monogalactosyldiacylglycerol, MGDG)、双半乳糖甘油二酯(digalactosyldiacylglycerol, DGDG)及总脂含量都显著降低, 但‘濮麦9号’叶片中的总脂、DGDG含量、DGDG/MGDG比值以及MGDG、磷脂(phospholipid, PL)和总脂的不饱和脂肪酸双键指数(DBI)都显著高于‘宁麦14号’。由此可见, 低氮胁迫后小麦叶片膜脂组分及含量的不同变化可能是这两个小麦品种对低氮胁迫响应不同的重要原因之一。

关键词: 小麦; 苗期; 低氮胁迫; 耐低氮能力; 膜脂

小麦(*Triticum aestivum*)是世界上总产量最高的两种作物之一, 同时也是中国最重要的粮食作物之一, 小麦的产量直接关系到国家粮食的安全和社会的稳定。但是, 小麦在生长中经常遭受多种非生物胁迫, 比如干旱胁迫、盐碱胁迫、养分胁迫等, 这些逆境胁迫严重影响小麦的正常生长发育, 进而导致产量的下降。氮素是植物从土壤中吸收最多的大量元素, 也是植物生长发育所必需的大量元素之一, 约占植物干重的1.5%~2.0%, 它在很多方面影响着植物的生长和发育, 参与植物体内蛋白质、氨基酸、核酸、叶绿素、糖类、脂类等物质的合成(陆景陵2003)。徐红卫等(2014)通过对5个不同基因型小麦品种在低氮胁迫下的研究表明, 低氮胁迫导致小麦苗期叶片干重减少。氮素缺乏会影响植物的氮代谢和碳代谢, 还影响植物体内氨基酸和蛋白质的丰度(Wang等2003)。此外, 缺氮还会影响植物叶片中叶绿素含量以及叶绿体中类囊体的数量(García-Ferris等1996)。吴言等(2014)研究表明缺氮影响了水稻(*Oryza sativa*)叶片中叶绿素合成, 从而导致水稻叶片净光合速率下降, 干物质积累减少。李强等(2015)研究表明耐低氮能力强的玉米(*Zea mays*)品种缓解低氮胁迫对植株光合系统的影响, 维持较高光系统II (photosystem II, PSII)有效光量子产量和叶绿素含量, 从而保证了耐低氮能力强的品种在低氮环境下保持较高的干物质产量。

植物叶片中75%的氮素存在于叶绿体中, 它不仅对植物光合作用和碳同化具有重要作用, 而且也会影响植物叶绿体膜脂的组成和组分含量(Evans 1989; Wang等2003)。叶绿体膜由内外被膜两层薄膜构成, 是叶绿体和外界环境接触的屏障, 其完整性和流动性会影响植物的生长发育(庞士铨等1990)。逆境胁迫会破坏叶绿体膜的完整性及流动性, 进而使整个叶绿体丧失基本功能(Zhao等2011)。在植物的长期进化过程中, 通过改变膜脂的组分来适应环境是植物适应逆境胁迫的一条重要途径(Harwood 1996)。有研究发现提高烟草(*Nicotiana tabacum*)叶片中半乳糖脂的含量可以维持膜结构的稳定和功能, 进而有效提高烟草在逆境胁迫下的耐受能力, 如盐胁迫、低磷胁迫和铝毒害(Wang等2014; 史中惠等 2013; Zhang等2016)。王鑫月等(2016)发现铝胁迫下水稻膜脂含量和脂肪酸组分的变化可能是铝毒害抑制水稻生长的重要原因之一。Zheng等(2011)发现植物可以通过膜脂质的重塑以及调整脂肪酸的不饱和度水平来适应频繁的温度变化。因此, 维持膜脂含量和成分的稳定是提高植物逆境胁迫能力的重要途径之一。

在植物中, 半乳糖脂约占到叶片中总膜脂的75%, 其中单半乳糖甘油二酯(monogalactosyldiacylglycerol, MGDG)在类囊体膜脂中约占50%, 双

收稿 2016-11-14 修定 2017-03-27

资助 国家自然科学基金(31200206)、中国科学院西部之光项目和陕西省科技新星(2016KJXX-66)。

* 通讯作者(E-mail: linayin@nwsuaf.edu.cn)。

半乳糖甘油二酯(digalactosyldiacylglycerol, DGDG)约占25% (Block等1983)。高等植物的类囊体膜除了含有半乳糖脂, 还含有硫代异鼠李糖甘油二酯(sulfoquinovosyldiacylglycerol, SQDG)以及磷脂酰甘油二酯(phosphatidylglycerol, PG), 各占5%~12%, 其中MGDG和DGDG的含量以及DGDG/MGDG的比例会影响生物膜的结构和功能(Block等1983)。缺氮胁迫影响MGDG和DGDG的合成。Gaude等(2007)研究发现, 在缺氮条件下拟南芥叶绿体中的MGDG含量减少的同时伴随着DGDG含量增加, 还发现DGDG合成基因*DGD1*及*DGD2*表达量升高, DGDG/MGDG的比值增加。李娟等(2009)通过测定不同氮浓度水平青花菜(*Brassica oleracea* var. *italica*)叶片中膜脂含量以及脂肪酸组成, 发现随着氮浓度由5 mmol·L^{-1}升至20 mmol·L^{-1}, MGDG的相对含量升高, 同时MGDG中不饱和脂肪酸比例显著升高, 说明适当增加氮营养水平可增加叶片中MGDG的含量和饱和度。以上研究表明, 膜脂含量和脂肪酸组分的变化对植物适应氮胁迫发挥着重要的作用。

缺氮会影响植物膜脂含量和组分的变化, 但是不同品种植物的耐低氮能力和其膜脂合成能力是否有关还不清楚。因此本研究以耐低氮性不同的两个小麦品种为试验材料, 研究低氮胁迫对苗期中下部成熟叶片的光合特性以及膜脂含量和组分的影响。探讨不同小麦品种耐低氮能力是否与它在低氮环境下保持膜脂含量和组分稳定的能力有关, 从而为提高小麦的耐低氮能力和作物育种提供理论依据。

材料与方法

1 材料及试验处理

本研究以小麦(*Triticum aestivum* L.)品种‘宁麦14号’(‘Ningmai 14’, NM14)和‘濮麦9号’(‘Pumai 9’, PM9)为试验材料。选取籽粒饱满的小麦种子用1%次氯酸钠处理20 min, 对种子表面进行消毒, 用蒸馏水洗净后播种在蛭石中28°C萌发7 d, 选择长势相当的幼苗移到泡沫板上采用水培方法进行培养。全营养液配方(1倍)如下: 磷(1 mmol·L^{-1} KH_2PO_4)、钾(4 mmol·L^{-1} KCl)、镁(2 mmol·L^{-1} $MgSO_4·7H_2O$)、钙(4 mmol·L^{-1} $CaCl_2$)、氮(14 mmol·L^{-1} KNO_3, 1 mmol·L^{-1} NH_4Cl), 微量元素配方同Hoagland营养液, pH为5.6~5.8, 在本研究的小麦培养过程中所用的是全营养液配方的1/2。将长势一致的幼苗分成两部分, 一部分植株移入含KNO_3 (硝态氮浓度为7.0 mmol·L^{-1})和NH_4Cl (铵态氮浓度为0.5 mmol·L^{-1})的总氮浓度为7.5 mmol·L^{-1}的足氮营养液(HN)中, 另一部分植株移入含KNO_3 (硝态氮浓度为0.7 mmol·L^{-1})和NH_4Cl (铵态氮浓度为0.05 mmol·L^{-1})的总氮浓度为0.75 mmol·L^{-1}的低氮营养液(LN)中, LN中其他养分浓度同HN。实验过程中, 每个品种的每个处理设置4个重复, 每个培养盆中移入16株小麦幼苗, 营养液体积为5 L, 2 d换一次营养液, 全天通气, 培养1个月后进行采样。本实验在人工气候室内完成, 光照强度为500 μmol·m^{-2}·s^{-1}, 光照和黑暗时间分别为14和10 h, 早上7:00开灯, 晚上21:00关灯, 昼/夜温度为23°C/15°C, 相对湿度为45%~55%。

2 方法

2.1 生物量

参考高俊凤(2006)的方法, 将在不同氮浓度营养液中培养1个月的幼苗植株放入烘箱105°C杀青30 min后80°C烘干至恒重。每个处理分别测定16株。

2.2 叶绿素含量

参考高俊凤(2006)的方法, 取培养一个月的小麦幼苗中下部叶片(即从下往上数的第3片), 将叶片剪碎称取0.2 g测定叶绿素, 每个处理分别测定4个重复, 采用80%丙酮溶液浸提比色法测定。

2.3 光合参数的测定

使用Li6400 (Li-Cor公司, USA)便携式光合仪于采样前1 d照光后第2小时开始测定。LED光量子设为500 μmol·m^{-2}·s^{-1}, 外界二氧化碳浓度为440 μmol (CO_2)·mol^{-1}, 气流速度设为500 mmol·s^{-1}, 每个处理每次测定5个重复。

2.4 PSII最大光化学效率

采用Imaging-PAM (Walz, Effeltrich, Germany)荧光仪测定叶绿素荧光动力学参数。小麦中下部叶片暗适应30 min后测定叶片PSII最大光化学效率(F_v/F_m)。每个处理测定5个重复。

2.5 总氮测定

凯氏定氮法测定小麦中下部叶片中的总氮含量, 每个处理测定3个重复。

2.6 叶片膜脂的提取、分离及脂肪酸的测定

取培养1个月的小麦中下部叶片, 将叶片剪碎取0.3 g, 用于叶片膜脂的提取, 每个处理测定3个重复。叶片膜脂的提取参考Bligh和Dyer (1959)以及Wewer等(2013)的方法, 将提取的膜脂用300 μL氯仿溶解, 保存于−40°C。膜脂的分离参考Wang和Benning (2011)的薄层色谱(thin-layer chromatography, TLC)方法, TLC可以将磷脂和半乳糖脂分离出来。用0.15 mol·L^{-1} $(NH_4)_2SO_4$溶液活化Merck硅胶板, 使用的展开液为丙酮/甲苯/水(91:30:7.5, *V*/*V*/*V*), TLC法分离膜脂后, 用碘蒸气对晾干的展开后的硅胶板染色来确定各类膜脂的位置, 为了防止膜脂被碘蒸气氧化, 点样过程中专门设置一个点用来染色以确定各类膜脂的位置, 样品不染色。用小刀将确定好的膜脂位置的硅胶刮下来, 用漏斗将这些粉末装入含螺塞的玻璃管中, 向玻璃管中先加入1mL 1 mol·L^{-1}的HCl (用无水甲醇配制), 再加入100 μL 100 mg·L^{-1}十五烷酸(C15:0)作为内参, 在一个新管中加入只含有十五烷酸和甲醇化的HCl作为对照, 用塞子封紧玻璃管。将玻璃管在80°C水浴25 min (玻璃管需密封好, 防止液体的蒸发)。取出玻璃管, 晾至室温, 加入1 mL 0.9% NaCl, 再加入1 mL正己烷, 涡旋振荡, 1 000×*g*离心3 min。在通风橱中, 用吸管吸出含有样品的上层己烷层。用氮吹仪使用缓慢的N_2气流来蒸发正己烷, 不完全干燥即可。N_2吹干后的提取物用60 μL正己烷溶解, 用气相色谱法测定膜脂成分及含量, 进样量为2 μL。气相色谱仪型号为岛津GC2014C, 色谱柱为InertCap WAX (No. 1010-67162), 柱长60.0 m, 薄膜厚度0.25 μm, 内径0.25 mm。色谱柱温度为140.0°C, 气化室温度为250°C, 柱温箱温度程序设置为梯度温度(140~160°C, 25°C·min^{-1}; 160~240°C, 8°C·min^{-1}), 压力为176.2 kPa, 总流量为24.0 mL·min^{-1}, 色谱柱流量为1.00 mL·min^{-1}, 线速为23.6 cm·s^{-1}, 吹扫流量为3.0 mL·min^{-1}, 分流比为20.0:1。根据标准脂肪酸样品的保留时间确定测定样品中脂肪酸种类, 然后利用峰面积计算样品脂肪酸含量, 进而换算得到各膜脂的含量。

2.7 不饱和脂肪酸双键指数

不饱和脂肪酸双键指数(double bond index, DBI)的计算根据Rawyler等(1999)的方法, DBI=$\sum(n\times p)$, *n*指每个脂肪酸分子的双键数, *p*为各脂肪酸物质的量的百分比, 即DBI=$0\times p_{16:0}+1\times p_{16:1}+2\times p_{16:2}+3\times p_{16:3}+0\times p_{18:0}+1\times p_{18:1}+2\times p_{18:2}+3\times p_{18:3}$。

3 数据处理

采用SPSS 19.0软件进行数据统计分析, 用Tukey HSD检验法进行单因素方差分析, 显著性水平为$P<0.05$。Excel 2010制图。

实验结果

1 低氮胁迫对‘宁麦14号’和‘濮麦9号’生物量的影响

生物量是衡量植物对逆境胁迫耐受性的一个重要指标。如图1所示, 在正常条件下‘濮麦9号’的总生物量显著低于‘宁麦14号’; 低氮处理后, ‘宁麦14号’和‘濮麦9号’的总生物量分别下降了29.4%和24.1% (显著差异); 同时分别以正常条件下‘濮麦9号’和‘宁麦14号’的生物量为100%, 比较低氮胁迫下两个小麦品种生物量的下降程度, ‘宁麦14号’和‘濮麦9号’分别下降了29.4%和24.1% (显著差异), 用*t*检验法进行独立样本方差分析, 结果显示, ‘宁麦14号’的生物量下降程度显著高于‘濮麦9号’。因此, 这些结果说明‘濮麦9号’的耐低氮能力高于‘宁麦14号’。

2 低氮胁迫对‘宁麦14号’和‘濮麦9号’叶绿素含量的影响

如图2-A所示, 在正常条件下, ‘宁麦14号’和

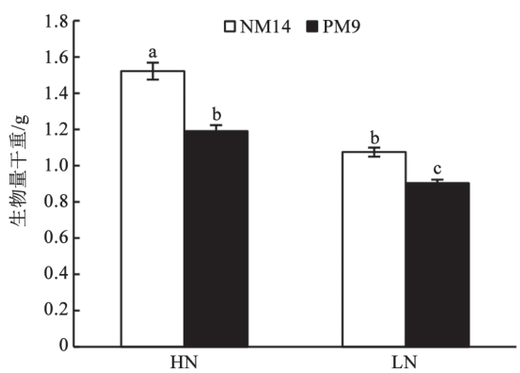

图1 低氮胁迫对‘宁麦14号’和‘濮麦9号’生物量的影响

Fig.1 Effect of nitrogen starvation on biomass of ‘Ningmai 14’ and ‘Pumai 9’ plants

图中数据表示为$\bar{x}$±SD, *n*=16。各柱形上用不同小写字母标识表示数据间差异显著($P<0.05$), 图1~5、7~9同; NM14: ‘宁麦14号’; PM9: ‘濮麦9号’; 下同。

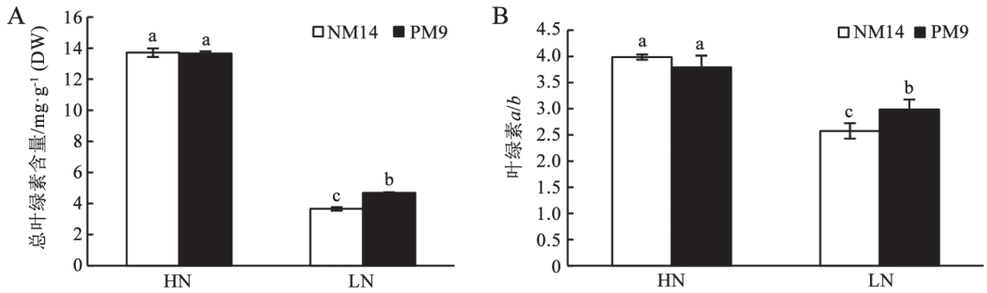

图2 低氮胁迫对‘宁麦14号’和‘濮麦9号’叶片叶绿素含量的影响

Fig.2 Effect of nitrogen starvation on chlorophyll contents of ‘Ningmai 14’ and ‘Pumai 9’ plants

A: 总叶绿素含量; B: 叶绿素*a*含量/叶绿素*b*含量。

‘濮麦9号’两个小麦品种的叶绿素含量没有显著差异。低氮胁迫后小麦叶片的叶绿素含量都有不同程度的下降, ‘宁麦14号’和‘濮麦9号’分别下降了73.3%和65.7%, ‘濮麦9号’的叶绿素含量显著高于‘宁麦14号’ (显著差异); 由图2-B可知正常条件下两个小麦品种的叶绿素*a*/*b*没有差异, 低氮胁迫后‘濮麦9号’的叶绿素*a*/*b*显著高于‘宁麦14号’。

3 低氮胁迫对‘宁麦14号’和‘濮麦9号’叶片光合参数和F_v/F_m的影响

如图3-A所示, 在正常条件下, ‘濮麦9号’的净光合速率显著低于‘宁麦14号’; 低氮胁迫下两个品种的叶片净光合速率出现了不同程度的下降, ‘宁麦14号’下降了63.6% (显著差异), ‘濮麦9号’下降了5.9% (显著差异)。低氮胁迫下, ‘濮麦9号’的净光合速率是‘宁麦14号’的2.19倍。如图3-B所示, 正常条件下, ‘濮麦9号’的气孔导度(G_s)显著高于‘宁麦14号’; 低氮胁迫后两个品种的叶片气孔导度出现了不同程度的下降, ‘宁麦14号’下降了75.9% (显著差异), ‘濮麦9号’下降了30.4% (显著差异)。低氮胁迫下, ‘濮麦9号’的气孔导度是‘宁麦14号’的3.45

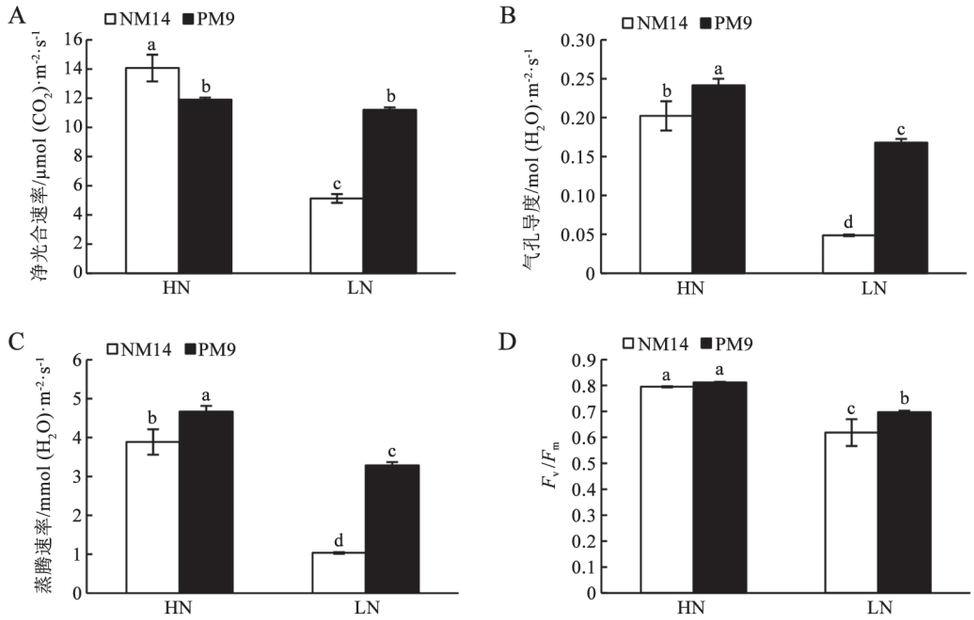

图3 低氮胁迫对‘宁麦14号’和‘濮麦9号’叶片光合参数和F_v/F_m的影响

Fig.3 Effect of nitrogen starvation on photosynthetic parameters and F_v/F_m of ‘Ningmai 14’ and ‘Pumai 9’ plants

图中数据表示为$\bar{x}$±SD, n=5。A: 净光合速率; B: G_s; C: T_r; D: F_v/F_m。

倍。如图3-C所示, 正常条件下, ‘濮麦9号’的蒸腾速率(T_r)显著高于‘宁麦14号’; 低氮胁迫后, ‘宁麦14号’和‘濮麦9号’的蒸腾速率分别下降了73.4%和29.6% (显著差异)。低氮胁迫后, ‘濮麦9号’的蒸腾速率是‘宁麦14号’的3.18倍。如图3-D所示, 在正常条件下, 两个品种小麦叶片的F_v/F_m在0.78~0.81之间, 未达到差异显著性水平; 在低氮胁迫下, 两个小麦品种叶片的F_v/F_m都出现不同程度的下降, 其中‘宁麦14号’和‘濮麦9号’分别下降了22.2%和14.1% (显著差异), ‘濮麦9号’的F_v/F_m显著高于‘宁麦14号’。以上结果表明, 在低氮环境下‘濮麦9号’能维持相对较高的净光合速率和F_v/F_m。

4 低氮胁迫对‘宁麦14号’和‘濮麦9号’叶片总氮含量和总叶绿素/氮的影响

由图4-A所知, 正常条件下, ‘濮麦9号’中下部叶片的总氮含量低于‘宁麦14号’; 低氮处理后, ‘宁麦14号’和‘濮麦9号’叶片中的总氮含量分别下降了61.7%和49.6% (显著差异), ‘濮麦9号’叶片中的总氮含量显著高于‘宁麦14号’; 由图4-B所示, 正常条件下‘濮麦9号’叶片中的总叶绿素与氮含量的比值高于‘宁麦14号’; 胁迫后, ‘濮麦9号’和‘宁麦14号’叶片中的这一比值未达到差异显著性水平。

5 低氮胁迫对‘宁麦14号’和‘濮麦9号’叶片膜脂含量和组分的影响

为了说明低氮胁迫是否对小麦叶片的半乳糖脂和磷脂的合成有影响, 我们对叶绿体膜中重要的半乳糖脂(MGDG、DGDG)和磷脂(SQDG+PL)的含量和组分进行了测定及分析。如图5所示, 正常条件下, ‘宁麦14号’和‘濮麦9号’小麦叶片中的MGDG含量没有差异, ‘濮麦9号’小麦叶片中

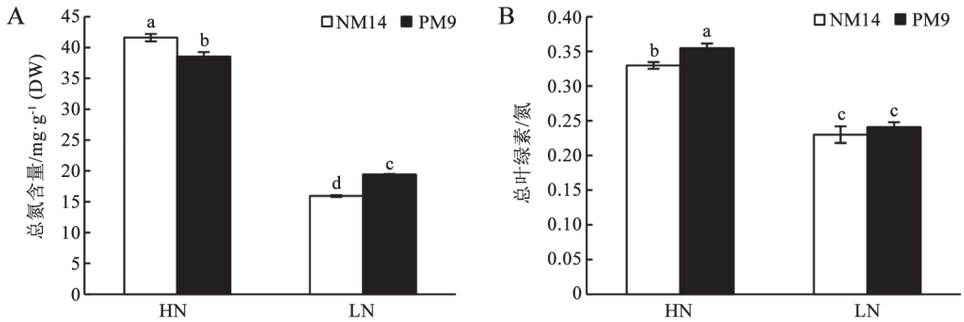

图4 低氮胁迫对‘宁麦14号’和‘濮麦9号’叶片总氮含量和总叶绿素/氮的影响

Fig.4 Effect of nitrogen starvation on total nitrogen content and the ratio of total chlorophyll content to nitrogen content in leaves of ‘Ningmai 14’ and ‘Pumai 9’ plants

图中数据表示为$\bar{x}$±SD, n=3; 图5同。A: 总氮含量; B: 总叶绿素/氮。

DGDG和总脂含量显著高于‘宁麦14号’, ‘濮麦9号’小麦叶片中SQDG+PL含量显著低于‘宁麦14号’; 低氮处理后‘宁麦14号’小麦叶片中的MGDG、DGDG以及SQDG+PL的含量都显著下降, 分别下降了47.1%、26.7%和18.5% (显著差异); ‘濮麦9号’叶片中的MGDG和DGDG的含量分别下降了46.6%和35.9% (显著差异), SQDG+PL的含量反而略微升高; 低氮胁迫后两个小麦品种叶片中的MGDG和SQDG+PL含量没有明显差异, ‘濮麦9号’叶片中的DGDG及总脂含量均显著高于‘宁麦14号’。

对小麦叶片中的半乳糖脂和磷脂的脂肪酸组分分析发现, 其半乳糖脂的主要组成成分是不饱和脂肪酸C18:3。与正常条件下相比, 低氮胁迫后, 小麦叶片中的MGDG、DGDG以及SQDG+PL的不饱和脂肪酸(以C18:2和C18:3为主)含量都有所下降, 而饱和脂肪酸(以C16:0和C18:0为主)含量都有所上升(图6)。

DBI可以反映细胞膜的流动性和通透性。如图7所示, 正常条件下, ‘宁麦14号’和‘濮麦9号’叶片中总脂的DBI无差异, ‘濮麦9号’叶片中DGDG和SQDG+PL的DBI明显低于‘宁麦14号’, ‘濮麦9号’叶片中MGDG的DBI显著高于‘宁麦14号’; 低氮处理后, ‘濮麦9号’叶片中SQDG+PL的DBI升高, 但其MGDG以及总脂的DBI都呈现下降的趋势, DGDG

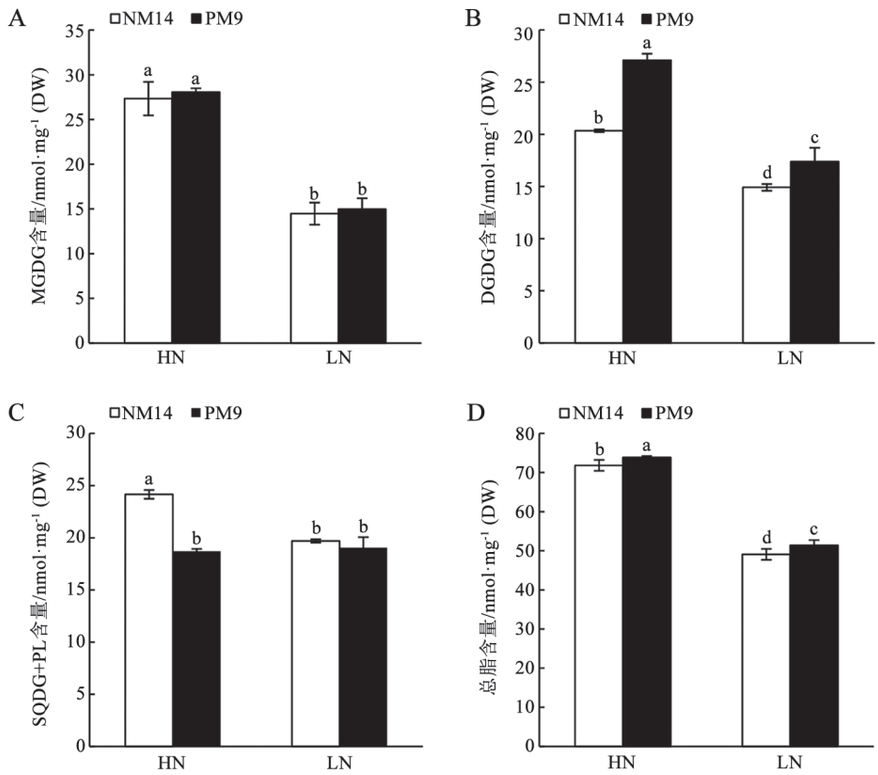

图5 低氮胁迫对‘宁麦14号’和‘濮麦9号’叶片膜脂含量和总脂含量的影响

Fig.5 Effect of nitrogen starvation on the contents of galactolipids, phospholipids and total lipid in leaves of ‘Ningmai 14’ and ‘Pumai 9’ plants

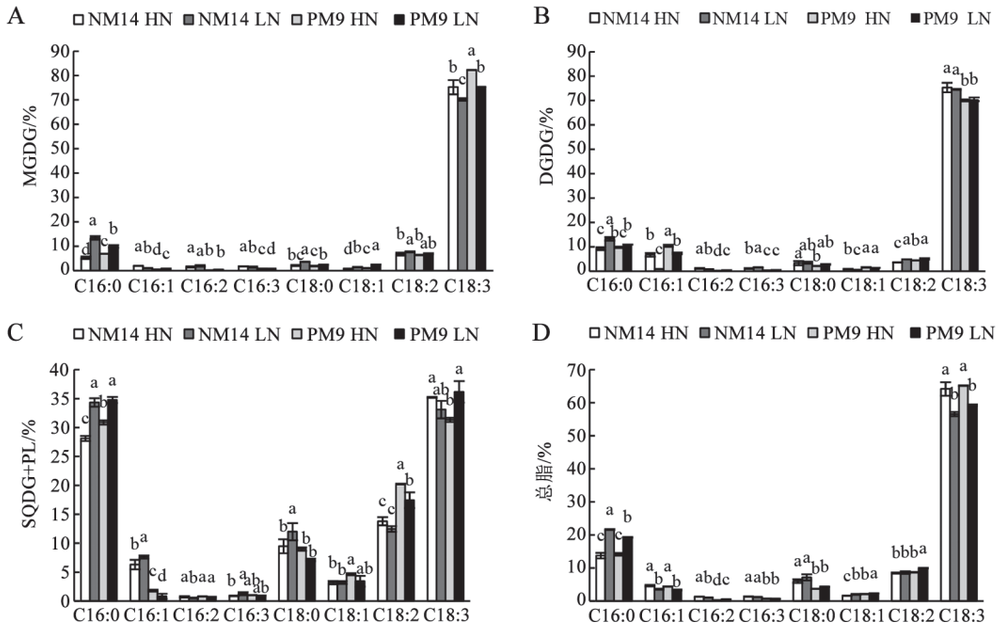

图6 低氮胁迫对‘宁麦14号’和‘濮麦9号’叶片主要膜脂的脂肪酸组成成分的影响

Fig.6 Effect of nitrogen starvation on fatty acid composition in main lipids class in leaves of ‘Ningmai 14’ and ‘Pumai 9’ plants

图中数据为物质的量的百分比, 图7同。同一脂肪酸组分用不同小写字母标识表示数据间差异显著(P<0.05)。

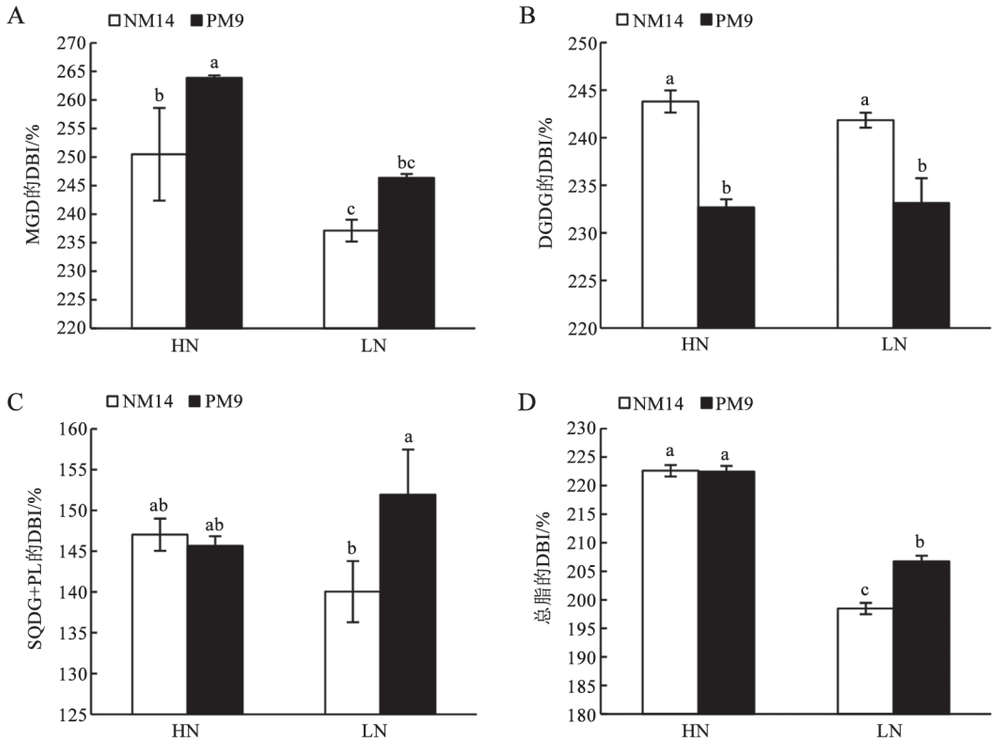

图7 低氮胁迫对‘宁麦14号’和‘濮麦9号’叶片半乳糖脂、磷脂和总脂的DBI的影响

Fig.7 Effect of nitrogen starvation on DBI of galactolipids, phospholipids and total lipid in leaves of ‘Ningmai 14’ and ‘Pumai 9’ plants

的DBI变化不大, ‘宁麦14号’叶片中的MGDG、DGDG、SQDG+PL以及总脂的DBI均呈现下降的趋势。从图7中也可以看到, 低氮胁迫下, ‘濮麦9号’叶片中DGDG的DBI显著低于‘宁麦14号’, 相反地, ‘濮麦9号’叶片中MGDG和SQDG+PL以及总脂的DBI都显著高于‘宁麦14号’。

在正常条件下, ‘濮麦9号’的DGDG/MGDG的比值显著高于‘宁麦14号’; 低氮胁迫后, ‘濮麦9号’和‘宁麦14号’的DGDG/MGDG的比值分别上升了20.0%和38.1% (显著差异), 但是‘濮麦9号’的DGDG/MGDG的比值显著高于‘宁麦14号’ (图8)。本研究中, 在正常条件下, ‘宁麦14号’与‘濮麦9号’的MGDG/叶绿素没有差异, ‘濮麦9号’的DGDG/叶绿素和总脂/叶绿素显著高于‘宁麦14号’, ‘濮麦9号’的(SQDG+PL)/叶绿素显著低于‘宁麦14号’; 低氮处理后, 两个品种的MGDG/叶绿素、DGDG/叶绿素、(SQDG+PL)/叶绿素以及总脂/叶绿素都显著升高, ‘濮麦9号’的这4个比值都显著低于‘宁麦14号’ (图9)。

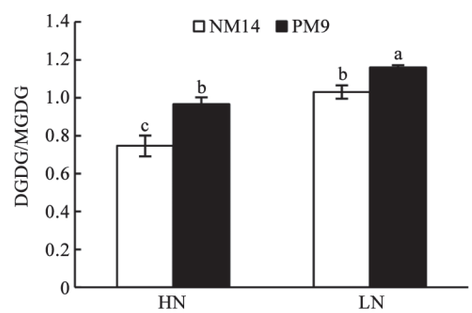

图8 低氮胁迫对‘宁麦14号’和‘濮麦9号’叶片DGDG/MGDG的影响

Fig.8 Effect of nitrogen starvation on the ratio of DGDG to MGDG in leaves of ‘Ningmai 14’ and ‘Pumai 9’ plants

讨 论

氮素是植物生长发育所需的大量元素之一, 缺氮会引起植物体内一系列的生理生化反应。Zhao等(2005)对高粱进行低氮处理后发现其叶片中的叶绿素含量及光合效率显著下降, 并且导致生物量降低。在本研究中, 低氮胁迫后, ‘宁麦14

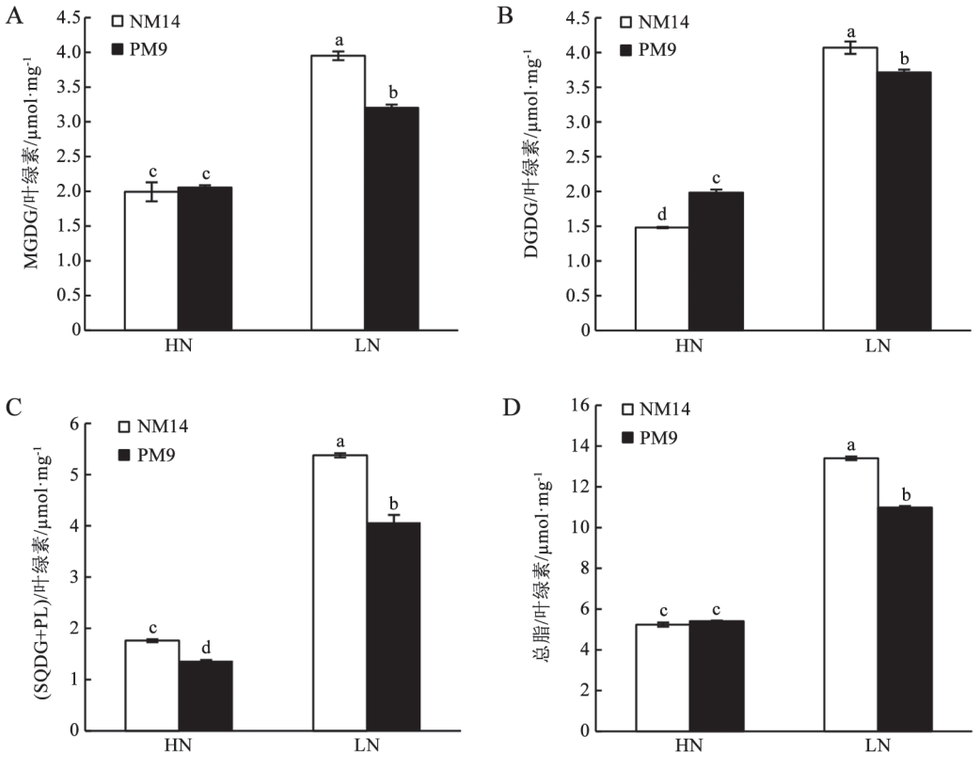

图9 低氮处理后‘宁麦14号’和‘濮麦9号’叶片中膜脂与叶绿素的比值

Fig.9 Effect of nitrogen starvation on the ratio of lipid to chlorophyll in leaves of ‘Ningmai 14’ and ‘Pumai 9’ plants

号’和‘濮麦9号’两个品种的生物量均显著下降, 并且‘濮麦9号’生物量的降幅低于‘宁麦14号’。叶片是植物进行光合作用的场所, 在植物生长发育过程中起着重要的作用。叶绿素是光合作用过程中将光能转变为化学能的关键色素, 其含量的高低是表征叶片光合性能的重要生理指标。植物缺氮会导致叶绿素合成受到影响(陆景陵2003)。本实验结果表明, 在正常条件下, ‘宁麦14号’和‘濮麦9号’叶片的叶绿素含量和F_v/F_m均未达到差异显著性水平。低氮胁迫下, 两个小麦品种的叶绿素、净光合能力、气孔导度、蒸腾速率和F_v/F_m都呈现下降趋势, 但‘濮麦9号’叶片的这些指标的值均显著高于‘宁麦14号’。安久海等(2014)研究发现, 在低氮胁迫下氮高效水稻品种具有较高的叶绿素含量和净光合能力, 这与本研究一致。表明‘濮麦9号’光合同化能力较强, 这也可能是‘濮麦9号’比‘宁麦14号’更能适应低氮环境的重要原因之一。

糖脂和磷脂是叶绿体膜的重要组成部分, 低氮胁迫会导致磷脂和糖脂含量发生变化(Gaude等2007; 李娟等2009)。本研究结果表明, 无论是在正常条件下还是在低氮胁迫下, ‘宁麦14号’和‘濮麦9号’叶片中的MGDG含量均没有达到差异显著性水平; 低氮胁迫后‘濮麦9号’叶片中的DGDG含量显著高于‘宁麦14号’, 但两个小麦品种叶片中总叶绿素与氮含量的比值没有达到显著性差异水平, 说明低氮胁迫下叶片中氮含量不是导致这两个品种叶片膜脂组成差异的原因。Narasimhan等(2013)发现缺氮后大豆叶片中的MGDG和DGDG含量下降。Haferkamp和Kirchhoff (2008)以及Kirchhoff等(2013)研究表明膜脂与叶绿素的比值是表征类囊体中组装蛋白密度的指标, 而且膜脂与叶绿素的比值越高表明组装蛋白密度越低。Gaude等(2007)研究表明, 在低氮胁迫下, 拟南芥的MGDG/叶绿素和DGDG/叶绿素均显著增加, 表明在逆境胁迫下类囊体中组装蛋白密度有下降的趋势。低氮胁迫后‘宁麦14号’和‘濮麦9号’的MGDG/叶绿素、DGDG/叶绿素、(SQDG+PL)/叶绿素以及总脂/叶绿素的值显著升高, 说明低氮胁迫后‘濮麦9号’和‘宁麦14号’的类囊

体中组装蛋白密度有下降趋势; ‘濮麦9号’的膜脂/叶绿素的比值显著低于‘宁麦14号’, 表明‘濮麦9号’的类囊体中组装蛋白密度显著高于‘宁麦14号’。这些结果均表明‘濮麦9号’的耐低氮能力比‘宁麦14号’强的原因可能是具有较高的半乳糖脂含量和类囊体组装蛋白密度。

双分子层膜脂DGDG和非分子双层膜脂MGDG的平衡会影响类囊体膜的稳定性(Williams 1998; Shimojima和Ohta 2011)。MGDG和DGDG可以相互转换(Harwood 1998)。有研究表明DGDG/MGDG的比值在维持光合器官结构和功能方面起着关键作用(Dörmann和Benning 2002)。在逆境胁迫条件下, 含有相对较高水平的双分子层膜脂可以促进细胞膜结构的稳定性。在本研究中, 低氮处理后两个品种的DGDG/MGDG均增加。有研究表明, 缺氮后大豆叶片中的DGDG/MGDG的比值增加(Narasimhan等2013)。在其他逆境胁迫(如干旱胁迫和高温胁迫)下, 植物会调整DGDG/MGDG的比值。有研究表明植物通过增加DGDG/MGDG的比值来维持膜的物理状态和膜蛋白的正常功能间的平衡, 从而提高植物的抗旱性(Torres-Franklin等2007)。DGDG的相对含量、DGDG/MGDG的比值或DGDG的相对含量和DGDG/MGDG比值在其他必须的细胞过程中起着关键作用, 比如蛋白质的折叠、插入以及叶绿体内胞内蛋白质的转运(Bruce 1998; Chen等2006)。相反地, 在高温胁迫下, 减少DGDG和DGDG/MGDG比值阻止叶绿素积累并降低植物的耐热性(Chen等2006)。DGDG/MGDG会影响叶绿体膜的通透性以及膜双分子层的稳定性。Gaude等(2007)研究表明, 拟南芥在缺氮条件下*MGD1*、*MGD2*和*MGD3*的表达不受影响, 但影响*DGD1*以及*DGD2*的表达, 因此MGDG的合成并不受缺氮的影响, MGDG的降低是因为原本存在的MGDG转变成了DGDG, 从而导致MGDG降低以及DGDG的升高, 即缺氮促进了MGDG向DGDG的转化。在本研究中, 低氮胁迫下‘濮麦9号’的DGDG/MGDG的比值显著高于‘宁麦14号’, 且‘濮麦9号’和‘宁麦14号’的MGDG含量没有达到显著性差异水平, ‘濮麦9号’的DGDG含量显著高于‘宁麦14号’, 从而使‘濮麦9号’具有稳定和维持其膜结构和功能的高能力, 并且还保持了较高的叶绿素含量, 进而解释了‘濮麦9号’在低氮胁迫下保持较高光合速率的原因。在本研究中‘濮麦9号’中较低糖脂含量的降解以及较高的DGDG/MGDG比值可能有助于减轻低氮胁迫对其光和器官的损害和保持叶绿素含量及光合能力, 同时光合效率的降低可能是低氮胁迫下抑制植物生长的原因, 这些表明较高的DGDG/MGDG可能是‘濮麦9号’耐低氮能力强的原因之一。

低氮处理后, 两个小麦品种中的MGDG、SQDG+PL以及总脂中的不饱和脂肪酸含量下降而DGDG中的不饱和脂肪酸没有显著变化, ‘濮麦9号’叶片中MGDG、SQDG+PL以及总脂中的不饱和脂肪酸含量显著高于‘宁麦14号’。DBI是衡量膜流动性的一个重要指标。膜脂分子的极性基强弱、脂肪酸链的长短、不饱和键的位置和数目直接影响生物膜的物理特性, 进而影响膜的完整性。邓令毅等(1982)研究发现在低温胁迫下植物膜脂的DBI增加, 使植物能保持膜的流动性和完整性, 进而提高植物的抗寒性。目前关于膜脂流动性与耐低氮有无直接关系的研究还是空白。一般情况下DBI越大, 膜脂的流动性越好, 从而有利于改善逆境(低氮胁迫)对植物细胞膜的影响, 改善膜的流动性和结构的完整性, 进而维持膜的正常功能。在本研究中, ‘宁麦14号’和‘濮麦9号’叶片中DGDG的DBI在低氮环境下没有达到差异显著性水平, ‘濮麦9号’的MGDG、SQDG+PL以及总脂的DBI显著高于‘宁麦14号’。说明‘濮麦9号’在低氮环境下能较好维持膜的流动性和结构的完整性, 有助于维持其膜的正常功能, 从而提高‘濮麦9号’对低氮环境的适应能力。

综上所述, 在低氮条件下, ‘濮麦9号’的叶片能维持较高的半乳糖脂含量、DGDG/MGDG以及类囊体中较高的组装蛋白密度, 使得叶片保持较高的叶绿素含量, 进而维持较高的净光合速率以及F_v/F_m, 缓解低氮胁迫对‘濮麦9号’的影响, 从而提高‘濮麦9号’对低氮胁迫的耐受性。本研究结果表明小麦叶片膜脂组分及含量的不同变化可能是这两个小麦品种对低氮胁迫耐受性不同的重要原因之一, 同时表明半乳糖脂在植物响应低氮胁迫中起着重要作用以及在低氮环境下能维持糖脂含量和组分稳定的品种具有更好的耐低氮能力。

参考文献

An JH, Liu XL, Xu C, Cui JJ, Xu KZ, Ling FL, Zhang ZA, Wu ZH (2014). Photosynthetic physiological characteristics of rice varieties with high nitrogen use efficiencies. J Northwest A&F Univ-Nat Sci, 42 (12): 29–45 (in Chinese with English abstract) [安久海, 刘晓龙, 徐晨, 崔菁菁, 徐克章, 凌凤楼, 张治安, 武志海(2014). 氮高效水稻品种的光合生理特性. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 42 (12): 29–45]

Bligh EG, Dyer WJ (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. Can J Biochem Physiol, 37 (8): 911–917

Block MA, Dorne AJ, Joyard J, Douce R (1983). Preparation and characterization of membrane-fractions enriched in outer and inner envelope membranes from spinach-chloroplasts. II. Biochemical Characterization. J Biol Chem, 258 (21): 13281–13286

Bruce BD (1998). The role of lipids in plastid protein transport. Plant Mol Biol, 38: 223–246

Chen J, Burke JJ, Xin Z, Xu C, Velten J (2006). Characterization of the *Arabidopsis* thermosensitive mutant *atts02* reveals an important role for galactolipids in thermotolerance. Plant Cell Environ, 29 (7): 1437–1448

Deng LY, Wang HC (1982). Cold hardiness of grape in relation to membrane lipid composition. Plant Physiol J, 8 (3): 273–283 (in Chinese with English abstract) [邓令毅, 王洪春(1982). 葡萄的膜脂和脂肪酸组分与抗寒性关系的研究. 植物生理学报, 8 (3): 273–283]

Dörmann P, Benning C (2002). Galactolipids rule in seed plants. Trends Plant Sci, 7 (3): 112–118

Evans JR (1989). Photosynthesis and nitrogen relationship in leaves of C_3 plants. Oecologia, 78: 9–19

Gao J (2006). Experimental Guidance for Plant Physiology. Beijing: Higher Education Press (in Chinese) [高俊凤(2006). 植物生理学实验指导. 北京: 高等教育出版社]

García-Ferris C, de los Ríos A, Ascaso C, Moreno J (1996). Correlated biochemical and ultrastructural changes in nitrogen-starved *Euglena gracilis*. J Phycol, 32 (6): 953–963

Gaude N, Bréhélin C, Tischendorf G, Kessler F, Dörmann P (2007). Nitrogen deficiency in *Arabidopsis* affects galactolipid composition and gene expression and results in accumulation of fatty acid phytyl esters. Plant J, 49 (4): 729–739

Haferkamp S, Kirchhoff H (2008). Significance of molecular crowding in grana membranes of higher plants for light harvesting by photosystem II. Photosynth Res, 95 (2–3): 129–134

Harwood JL (1996). Recent advances in the biosynthesis of plant fatty acids. Biochim Biophys Acta, 1301: 7–56

Harwood JL (1998). Involvement of chloroplast lipids in the reaction of plants submitted to stress. In: Siegenthaler PA, Murata N (eds). Lipids in Photosynthesis: Structure, Function and Genetics. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 287–302

Kirchhoff H, Sharpe RM, Herbstova M, Yarbrough R, Edwards GE (2013). Differential mobility of pigment-protein complexes in granal and agranal thylakoid membranes of C_3 and C_4 plants. Plant Physiol, 161: 497–507

Li J, Li NN, Guo SR (2009). Effects of nitrogen supply level on the membrane lipids and fatty acid content of leaves in broccoli. J Nanjing Agr Univ, 32 (1): 18–22 (in Chinese with English abstract) [李娟, 栗娜娜, 郭世荣(2009). 氮营养水平对青花菜叶片膜脂组成和脂肪酸含量的影响. 南京农业大学学报, 32 (1): 18–22]

Li Q, Luo YH, Yu DH, Kong FL, Yang SM, Yuan JC (2015). Effects of low nitrogen stress on photosynthetic characteristics and chlorophyll fluorescence parameters of maize cultivars tolerant to low nitrogen stress at the seedling stage. J Plant Nutr Fert, 21 (5): 1132–1141 (in Chinese with English abstract) [李强, 罗延宏, 余东海, 孔凡磊, 杨世民, 袁继超(2015). 低氮胁迫对耐低氮玉米品种苗期光合及叶绿素荧光特性的影响. 植物营养与肥料学报, 21 (5): 1132–1141]

Lu J (2003). Plant Nutrition. Beijing: China Agricultural University Press (in Chinese) [陆景陵(2003). 植物营养学. 北京: 中国农业大学出版社, 23–24]

Narasimhan R, Wang G, Li M, Roth M, Welti R, Wang X (2013). Differential changes in galactolipid and phospholipid species in soybean leaves and roots under nitrogen deficiency and after nodulation. Phytochemistry, 96: 81–91

Pang S (1990). Plant Stressed Physiology. Harbin: Northeast Forestry University Press (in Chinese) [庞士铨(1990). 植物逆境生理学基础. 哈尔滨: 东北林业大学出版社]

Rawyler A, Pavelic D, Gianinazzi C, Oberson J, Braendle R (1999). Membrane lipid integrity relies on a threshold of ATP production rate in potato cell cultures submitted to anoxia. Plant Physiol, 120: 293–300

Shi ZH, Wang SW, Yin LN, Zhang MJ, Deng XP (2013). Tolerance of tobacco plants with *OsMGD* gene to low phosphorus stress. J Northwest A&F Univ-Nat Sci, 41 (10): 97–104 (in Chinese with English abstract) [史中惠, 王仕稳, 殷俐娜, 张梅娟, 邓西平(2013). 超表达水稻*MGD*基因(*OsMGD*)烟草植株的耐低磷胁迫能力. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 41 (10): 97–104]

Shimojima M, Ohta H (2011). Critical regulation of galactolipid synthesis controls membrane differentiation and remodeling in distinct plant organs and following environmental changes. Prog Lipid Res, 50 (3): 258–266

Torres-Franklin ML, Gigon A, de Melo DF, Zuily-Fodil Y, Pham-Thi AT (2007). Drought stress and rehydration affect the balance between MGDG and DGDG synthesis in cowpea leaves. Physiol Plant, 131 (2): 201–210

Wang R, Okamoto M, Xing X, Crawford NM (2003). Microarray analysis of the nitrate response in Arabidopsis roots and shoots reveals over 1,000 rapidly responding genes and new linkages to glucose, trehalose-6-phosphate, iron, and sulfate metabolism.

Plant Physiol, 132 (2): 556–567

Wang S, Uddin MI, Tanaka K, Yin L, Shi Z, Qi Y, Mano J, Matsui K, Shimomura N, Sakaki T, et al (2014). Maintenance of chloroplast structure and function by overexpression of the rice *MONOGALACTOSYLDIACYLGLYCEROL SYNTHASE* gene leads to enhanced salt tolerance in tobacco. Plant Physiol, 165: 1144–1155

Wang XY, Zhang MJ, Xiong BL, Yin LN, Wang SW, Deng XP (2016). Effects of aluminum stress on the composition and content of membrane lipids in rice (*Oryza sativa*). Plant Physiol J, 52 (4): 461–470 (in Chinese with English abstract) [王鑫月,张梅娟, 熊炳霖, 殷俐娜, 王仕稳, 邓西平(2016). 铝胁迫对水稻膜脂组分和含量的影响. 植物生理学报, 52 (4): 461–470]

Wang Z, Benning C (2011). *Arabidopsis thaliana* polar glycerolipid profiling by thin layer chromatography (TLC) coupled with gas-liquid chromatography (GLC). J Vis Exp, (49): e2518

Wewer V, Dörmann P, Hölzl G (2013). Analysis and quantification of plant membrane lipids by thin-layer chromatography and gas chromatography. Methods Mol Biol, 1009: 69–78

Wu Y, Tang N, Zhang BJ (2014). Effects of nitrogen deficiency on the photosynthetic characteristics of different varieties of japonica rice. Hubei Agr Sci, 53 (8): 1762–1765 (in Chinese with English abstract) [吴言, 唐宁, 张边江(2014). 缺氮对不同粳稻品种光合特性的影响. 湖北农业科学, 53 (8): 1762–1765]

Xu HW, Lu RJ, Liu CH, Gao RH, Gao GM, Huang YC, Yang SS, Chen ZW, He T, Li YB, et al (2014). Comparison of low nitrogen tolerance of wheat genotypes at seedling and maturity stages. Plant Physiol J, 50 (12): 1773–1779 (in Chinese with English abstract) [徐红卫, 陆瑞菊, 刘成洪, 高瑞红, 郭桂梅, 黄亦辰, 杨沙沙, 陈志伟, 何婷, 李颖波等(2014). 不同基因型小麦苗期和成熟期耐低氮性的比较. 植物生理学报, 50 (12): 1773–1779]

Zhang M, Deng X, Yin L, Qi L, Wang X, Wang S, Li H (2016). Regulation of galactolipid biosynthesis by overexpression of the rice *MGD* gene contributes to enhanced aluminum tolerance in tobacco. Front Plant Sci, 7: 337

Zhao D, Reddy KR, Kakani VG, Reddy V (2005). Nitrogen deficiency effects on plant growth, leaf photosynthesis, and hyperspectral reflectance properties of sorghum. Eur J Agron, 22 (4): 391–403

Zhao J, Wang C, Bedair M, Welti R, Sumner LW, Baxter I, Wang X (2011). Suppression of phospholipase Dγs confers increased aluminum resistance in *Arabidopsis thaliana*. PLoS ONE, 6 (12): e28086

Zheng GW, Tian B, Zhang FJ, Tao FQ, Li WQ (2011). Plant adaptation to frequent alterations between high and low temperatures: remodeling of membrane lipids and maintenance of unsaturation levels. Plant Cell Environ, 34: 1431–1442

Effect of nitrogen deficiency on leaf lipid composition in different nitrogen-deficiency tolerant wheat (*Triticum aestivum*) cultivars during seedling stage

QI Ling-Yun[1,3], YIN Li-Na[1,2,3,*], ZHANG Mei-Juan[2,3,4], CAO Bei-Bei[1,3], WANG Shi-Wen[1,2,3], DENG Xi-Ping[2,3]

[1]College of Natural Resources and Environment, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; [2]State Key Laboratory of Soil Erosion and Dryland Farming on the Loess Plateau, Institute of Soil and Water Conservation, Chinese Academy of Sciences and Ministry of Water Resources, Yangling, Shaanxi 712100, China; [3]Institute of Soil and Water Conservation, [4]College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China

Abstract: The objective of this study was to evaluate the effect of nitrogen deficiency on membrane lipid composition and contents in different nitrogen-deficiency tolerant wheat (*Triticum aestivum*) cultivars. Two wheat cultivars (‘Pumai 9’, PM9; ‘Ningmai 14’, NM14) were grown in nitrogen-deficiency hydroponic solution for one month. The results show that the biomass was more decreased in NM14 than PM9 under nitrogen-depleted condition. The chlorophyll content, photochemical efficiency of photosystem II (PSII) and photosynthetic rate in PM9 were significantly higher than those of NM14 during nitrogen deficiency. Lipid analyses showed that the levels of monogalactosyldiacylglycerol (MGDG), digalactosyldiacylglycerol (DGDG) and total lipid in the two cultivars were decreased under nitrogen-depleted condition. However, the contents of DGDG, DGDG/MGDG and total lipid of PM9, the double bond index (DBI) in MGDG, phospholipid (PL) and total lipid in PM9 were significantly higher than those of NM14 after nitrogen-deficiency treatment. Taken together, the changes of lipid components and contents in leaves might play an important role in the response to nitrogen-depleted condition.

Key words: wheat (*Triticum aestivum*); seedling stage; nitrogen starvation; nitrogen-deficient tolerance; membrane lipid

Received 2016-11-14 Accepted 2017-03-27

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 31200206), West Light Foundation of the Chinese Academy of Sciences, and the Program for Scientific and Technological Star of Shaanxi Province (Grant No. 2016KJXX-66).

*Corresponding author (E-mail: linayin@nwsuaf.edu.cn).