

冬小麦叶片自然衰老的形态及生理变化 与品种和营养的关系研究

崔四平¹, 刘轶倩¹, 王春祥¹, 魏建昆¹, 郭秀林¹, 马春红¹, 于淑池²

(1. 河北省农林科学院遗传生理研究所, 石家庄, 050051;

2. 承德民族师范高等专科学校化学系, 承德市, 067000)

摘要: 研究用砂培盆栽法, 选用抗旱性较强的 621 及抗旱性较弱的中麦 9, 在正常水分供应条件下, 对不同施肥水平处理, 整株水平的不同叶位间, 叶片衰老的时空规律进行了研究。结果表明: 小麦叶片的自然衰老具有明显的时空顺序特点, 符合细胞凋亡的特征。本研究为冬小麦叶片自然衰老是细胞凋亡类型的推断提供了间接证据。

关键词: 冬小麦; 叶片; 衰老; 凋亡

中图分类号: S512.01 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2003)院庆专集-0046-06

Relationship of the Alteration of Morphology and Physiology with the Variety and Nutrition Level During Leaf Senescence of Winter Wheat

CUI Si ping¹, LIU Yi qian¹, WANG Chun xiang¹, WEI Jian kun¹,

GUO Xiu lin¹, MA Chun hong¹, YU Shu chi²

(1. Institute of Genetics and Physiology, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050051, China; 2. The Department of Chemistry, Chengde Teachers College for Nationalities, Chengde 067000, China)

Abstract: In this paper, several morphological and physiologic parameters of leaf senescence of winter wheat were studied under different levels of nutrition supply and normal condition of water. Garden pots (20 cm × 20 cm) filled with clean sand were used to culture the seedlings. Two varieties (No. 621, drought resistance, and Zhong Mai No. 9, drought sensitivity) were used. It could be concluded that de-green of leaf happened orderly. The death initiated from older leaf and senescence began from tip of leaf. In senile leaf the photosynthetic rate decreased significantly and content of chlorophyll and protein reduced at the same time. But water content of leaf still remained a higher level. The evidence revealed the senescence of wheat leaf showed the morphologic and physiologic feature of programmed cell death in this study.

Key words: Winter wheat; Leaf; Senescence; Apoptosis

小麦抗旱性鉴定技术是作物抗旱生理研究的一项重要内容。反复干旱法因为其简便、快速的特点在实践中得到广泛应用。但是这种技术存在重复性差的缺陷。其主要原因是土壤水势难以精确控制。我们拟在较轻水分胁迫下, 建立一种对小麦进行抗旱性鉴定的方法。这一技术的核心是将原来旧的反

复干旱法中的植株死亡率指标, 改为叶片复绿比指标。因此, 需要了解在正常供水条件下以及在受到水分胁迫时叶片的衰老的基本规律。

本试验首先拟在正常水分供应条件下, 对不同抗旱性小麦品种植株的不同叶位的叶片衰老规律进行形态和生理变化方面的研究, 同时研究供肥水平

对小麦叶片衰老的影响, 为快速抗旱性鉴定新技术提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

小麦品种为 621(抗旱对照品种)和中麦 9(由中国农科院育成, 不抗旱)。以上品种均由河北农业大学生物技术中心提供。

材料培养 将精选的小麦种子, 用花盆砂培。露天(有防雨棚)自然光照。花盆共 18 个, 直径 25 cm。内装洗净的沙子, 浇水至最大持水量, 每盆同时播种 621 和中麦 9 两个品种各 20 粒种子。试验分为 3 组, 每组 6 盆, A 组间隔一天浇 Hodgland 营养液, 间隔一天浇自来水。B 组间隔一天浇 1/10 Hodgland 营养液, 间隔一天浇自来水。C 组每天均浇自来水。三组每次均浇 600 mL 的溶液或水, 待小麦长出 6~7 片叶时取样, 分别对第 4~7 片叶进行测定。

1.2 试验方法

叶片干重测定采用称重法 按照普通的生理方法, 在烘箱中, 于 105℃下杀青 0.5 h, 然后在 80℃下烘干至恒重, 含水量计算公式为:

含水量(%) = (鲜重 - 干重) / 鲜重 × 100

叶片可溶性蛋白含量的测定 参考高俊凤^[1]主编的《植物生理学实验》, 采用考马斯亮蓝 G-250 法, 用牛血清蛋白(BSA)作为标准蛋白, 于波长 595 nm 比色测定。

叶片叶绿素含量测定 参考高俊凤编著的《植物生理学实验技术》, 用丙酮提取法进行叶绿素含量的测定。

光合速率测定 用英国 PP 公司产的 CSAI 光合测定仪, 采用内部供应 CO₂ 的方法测定。

2 结果与分析

2.1 小麦叶片衰老的外观形态

在取样测定时, 全肥处理已经有 7 片叶, 1/10 肥处理的苗龄达到 6 片叶子, 不施肥对照只有 5 片。两个品种的 3 个处理的小麦苗第 1~3 叶片均已经失水枯死。正在衰老的叶片的明显外观特征是叶色变黄, 而且失绿变黄总最先从叶片的尖部开始。在本试验中, 叶片失绿变黄发生在第 4 叶位, 品种和处理间没有明显差异。施肥水平对小麦苗期个体发育影响非常明显。全肥处理保有 3.5 片绿叶, 1/10 肥处理保有 2.5 片绿叶, 对照则只保有 1.5 片绿叶。

施肥水平高的处理, 小麦植株个体生长发育明显好于对照, 主要表现为: 植株高大, 叶片面积增大, 叶片数量提高。由以上的试验结果可以得到以下结论: 小麦叶片的衰老具有明显的时间和空间顺序特征, 即: 由下而上, 由尖端到基部顺序进行。这种现象与细胞凋亡的有序性是一致的。肥料的作用主要表现在对植株个体生长的促进上, 对减缓衰老只是次要作用。

2.2 光合速率的变化

经测定, 不同施肥水平对小麦各叶位的光合速率有明显的影响, 但不同品种同一处理之间差异不明显(表 1)。

表 1 施肥水平对不同小麦品种叶片光合速率的影响 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$

	621			中麦 9		
	0 肥	1/10 肥	全肥	0 肥	1/10 肥	全肥
4 叶	0.00	0.07	2.60	0.17	0.23	2.83
5 叶	2.33	1.73	4.70	3.03	1.80	4.57
6 叶		4.43	4.40		4.27	5.30
7 叶			4.60			4.80

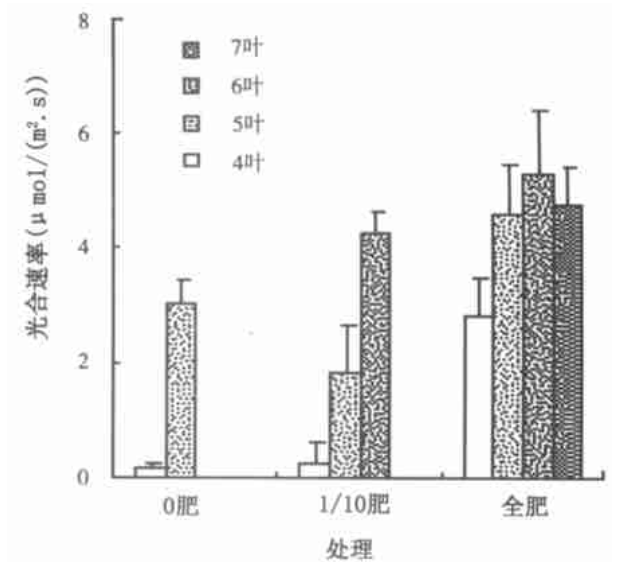


图 1 621 各处理和叶位光合速率

从图 1 可见, 全肥处理已经生长到了七叶龄, 有 4 片叶子有光合能力, 5~7 片叶光合速率较高, 第 4 片叶子光合速率明显降低, 但是明显高于其他两个施肥处理, 由此可见, 施肥可以在一定程度上延缓叶片的衰老, 增加光合能力持续时间, 但是不会影响叶片衰老的大趋势; 1/10 供肥处理生长到了六叶期, 只有上面的 5, 6 叶 2 片叶具有较高的光合活性, 第 4 叶的光合活性几乎完全丧失; 对照处理麦苗只有 5

叶龄, 只有5片叶有较明显的光合活性, 4片叶的光合活性已经接近零。

图2显示的中麦9的光合速率变化情况基本与621品种相同。由此可见: 随着施肥水平的降低, 有光合能力的叶片数明显减少, 光合速率降低。每个处理和品种都表现出, 1~3叶片完全死亡, 第4叶片的光合能力比上部的叶片显著降低, 第5叶片以上的叶子的光合速率没有明显差异。施肥的主要效果似乎是提高了叶片发育的速度, 对衰老的减缓是次要的影响。

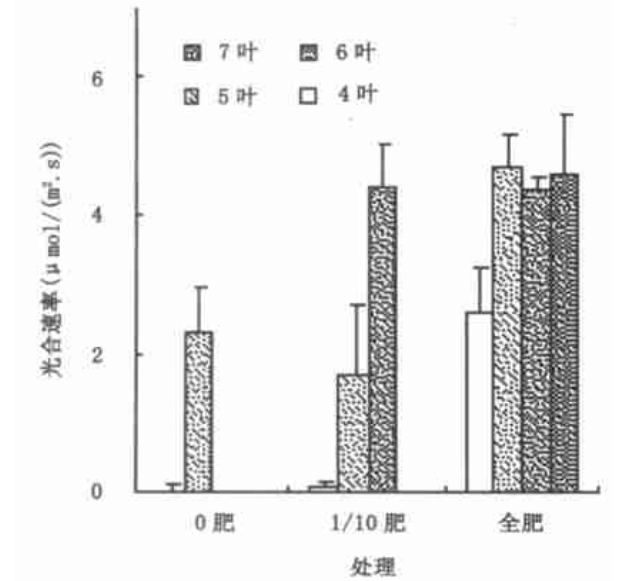


图2 中麦9各处理和叶位光合速率

	621			中麦9		
	0肥	1/10肥	全肥	0肥	1/10肥	全肥
4叶	3.79	3.40	5.93	3.9	4.9	5.2
5叶	6.87	7.46	6.50	6.4	9.9	8.7
6叶		7.15	6.33		9.0	7.9
7叶			7.31			8.3

	621			中麦9		
	0肥	1/10肥	全肥	0肥	1/10肥	全肥
4叶	2.67	2.42	4.29	2.76	3.47	3.78
5叶	4.89	5.36	4.71	4.63	7.01	6.37
6叶		5.08	4.81		6.29	5.60
7叶			5.07			6.00

图3~5分别是不同施肥水平内品种间各叶位光合速率差异比较。结果表明: 同一施肥水平下, 各品种的同叶位间的光合速率没有明显差异。

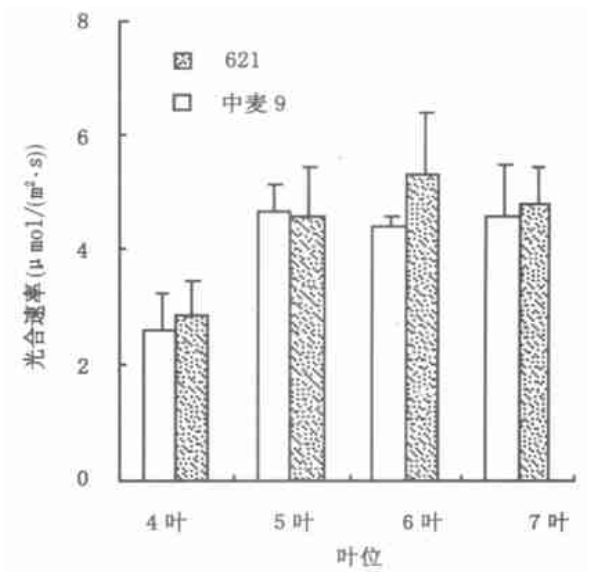


图3 全肥处理品种间各叶位光合速率

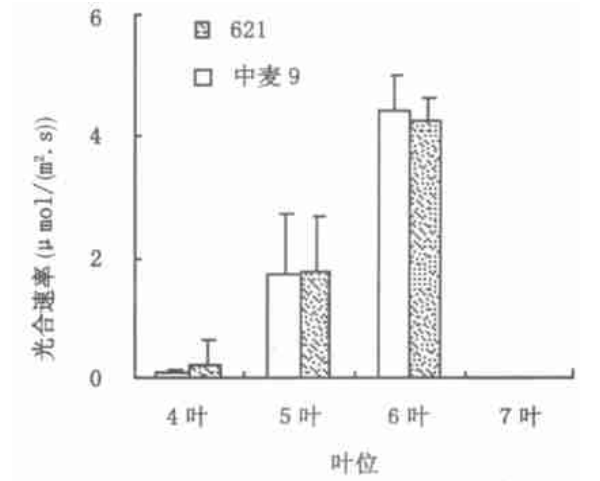


图4 1/10肥处理品种间各叶位光合速率

2.3 叶绿素含量变化

表1~3是不同处理和不同品种的各叶片的总叶绿素、叶绿素a以及叶绿素b含量的测定结果。数据表明, 中麦9小麦的叶片有较高的叶绿素含量。结合光合速率的测定结果分析, 叶绿素含量高并没有提高中麦9的光合速率, 这可能是品种特性造成的。

叶绿素含量的另一个明显的趋势是, 以第4片叶为界, 上位叶片之间的叶绿素含量没有明显的差异, 到第4叶片叶绿素含量急剧下降。叶绿素a和叶绿素b的变化与总叶绿素含量的表现一致。这与上述的叶片外观形态以及光合速率测定结果一致, 反映了小麦植株的叶片自然衰老具有一种时间和空间顺序特性。

	621			中麦 9		
	0 肥	1/ 10 肥	全肥	0 肥	1/10 肥	全肥
4 叶	0.64	0.55	0.90	0.65	0.77	0.77
5 叶	1.11	1.16	0.97	1.01	1.39	1.24
6 叶		1.17	1.12		1.54	1.31
7 叶			1.51			1.14

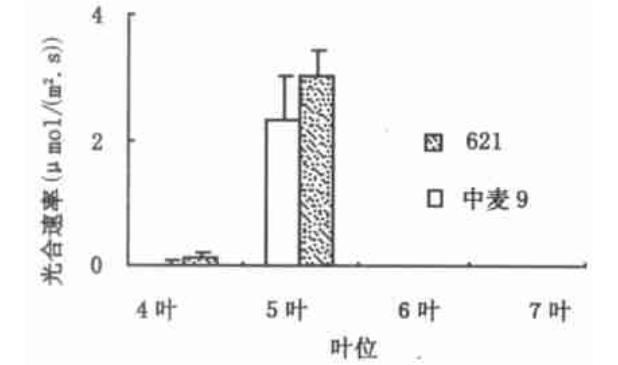


图 5 对照处理品种间各叶位光合速率

全肥处理中,两品种间叶绿素含量的叶位间表现有区别。抗旱性较强的 621 小麦,随着叶位提高,叶绿素含量逐渐提高,但是差别不大;然而,中麦 9 却表现出,在 4,5 叶位间有叶绿素含量的较大差别。因此,在施肥水平较高时,有可能较明显的延缓抗旱性较强品种的叶绿素降解或增强合成。

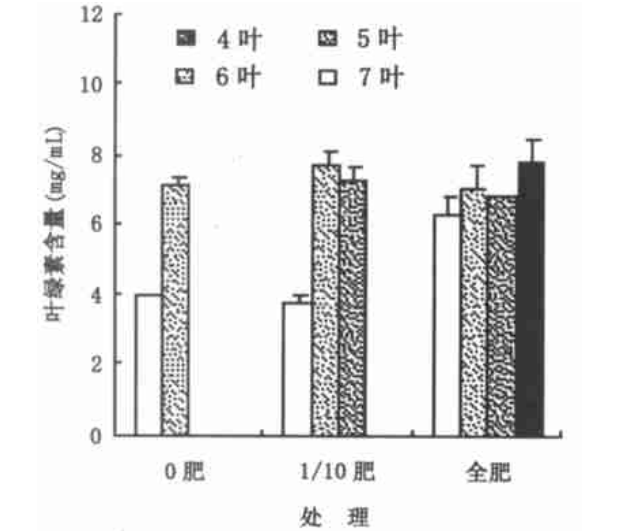


图 6 621 小麦不同施肥叶绿素含量

2.4 叶片含水量变化从叶片含水量测定结果可以看出,施肥会明显提高叶片含水量。两个抗旱性不同的品种之间,均表现以下趋势:在叶片已经明显失绿,以及同一施肥水平下,叶绿素和蛋白质含量明显降低的第 4 叶,叶片含水量没有明显降低,与上位的

其他叶片比较,叶片含水量没有明显的差异。(表 5, 图 6, 7)

由图 6, 7 可看出,第 4 片叶子以上的叶片含水量基本保持在 70% 以上,差异不大。从不施肥对照处理似乎可以看出,抗旱性强的 621 的第 4 片叶子,其含水量与其他上位叶片都处在同一水平,而抗旱性弱的中麦 9 的第 4 片叶子的含水量在各测定叶片中最低。

	621			中麦 9		
	0 肥	1/10 肥	全肥	0 肥	1/ 10 肥	全肥
4 叶	74.2	72.6	78.4	71.2	73.8	74.6
5 叶	74.5	75.6	79.1	77.6	76.1	78.7
6 叶	74.7	73.2	80.0	72.7	75.7	76.8
7 叶			76.3			77.1

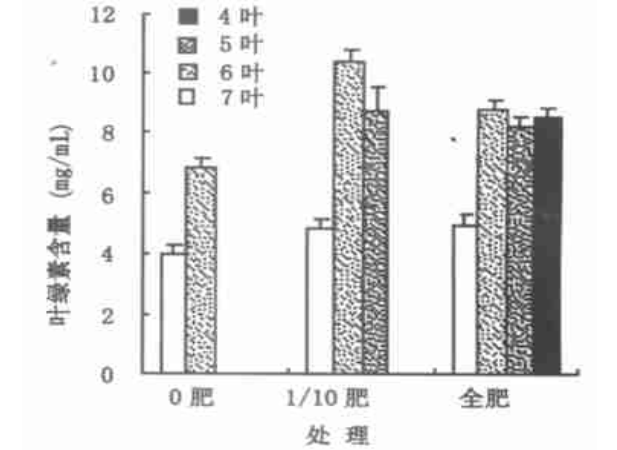


图 7 中麦 9 不同施肥叶绿素含量

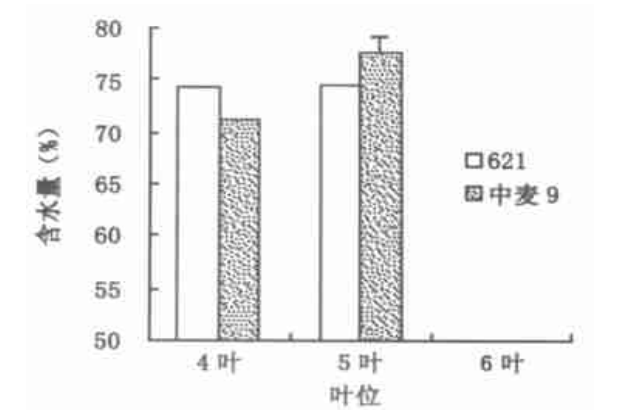


图 8 不施肥处理品种间叶片含水量比较

图 8~ 10 是从同一施肥水平对两个小麦品种的 4~ 7 片叶的含水量进行得比较。各叶位间的叶片含水量没有表现出差异,只是施肥水平高的处理中,两品种的叶片含水量在各叶位均高于其他施肥处理水平。总之,虽然其他的测定指标均已经显示,两个

小麦品种第 4 叶位, 叶片已经明显出现衰老症状, 1 ~ 3 叶位的叶片已经失水枯死, 但是第 4 叶片的含水量仍然很高, 也就是说, 它仍然保持着一定的生理活性, 叶肉细胞并没有完全死亡。

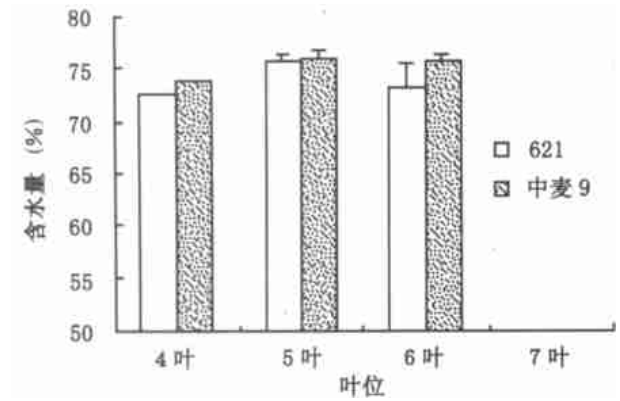


图 9 1/10 肥处理品种间叶片含水量比较

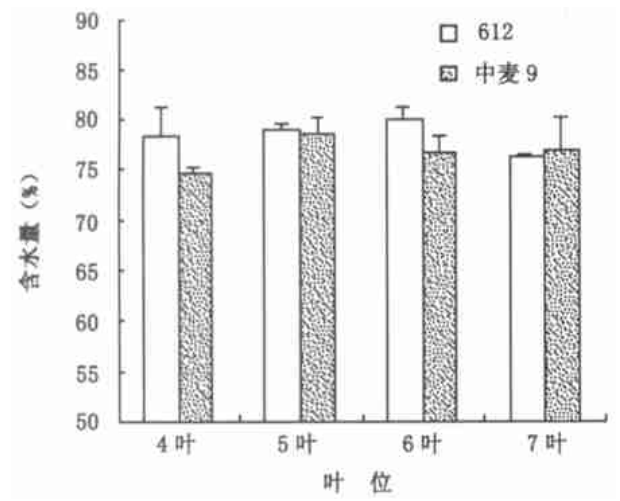


图 10 全肥处理品种间叶片含水量比较

2.5 蛋白质含量与叶片衰老

蛋白质测定结果显示, 各个施肥处理以及各品种, 在第 4 叶位的叶片, 其蛋白质含量明显降低, 与光合速率以及叶绿素含量的变化趋势一致。(表 6, 图 11, 12)

	表 6 叶片蛋白质含量			mg / g		
	621			中麦 9		
	0 肥	1/10 肥	全肥	0 肥	1/10 肥	全肥
4 叶	10.1	16.1	22.1	19.6	12.2	18.8
5 叶	36.1	42.5	41.4	27.8	36.2	51.4
6 叶		25.8	53.7	40.6	53.4	
7 叶		36.1		77.4		

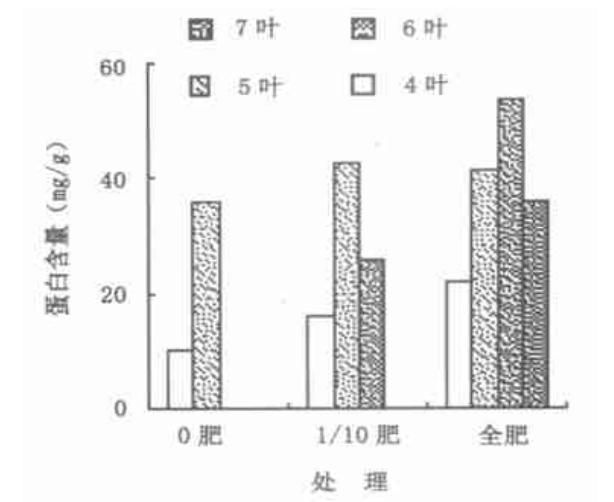


图 11 621 各处理不同叶位蛋白含量

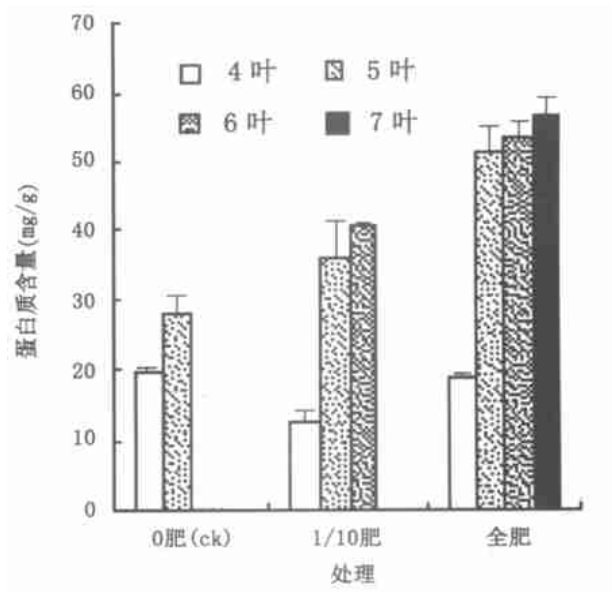


图 12 中麦 9 各处理及不同叶位蛋白质含量

3 讨论

3.1 关于小麦叶片的衰老与细胞凋亡

根据前人大量的研究结果表明^[1,2], 从形态外观上可以直观地看到, 叶片衰老时叶片颜色由绿变黄, 这是衰老最明显的标志。从时间进程上分类, 也可以将叶片衰老的进程划分为 3 个阶段。衰老前叶片保持全绿, 从叶片尖端变黄至叶片全部枯死的全过程中以叶色变化^[1]可分为: 缓慢衰老阶段、快速衰老阶段和失水枯死阶段。从这些研究中可以看出, 叶片衰老过程具有时空顺序特性。

本研究的结果也显示, 从外观上可直接观察到, 盆栽砂培的小麦幼苗, 在正常供水条件下, 小麦叶片的衰老是有序的。衰老先从老叶片开始。在叶片

内,衰老首先从叶片的尖端开始,逐步沿着叶片边缘向叶脉和叶片基部发展。

大量研究资料表明,光合速率的下降是叶片衰老早期的重要表现^[3],其微观形态表现为叶绿体间质破坏,类囊体膨胀、断裂,噬体数目增多,叶绿素含量下降。由此可见,叶片衰老的各种微观形态变化也有先后次序,这是叶片衰老具有时空顺序的微观形态证据。

衰老会引起原生质膜透性的改变^[4~7]。由于膜完整性受到破坏,胞内物质发生渗漏,引起叶片浸出液电导率的急剧增加,叶片电导率的激增比叶片失绿和叶绿体形态改变要晚。叶片浸出液电导率的急剧升高很可能是叶片衰老后期失水枯死的前奏,而RNA、叶绿素和蛋白质降低才是衰老开始的标志。这就是说在原生质膜完整性破坏之前,衰老已经开始。

在本研究中发现,虽然其他的测定指标均已经显示,两个小麦品种第4叶位,叶片已经明显出现衰老症状,1~3叶位的叶片已经失水枯死,但是第4叶片的含水量仍然很高,也就是说,它仍然保持着一定的生理活性,叶肉细胞并没有完全死亡。但是,此时的叶片外部形态、蛋白质含量、叶绿素含量以及光合速率指标均显著下降。这些证据说明,小麦叶片的自然衰老过程可能是受控的主动过程。

细胞凋亡(Apoptosis)又称细胞程序死亡(Programmed Cell Death,PCD)^[8,9]。这种过程是主动的、有高度时空次序的、由基因调控以及一系列酶参与的自然生命过程。

从前人在叶片与衰老的研究以及本实验研究的结果看,小麦叶片的自然衰老具有明显的时空顺序特点。通过本试验,为小麦叶片衰老是细胞凋亡类型的结论提供了间接证据。

3.2 关于小麦叶片衰老的品种间差异

在选用的两个抗旱性不同的小麦品种间,叶片衰老的叶位间差异不大。不同肥料水平,不同品种间,均表现前三叶片失水枯死,第4叶片明显衰老。其中第4叶片光合速率明显下降,叶绿素含量和蛋

白质含量同步下降。但是叶片含水率却保持在较高水平。如果从细胞凋亡的角度分析其中的原因,可能是在本试验的条件下,在小麦种内,基因对叶片衰老的控制是有固定程序的。这也在理论上为利用小麦叶片的衰老进程的特性进行抗旱性鉴定提供了依据。

3.3 关于施肥对叶片衰老的影响

施肥对小麦叶片影响最明显的是叶片出生速度的加快,对叶片衰老有一定的延缓作用。因此在使用小麦叶片反应作为反复干旱鉴定指标时,控制统一的施肥水平,应作为一个验证设计控制因子加以重视。

参考文献:

- [1] 肖凯. 小麦叶片衰老生理变化的研究[J]. 麦类作物, 1994, 1: 46-48.
- [2] 刘道. 植物叶片的衰老[J]. 植物生理学通讯, 1983, 2: 14-19.
- [3] 张荣铎, 程在全. 小麦叶片光合速率高值持续期的初步研究[J]. 南京师范大学学报(自然版), 1992, 76-86.
- [4] 王根轩, 杨成德, 梁厚果. 蚕豆叶片发育与衰老过程中超氧化物歧化酶活性与丙二醛含量变化[J]. 植物生理学报, 1989, 15: 13-17.
- [5] 沈文飏. 小麦旗叶自然衰老过程中清除活性氧能力的变化[J]. 植物学报, 1997, 39.
- [6] 聂先舟, 刘道宏, 徐竹生. 水稻旗叶脂质过氧化作用与叶龄及 NO_2^+ , Ag^+ 的关系[J]. 植物生理通讯, 1989, 25: 32-34.
- [7] 林植芳, 李双顺, 林橘珠. 衰老叶片和叶绿体中 H_2O_2 的积累与膜质过氧化的关系[J]. 植物生理学报, 1988, 14(1): 16-22.
- [8] Kerr J F. A histochemical study of hypertrophy and ischaemic injury of rat liver with special reference to changes in lysosomes Apoptosis: of functional paradigm for programme plant cell death in induced by a host selective phytotoxin and invoked during development[J]. J Path Bact, 1965, 90: 419-435.
- [9] 华志明, 陈睦传, 沈明山. 植物生长发育中程序性细胞死亡[J]. 生物工程进展, 1998, 18(3): 32-36.