

模拟夏季高温条件下银杏幼苗 抗氧化酶系统的动态变化

曹福亮, 郁万文, 汪贵斌, 张往祥

(南京林业大学 森林资源与环境学院, 江苏 南京 210037)

摘要:在模拟夏季高温条件下,研究了2年生盆栽银杏叶片膜相对透性、MDA含量、 H_2O_2 含量、 $\cdot O_2^-$ 产生速率及SOD、POD活性的动态变化。结果表明:在升温初期,银杏叶片相对电导率、MDA含量降低, $\cdot O_2^-$ 产生速率升高、SOD活性降低,而 H_2O_2 含量、POD活性均降低,表明叶片细胞膜对短暂高温有一定的稳定性。在升温后期,叶片相对电导率、MDA含量升高, $\cdot O_2^-$ 含量、SOD活性升高,而 H_2O_2 含量升高、POD活性降低。叶片相对电导率和 $\cdot O_2^-$ 产生速率的最高值出现在降温过程的40℃时,MDA和 H_2O_2 含量的最高值出现在35℃,而SOD活性的最高值则出现在30℃,表明各项指标对短期高温的反应具有滞后性。随着温度降低,叶中 $\cdot O_2^-$ 产生速率和 H_2O_2 含量下降,活性氧代谢趋于平衡,从而使叶片相对电导率和MDA含量下降。

关键词:人工模拟夏季高温; 银杏幼苗; 抗氧化酶系统; 动态变化

中图分类号:S791.243

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2008)02-0082-04

Dynamic Changes of Antioxidant Enzyme System in Ginkgo Seedling under Stimulated High Temperature Stress in Summer

CAO Fu-liang, YU Wan-wen, WANG Gui-bin, ZHANG Wang-xiang

(College of Forest Resources and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

Abstract: The dynamic changes of the relative electrical conductivity, MDA, H_2O_2 contents, $\cdot O_2^-$ generation rate, SOD, POD activities in ginkgo seedling were studied in pot under stimulated high temperature stress in summer. The results showed that, in the earlier stage of warming, the relative electrical conductivity, MDA content, SOD activity, H_2O_2 content and POD activity in ginkgo decreased, while $\cdot O_2^-$ generation rate increased, which showed that cell membrane in ginkgo leaf had a certain extent stability. In the later stage of warming, the relative electrical conductivity, MDA content in ginkgo, $\cdot O_2^-$ generation rate, SOD activity, H_2O_2 content increased, while POD activity decreased. The highest values of the relative electrical conductivity and $\cdot O_2^-$ generation rate appeared at 40℃ of cooling, those of MDA and H_2O_2 contents did at 35℃ of cooling, and that of SOD activity did at 30℃ of cooling, which showed the hysteresis of the above indexes to short-term high temperature. $\cdot O_2^-$ generation rate and H_2O_2 content decreased, activate oxygen metabolism kept the balance, so that the relative electrical conductivity and MDA content decreased.

Key words: stimulated high temperature stress in summer; ginkgo seedling; antioxidant enzyme system; dynamic change

高温作为夏季的主要逆境之一,是夏季林木生长和农蔬生产的严重障碍。因此研究高温对植物生理代谢的影响,对于快速准确地鉴定和筛选耐热材料,提高耐热育种效率具有重要意义。许多研究表

收稿日期:2007-09-10

作者简介:曹福亮(1957—),男,教授,E-mail:samcao2007@yahoo.com.cn

基金项目:“十一五”国家攻关科技支撑计划课题“银杏和喜树工业原料林培育技术”(2006BAD18B0301)

明,高温首先破坏细胞膜结构,致使细胞内含物外渗,细胞膜的热稳定性(高温胁迫下细胞膜相对透性直接反映植物的耐热程度)^[1]变差、膜脂过氧化作用是导致膜结构破坏、引起植株损伤甚至死亡的重要原因,而植物体内 POD、SOD 等细胞膜保护酶与植物的耐热性有关,可作为耐热性筛选指标^[2-4]. 本文以银杏 *Ginkgo biloba* 为试材,研究了模拟夏季高温条件下银杏叶片膜相对透性,MDA、H₂O₂ 含量,·O₂⁻ 产生速率,SOD、POD 活性等的动态变化,以期从自由基生物学角度反映出高温伤害与细胞膜热稳定性及抵御高温伤害的生理特征,为夏季高温条件下银杏抗氧化酶系统的日动态调节机制和耐热育种研究提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 供试材料与试验设计

银杏种子采自江苏省泰兴银杏种质资源圃,品种为泰兴大佛指. 于 2005 年春天,催芽后选取饱满均匀的种子播于花盆(25 cm × 15 cm × 15 cm)中,每盆 3 粒,露天培育. 至 2007 年 7 月初移入 LRH-400-GS II 人工气候室内,光照强度 10 000 lx,每天光照 14 h,温度 25 ℃. 控制土壤田间持水量在 75% 左右,适应 10 d 后进行短期梯度变温处理,每 4 h 变更 1 个梯度,温度梯度依次为 25、30、35、40、42、40、35、30、25 ℃,在变更温度前采集上、中、下各 3 片叶,混合后进行相关指标测定,每处理 4 个重复.

1.2 测定方法

细胞膜透性(RPP)用相对电导率法^[5]测定;MDA 含量用 TBA 比色法^[5]测定;SOD 活性用 NBT 比色法^[5]测定,稍加改进,以抑制 NBT 光化还原 50% 为一个酶活力单位(U),酶活性以鲜质量 U · g⁻¹ 表示;POD 活性用愈创木酚法^[6]测定 $D_{470\text{ nm}}$ 值的变化,以每分钟内 $D_{470\text{ nm}}$ 变化 0.01 为 1 个 POD 活性单位(U),酶活性以鲜质量 U · g⁻¹ · min⁻¹ 表示;·O₂⁻ 产生速率用羟胺氧化法^[5]测定;H₂O₂ 含量的测定参照文献[7].

2 结果与分析

2.1 模拟夏季高温条件下银杏叶片膜相对透性动态变化

如图 1 所示,随着温度升高,银杏叶片膜相对透性总体呈“升高”的趋势,但升高幅度不大,在 42 ℃ 时仅比未升温时增加 3.01%,而在 30 ℃ 时有所降

低,为未升温的 90.4%. 随着温度的回降,膜相对透性降低. 值得注意的是,膜相对透性在回温之初(40 ℃)升至最大,比未升温时升高 7.56%,表明高温引起了叶片细胞膜内含物的部分外渗,且表现出一定的滞后性,这可能与处理时间(4 h)较短有关.

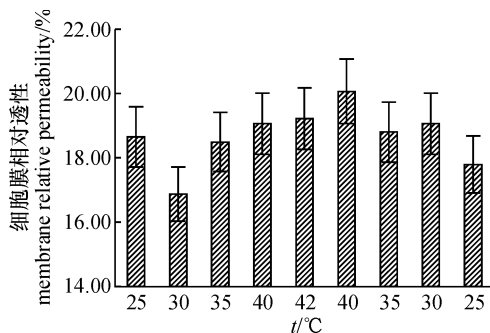


图1 不同温度条件下膜相对透性的变化

Fig. 1 Changes of membrane relative permeability in different temperature

2.2 模拟夏季高温条件下银杏叶片 MDA 含量动态变化

MDA 是膜脂过氧化作用的最终产物,是反映植物体膜系统伤害的重要标志之一. 由图 2 可以看出,随着温度的升高,MDA 含量有所下降,于 40 ℃ 时降至最低,为未升温的 86.5%,42 ℃ 时又有所升高. 在降温之初(40、35 ℃),MDA 含量升至最高,随后随温度的降低而下降,但均高于升温过程中对应温度的 MDA 含量. 这表明高温引起了叶片细胞膜的部分过氧化,但同样表现出一定的滞后性,与膜相对透性在降温过程的变化相对应.

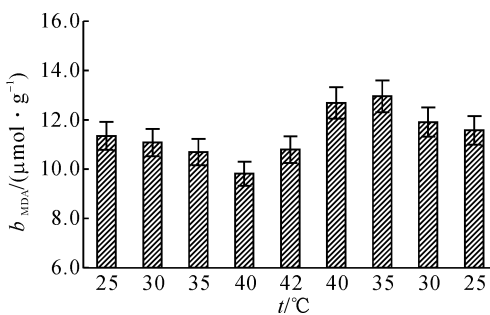


图2 不同温度条件下 MDA 含量的变化

Fig. 2 Changes of MDA content in different temperature

2.3 模拟夏季高温条件下银杏叶片·O₂⁻ 产生速率和 SOD 活性的动态变化

·O₂⁻ 参与启动膜脂过氧化或膜脂脱脂作用,而 SOD 的主要功能是催化·O₂⁻ 发生歧化反应,清除·O₂⁻ 对细胞的损害. 由图 3 可知,在整个“升温—降温”过程中,·O₂⁻ 产生速率随着温度的升高而加快,

于降温之初的 40 ℃ 时升至最高,为未处理的 150.7%。随着温度继续降低,·O₂⁻ 产生速率下降,降至 25 ℃ 时,·O₂⁻ 产生速率仅为未处理的 78.4%。如图 4 所示,在升温前期,SOD 活性下降,于 35 ℃ 时降至最低,为未处理的 91.4%。在随后的升温—降温过程中,SOD 活性逐渐升高,且于降温过程的 35 和 30 ℃ 时升至较高水平,分别比未处理的升高 3.47% 和 3.83%,当降至 25 ℃ 时,SOD 活性有所下降,但仍高于未处理时的 SOD 活性。这说明银杏可以通过保持较高的 SOD 活性水平,消除·O₂⁻ 对细胞膜的氧化损伤来适应夏季高温,但表现出一定的滞后性。

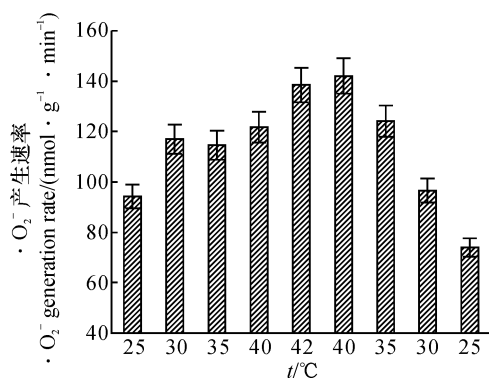


图3 不同温度条件下·O₂⁻产生速率的变化

Fig. 3 Changes of ·O₂⁻ generation rate in different temperature

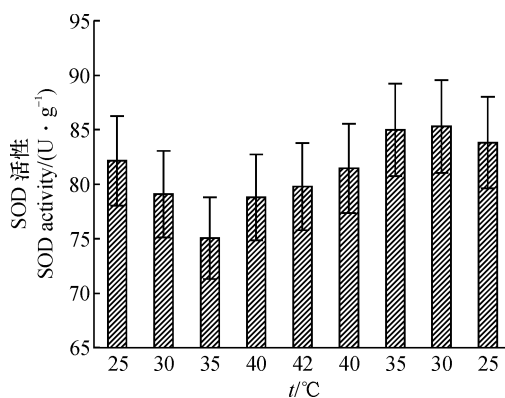


图4 不同温度条件下 SOD 活性的变化

Fig. 4 Changes of SOD activity in different temperature

2.4 模拟夏季高温条件下银杏叶片 H₂O₂ 含量和 POD 活性的动态变化

从图 5 可以看出,在整个“升温—降温”过程中,H₂O₂ 含量随着温度的升高而升高,于降温至 35 ℃ 时升至最高,为未处理的 129.1%。随后,温度继续降低,H₂O₂ 含量下降,降至 25 ℃ 时,H₂O₂ 含量仍比未处理的高 15.7%。如图 6 所示,在升温过程中,POD 活性持续下降,至降温过程的 40 ℃ 时降至最低,为未处理的 39.5%。随着温度的降低,POD 活性

有所恢复,降至 25 ℃ 时,POD 活性也仅为未处理的 62.8%。

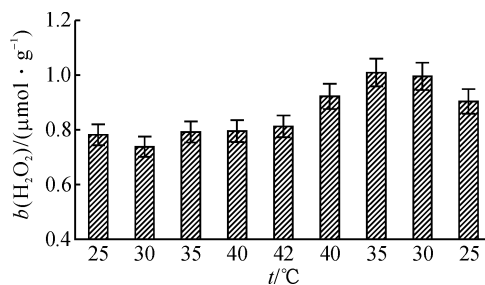


图5 不同温度条件下 H₂O₂ 含量的变化

Fig. 5 Changes of H₂O₂ content in different temperature

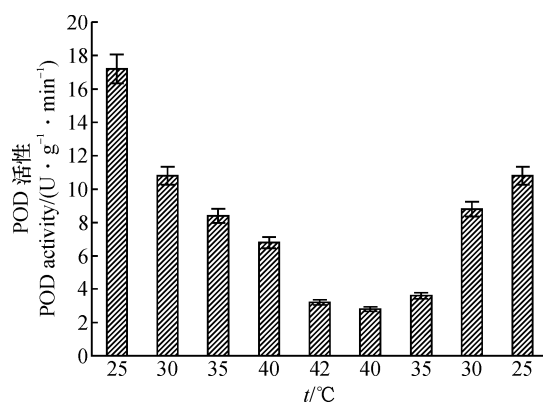


图6 不同温度条件下 POD 活性的变化

Fig. 6 Changes of POD activity in different temperature

3 讨论与结论

正常环境下,植物体内活性氧产生和清除处于动态平衡;高温胁迫往往导致活性氧代谢平衡破坏,为了避免活性氧过量积累对植物生物膜及其他大分子物质的伤害,清除活性氧的酶促防御系统活性随之变化^[8-10]。

植物组织对环境胁迫的一个共同反应是脂质过氧化作用^[11],致使生物膜透性的增加。本试验表明,在温度升高初期,银杏叶片相对电导率、MDA 含量降低,表明叶片中的膜脂未发生过氧化作用,膜的完整性和稳定性也未被破坏,所以上述变化可能是膜对温度升高作出的一种适应性的应激反应;而·O₂⁻ 产生速率加快、SOD 活性降低,H₂O₂ 含量、POD 活性均降低,表明短暂高温逆境并未激活 SOD 和 POD 2 种保护酶,即短暂高温下,银杏叶片膜的完整性和稳定性的维持可能存在其他的适应性的应激机制或保护机制,或者说其在短暂高温下有着一定的稳定性。但随着温度进一步升高,叶片相对电导率、MDA 含量升高,表明叶片细胞中膜脂部分过氧化,膜的完整性和稳定性有所破坏;而·O₂⁻ 产生速率加快、SOD 活性

升高, H_2O_2 含量升高、POD 活性降低, 表明短暂高温逆境部分激活了保护酶(仅 SOD) 活性, 也说明短暂高温下, 银杏叶片膜发生的部分过氧化及膜的稳定性和完整性的部分破坏, 是由于叶片中活性氧含量得不到有效清除, 致使其含量增加所致。这与前人对高温胁迫下水稻^[12-13]、马铃薯^[14]等在活性氧代谢、抗氧化酶活性变化或膜稳定性方面的研究结论相符。但是叶片相对电导率、MDA 含量、 $\cdot\text{O}_2^-$ 产生速率、SOD 活性和 H_2O_2 含量的最高值均不是出现在温度最高(42 °C) 时, 而是出现在温度降低的过程中, 如相对电导率和 $\cdot\text{O}_2^-$ 产生速率的最高值出现在降温过程的 40 °C, MDA 和 H_2O_2 含量的最高值出现在 35 °C, SOD 活性的最高值则出现在 30 °C 时, 表明各项指标对短期高温的反应具有滞后性和不同步性, 这可能与处理的时间较短和各指标对短期高温反应的敏感性存在差异有关。随着温度进一步降低, 由于前期高温的刺激, SOD 和 POD 活性均被激活(POD 活性升高, SOD 活性维持在较高的水平), 使得叶片中 $\cdot\text{O}_2^-$ 产生速率和 H_2O_2 含量降低, 活性氧代谢趋于平衡, 从而使叶片膜的稳定性和完整性得到恢复, 表现为相对电导率和 MDA 含量下降。

综上所述, 在人工模拟夏季高温条件下, 银杏叶片可通过 SOD 和 POD 等保护酶有效地控制体内活性氧代谢, 维持叶片膜透性的完整性和稳定性。而在夏季自然环境中, 无论是高温的强度还是持续时间, 一般均比本试验(42 °C 和 4 h) 的低或短, 所以在我国分布的大部分银杏一般均可平安度过夏季的高温时期。

参考文献:

- [1] 马永战, 邹琦, 程柄嵩. 高温锻炼与解除对冬小麦叶片细胞膜稳定性的影响[J]. 山东农业大学学报, 1988, 19(2): 55-58.
- [2] 李晓芝, 周人纲, 樊志和, 等. 高温对粒用苋菜幼苗叶片中可溶性蛋白、超氧化物歧化酶及膜耐热性的影响[J]. 华北农学报, 1994, 9(3): 48-51.
- [3] 周人纲, 樊志和. 热锻炼对麦叶片细胞膜及有关酶类活性的影响[J]. 作物学报, 1995, 21(5): 567-572.
- [4] 吴国胜, 曹婉仁, 王永健, 等. 细胞膜热稳定性及保护酶和大白菜耐热性的关系[J]. 园艺学报, 1995, 22(4): 353-358.
- [5] 中国科学院上海植物生理研究所, 上海市植物生理学会. 现代植物生理学实验指南[M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 2004.
- [6] 李合生. 植物生理生化试验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.
- [7] 刘俊, 吕波, 徐朗莱. 植物叶片中过氧化氢含量测定方法的改进[J]. 生物化学与生物物理进展, 2000, 27(5): 548-551.
- [8] 张玉华, 朱月林, 缪旻珉. 高温胁迫对黄瓜花药中 Ca^{2+} 分布、ABA 含量及蛋白质合成的影响[J]. 园艺学报, 2005, (2): 314-317.
- [9] 汪炳良, 徐敏, 史庆华, 等. 高温胁迫对早熟花椰菜叶片抗氧化系统和叶绿素及其荧光参数的影响[J]. 中国农业科学, 2004, 37(8): 1245-1250.
- [10] TIBOR J, GABRIELLA S, KRISZTINA R G, et al. Comparative study of frost tolerance and antioxidant activity in cereals [J]. Plant Science, 2003, 164: 301-306.
- [11] 张燕, 李天飞, 方力, 等. 钙对高温胁迫下烟草幼苗抗氧化代谢的影响[J]. 生命科学研究, 2002, 6(4): 356-361.
- [12] 朱雪梅, 柯永培, 邵继荣, 等. 高温胁迫对重穗型水稻品种叶片活性氧代谢的影响[J]. 种子, 2005, 24(3): 25-28.
- [13] 张桂莲, 陈立云, 张顺堂, 等. 高温胁迫对水稻剑叶保护酶活性和膜透性的影响[J]. 作物学报, 2006, 32(9): 1306-1310.
- [14] 任彩虹, 闫桂琴, 邵刚, 等. 高温胁迫对马铃薯幼苗叶片生理效应的影响[J]. 中国马铃薯, 2007, 21(1): 5-10.

【责任编辑 李晓卉】