

水分胁迫对梨树叶片质膜氧化还原系统的影响

王国泽

(内蒙古科技大学数理与生物工程学院, 内蒙古 包头 014010)

摘 要: 对水分胁迫下早酥梨和杜梨两种梨树叶片的质膜氧化还原系统进行了研究。结果表明, 水分胁迫使梨幼树叶片质膜 ATPase 活性提高, 质膜 NADH(还原性辅酶 I)和 NADPH(还原性辅酶 II)的氧化速率及 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 和 $\text{EDTA}-\text{Fe}^{3+}$ 的还原速率降低, GSH(谷胱甘肽)和 Vc(抗坏血酸)的氧化速率明显增加, 表明除了 NADH 和 NADPH 外, GSH 和 Vc 也可以作为早酥梨幼树叶片质膜氧化还原系统的电子供体。进一步而言, 在水分胁迫条件下, GSH 和 Vc 可能是代替 NADH 和 NADPH 的质膜氧化还原系统的电子供体。

关键词: 水分胁迫; 早酥梨; 杜梨; 质膜氧化还原系统

中图分类号: S661.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7601(2009)04-0090-04

世界上干旱半干旱地区占陆地面积的 55%, 在这类地区水分是限制植物分布, 影响作物产量的最重要因素之一。植物抗旱性是一个极其复杂的现象, 它既包括植物抵抗水分亏缺的能力, 也包括植物从干旱缺水的土壤中吸取水分的能力^[1]。长期以来, 人们对干旱机理和抗旱理论及措施进行了多方面的探索。近 30 年来, 研究者发现质膜电子传递与各种植物生理过程之间存在着某种联系: 植物细胞质膜中存在氧化还原系统, 它可能和质膜 $\text{H}^+ - \text{ATPase}$ 共同参与跨膜质子电动势的建立, 并与植物生长发育、质子分泌以及细胞壁合成等生理生化过程相关联^[2]。研究发现, 多种逆境条件对植物细胞质膜氧化还原系统产生影响^[3-10]。

但是关于水分胁迫对果树叶片质膜氧化还原系统的影响报道甚少。梨是落叶果树中的重要树种之一, 栽培范围广泛, 有相当大的面积分布在干旱半干旱地区。因此以梨为试材进行抗干旱研究具有重要意义。本文以早酥梨和杜梨幼树为材料, 探讨水分胁迫对叶片氧化还原系统的影响, 从而为抗旱基因工程提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试材及其栽培条件

供试的两个不同梨种类, 即不抗旱的早酥梨 (*P. bretschneideri* cv. *Zao Su*) 和抗旱的杜梨 (*P. betulaefolia*. *Bqe*) 二年生盆栽幼树。采用上口直径 30 cm, 下底直径 20 cm, 高 40 cm 的瓦盆, 填充料为田间自然土, 装土量为 10 kg/盆。试验于内蒙古巴盟临

河果园进行。

1.2 试验处理及取样

选择整齐一致的早酥梨和杜梨二年生幼树, 与 4 月 1 日定植于盆内, 正常管理。5 月 20 日开始预备实验。5 月 30 日试材置于防雨棚内, 保持良好的光照与通风。试验设置正常管理(对照)和施旱两种处理。干旱处理根据土壤含水量和叶片组织相对含水量随时间延长下降程度不同设置轻度胁迫、中度胁迫和严重胁迫 3 个水平, 设 3 次重复。试验自 6 月 1 日开始, 至 7 月 25 日结束, 共进行 4 次。分别为 6 月 1 日(对照), 6 月 10 日(轻度胁迫), 6 月 18 日(中度胁迫), 6 月 30 日(严重胁迫)取样。第 2 次至第 4 次试验处理和对照同时取样。叶取新梢基部第 5, 6, 7 片用于测试。

1.3 测定方法

1.3.1 质膜的分离及提纯^[11] 取 50 g 早酥梨和杜梨叶片, 按 1:2 比率加入 30 mmol/L Hepes - Tris pH7.4, 250 mmol/L 甘露醇, 3 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT 的匀浆液, 在研钵中匀浆, 然后用二层纱布过滤, 滤液经 5 000 g 离心 10 min 取上清液, 在 10 000 g 离心 15 min, 沉降颗粒即为线粒体, 将其悬浮于含 250 mmol/L 甘露醇, 1 mmol/L HepeS - Tris pH7.4 缓冲液中待用。上清液继续在 80 000 g 下离心 30 min, 取沉降颗粒, 悬浮于 5 ml 含 250 mmol/L 甘露醇, 1 mmol/L DTT, 2.5 mmol/L hePes - Tris 悬浮液中, 取悬浮液 1.5 mL, 然后小心地铺在上层为 6%、下层为 12% DextranT70 溶液上, 在 70 000 g 离心 2 h。小心收集 6% 与 12% DextranT70 层间的沉降颗

收稿日期: 2008-02-17

基金项目: 内蒙古自治区高等学校科学研究项目(NJZY07105)

作者简介: 王国泽(1975—), 女, 内蒙古赤峰人, 副教授, 博士, 主要从事农产品加工与贮藏方向的研究。E-mail: lycwgz@126.com。

粒,即为原生质膜制剂。贮于-20℃下备用,以上操作均在4℃下进行。

1.3.2 质膜 ATPase 活性测定^[11] 采用钼蓝法测定 ATPase 水解 ATP 释放的无机磷量,用 $\mu\text{mol} - \text{Pi}/\text{mg} - \text{蛋白} \times \text{h}$ 表示酶的活性,反应混合液中含 100 mmol/L Hepes - Tris (pH = 6), 30 mmol/L MgSO_4 和 0.05 mmol/L 钼酸铵。另外,据实验要求加入 MgSO_4 、KCl、KBr 与 KI 等试剂。

1.3.3 NADH 和 NADPH 氧化速率的测定^[12] 将反应介质(蔗糖 0.25 mol/L, Tris—Mes 10 mmol/L pH 8.0)置于 1 ml (光径 1 cm) 石英比色杯中,加入 50 mmol/L 的 NADH 5 μl 和 100 mmol/L 的 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 10 μl ,最后加入膜制剂(含 10 μg 膜蛋白)开始反应。用岛津 UV - 190 型双光束分光光度计记录 340 nm 消光系数。以不加膜制剂的为空白,按 NADH 1 mmol/L 的消光系数为 6.23 计算 NADH 的氧化速率。NADPH 的氧化速率测定同 NADH。

1.3.4 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 和 EDTA - Fe^{3+} 还原速率的测定^[13] 与 NADH 氧化速率测定方法相同。只是测定波长改为 420 nm。按 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 1 mmol/L 消光系数为 1 计算 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 的还原速率。将上述相同反应介质与 NADH、100 mmol/L 的非啉 10 μl 和 100 mmol/L 的 EDTA - Fe^{3+} 10 μl 加到比色杯中,加入含 10 μg 膜蛋白的膜制剂开始反应。以不加膜制剂为空白,测定 535 nm 消光系数。用亚铁盐配制标准曲线,计算 EDTA - Fe^{3+} 还原速率。

1.3.5 GSH 和 Vc 氧化速率的测定^[12] GSH 测定方法同 NADH,波长为 420 nm;Vc 测定方法同 GSH。

1.3.6 数据分析 采用 SPSS 数据处理系统软件分析处理间的差异显著性。

2 结果与分析

2.1 水分胁迫对质膜 ATPase 活性的影响

如表 1 所示,随着水分胁迫程度的增加,早酥梨、杜梨幼树叶片质膜 ATPase 活性不断增高。在轻度胁迫时,早酥梨、杜梨质膜 ATPase 活性分别较对照增加了 54% 和 22.9%,其中,不抗旱的早酥梨与对照差异显著,而抗旱性较强的杜梨在轻度胁迫下与对照相比差异不显著;中度胁迫时,早酥梨、杜梨质膜 ATPase 活性分别较对照增加了 97% 和 32.6%,早酥梨与对照差异显著,而杜梨较对照依然没有达到差异显著的水平;当重度胁迫时,早酥梨、杜梨质膜 ATPase 活性与对照相比均呈显著差异。显然,经水分胁迫后质膜 ATPase 活性发生了变化,且不抗旱的早酥梨比抗旱性较强的杜梨增长率高得多。

表 1 水分胁迫对质膜 ATPase 活性的影响 [$\mu\text{g Pi}/(\text{mg} \cdot \text{min})$]

Table 1 The influence of water stress on ATPase activity of plasmic membrane				
项目 Items	早酥梨 Crisp pear tree	增长率 Increase rate(%)	杜梨 Birchleaf pear tree	增长率 Increase rate(%)
对照 CK	35.46	100a	38.66	100a
轻度胁迫 Mild water stress	51.87	154b	46.78	122.9a
中度胁迫 Moderate water stress	69.36	197b	52.69	132.6a
重度胁迫 Severe water stress	74.61	204c	60.34	140.4b

注:不同字母为 $P < 0.05$ 下差异显著。
Note: Different letters mean significance of difference at 0.05 levels ($P < 0.05$).

2.2 水分胁迫对 NADH 和 NADPH 氧化速率的影响

如表 2 所示,早酥梨和杜梨表现出一致的变化趋势。在轻度胁迫条件下,NADH 和 NADPH 的氧化速率对初期轻微的胁迫不敏感且略有增加。这可能是在干旱初期,细胞内的保护酶类活性增加,使细胞能维持正常的代谢而保证较高的 NADH 和 NADPH 水平。但随着胁迫强度的增加,细胞内产生较多的自由基,是代谢失调、质膜受到损伤、呼吸作用减弱而使电子供体 NADH 和 NADPH 含量下降所致。试验结果还表明:早酥梨和杜梨 NADH 和 NADPH 氧化速率的变化幅度存在明显的差异。耐旱的杜梨在水分胁迫初期,其氧化速率基本没有多大的变化,在以后的胁迫进程中,尽管其氧化速率有所下降,但是比较平缓。而不耐旱的早酥梨在干旱初期呈上升趋势,随着干旱的加重氧化速率明显下降。

表 2 水分胁迫对 NADH 与 NADPH 氧化速率的影响 [$\text{nmol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$]

Table 2 The influence of water stress on the oxidation rate of NADH and NADPH				
项目 Items	早酥梨 Crisp pear tree		杜梨 Birchleaf pear tree	
	NADH	NADPH	NADH	NADPH
对照 CK	204.00aA	98.36aA	186.32aA	84.46aA
轻度胁迫 Mild water stress	218.36aA	112.21aA	201.22aA	101.2aA
中度胁迫 Moderate water stress	78.45bB	69.23bB	59.32bB	52.11bB
重度胁迫 Severe water stress	56.23bB	50.00bB	50.00bB	40.16bB

注:不同小写字母为 $P < 0.05$ 下差异显著,不同大写字母为 $P < 0.01$ 下差异显著。下同。
Note: Different lowercase letters mean significance of difference at 0.05 levels ($P < 0.05$), different capital letters mean significance of difference at 0.01 levels ($P < 0.01$). The same as below.

由此可见,梨在水分胁迫条件下,质膜 NADH 与 NADPH 氧化速率与胁迫强度密切相关。总的趋势是氧化速率在轻度胁迫时有所增加,但随着胁迫强度的增强,NADH 与 NADPH 氧化速率较对照持续下降,在中度胁迫前已大幅度下降。

2.3 干旱对 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{(3-)}$ 和 $\text{EDTA}-\text{Fe}^{3+}$ 还原速率的影响

水分胁迫对质膜氧化还原系统的影响还表现在对 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{(3-)}$ 和 $\text{EDTA}-\text{Fe}^{3+}$ 还原速率的影响。从表 3 可以看出,以 NADH 作为电子供体时的 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{(3-)}$ 和 $\text{EDTA}-\text{Fe}^{3+}$ 的还原速率均受到影响。

轻度胁迫还原速率下降较少,但是,从轻度胁迫到中度胁迫这一过程,其还原速率急剧下降。在中度胁迫以后,其还原速率又平缓下降。 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{(3-)}$ 和 $\text{EDTA}-\text{Fe}^{3+}$ 作为电子受体在干旱进程中还原速率下降,这可能是由于在水分胁迫下生物氧化过程受阻,其质膜上的一些电子传递体合成减弱,分解加快,从而使电子传递受阻,酶活性下降,以至使 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{(3-)}$ 和 $\text{EDTA}-\text{Fe}^{3+}$ 的还原速率降低。抗旱的杜梨在整个胁迫过程中其电子受体还原速率的下降幅度低于早酥梨。从以上研究可看出,杜梨在胁迫进程中受害程度低于早酥梨。

表 3 水分胁迫对 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{(3-)}$ 与 $\text{EDTA}-\text{Fe}^{3+}$ 还原速率的影响[$\text{nmol}/(\text{mg}\cdot\text{min})$]
Table 3 The influence of water stress on the deoxidation rate of $\text{EDTA}-\text{Fe}^{3+}$ and $\text{Fe}(\text{CN})_6^{(3-)}$

项 目 Items	早酥梨 Crisp pear tree		杜梨 Birchleaf pear tree	
	$\text{Fe}(\text{CN})_6^{(3-)}$	$\text{EDTA}-\text{Fe}^{3+}$	$\text{Fe}(\text{CN})_6^{(3-)}$	$\text{EDTA}-\text{Fe}^{3+}$
对照 CK	496.21aA	480.21aA	420.23aA	396.42aA
轻度胁迫 Mild water stress	434.21aA	421.36aA	398.26aA	345.42aA
中度胁迫 Moderate water stress	107.32bB	121.36bB	158.21bB	132.21bB
重度胁迫 Severe water stress	90.12bB	84.23bB	132.21bB	140.20bB

2.4 水分胁迫对 GSH 和 Vc 氧化速率的影响

干旱进程中早酥梨和杜梨的 GSH 和 Vc 氧化速率变化趋势是一致的,如表 4 所示:在胁迫初期,其氧化速率均缓慢上升,但随着胁迫程度的增加,其氧化速率急剧升高。从本实验也可以看出:虽然两种梨树的 GSH 和 Vc 氧化速率随着胁迫程度的增加其变化规律基本相同,但其变化幅度因为种类的不同而存在差异。杜梨在整个胁迫过程中 GSH 和 Vc 的

氧化速率均明显低于早酥梨。可见在干旱进程中作为质膜氧化还原系统的天然电子供体,其氧化速率升高。究其原因,可能是为了保证电子的正常传递,来适应干旱。不抗旱的早酥梨对干旱由于具有较弱的抵御能力和适应机制,所以 GSH 和 Vc 作为电子供体时其氧化速率增加幅度较大,而抗旱的杜梨则恰好相反。

表 4 水分胁迫对 GSH 和 Vc 氧化速率的影响
Table 4 The influence of water stress on the oxidation rate of GSH and Vc

项目 Items	GSH 的氧化速率[$\mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{min})$] The oxidation rate of GSH				Vc 的氧化速率[$\mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{min})$] The oxidation rate of Vc			
	对照 CK	轻度 Mild	中度 Moderate	重度 Severe	对照 CK	轻度 Mild	中度 Moderate	重度 Severe
早酥梨 Crisp pear tree	62.34aA	70.58aA	93.46bB	110.24bB	51.36aA	55.87aA	72.31bB	90.59bB
杜梨 Birchleaf pear tree	58.46aA	60.57aA	69.86aA	74.57aA	42.10aA	47.86aA	58.58bB	67.87bB

3 讨 论

逆境条件下,质膜的结构、组成和功能受到很大的影响^[3]。根据已有的研究资料可以确定在体内和体外,质膜上都存在氧化还原系统。最常使用的电子供体是 NAD(P)H 和亚铁氰化物,电子受体是铁氰化物和 $\text{Fe}^{3+}-\text{EDTA}$ 。本实验发现水分胁迫也影响质膜氧化还原系统的运转,使质膜的 NADH 和

NADPH 以及 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 和 $\text{EDTA}-\text{Fe}^{3+}$ 的还原都大幅度下降(表 2、3)。水分胁迫引起的 NADH 和 NADPH 氧化速率降低的程度相似,暗示水分胁迫对 NADH 和 NADPH 氧化的影响机制可能相同。

Hsiao^[14]认为参照胁迫严重程度和时间进程研究植物对水分胁迫的响应更为有效。我们采用这种处理方式研究了不同梨种类对水分亏缺的反应性和适应性,同时发现了抗旱性较强的杜梨与抗旱较弱

的早酥梨对水分亏缺反应程度的差异。并在实验中发现质膜氧化还原系统中 NADH 和 NADPH 的氧化速率、EDTA-Fe³⁺ 和 Fe(CN)₆³⁻ 的还原速率变化能力不同是以上差异之一。Mcpller 和 Crane 研究表明^[15], 质膜氧化还原系统是多途径的: 通常以 NADH 和 NADPH 为电子供体, 还原 Fe(CN)₆³⁻, 但不能还原 EDTA-Fe³⁺, 被称为标准系统, 缺铁可以诱导另一种为 Turbo 系统的质膜氧化还原系统, 该系统以 NADH 为电子供体, 还原 EDTA-Fe³⁺ 和 Fe(CN)₆³⁻。表 3 的研究结果表明, 在以 NADH 为电子供体时, EDTA-Fe³⁺ 和 Fe(CN)₆³⁻ 都可以作为电子受体被还原, 却不需要经过缺铁培养。显然, 本文实验获得的质膜氧化还原系统与 Mcpller 等提出的标准系统和 Turbo 系统不同。Misra 研究表明^[16], 除 NADH 和 NADPH 外, GSH 和 Vc 也可以作为质膜氧化还原系统的电子供体。本实验还发现随着胁迫程度的增加 GSH 和 Vc 的氧化速率均增加, 所以可能是在水分胁迫下 GSH 和 Vc 是 NADH 作为质膜氧化还原系统电子供体的替代物质, 至于是否还有其它物质, 尚需进一步研究。

参考文献:

- [1] 山 仓. 植物水分亏缺和半干旱地区农业生产中的植物水分问题[J]. 植物生理生化进展, 1983, (1): 108—119.
- [2] Oren-Shamir M, Pick U, Avron M. Involvement of the plasma membrane ATPase in the osmoregulatory mechanism of the alga *Dunaliella salina*[J]. Plant Physiol, 1989, (89): 1258—1263.
- [3] 邱全胜, 李 琳, 梁厚果, 等. 水分胁迫对小麦根细胞质膜氧化还原系统的影响[J]. 植物生理学报, 1994, 20(2): 145—1511.
- [4] Zhao S, Colombo S J, Blumwald E. The induction of freezing tolerance in jack pine seedlings: the role of root plasma membrane H⁺ OAT-Pase and redox activities[J]. Physiol Plant, 1995, 93: 55—601.
- [5] 宫海军, 陈坤明, 陈国仓, 等. 匪巨国西北植物学报春小麦叶片质膜氧化还原系统及其对缓慢干旱胁迫的响应[J]. 西北植物学报, 2003, 23(2): 229—234.
- [6] 孙光闻, 朱祝军, 陈日远, 等. 镉对小白菜根细胞质膜氧化还原系统的影响[J]. 华北农学报, 2007, 22(3): 65—67.
- [7] 刘慧英. 嫁接影响西瓜果实品质和幼苗耐冷性的生理机制研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2003.
- [8] 许 勇, 张海英, 康国斌, 等. 西瓜野生种质幼苗耐冷性的生理生化特性与遗传研究[J]. 华北农学报, 2000, 15(2): 67—711.
- [9] 曹翠玲, 高俊凤, 曹 薇. 小麦根细胞质膜氧化还原系统对干旱胁迫反应与 K⁺ 累积的关系[J]. 西北农业大学学报, 1996, 24(3): 25—291.
- [10] 郑桂珍, 关军锋, 李广敏. 渗透胁迫对小麦根、胚芽生长及其质膜氧化还原系统的影响[J]. 中国生态农业学报, 2003, 11(3): 48—501.
- [11] 焦新之, 倪晋山. 水稻及燕麦根细胞的原生质膜、线粒体内膜与液泡膜 ATPase 的比较研究[J]. 实验生物学报, 1988, 21(4): 409—414.
- [12] 焦新之, 李 琳, 黄丽萍, 等. 花生下胚轴组织 H⁺ 分泌与质膜氧化还原系统的某些特性[J]. 植物生理学报, 1991, 17(1): 49—55.
- [13] 陈思学, 李 琳, 颜季琼, 等. 杜氏盐藻细胞质膜氧化还原系统与 K⁺ 吸收[J]. 植物学报, 1996, 38(4): 295—301.
- [14] Hsiao T C. Plant responses to water stress[J]. Plant Physiol, 1973, (24): 519—570.
- [15] Mqller I M, Crane F L. Redox processes in the plant plasma membrane[C]. //Larsson C, Moller I M. The plant plasma membrane: structure, function and molecular biology. Berlin: Springer-Verlag, 1990: 93—126.
- [16] Misra P C. Transplasma membrane electron transport in plants[J]. J Bioenerg Biomemb, 1991, 23: 425—442.

The influence of water stress on redox system of leaf plasmic membrane of pear trees

WANG Guo-ze

(School of Mathematical, Physical Sciences and Biological Engineering, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou, Inner Mongolia 014010, China)

Abstract: The basic physiological index of redox system of leaf plasmic membrane were studied on two varieties of pear trees, *P. bretschneideri* cv. Zao Su and *P. betulofolia*. Bqe. The result showed that water stress could increase ATPase activity, reduce both the oxidation rate of NADH and NADPH and the deoxidation rate of EDTA-Fe³⁺ and Fe(CN)₆⁽³⁻⁾ of plasmic membrane. When water stress occurred, the oxidation rate of GSH and vitamin C (Vc) obviously increased, which indicated that GSH and Vc could be as electron donor of redox system of plasmic membrane besides NADH and NADPH in the leaves of young crisp pear trees. Probably under water stress condition, GSH and Vc could replace NADH and NADPH, acting as electron donor of redox system of plasmic membrane.

Key words: water stress; crisp pear; birchleaf pear; redox system of plasmic membrane