

干旱胁迫下蚕豆叶片抗氧化酶活性的变化

武永军¹, 项 燕¹, 曹 让¹, 王培先¹, 梁宗锁^{1,2}

(1. 西北农林科技大学生命科学院, 陕西 杨凌 712100; 2. 中国科学院水土保持研究所, 陕西 杨凌 712100)

摘 要: 抗氧化防御系统在植物抗旱中发挥着极大的作用。本试验采用 PEG 胁迫和叶片 35℃ 烘干处理的方法, 研究了模拟干旱胁迫条件下蚕豆叶片 SOD、POD、CAT 活性变化。结果表明, 三种抗氧化酶随胁迫时间的延长活性升高; 随胁迫程度增加 SOD 活性降低, POD 和 CAT 活性变化规律性不明显。总体而言, SOD 活性对胁迫的耐受性更强。

关键词: 蚕豆; 抗旱; 水分胁迫; 抗氧化酶

中图分类号: Q945.78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7601(2009)05-0188-03

自由基是机体正常代谢产物, 包括氢氧根负离子(OH⁻)、羟基自由基(·OH)、过氧化氢(H₂O₂)、超氧阴离子自由基(O₂⁻)、单线态氧(¹O₂)等。植物在正常生长情况下由于机体内存在防御系统, 其自由基代谢保持平衡状态^[1]。在水分胁迫等逆境条件下, 活性氧的代谢平衡被打破, 活性氧积累增多, 对植物造成多种伤害。例如, 生物膜损伤, 细胞膜透性改变, 酶蛋白失活, DNA 损伤等^[2~4]。

抗氧化防御系统在植物抗旱中发挥着极大的作用, 包括抗氧化酶类和抗氧化非酶物质。抗氧化酶类, 包括超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)、抗坏血酸过氧化物酶(APS)、谷胱甘肽还原酶(GR)等^[5,6]。超氧化物歧化酶(SOD)催化 O₂⁻ 转化为 H₂O₂ 和 O₂ 的反应, 是活性氧(O₂⁻)的净化剂^[7]。CAT 主要负责清除 H₂O₂, POD 也是负责清除 H₂O₂ 的一种主要保护酶^[8,9]。

活性氧清除系统及活性氧信号作用在植物对胁迫响应中的反应是极为复杂的, 植物品种的差异、胁迫方式(低温、高温、水分胁迫、化学试剂等)和胁迫程度强弱都能破坏活性氧代谢平衡, 而且不同的酶对胁迫的响应方式也不尽相同。人们对这一问题的认识仍不是特别明确; 加之多数实验结论来自于实验室培养的植物生长的某一阶段, 因此, 结论也存在差异^[10]。由于蚕豆(*Vicia faba* L.) 叶片上下表皮都比较容易撕取, 所以多年来一直是研究气孔生物学的一种模式材料^[11]。为了研究干旱胁迫下蚕豆叶片的信号转导途径, 我们采用根系水分胁迫和对叶片烘干处理的方式首先研究了叶片抗氧化酶的变

化, 为后续研究提供支持。

1 材料与方法

1.1 供试材料的培养

选取饱满的蚕豆种子(*Vicia faba* L. Lincan No. 5), 先用清水搓洗数遍, 浸泡 12 h, 然后摆放到铺有滤纸的培养皿中, 上盖湿纱布待其发芽。种子发芽后, 移植到培养槽中用 1/2 Hoagland 营养液培养, 间隔为 10 cm 左右; 每两天换一次营养液, 早八点和晚六点分别通气一次, 每次两小时。培养槽置于光照培养箱中, 昼夜温差 25/18℃, 光强 30 μmol/(m²·s), 相对湿度 80%。蚕豆长出 3 对叶片时使用 PEG 溶液进行水分胁迫处理和各项指标测定。

1.2 试验处理和取材

分别用 -0.2、-0.3、-0.5 MPa PEG 溶液进行胁迫处理 5 h、12 h, 35℃ 蚕豆叶片烘干 10 min、30 min, 以不加胁迫液处理(0 MPa PEG)为对照(CK)分别对各处理叶片进行相关酶活性测定。

1.3 测定项目和测定方法

SOD、POD 和 CAT 活性测定参照高俊凤等方法^[12]。

2 结果与分析

2.1 PEG 胁迫对蚕豆叶片 SOD 活性的影响

图 1 显示, 在 PEG 溶液处理下, 随着处理时间的延长, 蚕豆叶片中的 SOD 活性均有所增加。随着 PEG 浓度的增加, 相同处理时间下蚕豆叶片 SOD 活性有降低趋势。此外, -0.2 MPa PEG 处理下的蚕豆叶片 SOD 活性高于对照, 也高于其他较高浓度处

收稿日期: 2009-02-20

基金项目: 国家自然科学基金(30600384); 西北农林科技大学青年骨干支持项目

作者简介: 武永军(1974-), 男, 硕士, 讲师, 主要从事植物应对非生物胁迫的信号转导和分子遗传机制研究。E-mail: yongjunwu2005@yahoo.com.cn

理下的蚕豆叶片中 SOD 活性。这可能是因为 -0.3 MPa PEG 和 -0.5 MPa PEG 的处理对植株的胁迫强度较大,植株处于萎蔫状态,酶蛋白因极度缺水而分解或失活。

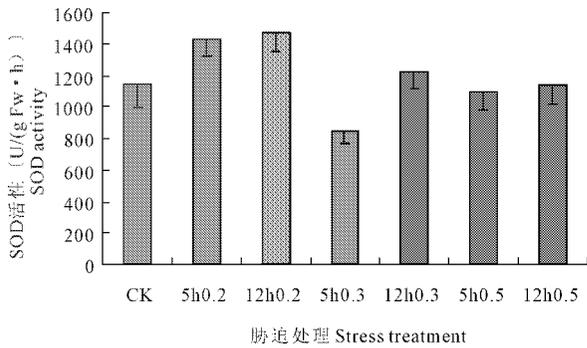


图 1 PEG 胁迫处理下蚕豆叶片 SOD 活性变化

Fig.1 Influence of PEG stress on SOD activity of *Vicia faba*

从图 2 可以看出随着烘干时间的延长, SOD 活性呈现出先升后降的走势。可能是因为,胁迫之初干旱胁迫产生的自由基作为底物诱导或激活了抗氧化酶活性。而随着 SOD 活性的增加,自由基的量又迅速减少,自由基的减少反过来又使 SOD 活性降低。

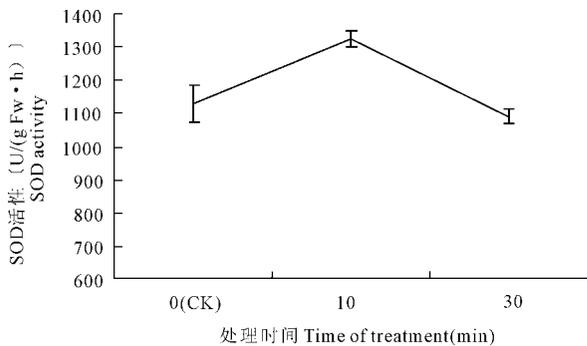


图 2 35°C 叶片烘干处理对蚕豆 SOD 活性影响

Fig.2 Influence of 35°C baking treatment on SOD activity of *Vicia faba*

2.2 PEG 胁迫对蚕豆叶片 POD 活性的影响

SOD 的产物 H_2O_2 就是 POD 的底物,所以二者的活性呈现出正相关,这与本实验结果相符,也支持上述有关 SOD 的分析。在烘干处理下(图 4),POD 活性的变化也和 SOD 一致。

通过与 SOD 活性比较可以发现,对照组的 POD 活性始终高于处理的活性,而 -0.2 MPa PEG 处理下的 SOD 活性高于对照组和其它处理。

对此我们认为有两种可能的原因:一种可能是因为酶底物不同,干旱的不同时期或不同程度下产生的底物不同, -0.2 MPa PEG 下产生了适合 SOD 的诱导底物。另一种可能是由于酶在热、酸碱、浓盐

等情况下容易失活分解,也即 POD 对胁迫的耐性没有 SOD 高。

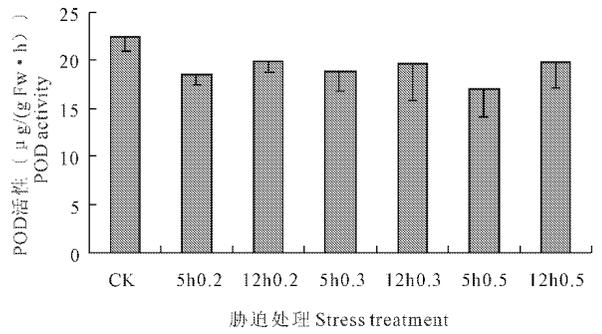


图 3 PEG 胁迫处理下蚕豆叶片 POD 活性变化

Fig.3 Influence of PEG stress on POD activity of *Vicia faba*

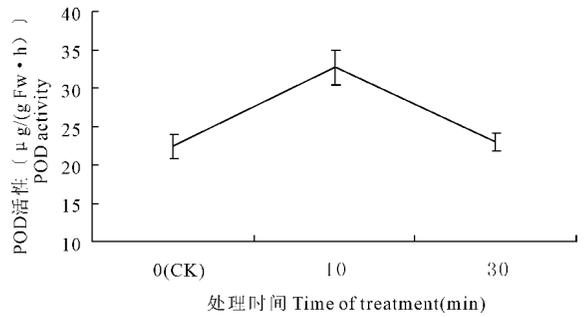


图 4 35°C 叶片烘干处理对蚕豆 POD 活性影响

Fig.4 Influence of 35°C baking treatment on POD activity of *Vicia faba*

2.3 PEG 胁迫对蚕豆叶片 CAT 活性的影响

如图 5,相同 PEG 浓度处理下随着处理时间的延长 CAT 活性在升高,但是不同浓度处理间的 CAT 活性变化规律不明显。但和对照相比,可以看出 CAT 对缺水的耐性可能比 POD 更小。

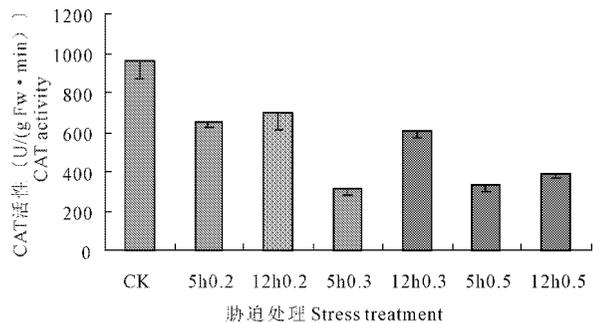


图 5 PEG 整株处理对蚕豆叶片 CAT 活性影响

Fig.5 Influence of PEG stress on CAT activity of *Vicia faba*

烘干处理下的 CAT 活性同其它两个酶活性变化差别也较大。由图 6 可以看出,在 10 min 时 CAT 活性已经在下降了,而在 10 min 和 30 min 之间的下降却不十分明显。说明在 10 min 之前 CAT 活性已经由上调转为下降,表明 CAT 容易失活的特征。

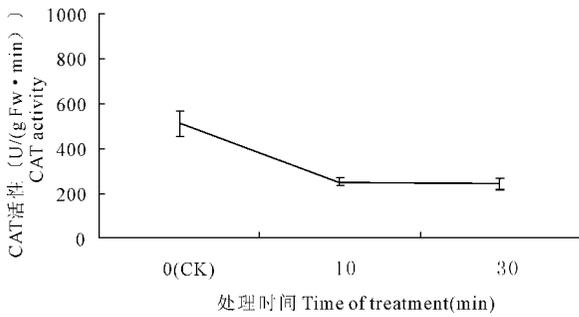


图 6 35℃ 叶片烘干处理对蚕豆 CAT 活性影响

Fig. 6 Influence of 35℃ baking treatment on CAT activity of *Vicia faba*

3 讨论

3.1 叶片烘干处理

胁迫持续的过程也是植物对抗和适应胁迫并进行自我调节的过程。图 2、图 4 显示了植物在遭遇水分胁迫时调节适应的过程。从叶片烘干处理下 SOD 和 POD 的活性可以看出,抗氧化酶活性随胁迫加重呈先升后降的变化;而 CAT 在 10 min 和 30 min 之间的下降不明显说明在 10 min 时已经严重失活。表明 SOD 对缺水的耐性比 POD 强,而 CAT 最容易失活,这也与前人的报道相一致^[13]。

3.2 PEG 处理整株蚕豆

在 PEG 处理下的几个指标的观察分析中,这几组数据有一个共同点:在时间梯度上抗氧化酶活性都有上升趋势但上升幅度又往往不太大,抗氧化酶活性和胁迫程度呈现微弱的正相关;但在浓度梯度上抗氧化酶活性却呈现下降趋势,而且对照的 POD 和 CAT 活性明显高于处理组。

本研究中对蚕豆适应不同 PEG 处理所需要的时间只分为 5 h 和 12 h 两个时间段。抗氧化酶随着时间的延长是上升的,据此推测 5 h 时植物已经初步适应了这几个浓度的胁迫、或者蚕豆的代谢调节已接近平衡状态,在时间延长到 12 h 过程中胁迫的程度稍有增加,使得抗氧化酶活性有小幅上调。严重胁迫下抗氧化酶变得很不稳定,开始失活和分解,从而使实验结果中酶失活的动力学趋势掩盖了植物响应干旱胁迫时酶活调节的动力学规律。

SOD 对缺水的耐性相对强一些^[13],在 -0.2 MPa PEG 的胁迫下保持高活性,出现了高于对照组的活性。同时还可以看出:SOD 活性在 -0.3 MPa PEG 和 -0.5 MPa PEG 胁迫下的下降幅度也相对较小。而 CAT 活性在处理后降低幅度最大,可能已经接近缺水分解的最低限,CAT 活性在时间梯度下虽然有上调的趋势,但幅度却参差不齐,同时浓度梯度

对比下的酶活调节趋势也变得相对不明显。这也正好印证了如上所述酶失活的推测。

研究表明抗氧化酶在胁迫下随胁迫强度加重都有先升后降的对应关系^[14]。如果在设置试验的材料处理时所有的处理强度都分布在最高值的一边,试验结果就有可能出现单独上升或单独下降的结果。本试验结果还说明,同一批处理组中的蚕豆抗氧化酶活性在时间和 PEG 浓度两个梯度上分别表现出了不同的走势。在设计试验时这两个梯度我们是都作为胁迫强度的梯度来设置的。由此看来,“胁迫强度”是一个很笼统的词。所以在抗旱研究材料的处理时,需要对不同的胁迫方式和相应的胁迫梯度精确地加以细分和控制,因为植物对它们的响应机制还有响应程度都有可能是大相径庭的。

参考文献:

- [1] MoCord J M. Superoxide dismutase: An enzymic function for erythrocyte[J]. *Biol. Chem.*, 1969, 22, 6049—6055.
- [2] 康绍忠. 新的农业科技革命与 21 世纪我国节水农业的发展[J]. *干旱地区农业研究*, 1998, 16(1): 11—17.
- [3] Carlos G B, Facundo G, Dana E M, et al. Mitochondria are the main target for oxidative damage in leaves of wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2004, 55: 403—407.
- [4] Wu Yue-Xuan, Andreas V T. Physiological Effects of Azoxystrobin and Epoxiconazole on Senescence and the Oxidative Status of Wheat [J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2001, 71: 1—10.
- [5] Salin M L. Toxic oxygen species and protective systems of the chloroplast [J]. *Physiol. Plant*, 1987, 72: 681—689.
- [6] Asada K. Ascorbate peroxidase—a hydrogen peroxide scavenging enzyme in plants [J]. *Physiol. Plant*, 1992, 85: 235—241.
- [7] Fridovich I. Superoxide dismutase [J]. *Ann Rev. Biochem.*, 1975, 44: 147—159.
- [8] Ramiro H L, Mariana N M, Celina M L, et al. Effect of photooxidative stress induced by paraquat in two wheat cultivars with differential tolerance to water stress [J]. *Plant Science*, 2003, 164: 841—848.
- [9] 蒋明义, 荆家海, 王韶唐. 渗透胁迫对水稻幼苗膜脂过氧化及体内保护酶系统的影响 [J]. *植物生理学报*, 1991, 17(1): 80—84.
- [10] 陈坤明, 宫海军, 陈国仓, 等. 春小麦不同发育阶段抗氧化系统对田间缓慢干旱的响应 [J]. *西北植物学报*, 2003, 23(9): 1497—1505.
- [11] Melhorn V, Matsumi K, Koiwai H, et al. Transient expression of *AtNCED3* and *AAO3* genes in guard cells causes stomatal closure in *Vicia faba* [J]. *Journal of Plant Research*, 2008, 121(1): 125—131.
- [12] 高俊风. 植物生理学实验技术 [M]. 西安: 世界图书出版公司, 2000.
- [13] 刘缠民, 蒋继宏, 冯照军, 等. 日本黑褐蚁营养成分分析及两种脱水方法对其 SOD、POD、CAT 活力的影响 [J]. *信阳师范学院学报*, 2001, 14(2): 201—203.
- [14] 齐秀东, 孙海军, 郭守华. SOD—POD 活性在小麦抗旱生理研究中的指向作用 [J]. *中国农学通报*, 2005, 21(6): 230—232.

(英文摘要下转第 195 页)

- [2] 毛桂莲,徐兴.枸杞耐盐突变体的筛选及生理生化分析[J].西北植物学报,2005,25(2):275-280.
- [3] 田敏.植物细胞中的活性氧及其生理作用[J].植物学通讯,2005,41(2):235-241.
- [4] ALLEN R D. Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants[J]. Plant Physiol, 1995,107:1049-1054.
- [5] 郝再彬,苍晶.植物生理实验[M].哈尔滨:哈尔滨工业大学出版社,2004:60-63.
- [6] 王爱国,罗广华.植物产生 O_2^- 速率的测定[J].植物生理学通讯,1990,26(6):55-57.
- [7] 邹琦.植物生理生化实验指导[M].北京:中国农业出版社,1995:55-58.
- [8] 高俊凤.植物生理学实验指导[M].北京:高等教育出版社,2000:145-148.
- [9] 蒋明义,郭绍川.水分亏缺诱导的氧化胁迫和植物的抗氧化作用[J].植物生理学报,1996,22(2):144-150.
- [10] Cheeseman J M. Mechanism of salinity tolerance in plants[J]. Plant Physiol, 1988,87:547-550.
- [11] KE Y Q, PAN T G. Effect of salt stress on the ultrastructure of chloroplast and the activities of some protective enzymes in leaves of sweet potato[J]. Acta Phytophysiol Sin, 1999,25(3):229-233.
- [12] Liu H T, Li B, Shang Z L, et al. Calmodulin is involved in heat shock signal transduction in wheat. Plant physiol, 2003,132:1186-1195.
- [13] 高洪波,郭世荣,刘艳红,等.低氧胁迫下 Ca^{2+} 、 La^{3+} 和 EGTA 对网纹甜瓜幼苗活性氧代谢的影响[J].南京农业大学学报,2005,28(2):17-21.
- [14] Neill S, Desikan R, Hancock J. Hydrogen peroxide signaling[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2002,(5):388-395.
- [15] Karpinski S, Reynolds H, Karpinska B, et al. Systemic signaling and acclimation in response to excess excitation energy in Arabidopsis [J]. Science, 1999,284:654-657.

Effects of exogenous Ca^{2+} and H_2O_2 on active oxygen metabolism of isolated leaves of *Lycium barbarum* L. chloroplast under NaCl stress

MAO Gui-lian, FU Xiao-hui

(Life Science Academy of Ningxia College, Yinchuan, Ningxia 750021, China)

Abstract: In this study, the effects of exogenous calcium and H_2O_2 on the activity of oxygen (O_2^-) themalondialdehyde content (MDA), the activity of superoxide dismutase (SOD), the activity of peroxide (POD), catalase (CAT) and antiscorbutic acid peroxide enzyme (APX) were examined in *Lycium barbarum* L. chloroplast under NaCl stress. The results indicated that, under NaCl stress, O_2^- production rate and MDA content generally increased, meanwhile CAT and POD activities were also higher than those of control. When adding exogenous Ca^{2+} and H_2O_2 under NaCl stress, MDA content and O_2^- production rate were slower than those of NaCl stress, while protecting enzyme APX, CAT and POD activities increased compared to NaCl stress. It indicated that exogenous Ca^{2+} and H_2O_2 alleviated NaCl stress injury to plants to some extent.

Keywords: *Lycium barbarum* L.; exogenous Ca^{2+} and H_2O_2 ; NaCl stress; active oxygen metabolism

(上接第 190 页)

Activities of antioxidative enzymes of *Vicia faba* under PEG stress

WU Yong-jun¹, XIANG Yan¹, CAO Rang¹, WANG Pei-xian¹, LIANG Zong-suo^{1,2}

(1. College of Life Sciences, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2. Institute of Soil and Water Conservation, CAS, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Antioxidative defense system plays important roles in drought resistance of plants. In this study, we investigated the changes of SOD, POD and CAT of *Vicia faba* leaves using PEG treatment and leaf baken methods. The results showed that the activity of SOD, POD and CAT all increased during the course of PEG treatment. SOD activity decreased with increasing stress degree, POD and CAT activity showed no obvious tendency. In total, SOD has more tolerance among three antioxidative enzymes.

Keywords: *Vicia faba*; drought resistance; water stress; antioxidative enzymes