

不同热激处理对菊花抗氧化相关酶活性的影响

王 毅, 陈 蕤 坤, 朱 勋 路, 莫 明 雅, 徐 莺, 陈 放

(生物资源与生态环境教育部重点实验室, 四川大学 生命科学学院, 四川 成都 610064)

摘 要: 以观赏菊花为试验材料, 研究 45℃胁迫、35℃预热锻炼、0.5 mM 水杨酸处理以及水处理对其叶片超氧化物歧化酶、过氧化物酶、过氧化氢酶活性的影响。结果表明: 3 种酶活性均表现出下降的趋势, 其中 POD 和 CAT 活性变化较为一致, 与对照相比, 下降程度从小到大依次为直接胁迫< 热激锻炼< 水处理< 水杨酸处理; 而 SOD 下降程度从小到大则为热激锻炼< 直接胁迫< 水处理< 水杨酸处理。3 种酶活性均表现为水杨酸处理的下降程度最大, 且形态表现与生理变化一致。

关键词: 菊花; 热胁迫; 活性氧; 超氧化物歧化酶; 过氧化物酶; 过氧化氢酶

中图分类号: S 682.1⁺1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)09-0098-04

第一作者简介: 王毅(1986-), 女, 四川成都人, 在读硕士, 研究方向为园林生物技术。

通讯作者: 徐莺(1968-), 女, 博士, 副教授, 现主要从事园林植物生物技术等研究工作。

收稿日期: 2010-01-08

菊花(*Chrysanthemum morifolium*)为菊科菊属草本花卉, 是我国十大传统名花之一。其在布置园林和美化环境方面具有重要价值, 同时, 还具有可食、可饮、可药等多种用途^[1]。然而, 菊花性喜温和冷凉气候, 忌酷暑炎热天气, 最适生长温度为 15~25℃, 32℃以上则生长缓慢^[2]。近年来, 全球变暖趋势日益加剧, 全国许多地

[7] 吴志华, 曾富华, 马生健等. 水分胁迫下植物活性氧代谢研究进展(综述)[J]. 亚热带植物科学, 2004, 33(2): 77-80.

[8] 王洪春. 植物抗性生理[J]. 植物生理学通讯, 1981, 17(2): 72-81.

[9] 吕庆, 郑荣梁. 干旱及活性氧引起小麦膜脂过氧化与脱脂化[J]. 中国科学 C 辑, 1996, 26(1): 26-30.

[10] 沈秀瑛, 徐世昌, 戴俊英. 干旱对玉米 SOD、CAT 及酸性磷酸酶活性的影响[J]. 植物生理学通讯, 1995, 3(3): 183-186.

[11] Bowler C, VAN M, Inze D. Superoxide dismutase and stress tolerance[J]. Annu Rev Plant mol Biol, 1992, 43: 83-116.

[12] 孔兰静, 李红双, 张志国. 三种观赏草对土壤干旱胁迫的生理响应[J]. 中国草地学报, 2008, 30(4): 40-45.

[13] 陈庆华. 干旱胁迫对大豆苗期叶片保护酶活性和膜脂过氧化作用的影响[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(14): 6396-6398.

[14] 赵黎芳, 张金政, 张启翔, 等. 水分胁迫下扶芳藤幼苗保护酶活性和渗透调节物质的变化[J]. 植物研究, 2003, 23(4): 437-442.

Influences of Drought Stress on Membrane Lipid Peroxidation and Antioxidative Activity in Groun-cover Chrysanthemum Seedling

SHI Li-ran¹, CHEN Hong-yan², CUI Xing-guo¹

(1. Department of Life Science, Hengshui University, Hengshui, Hebei 053000; 2. College of Life Sciences Northwest Agricultural and Forestry University, Yangling, Shanxi 712100)

Abstract: To study the drought-tolerant ability, the membrane lipid peroxidation and antioxidative activity of leaf in groun-cover chrysanthemum seedlings were measured in drought stress with pot culture experiments simulating different soil water status. The results showed that the plasma membrane permeability and malondialdehyde content did not change significantly, but gradually increased with the aggravation of drought stress. The activities of superoxide dismutase(SOD) and catalase(CAT) increased under lightly and moderate drought stress, and then dropped under severe water stress. The activity of POD kept increasing. Based on the results above we concluded that groun-cover chrysanthemum show high adaptability to drought stress.

Key words: groun-cover chrysanthemum; drought stress; plasma membrane permeability; malondialdehyde; antioxidative

区, 7~9 月份气温均高达 35℃以上且持续多日, 对菊花营养生长和花芽分化造成严重伤害³, 导致其长势不良, 叶片变小, 边缘出现不规则褶皱, 开花质量差甚至不开花等, 使得很多优良性状难以得到发挥。

除了导致细胞、组织失水以外, 高温胁迫还会诱导植物产生包括超氧自由基(O₂⁻)、单线态氧(¹O₂)、过氧化氢(H₂O₂)和羟基自由基(·OH)等在内的大量活性氧, 从而对植物造成很大伤害⁴⁻⁸。然而, 由超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)等共同构成的植物体活性氧自由基酶促清除系统是清除胁迫下所产生的多余活性氧、防止细胞膜过氧化的主要方式之一, 其活性高低往往与植物耐热性密切相关。

自 20 世纪 60 年代末 Fridovich 提出生物自由基伤害假说以来, 植物抗性生理机制方面的研究业已展开, 李云^[9-10]、吴友根^[1]等也已经展开了热激锻炼下菊花生理变化及耐热性指标的确定方面的工作, 为今后进一步细致深刻的研究奠定了一定的基础, 但是关于菊花抗氧化方面的研究尚未进行, 因此该研究拟从活性氧系统入手, 研究不同热激及锻炼条件下植物的 SOD、POD、CAT 活性变化, 了解菊花体内抗氧化酶类对于其耐热性的影响, 以期对日后植物基因工程和品种改良提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料与方法

随机选取温室培养了 5 个月的生长健壮、长势基本一致、无病虫害的菊花盆栽苗, 分成 5 组进行处理(见表 1), 各处理组的湿度保持在 65%不变。处理完毕后, 立即取材料自顶端向下的第 3~5 片完全伸展的叶片, 进行酶活性测定, 每组 3 次重复。材料处理方法见表 1。

表 1 菊花热胁迫处理					
组 编 号	步骤				重复 次数
	(25℃、65%、 6 000 lx)48 h	水杨酸(SA)喷洒 叶片 2 h 1 次	35℃热 锻炼 6 h	45℃胁 迫 12 h	
1	√	×	×	×	3
2	√	×	×	√	3
3	√	×	√	√	3
4	√	√	×	√	3
5	√	水	×	√	3

1.2 指标的测定

抗氧化酶粗提液的制备: 称取处理后的菊花叶片 0.3 g, 剪碎, 加入 5 mL 0.05 mol/L 磷酸缓冲液(PBS), 和少量石英砂冰浴研磨至匀浆。匀浆以 4℃, 10 000 r/min 转速离心 15 min, 上清液即为样品提取液。

1.2.1 超氧化物歧化酶(SOD)活性的测定 采用上述方法制备的粗提液, 参考李柏林和梅慧生的方法^[12]进行测定。3.3 mL 反应体系中依次加入 50 mmol/L PBS (pH 7.8) 1.5 mL, 130 mmol/L 甲硫氨酸(methionine, Met)0.3 mL, 0.1 mmol/L EDTA-Na₂ 0.3 mL, 0.5 mL

蒸馏水, 0.02 mmol/L 核黄素溶液 0.3 mL, 0.75 mmol/L 氯化硝基四氮唑蓝(Nitrotetrazolium blue chloride, NBT) 0.3 mL 和 0.1 mL 粗酶液。样品于 25℃, 4 500 lx 光照下反应 20 min, 立即遮光终止反应。测定 560 nm 下光密度。

1.2.2 过氧化物酶(POD)活性的测定 利用上述方法制得的粗酶液(采用 pH 5.5 的 PBS), 参考愈创木酚法进行酶活性的测定。即: 样品于 470 nm 波长下测定光密度。

表 2 愈创木酚法测定 POD 活性							
编号	0.05 M PBS/mL	2% H ₂ O ₂ /mL	0.05 M 愈创 木酚/mL	粗酶 液/mL	沸水浴 /min	37℃ 水浴/min	20%三氯 乙酸/mL
对照	2.9	1.0	1.0	0.1	5	15	2.0
样品	2.9	1.0	1.0	0.1			

1.2.3 过氧化氢酶(CAT)活性的测定 采用上述方法制备的粗酶液(选用 pH 7.0 的 PBS), 参照 Abei 的方法^[13]进行酶活测定。加样方法见表 3。样品于 25℃预热 3 min, 逐管加入 0.1 mol/L 的 H₂O₂ 0.3 mL, 每加完 1 管立即计时, 并迅速倒入石英比色皿中, 240 nm 下测定吸光度, 每隔 1 min 读数 1 次, 共测 4 min。可溶性蛋白质测定方法参考 Whitam 等的考马斯亮蓝 G-250 染色法。^[14]

表 3 CAT 活性测定加样参照表		
管 号	1 样品	2 对照
粗酶液/mL	0.2	0.2 煮沸
pH 7.0 PBS / mL	1.5	1.5
蒸馏水/mL	1.0	1.0

1.3 统计分析

采用统计软件 One-way ANOVA (SPSS 12.0)和 Excel 2003 处理试验数据并进行相关分析。

2 结果与分析

2.1 表观形态比较

各组材料分别经过 45℃直接胁迫、35℃预热锻炼 6 h 之后 45℃胁迫、0.5 mM 水杨酸处理后 45℃胁迫和水处理, 重新置于常温下培养。从外观上看, 水杨酸处理组在处理结束后即表现出了明显的干枯症状, 并且在 2 d 后逐渐萎蔫直至死亡; 水处理组植株下部叶片也表现出了明显的干枯, 但是整体上看还是挺拔的, 大部分叶片也还是处于完全伸展状态; 热激锻炼组的植株有小部分叶片表现出了轻度萎蔫; 除此之外, 其它组均看不出显著变化(见图 1)。

2.2 抗氧化酶活性与菊花耐热性

2.2.1 SOD 活性 超氧化物歧化酶(SOD)是所有需氧生物中普遍存在的一种酶, 它主要存在于细胞溶质中。许多研究证实, SOD 能有效消除细胞中的超氧化物自由基 O₂⁻, 控制膜的过氧化水平, 在减轻膜的伤害上起着—



图1 各试验组菊花在处理结束后的表现形态

注: A, B, C, D, E 分别为对照组, 直接胁迫, 热激锻炼, 水杨酸处理, 水处理后菊花的表现形态 F 为水杨酸处理组菊花在处理结束 2 d 后的表现。

定的保护作用^[15-16], 其活性的高低往往与植物的耐热性相关。该试验结果显示, 对试验材料进行不同的处理, 均导致了 SOD 活性下降(如图 2 所示), 与对照组相比, 下降程度由小到大依次为: 热激锻炼下降 33%, 直接胁迫下降 55%, 水处理下降 66%, 水杨酸处理下降 71%。

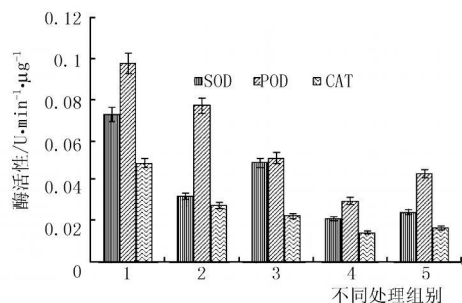


图2 不同热胁迫处理对菊花 SOD, POD, CAT 活性的影响

注: 1, 2, 3, 4, 5 分别为对照组, 直接胁迫, 热激锻炼, 水杨酸处理, 水处理。

2.2.2 POD 活性 过氧化物酶(POD)作为活性较高的一种酶, 广泛存在于植物体内不同组织中, 它与呼吸作用、光合作用、生长素的氧化、体内代谢状况以及对外界环境的适应性等都有关系, 在植物生长发育过程中它的活性不断发生变化。由图 2 可知, 仍然是对照组 POD 活性最强, 水杨酸处理组下降幅度最大, 为 69%, 其余各组活性下降程度分别为直接胁迫下降 21%, 热激锻炼下降 47%, 水处理下降 55%。

2.2.3 CAT 活性 过氧化氢酶(CAT)主要存在于过氧化氢体中, 催化 H_2O_2 分解为分子氧和水, 消除细胞内多余的过氧化氢, 从而使细胞免于遭受 H_2O_2 的毒害, 是生物防御体系的关键酶之一。从图 2 可以观察到, CAT 的活性变化趋势和 POD 完全一致, 直接胁迫下降 42%, 热激锻炼下降 53%, 水处理下降 65%, 水杨酸处理下降 70%。这与莫健彬^[17]等的研究结果相一致。

通过以上试验数据不难发现, 5 组处理中都是水杨

酸处理致使各项生理指标下降幅度最大, 而且从最终的盆栽观察结果可以看出 1, 2, 3, 5 组的植株均长势良好, 几乎没有明显的差异, 然而第 4 组的差别却很悬殊, 植株在经过处理后即表现出干枯的症状, 之后 2 d 逐渐萎蔫直至死亡, 说明在试验中第 4 组受到的伤害程度最深。

3 讨论与结论

在温度胁迫条件下, 植物要生存必须维持一定的能量代谢水平, 并通过代谢途径避免机体的损伤和有毒物质的积累。植物体各生理指标在高温胁迫后与正常温度下相比都会发生较为明显的变化^[18]。而保护酶系统活性的高低恰可以反映出植物对外界环境条件的适应性以及植物自身抗衰老的能力。其中, SOD 活力与植物抗逆性及抗衰老有密切关系, 是植物逆境生理学研究中的重要研究对象^[9]。一般来说, SOD 活性愈高, 清除活性氧的能力愈强。吴友根^[11], 陈娅琼^[20]等的研究表明, 热胁迫抑制了菊花的生长发育, 随着胁迫时间的延长, SOD 表现出下降的趋势, 这与该试验的结果比较相似。

POD 与 SOD 一样, 同为植物体内自由基清除剂, 对环境条件变化的反应很敏感, 属保护酶系统。很多耐高温植物品种, 如花生^[21], 月季^[22], 柑桔^[23]等, 往往在热胁迫处理后 POD 酶活性增强或维持较高的水平。然而, 在试验中, 并未观察到 POD 活性的增加, 其反而呈下降趋势, 这与李云^[8], 陈发棣^[24]等的研究结果不相一致。可能是由于在锻炼过程中或者胁迫初期植物就已经受到了伤害, 因此自身的调节机制无法有效地对植物体实施保护反应。试验结果显示, 不同的热激锻炼对于菊花 POD 活性有较大的影响, 而第 4 组水杨酸处理的 POD 活性最低, 说明第 4 组中植物受到的伤害程度最大。

相比较而言, CAT 活性表现出来的变化趋势与 POD 活性的变化趋势关系更密切一些。有研究显示, CAT 活性在耐热品种与热敏品种之间没有明显的差异^[25], 这似乎也试验的结果不相一致。从试验结果中可以看到, 经过各组处理后, 菊花 CAT 活性差异还是比较明显的。与对照组相比, 均表现出下降趋势, 其下降程度分别为直接胁迫下降 42%, 热激锻炼下降 53%, 水处理下降 65%, 水杨酸处理下降 70%。

通过对试验结果进行分析和比较, 表观上可以看到, 水杨酸处理导致植物严重干枯, 并最终死亡; 水处理在一定程度上造成了植株部分叶片的干枯, 但最终可以在常温下逐渐恢复; 热激锻炼处理造成了植株叶片的轻度萎蔫, 最终也逐渐恢复; 其它组和对照相比没有明显差异。而试验数据结果显示, 各项指标均表现为水杨酸处理组下降程度最大, 其中 SOD、POD、CAT 下降趋势分别为 71%、69%、70%; 水处理组下降程度居第 2 位, 三者下降程度分别为 66%、55%、65%。另外 2 组直接胁

迫和热激锻炼的差别不明显,这也和表观形态上看到的现象相吻合。

水杨酸处理之所以会导致这么明显的差异,可能是由于水杨酸给植物造成一个模拟的干旱环境,植株很可能受到了来自干旱和高温的双重胁迫,因此受伤害程度更严重一些;水处理较之于另外2种处理方法对植物的伤害程度更大,说明在植物耐热性的获得方面热激锻炼的效果更显著。而POD活性没有表现出上升的趋势反而下降,很可能是由于在最初的锻炼过程中或者在胁迫初期就已经对植物造成了较为严重的伤害,导致生物体无法在短时间恢复自身调节机制,因此也就无法及时有效地对外界胁迫做出相应的抵抗和防御。

参考文献

- [1] 李平,李庆伟,贺爱莉,等.菊花花瓣的组织培养技术研究[J].北方园艺, 2009(9): 68-70.
- [2] 房伟民,郭维明,陈俊愉.嫁接提高菊花耐高温与抗氧化能力的研究[J].园艺学报, 2009, 36(9): 1327-1332.
- [3] 吴友根,林允奋,李绍鹏,等.海南菊花种质资源初步调查及其在海南发展前景的分析[J].中国农学通报, 2008, 24(10): 509-511.
- [4] Chaitanya K V, Sundar D, Masilamani S, et al. Variation in heat stress-induced antioxidant enzyme activities among three mulberry cultivars [J]. Plant Growth Regulation, 2001, 100: 1-6.
- [5] Gulen H, Eris A. Effect of heat stress on peroxidase activity and total protein content in strawberry plants [J]. Plant Science, 2004, 166: 739-744.
- [6] Sharkey T D. Effects of moderate heat stress on photosynthesis importance of thylakoid reactions, rubisco deactivation reactive oxygen species and thermotolerance provided by isoprene [J]. Plant Cell and Environment, 2005, 28: 269-277.
- [7] Scanlios J G. Oxygen stress and superoxide dismutases [J]. Plant physiology, 1993, 101: 456-459.
- [8] Wahid A., Gelani S, Ashraf M, et al. Heat tolerance in plants: An overview [J]. Environmental and Experimental Botany, 2007, 61: 199-223.
- [9] 李云,杨际双,张钢.热激锻炼诱导菊花耐热性研究[J].西北植物学报, 2007, 27(10): 2041-2045.

报, 2007, 27(10): 2041-2045.

- [10] 李云,张钢,杨际双.热激锻炼对高温胁迫下菊花生理代谢的影响[J].武汉植物学研究, 2008, 26(2): 175-178.
- [11] 吴友根,林允奋,李绍鹏,等.热胁迫下菊花生理变化及其耐热性指标的确定[J].江苏农业学报, 2009, 25(2): 362-365.
- [12] 李柏林,梅慧生.燕麦叶片衰老和活性氧代谢的关系[J].植物生理学报, 1989, 15(1): 6-12.
- [13] Abei H E, Catakise In Bergmeyer H. U. (eds). Methods of Enzymatic Analyses [M]. Weinheim: Verlag Chemie, 1983: 273-282.
- [14] Whitham S, Dinesh-kumar S P, Choi D, et al. The product of the tobacco mosaic virus resistance gene N: Similarity to toll and the interleukin receptor [J]. Cell, 1994, 8: 1101-1115.
- [15] 王有年,张海英,卜庆雁,等.水分胁迫对李叶片抗氧化代谢的影响[J].北京农学院学报, 2003, 18(2): 97-100.
- [16] Dhindsa R S, Dhindsa P P, Reid D M. Leaf senescence and lipid peroxidation: Effects of some phytohormone and scavengers of free radicals and singlet oxygen [J]. Physiol Plant, 1982: 456-457.
- [17] 莫健彬,陈必胜,黄梅,等.高温对玉簪品种部分生理指标的影响研究[J].Seed, 2007, 26(5): 48-51.
- [18] 李淑娟,陈香波,李毅,等.观赏山植叶片耐热性生理指标研究初探[J].江苏林业科技, 2007, 34(2): 6-11.
- [19] 黄显波,严寒,胡建林,等.高温胁迫下水稻幼苗几个相关生理指标的变化[J].长江大学学报(自然科学版), 2008, 5(2): 50-53.
- [20] 陈娅琼,蒋文伟,黄建荣,等.4种荷兰菊品种耐热性生理指标初探[J].江苏林业科技, 2009, 36(1): 15-17.
- [21] 倪艳波,闫苗苗,魏光成,等.水分胁迫下花生部分生理指标的变化[J].安徽农业科学, 2007, 35(34): 1004-11005.
- [22] 叶小梅,卢忠华,蔡丽萍,等.4种引进月季品种叶片耐热性生理生化指标初探[J].广东林业科技, 2007, 23(1): 80-82.
- [23] 萧顺元,章文才.谷草转氨酶、过氧化物酶同工酶在柑桔遗传育种中应用的比较研究[J].中国柑桔, 1989(2): 9-12.
- [24] 陈发棣,陈素梅,房伟民,等.五个小菊品种(或种)的耐热性鉴定[J].上海农业学报, 2001, 17(3): 80-82.
- [25] 吴国胜,曹婉虹.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.

Effects of Different Heat Treatment on Activity of Antioxidant-Enzyme of *Chrysanthemum*

WANG Yi, CHEN Rui-kun, ZHU Xun-lu, MO Ming-ya, XU Ying, CHEN Fang
(College of Life Sciences Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610064)

Abstract: To investigate the effects of different heat treatment on the activity of antioxidant-enzyme, the garden *chrysanthemum* were treated at 45 °C, pre-heated exercised at 35 °C, treated with 0.5 mM salicylate and with water, then the activity of superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD), catalase (CAT) of their leaves were measured. The results showed that the activity of the three enzyme were all fallen, and the diversification trend of POD was similar with that of CAT. Compared to the control, the falling degree from the most to the least were the directly-stressed, the pre-heated exercised, water treated, salicylate treated; however, the falling degree of SOD were the pre-heated exercised, the directly-stressed, water treated, salicylate treated from the most to the least. That was to say, the activity of salicylate-treated fell the most in all the three enzyme, and it was the same as that appeared in the apparent shape.

Key words: *Chrysanthemum*; heat stress; reactive oxygen; superoxide dismutase (SOD); peroxidase (POD), catalase (CAT)