

高温胁迫下两种藓类植物过氧化物酶活性的变化

刘应迪¹, 曹同², 向芬¹, 彭春晖¹

(1. 吉首大学生命科学与化学学院, 湖南吉首 416000; 2. 中国科学院沈阳应用生态研究所, 辽宁沈阳 110015)

摘要: 在不同的高温胁迫条件下, 对湿地匍灯藓(*Plagiommium acutum*)和大羽藓(*Thuidium cymbifolium*)过氧化物酶(POD)活性及其与处理时间和处理温度的关系进行了初步研究。结果表明, 在一定的温度范围内, 随着温度的升高, POD活性增加, 二者成线性关系。在一定温度条件下, 一般随着处理时间的延长, POD活性增加。但是当超过一定的温度(45~50 °C)以及一定的处理时间(4~6 h), POD活性有所下降。结果还表明, 湿地匍灯藓的POD活性显著高于大羽藓。而且在高温胁迫下, 湿地匍灯藓POD活性变化比大羽藓活跃, 其变化幅度也比大羽藓大。

关键词: 湿地匍灯藓; 大羽藓; 过氧化物酶; 高温胁迫

中图分类号: Q813.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2001)03-0255-04

Effect of high temperature stress on the activity of peroxidase of two species of mosses

LIU Ying-di¹, CAO Tong², XIANG Fen¹, PENG Chun-hui¹

(1. College of Life Sciences and Chemistry, Jishou University, Jishou 416000, China;

2. Institute of Applied Ecology, Academic Sinica, Shenyang 110015, China)

Abstract: The effect of high temperature stress on the activity of peroxidase (POD) in *Plagiommium acutum* (Lindb.) T. Kop. and *Thuidium cymbifolium* (Doz. & Molke.) Doz. & Molke. were studied. The activity of POD increased with the severity of higher temperature stress. A linear correlation was found between the changes of enzyme activity with the temperature. Beyond 45~50 °C, the enzyme activity decreased. In natural condition (25 °C), enzyme activity nearly unchanged. In 35~40(45) °C, the enzyme activity increased with the time of high temperature stress. In 45~50 °C, from 0.5 h to 4 h, the enzyme activity increased with the time of high temperature stress. Four hours later, the enzyme activity decreased. The results also showed that the POD activity of *Plagiommium acutum* was stronger markedly than that of *Thuidium cymbifolium*.

Key words: *Plagiommium acutum*; *Thuidium cymbifolium*; peroxidase; high temperature stress

1 前言

过氧化物酶(POD)是植物细胞内保护酶系统中的一种^[1,2]。一般认为超氧化物歧化酶(SOD)催化 O_2^- 发生歧化反应生成 H_2O_2 和 O_2 ,而POD主要作用为

清除 H_2O_2 和其他过氧化物。大量研究表明,POD作为一种植物细胞内的保护性酶,不仅与植物抵御不良环境条件如低温等有关^[3,4],而且也与植物抵御各种病害和环境某些营养元素胁迫以及植物抗衰老有关^[5-10]。在植物抵御不良环境方面,多数研究集中在

收稿日期: 2000-10-08

作者简介: 刘应迪(1958-),男,湖南华容人,博士,副教授,从事植物学、植物生理学和生态学等的教学和研究工作。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 39970082)

抵御环境低温和植物的抗寒性研究上,高温胁迫对于酶活性的影响还不多见。我们选用2种五倍子蚜虫冬寄主藓类植物^[11,12]作为研究材料,对于高温胁迫下2种藓类植物POD活性的变化规律进行了初步研究,目的在于探讨冬寄主藓类植物对于高温胁迫的抵御机制,为五倍子生产中人工植藓和冬寄主藓类的越夏管理提供科学依据。

2 材料与方 法

2.1 实验材料

1. 湿地匍灯藓 *Plagiomnium acutum* (Lindb.) T. Kop.; 2. 大羽藓 *Thuidium cymbifolium* (Doz. & Molke.) Doz. & Molke.

2.2 材料处理

实验材料是在4月份于湖南省吉首市以西20 km的德夯村山谷中采集的,材料生境的海拔高度为200~300 m。材料采回后,置于室温下保湿培养待用,一般在2~3 d内即用于实验测试。设置了5个处理温度:25、35、40、45、50 °C。处理温度的控制是使用LRH-250GS人工气候箱进行的。每一温度处理又设置了5个时间梯度:0.5、1、2、4、6 h。每一温度、每一时间重复3次取样,以25 °C下培养的材料为对照。

2.3 POD的提取与活性的测定

剪取洗净的湿地匍灯藓和大羽藓枝条放入离心机中,500×g离心10 min。离心后取出用电子天平称量1 g鲜重的材料作为1个样,分次加入2.5 mL、62.5 mmol/L、pH 7.8的磷酸缓冲液(PBS),于冰浴上匀浆,4 000×g、4 °C下离心20 min,取上清液再次离心20 min。最后取上清液4 °C下保存备用。第二天将酶液稀释50倍,取1 mL稀释后的酶液(PBS代替酶液做空白)加3 mL反应混合液(100 mmol/L、pH 7.0的PBS,20 mmol/L愈创木酚)混匀。加20 μL H₂O₂启动反应于470 nm波长处作时间扫描,扫描曲线斜率为酶反应速率,以每分钟OD₄₇₀增加0.01为一个酶活单位(n),以公式 $\Delta OD_{470} \times \text{酶液稀释倍数} / \text{鲜重(gfw)} / \text{min} / 0.01$ 计算酶活性,以ngfw⁻¹min⁻¹为单位表示^[13]。

为避免实验操作的误差,我们注意了以下几个问题:(1)取生长旺盛、生长势均一的材料;(2)将材料洗净并在500×g下离心10 min后统一称取材料鲜重,在一定程度上可避免取样误差;(3)在冰浴上匀浆,4 °C下离心,酶液置4 °C下保存待测。此外,在制备酶

液时,我们取第1次离心的上清液做第2次离心,基本上能去掉组织碎片和细胞颗粒,保证实验结果的准确性。

3 实验结果与分析

3.1 高温胁迫下过氧化物酶(POD)活性随处理时间的变化

根据以上所述的实验方案,我们对于经过不同温度和时间处理的两种藓类植物共150份材料,进行了POD活性测定,得到整50个数据点的的结果,所得结果表示于图1。图1中所示的每一数据点,实际上是3份材料(重复)测定值的平均,经统计分析,标准差在2.3~8.9%之间,平均不超过5%。根据图1,我们可以得到以下几个初步的结果:

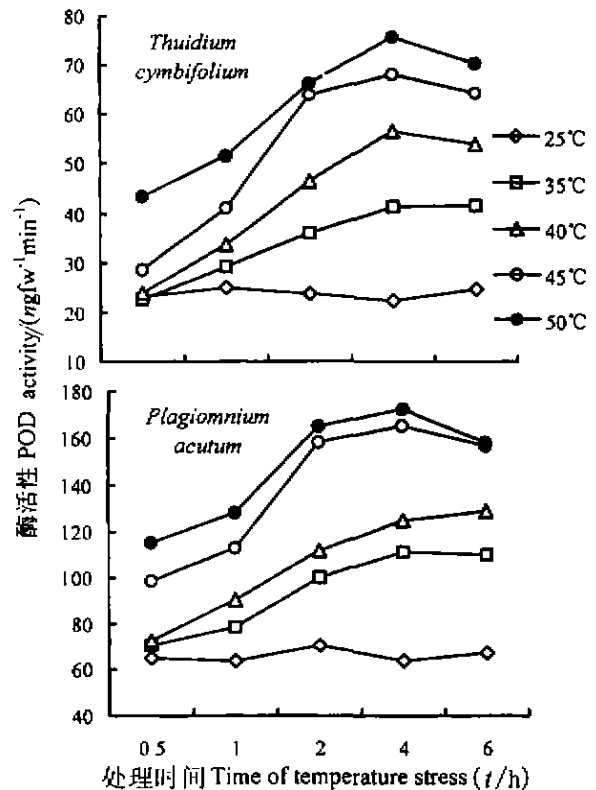


图1 高温胁迫下两种藓类植物过氧化物酶(POD)活性随处理时间的变化

Fig.1 Changes of the activity of peroxidase (POD) in two species of mosses under temperature stress and its relation to the treatment time

(1)在2种实验藓类中,湿地匍灯藓POD活性,在各种处理温度下,都显著比大羽藓高,若以25~35 °C下所测得的数据进行比较,湿地匍灯藓平均为79.93,大羽藓为29.08 gfw⁻¹min⁻¹,湿地匍灯藓的POD活性比大羽藓高出约175%。如果以各个温度处

理测得的总体平均值进行比较,则湿地匍灯藓要比大羽藓高出 156%。

(2) 培养在 25 °C 条件下的藓类,其 POD 活性基本保持稳定,随处理时间的延长,POD 活性只有轻微的波动。而在 35~50 °C 的高温胁迫条件下,POD 活性随处理时间的延长而增加。一般在 2~4 h 时,酶活性达到或接近其最高值。在处理时间 0.5 h 时,35~40 °C 处理下的 POD 活性几乎无变化,接近于对照,说明 35~40 °C 的条件还不足以在半个小时内引起植物体内的酶系统对胁迫做出反应。而 45~50 °C 的高温条件就不一样了,在这样的条件下,在半小时内 2 种藓类的 POD 活性都比对照组显著较高。

(3) 在 45 和 50 °C 的处理条件下,POD 活性变化最为活跃。在短时间内(0.5 h)酶活性上升很快,分别达到 98.65 和 115.3 (湿地匍灯藓) 以及 28.7 和 43.5 (大羽藓) $\text{gfw}^{-1}\text{min}^{-1}$ 。然后在 1~4 h 内酶活性上升幅度很大,4 h 达到最大值 165.4 和 172.5 (湿地匍灯藓) 和 68.12 和 75.65 (大羽藓) $\text{gfw}^{-1}\text{min}^{-1}$ 。4 h 后,两温度处理的酶活性有所下降,表明在高温胁迫下,随处理时间的延长可使过氧化物酶活性升高,但当高温胁迫达到一定强度和持续一定的时间以后,POD 受到高温伤害,其活性有所下降。

3.2 过氧化物酶(POD)与处理温度的关系

我们取不同温度胁迫下所测得酶活性数据,将处理 2~6 h (此时各温度处理下的酶活性接近或达到其最大值)的数据加以平均,所得的结果如下表所示。再以酶活性对应处理温度作图,得到图 2。

从表 1 和图 2 看来,2 种藓类植物 POD 酶活性与温度呈一线形关系,随着处理温度的上升,酶活性递增。图 2 还显示出了 2 种 POD 酶活性与温度关系的线形回归方程, R^2 分别为 0.971 7 和 0.986 2,相关性很好。在酶活性与温度关系方面,两种藓类植物也存在着显著的差异。不仅酶活性高低不同,而且酶活性变化对于高温胁迫的反应不一样。在高温胁迫下,湿地匍灯藓 POD 活性变化显然比大羽藓活跃。从回归方程斜率来看,湿地匍灯藓为 4.147 5,大羽藓为 1.976 8,显示高温胁迫可能更加容易引起湿地匍灯藓细胞内 POD 酶活性的变化。

4 讨 论

4.1 高温胁迫与藓类植物 POD 活性的关系

氧对需氧生物来说具有两重性:有机体依赖氧去

获取能量和维持生命;但是氧对其又会有毒害。生活在这种矛盾中的有机体有一系列的防御系统,以维持自身的正常活动^[2,6-14]。POD 作为这一防御系统中的酶类,在种子植物方面已经得到了广泛的研究,但是在藓类植物方面还未见报道。已有研究表明在环境胁迫条件下植物细胞中 POD 活性会比正常条件下显著改变,本项研究则证明,在藓类植物方面,POD 活性变化同样与植物所经历的环境胁迫有关,显示了环境条件对于藓类植物的伤害或影响。

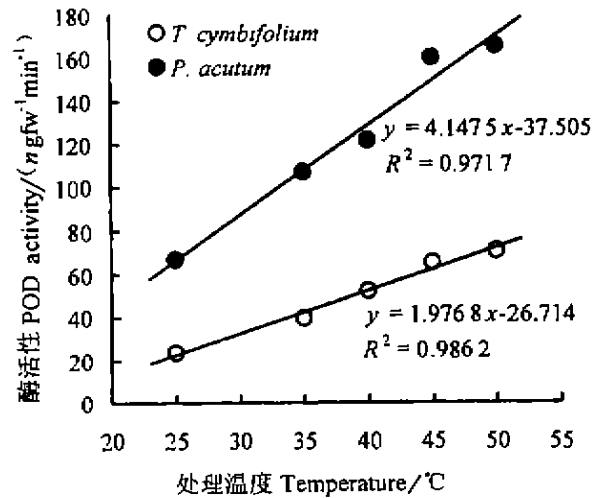


图 2 两种藓类植物过氧化物酶(POD)活性与处理温度的关系

Fig. 2 The relationship between the temperature and peroxidase (POD) activity of two species of mosses

表 1 不同温度条件下经 2~6 h 处理的藓类植物 POD 活性平均值

Table 1 Averages of POD activity of mosses under high temperature for 2~6 hours

处理温度 Temperature (°C)	大羽藓 <i>Thuidium cymbifolium</i>		湿地匍灯藓 <i>Plagiomnium acutum</i>	
	平均值 Average ($\text{gfw}^{-1}\text{min}^{-1}$)	标准差 Stdev.	平均值 Average ($\text{gfw}^{-1}\text{min}^{-1}$)	标准差 Stdev.
25	23.72	1.16	66.97	3.35
35	39.79	3.12	107.07	6.15
40	52.28	5.18	121.81	9.07
45	65.41	2.36	160.10	4.65
50	70.72	4.74	165.27	7.15

李晶等(2000)在红松(*Pinus koraiensis* Sieb. et Zucc)幼苗^[1]、刘鸿先等(1985)在黄瓜(*Cucumis sativus*)子叶^[11]曾经观察到,在低温胁迫下 POD 活性逐渐下降。与此不同,袁朝兴等(1990)却观察到棉花叶片^[15] POD 活性在水分胁迫条件下会逐渐升高。根据刘宁等^[16](2000)的报道,在渗透胁迫下,多花黑麦

草叶中 POD 活性一般在处理初期逐渐升高,达到其最大值以后,随着处理时间的延长又会逐渐下降。本实验获得的结果显示,在 35~40 °C 条件下,藓类植物 POD 活性一般随着处理时间的延长而升高。2 种藓类植物 POD 活性在 45 与 50 °C 温度处理下,短时间内酶活性升高幅度很大,但 6 h 后酶活性有所下降(图 1)。说明高温胁迫可以诱发 POD 活性上升,但是如果超过一定的温度界限,或在高温胁迫条件下超过一定的时间,下可能使酶蛋白结构遭到破坏而使其活性下降。

4.2 两种藓类植物 POD 活性的差异

大羽藓与湿地匍灯藓是在我国广大的五倍子产区分布十分广泛的习见种类。大羽藓多生长在裸露的岩石或树干上,能够忍受强烈的阳光和一定程度的干燥。但湿地匍灯藓一般只是生长在较为阴湿的环境,多为土生或生长在林下潮湿的岩石表面的薄土层上。我们曾就这两种藓类植物净光合速率(Pn)与光照、温度以及植物体水分含量的关系曾经做过初步研究^[7,10],一些生理指标显示,大羽藓乃属于抗干旱的强阳性藓类,似乎其抗性与适应性比湿地匍灯藓要更强一些。不过在温度响应曲线方面,二者并没有显示出明显的差异,它们的光合最适温度都在 25~35 °C 之间(春季)。

但是杨家书(1984)、云兴福(1995)和郑翠明等(1999)分别在小麦、黄瓜和大豆观察到,抗病性越强的品种,其 POD 活性越强^[5,8,19]。一般认为抗病性越强的作物品种,其 POD 活性越强。在本实验所使用的两种藓类植物中,湿地匍灯藓的 POD 活性以及高温胁迫下的变化幅度,都显著高于大羽藓(图 2)。这一结果是否说明湿地匍灯藓的抗高温性能优于大羽藓?由于在藓类植物方面,涉及到这个问题的资料较少,有待进一步研究。

参考文献:

- [1] J Fridovich. The biology of oxygen radical[J]. Science, 1975, 201: 875-880.
- [2] K E Pallitt, A J Young, Alscher R G. Antioxidants in higher plants[M]. Boca Raton, CRC Press; 1992. 59-60.
- [3] 刘鸿先,曾韶西,王以柔,等. 低温对不同耐寒力的黄瓜幼苗子叶各细胞器中超氧化物歧化酶(SOD)的影响[J]. 植物生理学报, 1985, 11(1): 48-57.
- [4] 李晶,阎秀峰,祖元刚. 低温胁迫下红松幼苗活性氧的产生及保护酶的变化[J]. 植物学报, 2000, 42(2): 148-152.
- [5] 杨家书. 小麦品种对白粉病抗性与过氧化物酶的关系[J]. 植物生理学报, 1984, 1(4): 235-240.
- [6] 林植芳. 衰老叶片和叶绿体中 H₂O₂ 的累积与膜脂过氧化化的关系[J]. 植物生理学报, 1998, 14(1): 16-22.
- [7] 陈璋. 水稻抗稻瘟病与苯丙氨酸及过氧化物酶活性的相关性[J]. 植物生理学通讯, 1993, 29(4): 275.
- [8] 郑翠明,滕冰,高凤兰,等. 感染 SMV 后大豆种皮超氧化物歧化酶过氧化物酶和多酚氧化酶的变化[J]. 中国农业科学, 1999, 32(1): 99-101.
- [9] 刘鹏,杨玉爱. 铝、硼对大豆叶片膜脂过氧化及体内保护系统的影响[J]. 植物学报, 2000, 42(5): 461-466.
- [10] 马峙英,刘叔倩,王省芬,等. 过氧化物酶同工酶与棉花黄萎病抗性的相关研究[J]. 作物学报, 2000, 26(4): 431-437.
- [11] Y D Liu, J Li. Resources of the overwintering host mosses of gallaphids in Hunan[J]. Journal of Jishou University (Natural Science). 1992. 13(6): 30-33.
- [12] Y D Liu, J Li, J X Shi. Selection and cultivation of overwintering host mosses of gallaphids in Western Hunan[J]. Journal of Jishou University (Natural Science). 1993, 14(6): 16-21.
- [13] 刘祖祺,张石城. 植物抗性生理学[M]. 北京:中国农业出版社, 1994. 371-372.
- [14] 曾韶西,王以柔. 低温胁迫对黄瓜子叶抗坏血酸过氧化物酶活性和谷胱甘肽含量的影响[J]. 植物生理学报, 1990, 16(1): 37-42.
- [15] 袁朝兴,丁静. 水分胁迫对棉花叶片中 IAA 含量、IAA 氧化酶和过氧化物酶活性的影响[J]. 植物生理学报, 1990, 16(2): 179-184.
- [16] 刘宁,高玉葆,贾彩霞,等. 渗透胁迫下多花黑麦草叶内过氧化物酶活性和脯氨酸含量以及质膜相对透性的变化[J]. 植物生理学通讯, 2000, 36(1): 11-14.
- [17] Yingdi Liu, Jing Li, Hou Jinjun, et al. The Measurement of Net Photosynthesis of Three Species of Plagiomnium Mosses and its Relation to the Light and Temperature[J]. J. Hattori Bot. Lab., 1999, 87: 315-324.
- [18] 刘应迪,李菁,曹同. 两种五倍子蚜虫冬寄主藓类植物的光合特性及其与光照、温度和植物体水分含量变化的关系[J]. 应用生态学报, 2000, (5):
- [19] 云兴福. 黄瓜组织中几种酶活性与其对霜霉病抗性的关系[J]. 华北农学报, 1995, 10(1): 92-98.