

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2007)01-0005-06

高温胁迫对马铃薯幼苗叶片生理效应的影响

任彩虹¹, 闫桂琴¹, 郜 刚^{1,2*}, 张丽萍¹

(1. 山西师范大学生命科学学院生物多样性研究所, 山西 临汾 041004;

2. 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

摘 要: 以中薯3号为材料, 研究了高温胁迫对马铃薯幼苗叶片膜脂过氧化、体内保护系统以及叶绿素含量等生理效应的影响。结果表明, 在高温胁迫下, 叶片中叶绿素和抗坏血酸含量下降, 超氧阴离子自由基(O_2^-)、丙二醛(MDA)含量、脯氨酸含量上升; 超氧化物歧化酶(SOD)活性呈现先升后降的变化趋势, 而多酚氧化酶(PPO)活性却一直呈上升趋势。说明高温逆境降低了植物体防御活性氧有关的酶促和非酶促保护系统的能力, 提高了体内自由基浓度, 加剧了膜脂过氧化。由此认为高温胁迫下马铃薯幼苗体内抗氧化酶活性受到抑制, 活性氧积累以及由此引起的膜脂过氧化是马铃薯幼苗高温伤害的原因之一。

关键词: 高温胁迫; 马铃薯; 生理效应; 膜脂过氧化; 体内保护系统

植物在高温胁迫下, 体内活性氧代谢失调和自

由基积累, 引起生理代谢的紊乱, 导致细胞结构受损^[1]。植物体内同时存在两类保护系统, 一类是酶类物质, 如SOD、CAT、APX以及PPO等; 另一类是非酶类化合物, 如抗坏血酸(AsA)、脯氨酸(Pro)以及高温诱导产生的一系列蛋白质等。它们能够在一定范围内及时清除过多的活性氧以维持体内自由基

收稿日期: 2006-12-14

作者简介: 任彩虹(1982-), 女, 硕士研究生, 主要从事马铃薯分子生态学研究。

基金项目: 山西省青年基金(20051042)

* 通讯作者: E-mail: gaogang20002000@126.com

Physiological Responses of Potato Plantlets in vitro to Salt Stress

Cui Yansen¹, Zhang Junlian^{1,2}, Li Xuecai¹, Wang Di^{1,2}, Huang Peng¹, Wang Li³, Du Ximei¹

(1. Agronomy College, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070, China;

2. Gansu Key Laboratory of Crop Genetic Improvement and Germplasm Enhancement, Lanzhou, Gansu 730070, China;

3. Life Science and Technology College, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070, China)

Abstract: The potato cultivar Atlantic plantlets in vitro were treated with different concentrations of NaCl for 20 days. The results indicated that with more salt concentration the content of Na^+ was increased dramatically, the content of K^+ was stable and Na^+/K^+ was increased significantly in the root and stem. In the leaf, the content of chlorophyll reduced, but the content of Malonaldehyde(MDA), membrane permeability and proline increased. Moreover, the content of proline was highly significantly correlated to the content of MDA and membrane permeability at a range of concentrations of NaCl, suggesting that the accumulation of proline could reflect the degree the plantlets in vitro got hurt. These results indicated that accumulated Na^+ , increase in membrane permeability and reduction in chlorophyll were the main effects on the growth of potato plantlets in vitro under salt stress.

Key Words: potato; plantlets in vitro; salt stress; physiological response

代谢的动态平衡,降低膜脂过氧化,保护膜系统的稳定性,提高植物的抗热性^[2]。大量研究表明,植物在高温胁迫下,体内产生大量的活性醌和氧自由基,最终导致膜的结构受到破坏,而使得植株受到伤害。

马铃薯是喜冷凉的蔬菜品种,在夏季高温多雨期不能正常生长^[3]。为考查马铃薯品种中薯3号的耐热性,本文研究了高温胁迫下马铃薯叶片超氧阴离子(O_2^-)、丙二醛(MDA)、叶绿素(Chl)、脯氨酸(Pro)和抗坏血酸(AsA)的含量以及SOD、PPO酶活性的变化规律,旨在探讨高温胁迫对马铃薯幼苗膜脂过氧化和体内保护系统以及叶绿素含量的影响,为生产实践中降低高温对马铃薯的伤害而提高产量等提供一些科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

中薯3号是京丰1号×BF67A的产物,由中国农业科学院蔬菜花卉研究所提供。马铃薯块茎在口径15 cm的花盆中以无土栽培法(草炭和蛭石按照1:1混匀)培养,每盆2株,在自然温光条件下培养至株高15 cm左右,移至光照强度3000 lx的恒温光照培养箱分别进行2种不同温度处理:(1)20℃培养作为对照;(2)30℃高温处理12 h,并且每隔1 h处理取样,液氮冷冻,-80℃低温保存以测定生理指标。

1.2 测定方法与数据统计

O_2^- 含量测定采用羟胺氧化法^[4],MDA含量用

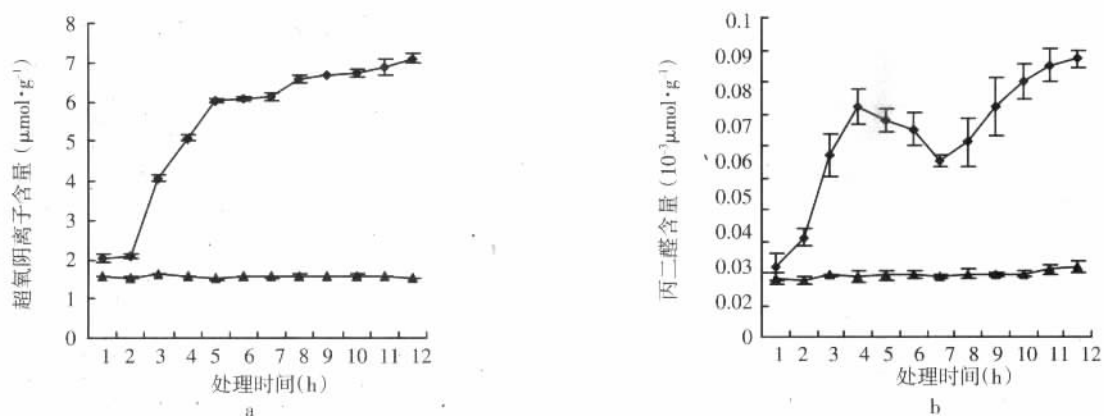
硫代巴比妥法^[5],Pro含量测定采用酸性茚三酮比色法^[5],AsA含量采用二甲苯萃取比色法^[5],SOD活性采用NBT光还原法^[5],PPO活性测定采用邻苯二酚法^[6],Chl含量用丙酮比色法测定^[5]。以上试验均重复3次,取3次试验结果的平均值进行分析。

2 结果与分析

2.1 O_2^- 和MDA含量随胁迫时间的变化

O_2^- 是生物体受到胁迫后首先生成的氧自由基,可以经过一系列反应而生成其它氧自由基,参与启动膜脂过氧化或者膜脂脱脂作用是其伤害植物的机理之一^[7]。在高温胁迫2 h内,马铃薯幼苗叶片中 O_2^- 含量与对照相比变化不大,在3~5 h范围内直线上升,5 h以后缓慢上升(图1-a)。这与各种酶活性逐渐降低,对活性氧的清除作用消弱有关。

图1-b表明,在高温胁迫0~4 h范围内,MDA含量直线上升,随后的3个小时内持续下降,表明马铃薯幼苗处于高温环境中一段时间,对高温有了一定的适应能力,所以出现了一个下降的趋势,从胁迫第7个小时开始继续缓慢上升。MDA是膜脂过氧化过程中的脱脂产物,它的含量可用来度量膜脂的过氧化程度^[8]。膜脂过氧化反应可由酶促诱发,但更主要的是由氧自由基启动。因此,MDA的积累在一定程度上反应了体内自由基活动的状态,MDA积累多, O_2^- 等自由基的水平也高。



图中(▲)代表对照,(◆)代表高温处理,下同。

图1 高温胁迫对 O_2^- 和MDA含量的影响

2.2 叶片AsA、Pro含量随胁迫时间的变化

抗坏血酸是植物体内重要的抗氧化剂,可以快速还原超氧阴离子自由基和羟基自由基,清除损伤

膜和酶分子结构中的自由基,防御活性氧的毒害^[9]。由图2-a可见,马铃薯幼苗叶片的AsA含量随着胁迫时间延长而直线下降。以正常温度下的数值100%

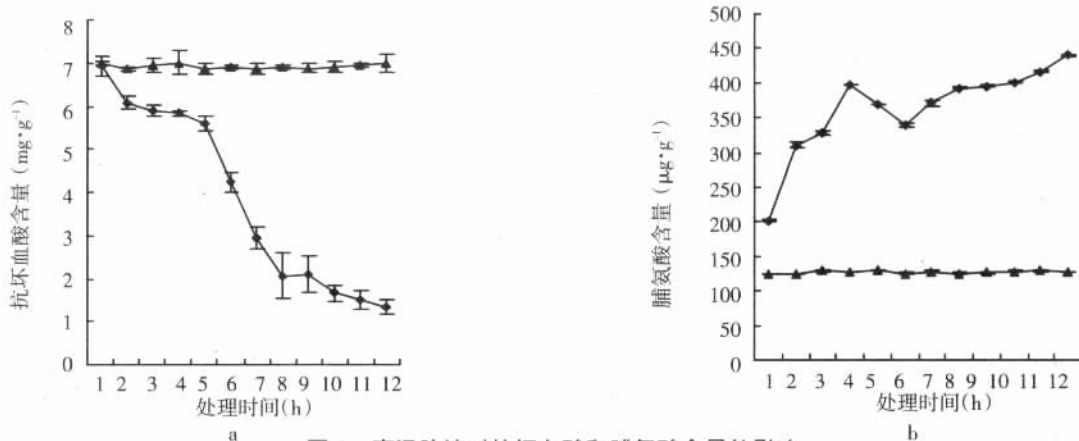


图2 高温胁迫对抗坏血酸和脯氨酸含量的影响

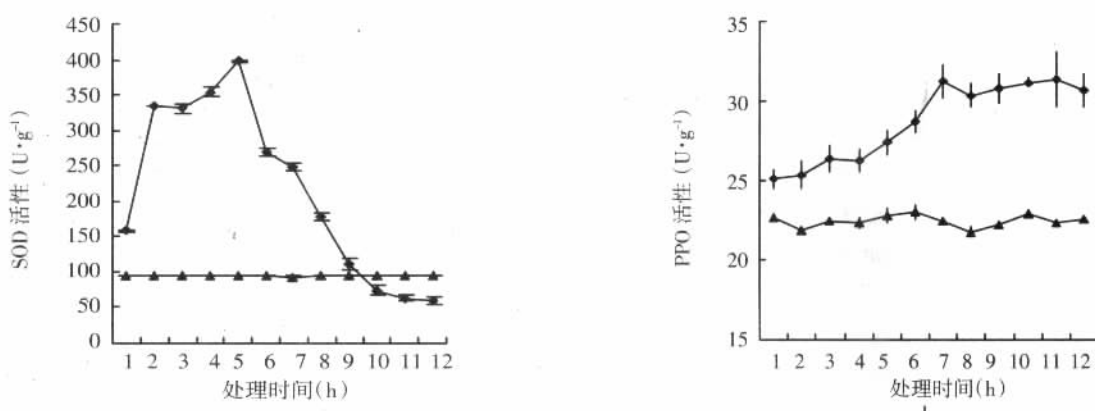


图3 高温胁迫对SOD和PPO活性的影响

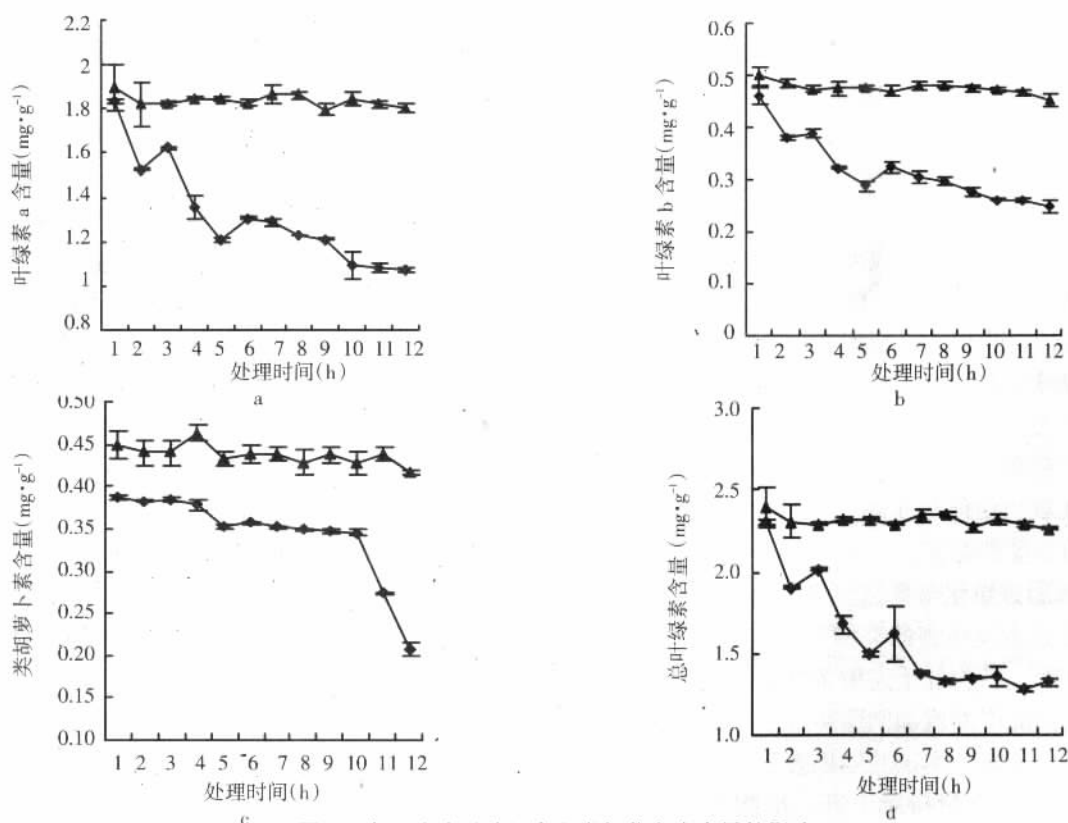


图4 高温胁迫对叶绿素和类胡萝卜素含量的影响

计算, 高温胁迫 12 h, AsA 含量下降了 63%。

由图 2-b 可见, 高温促进马铃薯幼苗叶片中脯氨酸的积累, 随着胁迫时间的延长, 脯氨酸含量逐渐增加。脯氨酸含量在胁迫 0~4 h 之间有一个较大幅度的上升, 4~6 h 内回落, 6 h 以后又逐步上升, 但幅度不大。

2.3 保护酶活性随胁迫时间的变化

在高温下, 由于活性氧代谢平衡受到破坏, 活性氧的增加对植物起到伤害作用。植株体内抗氧化酶 SOD、CAT、PPO 等清除植物体内过多的活性氧, 使得植株能够免受或者少受活性氧的伤害, 因此它们是植物重要的耐热保护酶系统。

从图 3-a 可以看出, 马铃薯幼苗叶片 SOD 活性随胁迫时间的延长而呈现先上升后下降的趋势, 至胁迫 12 h, SOD 酶活性下降了 36%。但是, 马铃薯幼苗叶片 PPO 活性却随着胁迫时间的延长而持续上升, 如图 3-b 所示。

2.4 叶绿素含量随胁迫时间的变化

高温胁迫能够加剧叶绿体的降解并且抑制其合成, 因此叶绿素含量的变化能够反应高温对植物的伤害程度。在本试验中, 随着高温处理时间的延长, 马铃薯幼苗叶片叶绿素 a、叶绿素 b、叶绿素总量和类胡萝卜素的含量都持续下降, 如图 4-a、b、c、d 所示。在高温处理 12 h 时, 叶片叶绿素 a、叶绿素 b、叶绿素总量以及类胡萝卜素含量较对照分别下降了 40.4%、45.27%、41.40% 及 50.49%, 变化规律一致。

3 讨论

植物对高温逆境的反应涉及到体内一系列生理效应的变化。本研究发现, 随着高温胁迫时间的延长, 马铃薯幼苗叶片的叶绿素和内源抗氧化剂抗坏血酸含量减少, O_2^- 、MDA 以及脯氨酸含量增加, 保护酶活性发生改变, SOD 活性呈现出先升高后降低的变化趋势, 而 PPO 活性则持续上升。细胞内清除活性氧的酶促和非酶促保护系统受到破坏, 最终导致植物受到毒害, 甚至死亡。

3.1 叶片膜脂过氧化与高温胁迫的关系

植物受到逆境伤害的关键部位是生物膜系统。大量研究证明, 植物处于逆境条件下细胞内自由基积累, 并且由此引发或加剧膜脂过氧化作用, 导致细胞膜损伤和破坏。本试验结果表明, 随着高温胁迫时间延长, O_2^- 含量持续上升, 细胞内活性氧代

谢平衡受到破坏, 活性氧过剩导致膜脂过氧化作用的引发或者加剧, 使得膜系统受损。

MDA 是膜脂氧化的主要产物之一, 它的含量高低是反映细胞膜脂过氧化作用强弱和质膜破坏程度的重要指标之一。在高温胁迫前期, MDA 含量急剧上升, 说明马铃薯幼苗在受到胁迫的初期, 机体本身代谢功能特别是保护酶系统的调节突然失去平衡, 导致活性氧产生过剩, 引起膜脂上不饱和脂肪酸的过氧化, 使膜脂组份发生改变, 进而改变膜透性、膜脂流动性及膜结合酶活力, 膜脂过氧化作用加强。随后可能是体内一些蛋白质的调节^[10], 使得体内保护酶的活性趋于稳定而不再急剧下降, 对高温有了一定的适应能力, 从而 MDA 含量也不再急剧上升而开始缓慢下降。但随着胁迫时间延长, 膜脂过氧化作用加强, 使得 MDA 含量继续呈现上升的趋势。此外, 丙二醛还能与细胞内的核酸和蛋白质等生物大分子发生反应, 生成 Schiff 碱, 进一步损伤细胞的生物膜。同时, 许多学者研究认为, 膜脂过氧化还能影响植物的光合作用和呼吸作用, 使光合作用和呼吸作用中的电子传递发生一定的改变, 从而导致大量活性氧自由基的产生, 进一步引起膜脂过氧化^[11]。

3.2 叶片 AsA、Pro 含量与高温胁迫的关系

细胞内 ASA 的含量高有利于生物体抵抗不良环境。试验结果表明, 与对照相比, 在胁迫期间, AsA 含量呈现下降的趋势。AsA 作为非酶促的抗氧化物质参与清除自由基, 排除过氧化物, 淬灭活性氧和保护 SH 基。高温胁迫使得马铃薯幼苗叶片细胞膜受到伤害, 正常的防御系统受到破坏, 膜脂发生过氧化作用, 体内积累大量的自由基, 与抗坏血酸反应以保护细胞膜结构的完整性, 从而使体内抗坏血酸含量降低。

到目前为止大量的证据表明, 脯氨酸累积有多种生理意义, 如作为细胞质渗透调节物质、稳定生物大分子结构^[12]、清除活性氧的作用^[13]。逆境胁迫作用于植物时, 往往造成水分胁迫, 高温时植物因强烈的蒸腾作用失水, 游离脯氨酸大量积累。可能由于脯氨酸的水合能力较强, 作为溶质, 可以调节细胞水分环境的变化。并且, 积累的脯氨酸可以作为胁迫时能量和氮源的贮存库, 解除胁迫后直接参与植物的代谢^[12]。植物体内脯氨酸含量在一定程度上反映了植物的抗逆性。

3.3 叶片保护系统酶类活性与高温胁迫的关系

植物在逆境胁迫下, 产生过多的自由基, 从而引起氧化胁迫, 导致膜脂过氧化、蛋白质构型改变、DNA 断裂、叶绿素含量减少、离子渗漏、直至细胞死亡^[14]。植物本身在进化过程中形成了防御活性氧毒害的机制, 体内抗氧化系统是决定植物细胞对氧化胁迫抗性的关键因素, 它能清除体内活性氧和膜脂过氧化所产生的有毒物质, 以利于植物在逆境中的生存。如 SOD、CAT、APX 等是抗氧化系统中酶促系统中重要的保护酶, 它们在高温胁迫下的作用已经得到了证实^[15]。SOD 能够以 O_2 作为基质进行歧化反应, 是防护氧自由基对细胞膜系统伤害的一种很重要的保护酶。CAT 能够分解植物体内由于光呼吸形成的过多的 H_2O_2 , 来防御对细胞的伤害, 保护膜的结构。APX 目前被认为是叶绿体内清除 H_2O_2 的关键酶, 通过 AsA-谷胱甘肽-NADPH 循环, 催化 AsA 氧化, 来清除叶绿体中 H_2O_2 和 O_2 以维持植物体内的活性氧代谢平衡, 而在一定程度上减缓或者抵抗逆境胁迫。

试验结果表明, 在高温胁迫初期, 马铃薯幼苗叶片 SOD 酶活性随时间的延长而逐步上升, 即诱导酶活性大幅增高, 可能是由于高温胁迫马铃薯幼苗后, 通过一系列代谢反应产生了对自身有害的超氧自由基和 H_2O_2 (酶底物), 从而诱导它们的表达, 以清除体内的 H_2O_2 及有机过氧化产物, 防止 H_2O_2 在体内积累, 限制潜在的活性氧伤害, 维持细胞的正常生理机能, 这是植株的保护性应激反应。但抗氧化酶的防御能力是有限的, 在胁迫后期, 酶活性随时间的进一步延长而降低, 这可能是由于高温胁迫逐渐超过植物所能够承受的极限时, 破坏酶的活性中心, 通过改变酶的结构或抑制酶的表达, 使得酶活性下降, 导致 H_2O_2 和其它过氧化物清除过程受阻而大量积累, 进一步对马铃薯植株造成损伤。而 PPO 活性随着胁迫时间延长不断上升, 与 SOD 酶活性变化完全不同。这两种重要的抗氧化酶适应高温胁迫的特点不同, 对高温胁迫的反应有一定的差异。

3.4 叶绿素含量与高温胁迫的关系

高温胁迫使得马铃薯幼苗叶片叶绿素含量明显下降, 使得叶片光合速率显著降低, 最终导致叶片发黄。其原因可能有三方面, 一是叶绿素的合成是在前质体或叶绿体中在一系列酶的作用下

形成的, 高温胁迫可能通过影响叶绿素合成相关的酶类 (如 Mg 螯合酶、叶绿素合成酶等) 进而抑制叶片中叶绿素的合成^[16], 二是高温胁迫引起活性氧的积累, 加速了叶绿素的降解, 造成叶片中叶绿素含量的降低^[17]。叶片中叶绿素含量的降低必定导致对光能的吸收能力下降, 进而引起光合速率的降低, 抑制光合产物的形成。类胡萝卜素既是光合色素, 又是细胞内源抗氧化剂, 一方面吸收光能并且传递给反应中心, 补偿由于叶绿素减少而造成的光合作用的下降, 另一方面可以吸收剩余能量, 淬灭活性氧, 防止膜脂过氧化^[18]。因此, 类胡萝卜素的减少也是叶绿素含量下降的原因之一。

以上结果表明, 高温胁迫对马铃薯幼苗保护系统有一定的影响。在胁迫初期, 马铃薯幼苗抗氧化酶活性和一些非酶物质含量都升高, 这可能是马铃薯通过自身调节机制适应胁迫的本能。在逆境初期体内活性氧积累, 诱发体内活性氧清除酶活性的增加, 相互协调以清除过多的活性氧对细胞的伤害, 此时 MDA 含量处于较低水平。但由于保护酶和其它物质对膜系统的保护作用是有其一定限度的, 在胁迫时间延长后, 部分抗氧化酶活性和抗氧化物质的合成和构型造成不可逆的损伤, 含量下降, 清除活性氧的能力随之下降, 细胞的膜脂过氧化作用加强, 表现为 MDA 含量的增加。表明马铃薯幼苗自身的调节机制已经减弱, 保护系统失调, 马铃薯幼苗受高温伤害的程度加大。活性氧自身的生成与清除的平衡被破坏而使得代谢失调是马铃薯幼苗受到高温伤害的重要原因。

[参 考 文 献]

- [1] Liu X Z, Huang B R. Heat stress injury in relation to membrane lipid peroxidation in creeping bentgrass [J]. *Crop Science*, 2000, 40: 503-510.
- [2] Dirk I, Marc V M. Oxidative stress in plants [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 1996, 6: 153-158.
- [3] 张振贤. 蔬菜栽培学 [M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2003: 438-452.
- [4] 王爱国, 罗广华. 植物的超氧自由基与羟胺的定量关系 [J]. *植物生理通讯*, 1990, 6: 55-57.
- [5] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.
- [6] 王清. 马铃薯 PPO 活性变化规律及抗块茎损伤褐化的基因工程研究 [D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2003.
- [7] 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.
- [8] 葛体达, 隋方功, 白莉萍, 等. 水分胁迫下夏玉米根叶保护酶活性变化及其对膜脂过氧化作用的影响 [J]. 中国农业科学, 2005, 38(5): 922-928.
- [9] Sonja D, Veljovic-Jovanovic, Cristina Pignocchi, et al. Low ascorbic acid in the vtc-1 mutant of Arabidopsis is associated with decreased growth and intracellular redistribution of the antioxidant system [J]. Plant Physiol, 2001, 127: 426-435.
- [10] Lindquist S, Craig E A. The heat-shock proteins [J]. Annu Rev Gen-et, 1988, 22: 631-677.
- [11] Vadim, Anatdiy, Vladimiri. The effect of Cu²⁺ on iron transport system of the plant cell plasma-lemma [J]. Plant physiol, 1997, 114: 1313-1325.
- [12] Zhao X, Li Y L. Variation of several physiological indices of five cool season turfgrasses under high temperature stress [J]. Acta Pratacultural Science, 2001, 10(4): 85-91.
- [13] Smirnof N. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation [J]. New Phytol, 1993, 125: 27-31.
- [14] Murin G. Unscheduled DNA synthesis in growing roots and stored embryos of *Vicia faba* after the action of maleic hydrazide and methyl methanesulphonate [J]. Mutat Res, 1996, 245(2): 83-86.
- [15] Gechev T, Willtekens H, Montagu M V, et al. Different responses of tobacco antioxidant enzymes to light and chilling stress [J]. Journal of Plant Physiology, 2003, 160: 509-515.
- [16] Tewari A K, Tripathy B C. Temperature-stress-induced impairment of chlorophyll biosynthetic reactions in cucumber and wheat [J]. Plant Physiol, 1998, 117: 851-858.
- [17] 郭培国, 李荣华. 夜间高温胁迫对水稻叶片光合机构的影响 [J]. 植物学报, 2000, 42(7): 673-678.
- [18] Willtekens H, Camp W V, Montagu M V. Sulfur dioxide and ultraviolet-B have similar effects on mRNA accumulation of antioxidant genes in *Nicotiana plumbaginifolia* L. [J]. Plant Physiology, 1994, 106: 1007-1014.

Physiological Effects of High Temperature Stress on Leaves of Potato Seedlings

Ren Caihong¹, Yan Guiqin¹, Gao Gang^{1,2}, Zhang Liping¹

(1. Institute of Biodiversity, College of Life Science, Shanxi Normal University, Linfen, Shanxi 041004, China;

2. Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: The potato seedlings were treated with different periods of high temperature stress and the physiological effects on leaves of potato were determined, such as membrane lipid peroxidation, endogenous protective systems and the content of chlorophyll. Under high temperature, the content of chlorophyll and AsA decreased, while the content of O₂⁻, MDA, and proline increased. The activities of SOD went up at beginning and then dropped at 30 min, but the activity of PPO increased during all the period. These indicated an injury on the protective system against active oxygen, and induced lipid peroxidation under high temperature stress. According to these results, the inhibited activities of antioxidant systems and the accumulation of active oxygen species by initiation of membrane lipid peroxidation may be a cause to the injury of high temperature stress on potato seedlings.

Key Words: high temperature stress; potato (*Solanum tuberosum* L.); physiological effects; membrane lipid peroxidation; endogenous protective systems

