

高温胁迫下氮素营养对小麦幼苗叶片中活性氧代谢的影响

刘洪展¹, 郑凤荣², 赵世杰³

(1. 山东大学威海分校海洋学院, 山东 威海 264209; 2. 国家海洋局第一海洋研究所, 山东 青岛 266061; 3. 山东农业大学生命科学学院, 山东 泰安 271018)

摘 要:以早衰型小麦品种L14为材料,研究高温胁迫下氮素营养与活性氧代谢的关系,结果表明:在轻度和严重高温胁迫下,氮素营养均能提高活性氧代谢相关酶(SOD、CAT)的活性,降低膜脂过氧化物的伤害。但是活性氧代谢非酶组分的变化各异,其中在37℃轻度高温胁迫时,随着氮素浓度的增加,AsA含量明显升高,GSH反应不敏感;42℃高温胁迫时,氮素营养明显降低AsA和GSH的含量。说明在低于大约37℃的胁迫温度下,氮素营养才能够提高活性氧的清除能力,减少活性氧的伤害作用,从而缓解高温胁迫。

关键词:小麦;高温胁迫;氮素营养;活性氧

中图分类号: S 512.1; Q 945.78

文献标识码: A

Effects of nitrate nutrition on active oxygen metabolism in the leaves of wheat seedlings under heat-stress condition

LIU Hong-zhan¹, ZHENG Feng-rong², ZHAO Shi-jie³

(1. Marine College of Shandong University at Weihai, Weihai, Shandong 264209, China; 2. The First Oceanography, National Oceanic Administration of China Institute, Qingdao, Shandong 266061, China; 3. Life Science College, Shandong Agriculture University, Taian, Shandong 271018, China)

Abstract: The relationship between nitrate nutrition and active oxygen metabolism in the pre-senescent wheat variety L14 under heat-stress condition was investigated. The results indicated: under the conditions of either moderate or severe heat stress, nitrogen nutrition improved the activity of enzymes (SOD, CAT) related to active oxygen metabolism, reduced the harm of ex-oxidation (MDA) of membrane lipid. However, the change of non-enzymic components (AsA, GSH) in active oxygen metabolism showed difference. The contents of AsA apparently rise but that of GSH appear insensitive with increment of nitrogen concentration during moderate heat-stress; nitrogen nutrition evidently promoted reduction of contents of AsA and GSH at 42℃ heat stress. It means nitrogen nutrition can raise scavenging capacity of active oxygen, reduce its harming function and finally alleviate the high temperature stress when the stress temperature is lower than about 37℃.

Key words: wheat; heat-stress; nitrate nutrition; active oxygen

植物光合作用与呼吸作用的协调运转完成了细胞水平的物质转化和积累,构成了植物产量形成的基础。然而,植物生长的逆境条件往往会干扰细胞水平的正常代谢,导致了代谢平衡的紊乱。通常认为,活性氧的产生是造成植物细胞伤害的一个重要因素。植物体中光合作用过程受到破坏时光能过剩可以导致活性氧的产生^[1],然而呼吸代谢失衡所造成的“电子漏”也是产生活性氧的一个因素^[2]。由于植物在长期的环境适应过程中形成了相应的防御体系来清除产生的活性氧,因此在一定范围内的逆境

会诱导活性氧清除系统的启动^[1-2]。

高温强光下产生的光抑制往往是由于活性氧对光合机构的损伤造成的^[3],然而夏季弱光高温滞后效应对呼吸作用的破坏也会导致活性氧的产生^[4],已有研究表明,植物体内的氮素代谢与活性氧的产生有一定的关系^[5]。小麦是喜凉作物,在生长发育后期容易受到夜间高温的伤害。本试验研究了外源氮素对夜间高温下的小麦叶片中活性氧酶系统和非酶组分的变化影响,以期对逆境条件下活性氧代谢的有效调控和作物栽培提供理论依据。

收稿日期: 2005-10-26 初稿; 2006-03-28 修改稿

作者简介: 刘洪展 (1975-), 男, 硕士, 讲师, 从事光合逆境生理研究。

基金项目: 山东省科技厅重点项目 (鲁科农字 [2001] 500 号)

1 材料与方法

1.1 材料培养

试验材料选用山东省农科院作物所选育的小麦新品种(系) L14。精选一定数量的小麦种子, 洗净, H_2O_2 消毒, 置于培养皿中, 加少许水, 盖上湿纱布, 待种子露白后, 取发芽一致的种子播于盛沙土的塑料盆中, 每盆留苗 10~13 株。盆上口径 15 cm, 盆高 14 cm。自然条件下常规管理。

1.2 材料处理

试验设 3 个处理, 处理代号为 $\text{N}_{0.5}$ 、 $\text{N}_{5.0}$ 、 N_0 。当盆栽小麦幼苗长至 6~7 片叶时, 以叶面喷洒 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $5.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NH_4NO_3 进行材料处理 ($\text{N}_{0.5}$ 、 $\text{N}_{5.0}$), 以叶面喷洒蒸馏水为对照 (N_0), 每天喷洒 1 次, 连续喷洒 6 d。然后在培养箱中进行暗期高温胁迫处理, 处理温度分别为 37°C 和 42°C , 每个温度分别处理 0、4、8、12 h 后取上部全展开倒数 2、3 两个叶片为试材进行测定。

1.3 测定方法

1.3.1 丙二醛 (MDA) 含量的测定 参照赵世杰等^[6]的方法, 分别测定 OD_{450} 、 OD_{532} 、 OD_{600} , 根据公式 $C (\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}) = 6.45 (\text{OD}_{532} - \text{OD}_{600}) - 0.56 \text{OD}_{450}$ 求得浓度, 由提取液体积和组织鲜重计算含量。

1.3.2 抗氧化剂含量的测定 称取 1 g 材料用 10 ml 的 5% 偏磷酸提取, 冷冻离心 ($15\,000 \times g$ 、20 min) 得上清液为待测液。抗坏血酸 (AsA)、谷胱甘肽 (GSH) 含量的测定均参照赵世杰等^[6]的方法。

1.3.3 抗氧化酶活性的测定 称取鲜重材料 1 g, 加入 10 ml 酶提取液 ($50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的磷酸缓冲液, pH 7.8, 含 1% 的 PVP) 冰浴研磨, 冷冻离心 ($12\,000 \times g$ 、15 min) 得上清液备用。SOD 活性、CAT 活性测定均参照赵世杰等^[6]的方法, 连续记录 240 nm 吸收值的变化, 以吸收值变化 0.001 为 1 个酶单位。以上试验均设 3 次重复。

2 结果与分析

2.1 高温胁迫下氮素营养对小麦叶片活性氧清除酶系统的影响

由图 1~5 可知, 经 6 d 叶面喷洒处理后、高温胁迫前测得不同处理间倒 2、3 叶的 SOD 酶、CAT 酶、AsA、GSH 含量均表现相同趋势, 即 $\text{N}_{5.0} > \text{N}_{0.5} > \text{N}_0$, 而 MDA 含量则表现为 $\text{N}_0 > \text{N}_{0.5} > \text{N}_{5.0}$ 。

2.1.1 高温胁迫下氮素营养对小麦叶片 SOD 活性的影响 SOD 是植物体中清除 O_2^- 的关键酶, 由图 1 可知, 在 37°C 时, 随着外源氮素浓度的增加, SOD 上升的幅度增大, 并且随着处理时间的延长, SOD 活性呈现上升的趋势, 高温胁迫 12 h 时, N_0 、 $\text{N}_{0.5}$ 、 $\text{N}_{5.0}$ 分别比未高温处理时提高了 14%、31%、37%; 在 42°C 时, 进行高温胁迫, SOD 活性在最初 4 h 内升高, 随时间延长活性下降, 高温胁迫 12 h 时, N_0 、 $\text{N}_{0.5}$ 、 $\text{N}_{5.0}$ 分别为未进行高温胁迫处理时的 81.9%、83.4%、86.3%, 高氮处理 ($\text{N}_{5.0}$) 的降低幅度小些。说明氮素营养可以维持植物体内较高的活性氧清除能力, 但是受到植物细胞结构完整性的影响。

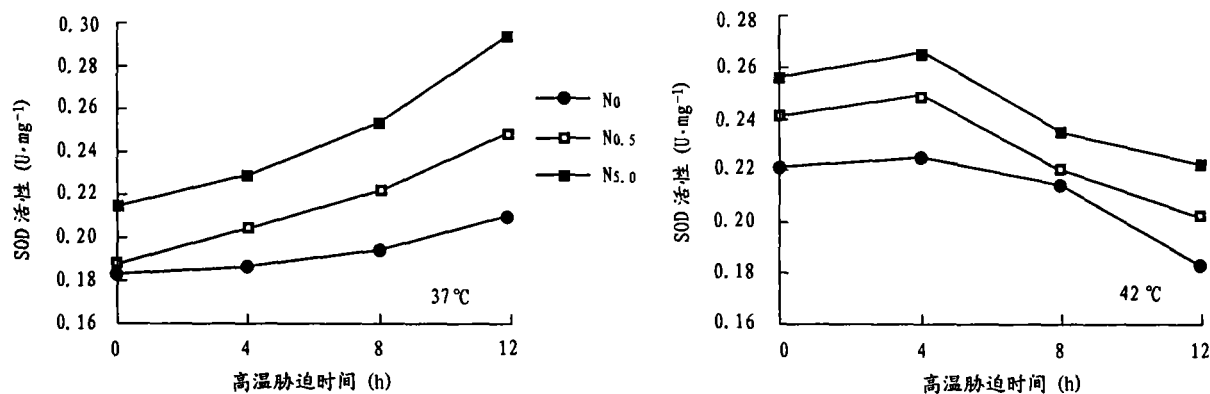


图 1 不同温度下不同浓度氮素营养对叶片中 SOD 活性的影响

Fig. 1 The effects of nitrogen nutrition on the activity of SOD in leaves under different stress temperature

2.1.2 高温胁迫下氮素营养对小麦叶片 CAT 活性的影响 CAT 是植物体中清除 H_2O_2 的关键酶之一。由图 2 可知, 在 37°C 时, 叶面喷洒氮肥有利于

CAT 活性的增加, 然而随着外源氮素浓度的升高, CAT 上升趋势有下降, 随着处理时间的延长, N_0 、 $\text{N}_{0.5}$ 、 $\text{N}_{5.0}$ 3 个处理 CAT 活性最终分别比原来提高

了25%、23%、20%；经42℃处理，CAT活性分别在大约4 h和6 h达到最大值，然后酶活性开始下降，高氮处理降低的幅度很小，外源氮肥显著增加

CAT活性功能。说明提高氮素营养可以增加活性氧清除酶的活性，减少活性氧的产生，但需要活性氧清除酶系统（SOD、CAT、APX）的协同作用。

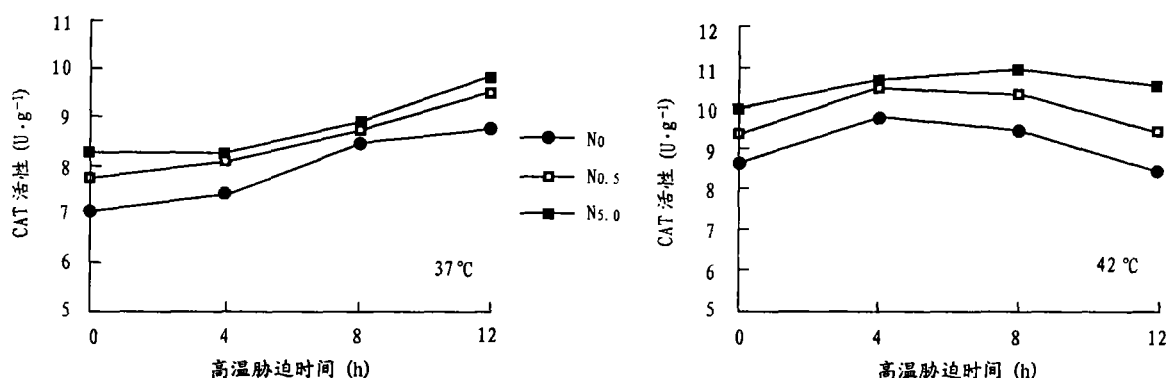


图2 不同温度下不同浓度氮素营养对叶片中CAT活性的影响

Fig. 2 The effects of nitrogen nutrition on the activity of CAT in leaves under different stress temperature

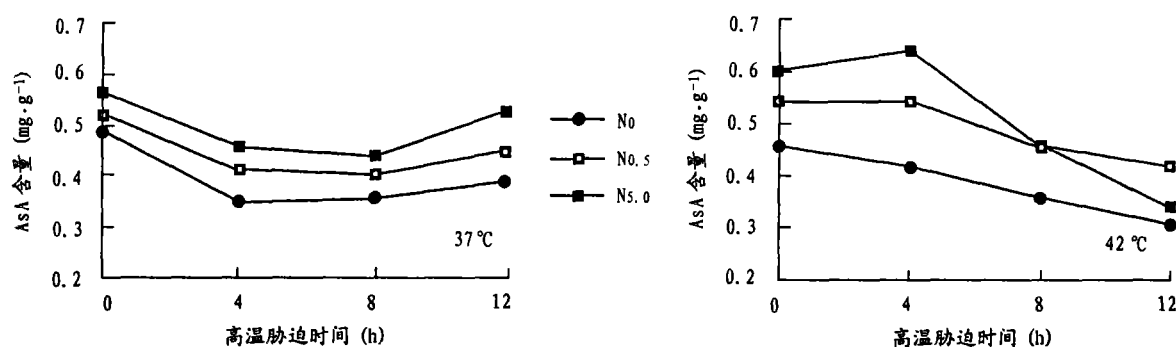


图3 不同温度下不同浓度氮素营养对叶片中AsA含量的影响

Fig. 3 The effects of nitrogen nutrition on the contents of AsA in leaves under different stress temperature

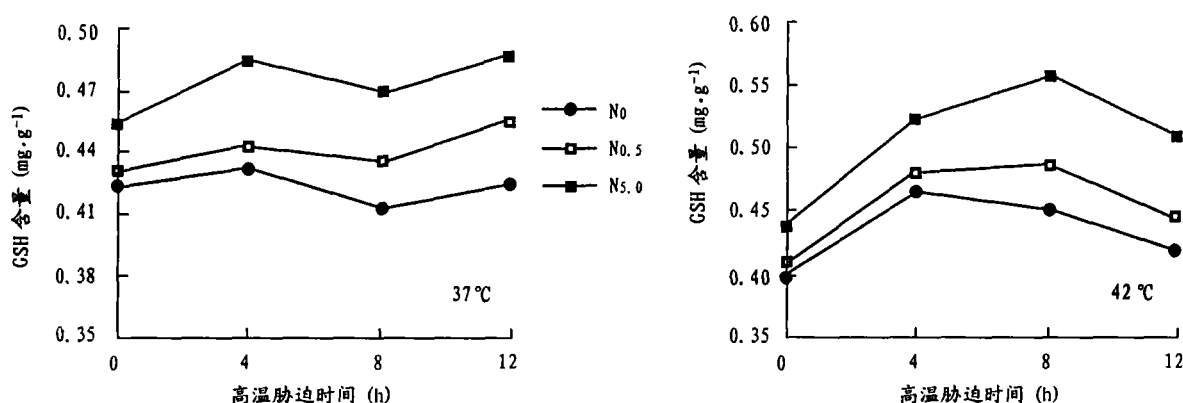


图4 不同温度下不同浓度氮素营养对叶片中GSH含量的影响

Fig. 4 The effects of nitrogen nutrition on the contents of GSH in leaves under different stress temperature

2.2 高温胁迫下氮素营养对小麦叶片活性氧清除的非酶组分的影响

2.2.1 高温胁迫下氮素营养对小麦叶片AsA含量

的影响 抗坏血酸(AsA)在水分胁迫下含量减少被认为是一种普遍现象，可能会对植物造成一定程度的膜损伤。由图3得知，在37℃下不同时间的处理

中, AsA 含量均表现出先下降后上升的趋势, 对照处理和低氮、高氮处理的 AsA 最终含量分别减少了 19.7%、9.3%、5.4%, 说明氮素可以提高 AsA 的含量, 缓解温度胁迫, 但是作用机理复杂; 42℃ 的处理中, 随时间延长 AsA 含量呈现大幅度下降趋

势, 不同浓度氮素处理之间具有明显差异, 高氮处理加剧了 AsA 的减少, 对照和低氮、高氮处理后的 AsA 最终含量分别为最初的 66.2%、61.2%、55.7%, 说明氮素营养只有在适当的胁迫条件下才可以通过抗坏血酸来维持膜的完整。

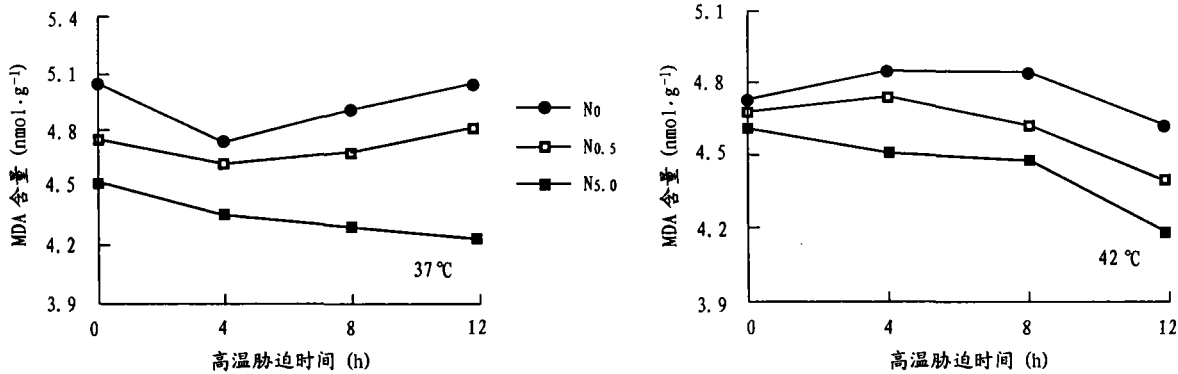


图5 不同温度下不同浓度氮素营养对叶片中MDA含量的影响

Fig. 5 The effects of nitrogen nutrition on the contents of MDA in leaves under different stress temperature

2.2.2 高温胁迫下氮素营养对小麦叶片GSH含量的影响 谷胱甘肽 (GSH) 除参与抗坏血酸—谷胱甘肽循环外, 在轻度水分胁迫下, 谷胱甘肽含量增加有助于活性氧的清除。由图4得知, 37℃处理过程中, 不同氮肥水平随处理时间延长表现出相同的趋势, 对照和氮素处理12 h后叶片中GSH含量分别为开始的95.7%、105.3%、107.2%, 说明氮素可以在一定程度上促进GSH含量的增加; 在42℃处理中, GSH含量先升高后下降, 在处理8 h后达到最大值, 随氮素浓度升高最终GSH含量分别增加1.7%、12.1%、15.3%, 说明在适当温度胁迫时氮素营养对GSH含量有较强促进作用。因此, 在高温逆境下, 氮素营养提高活性氧清除的非酶组分的含量也是减少活性氧产生的重要途径之一。

2.3 高温胁迫下氮素营养对小麦叶片MDA含量的影响 丙二醛 (MDA) 是由植物体内的自由基引发而产生的, 因此, MDA的积累在一定程度上反映了植物体内自由基活动的状态。由图5可以看出, 轻度高温胁迫条件下, 低氮处理的叶片中MDA含量随时间的增加呈现先降后升趋势, 高氮处理的叶片中MDA含量则持续减少, 所以氮素营养可有效地抑制MDA的产生; 在42℃的胁迫条件下, 不同浓度氮素处理后的MDA含量随时间变化趋势相同, 开始的8 h内变化不大, 然后急速下降, 最终N0、N0.5、N5.0的MDA含量分别减少了2.4%、7.5%、9.7%。因此氮素营养可能通过调节植物体内自由基的水

平, 从而减少膜脂过氧化程度。

3 讨论

正常情况下植物细胞内活性氧 (ROS) 的产生和清除是平衡的, 但当植物体遭遇外来胁迫, 包括生物和非生物胁迫如极端温度、水分胁迫、病原菌入侵等时, ROS的产生和代谢将失去平衡而产生氧化胁迫^[11], 发生氧化胁迫时会产生过量的ROS。对需氧生物来说, ROS是代谢过程中不可避免的产物, 植物细胞中产生ROS的部位有叶绿体、线粒体和过氧化物体等^[13]。低浓度的ROS能提高植物细胞的抗氧化防御机制, 从而清除活性氧, 使细胞免受伤害, 但高浓度的ROS可以与蛋白质、脂类和DNA作用而引起酶活性降低, 膜透性增大和突变增加^[12]。本试验中, 在轻度高温胁迫条件下, 清除活性氧的两个关键酶SOD和CAT活性增高, 但是清除活性氧的非酶组分AsA和GSH含量只是稍微有所增加, 说明低浓度的活性氧可以诱导植物细胞抗氧化酶防御; 由于非酶组分的含量受其相应代谢酶活性的影响, 而且这些组分的作用不具有抗氧化酶的专一性特点, 所以在活性氧的清除过程中只是起到微弱的辅助作用; 严重高温胁迫导致细胞抗氧化酶SOD和CAT的活性在处理后期开始降低, 非酶组分AsA和GSH也在严重胁迫持续一段时间后开始减少, 其中SOD活性和AsA含量变化尤为明显; 较高的MDA含量表明叶片细胞膜已受到了损伤。

植物可以通过调整体内活性氧代谢及清除系统来避免高温胁迫^[7],钙不仅是偶联胞外信号与胞内生理生化反应的第二信使,而且外源钙也能增强植物的抗热性^[8-9],施用某些外源生长调节物质可以提高植物对高温诱导的氧化胁迫的抵抗能力^[9]。同样,在我们的试验中,在小麦叶片遭受适度的高温胁迫时,通过叶面喷施氮素营养可以缓解高温伤害,原因是较高浓度的外源氮素可以促进低浓度活性氧诱导的抗氧化酶活性的增强以及抗氧化剂含量的增加,从而防止膜脂过氧化作用,维持了生物膜结构和功能的稳定。然而在严重高温胁迫时,尽管氮素营养可以使叶片中膜脂过氧化的最终产物MDA保持在较低的水平,但是较高浓度的氮素加剧了SOD活性的丧失和AsA含量的下降,CAT活性和GSH含量也没有一直保持较高水平,因此可能存在其他消除活性氧的酶或非酶组分^[10]。

植物遭受高温胁迫的过程就是活细胞不断地感受、接收高温信号,并作出适当的生理响应以维持其生命活动进行的过程。高温胁迫之后,抗氧化体系可能被热击削弱,导致了氧化物浓度的增加,从而干扰正常生理代谢。尽管外源矿质营养和生长调节物质可以通过影响植物体内活性氧的平衡来提高植物抵御高温胁迫的能力,但是内源信号物质在此过程的调节作用还需深入研究。

参考文献:

[1] 廖祥儒,王越. 叶绿体内活性氧产生及清除的酶系统[J]. 生命

的化学, 2000, 20 (6): 260—262.

[2] 罗银玲,宋松泉. 植物线粒体、活性氧与信号转导[J]. 西北植物学报, 2004, 24 (4): 737—747.

[3] 冯玉龙,张亚杰. 杨树无性系幼苗光合作用的光抑制[J]. 植物研究, 2001, 21 (4): 578—582.

[4] 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.

[5] 肖凯,张荣铨. 氮素营养调控小麦旗叶衰老和光合功能衰退的生理机制[J]. 植物营养与肥料学报, 1998, 4 (4): 371—378.

[6] 赵世杰,刘华山,董新纯. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 1998.

[7] 何晓明,林毓娥,陈清华,等. 高温对黄瓜幼苗生长、脯氨酸含量及SOD酶活性的影响[J]. 上海交通大学学报, 2002, 20 (1): 30—33.

[8] 张燕,方力. 钙对烟草叶片热激忍耐和活性氧代谢的影响[J]. 植物学通报, 2002, 19 (6): 721—726.

[9] 张建光,李英丽. 不同温度处理后施用外源物质对苹果果实抗氧化胁迫的影响[J]. 河北农业大学学报, 2004, 27 (2): 29—33.

[10] 周功克,孔英珍. 烟草愈伤组织在热胁迫过程中活性氧与抗氰呼吸变化的关系[J]. 植物生理学报, 2000, 26 (3): 241—246.

[11] NEILL S J, DESIKAN R, CLARKE AH. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signaling molecules in plants[J]. J Exp Bot, 2002, 53 (1): 237—247.

[12] HALLIWELL B, GUTTERIDGE J M C. Free radicals in biology and medicine: 3rd edition [M]. Oxford: Oxford University Press, 1999.

[13] DELRIO L A, CORPAS F J, SANDAL LM, et al. Reactive oxygen species: antioxidant systems and nitric oxide in peroxisome [J]. J Exp Bot, 2002, 53 (1): 255—272.

(责任编辑: 杨小萍)