

超高产小麦品种(系)生育后期抗氧化酶活性的变化

李 萌¹, 隋 娜², 贾 曦¹, 赵世杰³, 孟庆伟³, 田纪春³

(1. 山东省农业科学院, 山东 济南 250100; 2. 山东师范大学 生命科学学院,
山东 济南 250014; 3. 山东农业大学 作物生物学国家重点实验室, 山东 泰安 271018)

摘要:以鲁原 301、潍麦 8 号和山农 62G 三个超高产小麦新品种(系)和对照品种鲁麦 14 为材料, 测定其在生育后期的光系统 II 实际光化学效率(ΦPSII), 非光化学猝灭系数(NPQ), 抗氧化酶活性和活性氧含量。结果表明, 与对照品种鲁麦 14 相比, 三个超高产小麦新品种(系)在生育后期都具有较高的光系统 II 实际光化学效率(ΦPSII)和抗氧化酶活性, 而 $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 含量和 NPQ 都较低。表明生育后期超高产小麦新品种(系)的光合机构受伤害程度较轻, 利用光能的能力较强, 利于高产。从产量水平看, 鲁原 301、潍麦 8 号和山农 62G 品种的产量都高于鲁麦 14。

关键词: 生育后期; 超高产小麦; 抗氧化酶

中图分类号: S512.01 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2009)增刊-0145-05

Changes of Antioxidant Enzymes of Super High Yield Wheat Cultivars at Late Growth Period

LI Meng¹, SUI Na², JIA Xi¹, ZHAO Shi-jie³, MENG Qing-wei³, TIAN Ji-chun³

(1. Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250100, China; 2. College of Life Sciences of Shandong Normal University, Jinan 250014, China; 3. State Key Laboratory of Crop Biology, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China)

Abstract: Three super high yield wheat cultivars, Luyuan301, Weimai8 and Shannong62G were used as materials to study quantum efficiency of PSII electron transport (ΦPSII), non-photochemical quenching (NPQ), activity of antioxidant enzymes and the content of active oxygen. The results showed that ΦPSII and activity of antioxidant enzymes of three super high yield wheat cultivars were higher than those of Lumai14 at late growth period. The content of $\text{O}_2^{\cdot-}$ and H_2O_2 and NPQ of three super high yield wheat cultivars were lower than those of Lumai14. These results showed that photosynthetic apparatus of super high yield wheat cultivars was damaged more slightly and had higher ability to use light than that of Lumai14, which were in favor of high yield. The yield of Luyuan301, Weimai8 and Shannong62G were higher than that of Lumai14.

Key words: Late growth period; Super high yield wheat; Antioxidant enzyme

在生育后期, 随着叶片衰老, 作物对光能的利用效率下降, 同时植物体内的活性氧大量积累, 其产生与清除系统的平衡遭到破坏, 尤其是 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 可以转化成 H_2O_2 及攻击性更强的 OH, 进而引发膜脂的过氧化和脱酰化, 直接攻击核酸和蛋白质等, 导致光合机构因氧化胁迫而受到伤害。光合机构的光破坏在许多情况下是由过剩光能导致的活性氧的增加引发的, 植物对氧化胁迫的抗性与活性氧清除能力的大小密不可分^[1]。即使在正常的条件下, 植物体光合

器官除产生 O_2 外, 还生成具有破坏性的活性氧^[2]。引发光氧化损害的两类活性氧是超氧阴离子 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 和单线态氧 $^1\text{O}_2$ 。 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 主要由 Mehler 反应产生, $^1\text{O}_2$ 则由 O_2 与三线态叶绿素或三线态 P680^+ 作用产生的^[3]。当逆境胁迫加重时, 如果依赖叶黄素循环的热耗散不能及时耗散掉过剩能量, 或光合碳同化受阻, 就会导致过剩激发能传递给 O_2 产生活性氧。活性氧的积累会导致细胞膜系统的膜质过氧化伤害, 造成膜结构破坏和功能丧失, 结果表现为膜透性增

收稿日期: 2009-02-12

基金项目: 山东省农业良种工程重大课题(鲁农良种字[2006]6号)

作者简介: 李 萌(1980-), 男, 山东泰安人, 硕士, 助理研究员, 主要从事植物生理与分子生物学研究。

通讯作者: 赵世杰(1960-), 男, 副教授, 主要从事植物光合作用与抗逆性方面的研究。

大和离子泄漏^[4]。

植物体内存在一系列的非酶类抗氧化物质,如抗坏血酸、谷胱甘肽、类黄酮、类胡萝卜素和 α -生育酚等。另外,还存在一些清除酶类,主要包括SOD、CAT、APX与谷胱甘肽还原酶(GR)等^[5],这些抗氧化物质能够及时清除活性氧以减轻或避免活性氧对植物所造成的光氧化破坏^[6]。SOD是植物氧化代谢中一种极为重要的酶,它歧化 $O_2^{\cdot-}$ 为 H_2O_2 和 O_2 ,从而影响着植物体内 $O_2^{\cdot-}$ 和 H_2O_2 的浓度。APX在利用AsA作为电子供体的情况下,将 H_2O_2 还原,生成单脱氢抗坏血酸残基,后者又可以在水-水循环中被PSI通过铁氧环蛋白直接还原。

小麦在生育后期会遭受各种逆境胁迫,但超高产小麦品系在生育后期仍然具有较高的光合速率、较大的光合叶面积和较高的PS II最大光化学效率(F_v/F_m),并且其光合功能期长,叶绿素含量高,衰老延缓^[7],说明超高产小麦生长后期具有较强的抗逆能力。那么生育后期抗氧化酶活性的变化在提高超高产小麦品种的抗逆能力方面是否起到一定的作用呢?这还需要进一步的研究。本研究以鲁原301(L301)、潍麦8号(W8)和山农62G(62G)3个超高产小麦品种(系)以及对照品种鲁麦14(L14)为材料,研究抗氧化酶在小麦生育后期的作用。

1 材料和方法

1.1 试验材料

试验在山东农业大学实验农场进行。选用鲁原301(L301)、潍麦8号(W8)和山农62G(62G)3个超高产小麦品种(系)以及对照品种鲁麦14(L14)为材料。荧光和酶活性的测定都用旗叶。根据品种的生长特性和育种者要求,4个品种的每亩基本苗分别为15、18、18和10万基本苗,每个品种设3个重复,且为随机区组排列。小区面积 $3\text{ m} \times 5\text{ m}$,行距26.4 cm。生育期内按常规栽培措施进行管理,收获后取样进行室内考种,计算最终产量及产量构成。

1.2 试验方法

1.2.1 荧光参数的测定 选取照光一致的部位,采用FMS2脉冲调制式荧光仪(英国Hansatech科学仪器公司)测定光适应下的最大荧光(F_m)、稳态荧光(F_s)等荧光参数。测定时间为14:00。每个品种不同部位的叶片测定10个重复,在群体的自然状态下测定。根据Genty^[8]的方法计算PSII实际光化学效率 $\Phi_{PSII} = (F_m' - F_s)/F_m'$ 和非光化学猝灭值 $NPQ = 1/F_m'$ 。

1.2.2 抗氧化酶活性的测定 前处理:称取0.5 g叶片,在预冷的4 mL pH 7.8(0.05 mol/L)磷酸缓冲

液中冰浴研磨,于4℃下 $8\,000 \times g$ 离心15 min,取上清液测定各种酶的活性。

SOD酶活性的测定:按照Giannopolitis和Ries^[9]的方法测定SOD酶的活性,取前处理上清酶液1.5 mL与反应液(0.05 mol/L磷酸缓冲液、130 mmol/L Met溶液、75 $\mu\text{mol/L}$ NBT溶液、10 $\mu\text{mol/L}$ EDTA- Na_2 、20 $\mu\text{mol/L}$ 核黄素、蒸馏水定容至3 mL)在40 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 光强下反应30 min,以不照光的作为对照(磷酸缓冲液代替酶液),用UV-1601型分光光度计(日本岛津)测定560 nm OD值。

APX酶活性的测定:按照Dalton等^[10]的方法测定APX酶活性,测定系统含62 $\mu\text{mol/L}$ (V/V) 30% H_2O_2 , 0.3 mmol/L AsA, 99.57 $\mu\text{mol/L}$ EDTA- Na_2 , 用0.05 mol/L磷酸缓冲液(pH 7.8)定容至500 mL,取2.9 mL及0.1 mL酶液,用UV-1601型分光光度计在290 nm比色。计算其单位时间内吸光度的变化。

CAT酶活性的测定:按照Abel等^[11]的方法测定CAT酶活性,测定系统含0.3 mL酶提取液和2.7 mL CAT反应液(1 mL H_2O_2 (30 mmol/L)和1.7 mL磷酸缓冲液)。在290 nm进行比色。计算其单位时间内吸光度的变化。

POD酶活性的测定:按照Rao等^[12]的方法测定POD酶活性,测定系统含20 μL 酶提取液和3 mL POD反应液(28 μL 愈创木酚和30% H_2O_2 19 μL 用0.1 mol/L磷酸缓冲液(pH 6.0)定容至50 mL)。在470 nm进行比色。计算其单位时间内吸光度的变化。

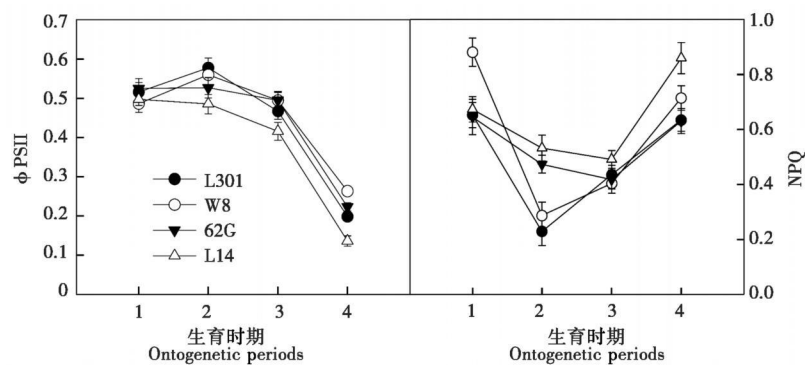
1.2.3 $O_2^{\cdot-}$ 和 H_2O_2 的测定 $O_2^{\cdot-}$ 的测定按照王爱国和罗广华^[13]的方法。 H_2O_2 的测定按照Sairam和Srivastava^[14]的方法。

2 结果与分析

2.1 超高产小麦品种(系)生育后期荧光参数的变化

Φ_{PSII} 表示光照下,光系统II的实际光化学效率;NPQ表示非光化学猝灭系数,反映热耗散的变化。从图1可以看出,在整个生育后期,小麦的 Φ_{PSII} 都表现为先升高后降低的趋势,但超高产小麦品种的 Φ_{PSII} 都高于对照品种鲁麦14,表明在生育后期,虽然叶片开始衰老,但超高产小麦利用光能的效率仍然比鲁麦14高。到成熟期,鲁原301,潍麦8号和山农62G的 Φ_{PSII} 比抽穗期分别降低了61.5%, 45.9%和57.5%,此时鲁麦14的 Φ_{PSII} 比抽穗期降低了72.6%。不同小麦品种的NPQ都是先降低然后增加。从开花期开始,对照品种鲁麦14的NPQ比超高产小麦品种的NPQ明显增加,这表明与超高

产小麦品种相比,鲁麦 14 对光能的利用率明显降低,很大一部分能量通过热的形式耗散掉了。



1, 2, 3, 4 分别为抽穗期(04—25)、开花期(05—01)、灌浆期(05—15)和成熟期(05—28)(以下相同),测定时间为 10:30—11:00。
1. Boot stage; 2. Blooming stage; 3. Grain filling stage; 4. Maturity stage(the same below); Measurement was done from 10:30 to 11:00.

图 1 不同小麦品种生育后期 Φ PSII 和 NPQ 的变化

Fig. 1 Φ PSII and NPQ of different wheat cultivars at late growth periods

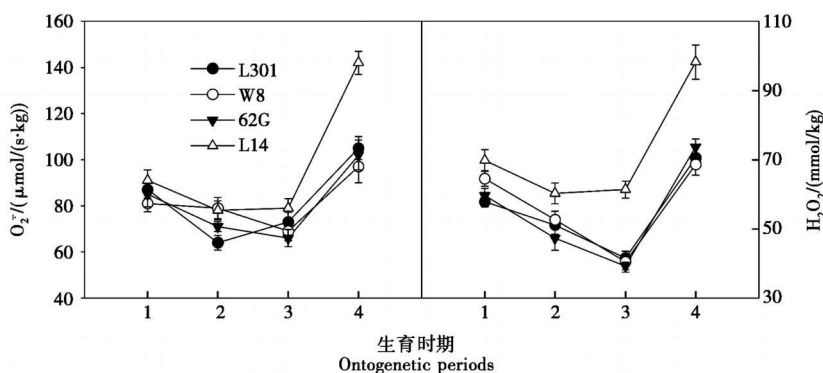


图 2 不同小麦品种生育后期 $O_2^{\cdot-}$ 和 H_2O_2 含量的变化

Fig. 2 Varieties of $O_2^{\cdot-}$ and H_2O_2 content of different wheat cultivars at late growth periods

2.2 超高产小麦品种(系)生育后期 $O_2^{\cdot-}$ 和 H_2O_2 含量的变化

生育后期,小麦对光能的利用效率下降,尽管有一大部分光能可以通过热耗散的形式耗散掉,但仍有过剩光能产生,从而促进活性氧大量积累,引发膜脂过氧化,导致光合机构受到伤害。从图 2 可以看出,不同小麦品种 $O_2^{\cdot-}$ 和 H_2O_2 的含量都表现为先降低然后增加,到成熟期 $O_2^{\cdot-}$ 和 H_2O_2 的含量达到最大值。在抽穗期,开花期和灌浆期超高产小麦品种和鲁麦 14 的 $O_2^{\cdot-}$ 含量相差不大,但到成熟期鲁麦 14 的 $O_2^{\cdot-}$ 含量明显增加,此时鲁原 301, 潍麦 8 号, 山农 62G 和鲁麦 14 的 $O_2^{\cdot-}$ 含量分别比抽穗期增加了 20.7%, 19.8%, 20.0% 和 56.0%。在整个生育后期,鲁麦 14 的 H_2O_2 的含量都高于超高产小麦品种,到成熟期,与抽穗期相比增加了 40.8%,而此时鲁原 301, 潍麦 8 号和山农 62G 的 H_2O_2 的含量比抽穗期分别增加了 22.0%, 6.3% 和 23.5%。

2.3 超高产小麦品种(系)生育后期抗氧化酶活性的变化

植物对氧化胁迫的抗性与活性氧清除能力的大小密不可分。因此抗氧化酶的活性的大小直接影响

活性氧的清除,从而影响光合机构受伤害的程度。从图 3 可以看出,在生育后期,不同小麦品种的 SOD、POD、APX 和 CAT 的活性都是先升高后降低,而且几乎都是在灌浆期酶活性达到最大,到成熟期酶活性最低。在整个生育后期,超高产小麦品种的抗氧化酶活性都高于鲁麦 14,到成熟期,鲁原 301、潍麦 8 号、山农 62G 和鲁麦 14 的 SOD 活性分别降为抽穗期的 67.3%, 57.4%, 60.3% 和 41.9%; POD 活性分别降为抽穗期的 75.1%, 74.8%, 61.1% 和 53.0%; APX 活性分别降为抽穗期的 46.4%, 77.5%, 73.2% 和 30.4%; CAT 活性分别降为抽穗期的 59.6%, 61.0%, 65.1% 和 48.6%。

2.4 不同小麦品种的产量与产量结构

从表 1 可以看出^[7],鲁原 301、潍麦 8 号和山农 62G 品种(系)的每公顷穗数明显低于鲁麦 14,而穗粒数显著高于鲁麦 14,鲁原 301 和潍麦 8 号达到差异极显著水平,且其穗粒数均在 40 粒以上。千粒重高于鲁麦 14,但是只有潍麦 8 号达到差异显著水平。从产量水平看,鲁原 301、潍麦 8 号和山农 62G 分别比对照高出 10.8%, 24.3%, 9.4%, 达到差异极显著水平。

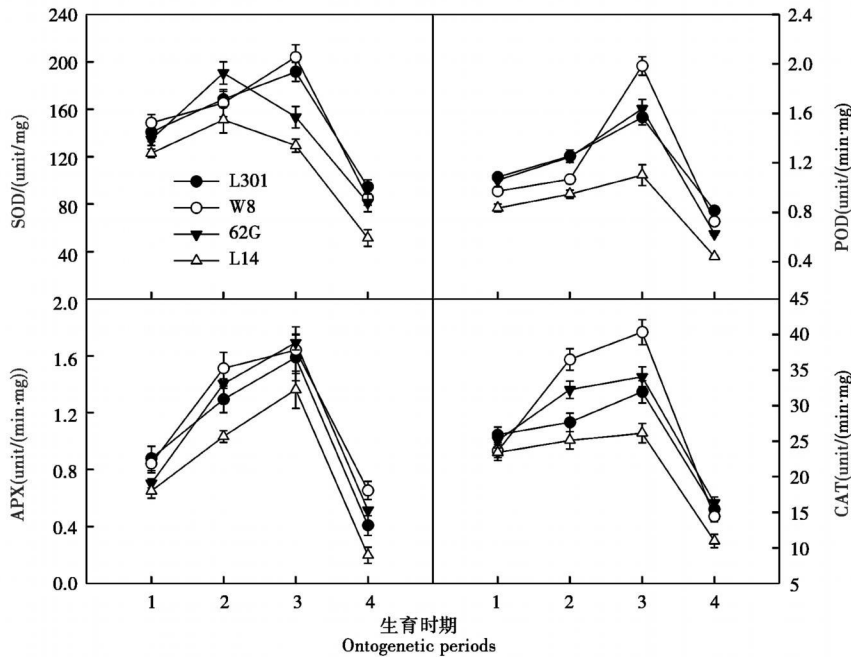


图 3 不同小麦品种生育后期 SOD、POD、APX 和 CAT 含量的变化

Fig. 3 Varieties of SOD, POD, APX and CAT content of different wheat cultivars at late growth periods

表 1 不同小麦品种的产量与产量结构

Tab. 1 Yield and yield components of different wheat cultivars

产量结构 Yield components	鲁原 301 Luyuan301	潍麦 8 号 Weimai8	山农 62G Shannong62G	鲁麦 14 Lumai14
每公顷穗数/(万/hm ²) Ear(10 000/hm ²)	459	433.5	552	624.5
穗粒数 Grain/ear	47.3±2.45**	48.6±2.15**	44.3±2.24*	37.7±1.94
千粒重/g Weight/1000 grains	44.3±2.58	51.2±2.61**	45.0±2.16	41.2±2.01
产量/(kg/hm ²) Grain yield	9 000**	10 098**	8 889**	8 126

注: *表示 $F > F_{0.05}$, 差异达显著水平; **表示 $F > F_{0.01}$, 差异达极显著水平。 Note: *. $F > F_{0.05}$, **. $F > F_{0.01}$.

3 讨论

小麦籽粒的碳水化合物主要由生育后期功能器官的光合作用所提供, 因此小麦生育后期的光合能力决定小麦产量的高低, 而旗叶对产量形成贡献最大^[15]。叶绿素荧光是植物光合作用的探针, 通过对叶绿素荧光猝灭的分析, 可以了解植物叶片对光能的吸收和利用^[16]。到生育后期, 与鲁麦 14 相比, 超高产小麦品种的 $\Phi PSII$ 降低较少, 热耗散也较低。这表明到生育后期, 尽管小麦叶片都在衰老, 但超高产小麦品种利用光能的能力仍较高, 能够积累较多的碳水化合物, 从而提高产量。而鲁麦 14 利用光能的能力降低, 大部分光能通过热的形式耗散掉了, 影响对光能的吸收利用。

在逆境条件下, 一些需氧细胞容易产生活性氧, 植物体内活性氧过量积累能够伤害光合器官, 引发或加剧膜脂过氧化, 造成细胞膜系统和代谢过程的伤害, 严重时会导致植物细胞的死亡。植物体内存在一系列的酶类与非酶类抗氧化物质。植物细胞中存在的能清除活性氧自由基的保护酶系, 包括超氧

化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)和抗坏血酸过氧化物酶(APX)等, 这些酶活性的变化, 已广泛用于植物对逆境的反应机理的研究^[17]。它们在清除超氧自由基、过氧化氢和过氧化物以及阻止或减少羟基自由基形成等方面起着重要作用, 防御膜脂过氧化, 从而使细胞膜免受其伤害。其中 SOD 以催化 $O_2^{\cdot -}$ 发生歧化作用起到清除 $O_2^{\cdot -}$ 的解毒作用, SOD 将 $O_2^{\cdot -}$ 歧化产生的 H_2O_2 由细胞内 CAT, APX 和 POD 清除。从图 3 可以看出, 生育后期超高产小麦品种的 SOD、CAT、APX 和 POD 活性都高于鲁麦 14, 表明超高产小麦品种生育后期清除活性氧的能力高于对照品种鲁麦 14。与此结果相一致, 生育后期超高产小麦品种的 $O_2^{\cdot -}$ 和 H_2O_2 含量低于鲁麦 14。

总之, 到生育后期, 随着叶片的衰老, 小麦利用光能的能力降低, 吸收的光能用于进行光合作用的部分减少, 大量的光能通过热的形式耗散掉, 也会有一部分过剩光能在植物体内积累, 产生活性氧, 伤害光合机构, 甚至导致细胞死亡。超高产小麦品种具有较高的抗氧化酶活性, 能够及时清除细胞产生的

活性氧,减少活性氧对光合机构产生的伤害,从而维持较高的光合性能,积累较多的光合产物,增加小麦产量。

参考文献:

- [1] Hodges D M, Andrews C J, Johnson D A, *et al.* Antioxidant enzyme responses to chilling stress in differentially sensitive inbred maize lines[J]. *J Exp Bot*, 1997, 48: 1105—1113.
- [2] Asada K, Takahashi M. Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis[M]// Kyle D J, Osmond C B, Amtzen C J. Photoinhibition. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1987: 227—287.
- [3] 郭连旺, 沈允钢. 植物光合作用光抑制分子机理及其光保护机制[J]. *植物生理学通讯*, 1996, 32: 1—8.
- [4] Mead J F. Free radical mechanism of lipid damage, a consequence for cellular membranes[M]// Pryor W A. *Free Radical in Biology* Chapter 2. New York: Academic Press, 1976.
- [5] Song X S, Hu W H, Mao W H, *et al.* Response of ascorbate peroxidase isoenzymes and ascorbate regeneration system to abiotic stresses in *Cucumis sativus* L [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2005, 43: 1082—1088.
- [6] Noctor G, Foyer C H. Ascorbate and glutathione, keeping active oxygen under control[J]. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1998, 49: 249—279.
- [7] 隋娜, 李萌, 赵世杰, 等. 超高产小麦品种(系)生育后期光合特性的研究[J]. *作物学报*, 2005, 31(6): 808—814.
- [8] Genty B, Briantais J M, Barker N R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1989, 990: 87—92.
- [9] Giannopolitis C N, Ries S K. Superoxide Dismutases. I. Occurrence in higher plants[J]. *Plant Physiol*, 1977, 59: 309—314.
- [10] Dalton D A, Hanus F J, Russell S A, *et al.* Purification, properties, and distribution of ascorbate peroxidase in legume root nodules[J]. *Plant Physiol*, 1987, 83: 789—794.
- [11] Abel P, Jose A H, Enrique O, *et al.* Changes in antioxidant enzymes and organic solutes associated with adaptation of citrus cells to salt stress[J]. *Plant Cell Tissue and Organ Cult*, 1996, 45: 53—60.
- [12] Rao M V, Paliyath G, Ormrod D P. Ultraviolet—B and ozone—induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Physiol*, 1996, 110: 125—136.
- [13] 王爱国, 罗广华. 植物的超氧化物自由基与羟胺反应的定量关系[J]. *植物生理学通讯*, 1990, 6: 55—57.
- [14] Saiyam P K, Srivastava G C. Changes in antioxidant activity in sub—cellular fractions of tolerant and susceptible wheat genotypes in response to long term salt stress[J]. *Plant Sci*, 2002, 162: 897—904.
- [15] Austin R B, Morgan C L. Flag leaf photosynthesis of *Triticum aestivum* and related diploid and tetraploid species[J]. *Ann Bot*, 1982, 49: 177.
- [16] Krause G H, Weis E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics[J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1991, 42: 313—349.
- [17] Bowler C, Van Montagu M, Inze D. Superoxide dismutase and stress tolerance[J]. *Annu Rev Plant Mol Biol*, 1992, 43: 83—116.