

文章编号: 1005-0906(2003)01-0063-04

水分胁迫对玉米叶片关键防御酶系活性及其同工酶的影响

孙彩霞¹, 刘志刚², 荆艳东²

(1. 中国科学院沈阳应用生态研究所, 沈阳 110016; 2. 沈阳农业大学农学院, 沈阳 110161)

摘要: 本文对协同完成自由基清除的关键防御酶系中 SOD、POD、CAT 的酶活性及同工酶在水分胁迫条件下的变化做了研究。结果表明: 水分胁迫下玉米叶片内的 SOD、POD、CAT 的酶活性和同工酶谱均发生了变化。其中, POD 同工酶谱的变化最为明显, 谱带颜色深浅和条数均有变化, 部分酶分子失去了酶活性而谱带消失, 另一部分酶分子活性则明显提高或出现新的谱带。SOD、CAT 同工酶谱的变化相对不强。同时 POD、CAT 同工酶谱在不同玉米基因型间差异较明显, SOD 则无太大差异。说明从抗旱育种角度出发, 可将其作为抗旱性鉴定的生化指标。

关键词: 水分胁迫; 玉米; SOD; POD; CAT; 酶活性; 同工酶

中图分类号: S513.01

文献标识码: A

Effect of Water Stress on Activity and Isozyme of the Major Defense-enzyme in Maize Leaves

SUN Cai-xia¹, LIU Zhi-gang², JING Yan-dong²(1. *Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016;**2. Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China)*

Abstract: SOD and POD in cooperation with CAT belonging to the major defense-enzyme system could clear away oxygen for radicals in the plant. The results showed that: the activity and isozyme both changes of SOD, POD and CAT under water stress were studied in this paper. The changes of bands and activities in peroxidase isozymes were more significant than others. At the same time, the differences of peroxidase and catalase isozymes in different genotypes maize were obviously than superoxide dismutase. Such results would facilitate maize breeding for improving drought resistance.

Key words: Water stress; Maize; SOD; POD; CAT; Enzyme activity; Isozyme

自由基是机体正常代谢产物, 虽然它在细胞代谢过程中连续不断地产生, 由于机体内存在防御系统, 故正常情况下其代谢保持平衡状态。但在水分亏缺时, 由于自由基产生过多, 或由于抗氧化防御系统作用减弱时, 体内自由基不能被完全清除而造成自由基的累积, 进而会危害生物体^[1]。因而, 植株体内源保护性物质和保护性酶在抗旱性形成中的作用非常重要。其中, SOD、POD、CAT 作为防御活性氧自由基对细胞膜系统伤害的酶在抗旱性形成中的作用, 从 MoCord 和 Fridovich^[2]提出生物自由基伤害学说

以来愈来愈受到重视。SOD 能将 O_2^- 转化成毒性较小的 H_2O_2 和 O_2 。 $(2O_2^- + 2H^+ \xrightarrow{SOD} O_2 + H_2O_2)$ 。CAT 和 POD 又可进一步清除 H_2O_2 生成无害的 O_2 和 H_2O 。 $(2H_2O_2 \xrightarrow{CAT/POD} 2H_2O + O_2)$ 。从而协同完成对生物体的保护作用。目前, 关于单一酶在水分胁迫中变化趋势及其与抗旱性的关系研究很多^[3-5], 但作为协同完成自由基清除的关键防御酶系的系统研究尚需加强, 本文做了此方面的工作。

1 材料和方法

1.1 试验材料和处理

以抗旱性不同的玉米杂交种丹玉 13 (D-Y13)、

收稿日期: 2002-08-18

作者简介: 孙彩霞, 博士后, 主要从事作物生理及植物营养方面的研究工作。

豫玉 3 号(Y-Y3)以及组成这两个杂交种的亲本自交系(Mo17、E28、3184、黄早四(H-Z4))为试验材料。盆栽单株种植。试验设正常供水和干旱(控水)两个处理,于抽雄期进行中度水分胁迫,处理持续 7 天。每一试材每一处理设 3 次重复。其它栽培管理措施按照常规进行。取穗位叶片中部进行各指标的测定。

1.2 测定指标和方法

1.2.1 超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)活性 取 0.5 g 叶片加入 0.062 5 M, pH7.8 的磷酸缓冲液(PBS)冰浴研磨定容至 5 mL, 15 000 r 4℃下离心 20 min, 上清液为酶提取液。

SOD 活性测定:酶反应体系依次加入 0.062 5 M pH7.8 PBS 2.3 mL, 0.06 mM 核黄素液 0.2 mL, 30 mM 蛋氨酸 0.2 mL, 0.003 mM EDTA 液 0.1 mL, 适量酶液, 1.125 mM 氯化硝基四氮唑蓝(NBT)0.2 mL。以不加酶液(以缓冲液代替)的试管为最大光化还原管, 用缓冲液作空白管(用缓冲液代替 NBT)。然后将各管在 4 000 Lux 下反应 25 min 进行光化还原。测定反应液的 OD₅₆₀ 值, 根据 SOD 抑制 NBT 光化学还原的量计算酶活性。

POD 活性测定:取 20 μ L 酶液(用 PBS 代替酶液作空白)加入反应混合液(100 mM pH7.0 PBS, 20 mM 愈创木酚), 混匀, 25℃温浴 5 min, 加 20 μ L 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(u)。

CAT 活性测定:取 1.0 mL 30% H₂O₂ 溶液和 1.9 mL 双蒸馏水加入一只光径 1 cm 比色皿中, 25℃水浴平衡 1 min, 加 0.1 mL 酶溶液, 在 240 nm 处以蒸馏水为参比在连续 5 min 内测定吸光度(每隔 1 min 读取 1 次结果, 直至每分钟吸光度的降低值达到稳定为止)。在上述条件下, 每分钟酶促分解 1 μ mol 过氧化氢(OD 值降低 0.043 6)的酶量为 1 个酶活力单位(u)。

1.2.2 SOD、POD、CAT 同工酶 用上述酶提取液按照胡能书^[6](1985)、张宪政^[7](1994)等方法进行同工酶电泳。选用不连续垂直板聚丙烯酰胺电泳方法, 碱性系统, 高离子强度电极缓冲液。分离胶采用化学聚合法, 浓度 POD、CAT 为 7.5%, SOD 为 10%, 浓缩胶浓度为 3%。电泳时采用稳流控制, 浓缩胶为 15 mA/板, 分离胶为 20 mA/板。电泳至溴酸蓝标志到达凝胶前沿为止。电泳完比后, 取下胶片, 分别按下述方法染色。

SOD 同工酶: (1) 2.45 mM NBT 液中于黑暗下浸 20 min; (2) 内含 0.028 mM 核黄素, 2.8×10^{-2} M 四甲基乙二胺的 3.6×10^{-2} M pH7.8 的磷酸缓冲液中于黑暗下浸泡 15 min; (3) 在 0.1 mM EDTA 的 0.05 M pH7.8 磷酸缓冲液中浸泡并于 40 W $\times$ 3 日光灯下照光 15 ~ 30 min。

POD 同工酶: 分别将联苯胺-醋酸溶液, 4% 氯化铵溶液, 5% EDTA Na₂ 溶液, 0.3% H₂O₂ 溶液, 按 1⁺ 1⁺ 1⁺ 8 的比例配制染色液。将胶板浸入配好的染色液中, 反复振荡 5 ~ 10 min, 至棕色酶带清晰显出, 立即倒掉染色液, 加水冲去浮色并保存, 数日谱带不发生变化。

CAT 同工酶: 将 1% 可溶性淀粉溶液于沸水浴中充分煮沸至无色透明。胶片脱下后放入上述溶液中 4℃浸泡 1 小时 40 分钟。倾出淀粉液加入 0.5% 过氧化氢溶液, 室温静置 1 min, 然后用双蒸馏水漂洗几次, 加入 0.5% KI 溶液(取 1 g, 用双蒸馏水定容至 200 mL, 加 1 mL 冰醋酸使之酸化), 将漂洗好的胶片放入。室温下背景逐渐变蓝色, 酶活处无色透明, 清晰后立即以蒸馏水漂洗, 并迅速照相, 记录, 以防谱带消失。

2 结果与分析

2.1 SOD、POD、CAT 酶活性与玉米抗旱性

由表 1 可知, 在水分胁迫下(WS), SOD 酶活性增加, POD 酶活性有上升的趋势, CAT 酶活性有下降的趋势。经分析表明, 无论酶活性具有升高或是下降的变化, 其与玉米基因型的抗旱性关系密切。抗旱性强的玉米基因型的酶活性在水分胁迫下或升高或下降但仍保持较高的酶活性而抗旱性较弱的玉米基因型的酶活性则下降明显或活性较低。说明玉米在干旱条件下能够通过部分活性氧清除酶类活性的增强来提高自身的抗旱能力。

表 1 水分胁迫下玉米叶片 SOD、POD、CAT 酶活性变化
 $\mu \cdot g^{-1} \text{FW} \cdot \text{min}^{-1}$

基因型	SOD		POD		CAT	
	CK	WS	CK	WS	CK	WS
D-Y13	77.26	83.94	6.528	12.419	1.169	1.099
Mo17	144.17	158.15	12.654	14.669	1.102	0.879
E28	131.89	137.04	9.557	15.737	0.599	0.239
Y-Y3	83.82	165.98	6.951	9.392	1.221	1.371
3184	98.45	103.33	7.585	10.580	0.455	1.910
H-Z4	93.62	144.51	11.714	8.952	1.058	0.542

2.2 SOD、POD、CAT 同工酶与玉米抗旱性

由图 1 可知,在水分胁迫下 SOD 同工酶谱带多少基本上无变化,呈迁移率(Rf)分别为 0.38,0.50,0.60,0.80 的四条酶带。在水分胁迫下 SOD 在近阳极端的谱带活性有所增强。这说明近正极向的小分子条带可能与抗旱机制有关。由图 2 可知,在水分胁迫下 POD 酶分子本身进行了深刻的改建,部分酶分子(Rf=0.74,0.79,0.85,0.91)几乎完全失去了本身的酶活性,而另一部分酶(Rf=0.17,0.48)分子则明显地提高活性。后一种情况可能是由于酶的活性中心大大改变了构型,也可能整个分子发生了构型变化。由图 3 可知在干旱条件下 CAT 大分子谱带有减少的趋势(因 CAT 同工酶从谱带出现到消失时间非常短暂,此处尤其迅速,尚需进一步研究),而近阳极端酶活有增加的趋势。

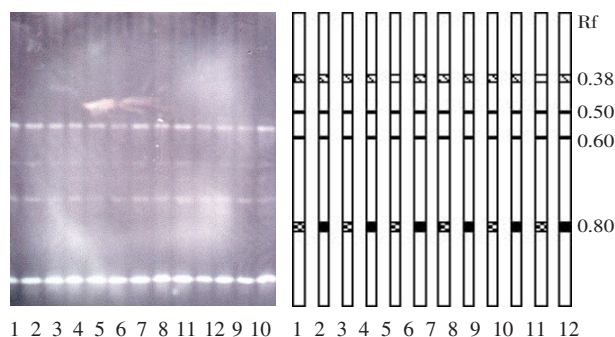


图 1 水分胁迫下玉米叶片 SOD 同工酶图谱

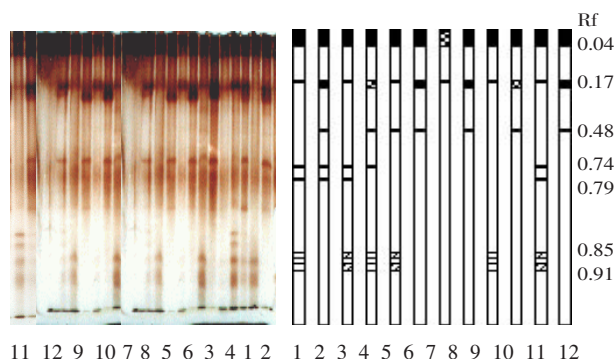


图 2 水分胁迫下玉米叶片 POD 同工酶图谱

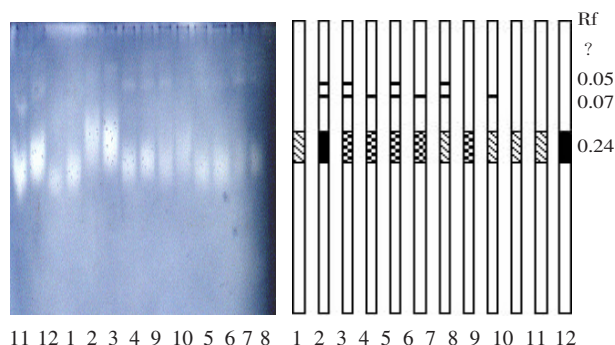


图 3 水分胁迫下玉米叶片 CAT 同工酶图谱

3 结论与讨论

玉米种性表现为株体自身整体功能对干旱胁迫有一定的弹性,受旱时可通过株体内一系列生理生化反应,来减轻或分散水分胁迫对细胞代谢过程的伤害,因而玉米内源保护性物质和保护性酶在受旱后呈现一定的升-降或降-升-降的变化规律^[3-5]。它们在株体内或具有特异性功能或协同作用进行旱害的防御,且在不同株体内的反应能力不同。本文的研究结果表明,在水分胁迫下保护性酶活性的变化,不仅和胁迫时间、胁迫程度有关,亦和品种自身特性有关,随着供试材料基因型的增加,其变化的规律性有所改变。

同工酶分析是认识基因存在和表达的工具^[8-10]。许多学者研究了不同逆境(冷、盐、旱等)下不同作物 POD 同工酶谱的变化^[11-12]。关于 CAT 同工酶的研究甚少。本文研究了作为协同完成自由基清除的关键防御酶系 SOD、POD、CAT 的同工酶谱变化。研究结果表明:POD 同工酶在水分胁迫下的变化最为明显,不仅谱带颜色深浅(酶活)有一些变化,且谱带条数变化明显,部分酶分子(Rf=0.74,0.79,0.85,0.91)失去了酶活性而谱带消失,而另一部分酶分子活性(Rf=0.17,0.48)则明显提高或出现新的谱带。说明其在适应干旱胁迫的过程中可能具有重要的作用。目前已经证实水分亏缺下,POD 同工酶的确参与了细胞壁的硬化过程,而该过程又是导致水分亏缺下细胞延伸生长受抑的原因之一^[13]。SOD、CAT 的同工酶谱变化相对不强。其中有些酶分子活性变化明显,但基本上无新的谱带出现。这可能是由 SOD、CAT 功能的专一性决定的。Park(1992)研究表明,CAT、SOD 对脂质过氧化引起的 DNA 损伤有一定程度的保护作用。Veda(1995)研究表明 CAT 能部分抑制(33%)DNA 链的断裂,曾庆平等(1997)认为 CAT 能控制 H₂O₂ 的信号转导强度(H₂O₂ 可作为信号转导分子或充当第二信使激活与逆境应答有关基因表达),并协同诱导抗逆应答基因的表达,若刺激强度在死亡阈值以上则启动既定的死亡程序来诱导细胞的主动调亡。另外,POD、CAT 同工酶谱在不同玉米基因型间差异较明显,而 SOD 则无太大差异。说明从抗旱育种角度出发,可将 POD、CAT 同工酶作为抗旱性鉴定的生化指标。以上结果说明,玉米体内 SOD、POD、CAT 同工酶确实能够适应水分胁迫而产生相应的变化,如某些酶活性变化和诱导产生新的谱带,这些都可能与抗旱机制有关。

值得注意的是,在以往的玉米抗旱性鉴定的生化指标中尚无采用有关同工酶变化的指标,随着分析方法的完善和研究技术手段的提高,这方面的研究进一步加强,必将提高玉米抗旱性鉴定的速度和效率。

参考文献:

- [1] Inaki Iturbe-ormatex et al. Oxidative damage in pea plant exposed to water deficit or paraquat [J]. Plant Physiol. 1998,116:173-181.
 - [2] Fridovich. Superoxide dismutase [J]. Ann, Rev. Biochem. 1975, 44: 147-159.
 - [3] 韩建民,史吉平,商振清. 渗透胁迫对玉米苗期叶片水分状况、SOD 和 POD 酶活性的影响[J]. 华北农学报,1995,10(1):128.
 - [4] 王芳雁,邵世勤,张建华,等. 水分胁迫对玉米保护酶系活力及膜系统结构的影响[J]. 华北农学报,1995,10(2): 43-49.
 - [5] 沈秀瑛,徐世昌,戴俊英.干旱对玉米 SOD、CAT 及酸性磷酸酯酶活性的影响[J]. 植物生理学通讯,1995,31(3):183-186.
 - [6] 胡能书,万贤国编.同工酶技术及其应用[M]. 湖南科学技术出版社,1985.5.
 - [7] 张宪政,陈凤玉,王荣富主编.植物生理学实验技术[M]. 辽宁科学技术出版社,1994. 6.
 - [8] 周光宇. 有关同工酶分析的几个问题[J]. 植物生理学通讯,1983 (1):1-4.
 - [9] 梅慧生. 植物同工酶研究的某些进展[J]. 植物生理学通讯,1981 (3): 1-7.
 - [10] 余叔文主编. 植物生理学与分子生物学[M]. 科学出版社,1992. 415.
 - [11] 王振镒,郭蔼光,罗淑萍. 水分胁迫对玉米 SOD 和 POD 活力及同工酶的影响[J]. 西北农业大学学报,1989,17(1): 45-49.
 - [12] 郝延龄,等. 低温对玉米幼苗 POD 同工酶的影响[J]. 黑龙江农业科学,1990(1): 26-29.
 - [13] 荆家海,肖庆德. 玉米叶片生长部位渗透调节和生长的生理物
- 理参数变化[J]. 植物生理学报,1988,14(4): 385-390.

联系电话: 024-23916216