

毛竹幼苗抗氧化酶和 AsA-GSH 循环对高温干旱及协同胁迫的响应

韩一林¹, 王鑫朝², 许馨露², 高 岩², 温国胜², 张汝民², 王玉魁¹

(1. 国家林业局 竹子研究开发中心 浙江省竹子高效加工重点实验室, 浙江 杭州 310012; 2. 浙江农林大学 省部共建亚热带森林培育国家重点实验室, 浙江 杭州 311300)

摘要: 为了探讨毛竹 *Phyllostachys edulis* 对高温干旱及协同胁迫的响应, 采用人工模拟干旱(对照、轻度、中度和重度干旱), 高温(对照 25 ℃和高温 40 ℃)及协同胁迫处理毛竹 3 年生盆栽苗, 分别测定叶片活性氧(ROS), 丙二醛(MDA), 抗坏血酸(AsA)和谷胱甘肽(GSH)质量摩尔浓度, 同时测定抗氧化防御酶和抗坏血酸-谷胱甘肽(AsA-GSH)循环酶活性的变化。结果表明: 干旱胁迫下, 毛竹叶片超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)和过氧化氢(H_2O_2)质量摩尔浓度显著增加($P<0.05$), 抗氧化酶活性及 ρ_{GSH}/ρ_{GSSG} (GSSG 为氧化型谷胱甘肽)比值均随干旱处理程度的增加而升高, 其中超氧化物歧化酶(SOD), 过氧化物酶(POD)活性和 ρ_{GSH}/ρ_{GSSG} 在中度干旱胁迫时较对照分别增加了 1.7 倍、1.7 倍和 0.6 倍($P<0.01$)。高温胁迫下, MDA 较对照增加 1.4 倍($P<0.01$); SOD, POD, 过氧化氢酶(CAT)活性和 ρ_{AsA}/ρ_{DHA} (DHA 为二十二碳六烯酸)均极显著升高($P<0.01$)。协同胁迫下, ROS 进一步增加, 膜脂过氧化程度增强, 同时 CAT 活性的稳定性最强, 活性随协同胁迫程度的增加稳步增加, ρ_{AsA}/ρ_{DHA} 降低, 而 ρ_{GSH}/ρ_{GSSG} 值变化不大, GSH 循环对抵抗协同胁迫比 AsA 循环表现出更强的耐性。在高温干旱及协同胁迫下, 毛竹幼苗可以通过调节抗氧化酶系统和非酶系统 AsA-GSH 循环协同作用来清除氧化物质, 提高抗旱胁迫能力。图 4 表 1 参 33

关键词: 植物生理学; 毛竹; 高温干旱及协同胁迫; 活性氧化物; 抗氧化酶; AsA-GSH 循环

中图分类号: S718.3

文献标志码: A

文章编号: 2095-0756(2018)02-0268-09

Responses of anti-oxidant enzymes and the ascorbate-glutathione cycle to heat, drought, and synergistic stress in *Phyllostachys edulis* seedlings

HAN Yilin¹, WANG Xinzha², XU Xinlu², GAO Yan², WEN Guosheng², ZHANG Rumin², WANG Yukui¹

(1. Key Laboratory of High Efficient Processing of Bamboo, China National Bamboo Research Center, Hangzhou 310012, Zhejiang, China; 2. Nurturing Station for the State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China)

Abstract: To study the physiological responses of 3-year-old *Phyllostachys edulis* seedlings to drought stress, heat stress, and synergistic stress, a pot experiment was conducted. Changes of reactive oxygen species (ROS), malondialdehyde (MDA), ascorbic acid, and glutathione concentration, as well as changes in enzyme activity of anti-oxidative enzymes and ascorbate-glutathione (AsA-GSH) cycle in the leaves of *Ph. edulis* were determined using an artificial simulation method by a spectrophotometer with different levels of drought stress (control check (70.0%–80.0% of field water-holding capacity), light stress (60.0%–70.0% FC), medium stress (40.0%–50.0% FC), and heavy stress (20.0%–30.0% FC)), heat stress (25 ℃ and 40 ℃), and synergistic stress. Results showed that the contents of superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) and hydrogen peroxide (H_2O_2) in leaves of

收稿日期: 2017-03-23; 修回日期: 2017-05-11

基金项目: 国家林业局引进国际先进农业科学技术计划项目(2013-4-23); 国家自然科学基金资助项目(31570686, 30972397); 浙江省中国林业科学研究院省院合作项目(2015SY13)

作者简介: 韩一林, 从事植物生理研究。E-mail: 1196021991@qq.com。通信作者: 王玉魁, 研究员, 博士, 从事植物生理等研究。E-mail: wyukui@126.com

Ph. edulis increased ($P<0.05$) compared to ck with drought stress. Anti-oxidant enzyme activities and the $\rho_{\text{GSH}}/\rho_{\text{GSSG}}$ ratio increased ($P<0.05$) compared to ck with an increase in the degree of drought stress. With moderate drought stress, compared to ck, highly significant differences ($P<0.01$) were found for activities of superoxide dismutase (SOD) (1.7 times higher), peroxidase (POD) (1.7 times higher), and the ratio of $\rho_{\text{GSH}}/\rho_{\text{GSSG}}$ (0.6 times higher). Compared to ck, MDA increases (1.4 times) were highly significant ($P<0.01$), and increases in the activity of SOD, POD, and catalase (CAT), along with the ratio $\rho_{\text{AsA}}/\rho_{\text{DHA}}$ were highly significant ($P<0.01$) with heat stress. After synergistic stress, compared to ck, ROS increased ($P<0.01$), and the degree of membrane lipid peroxidation was enhanced ($P<0.01$); meanwhile, the stability of CAT activity was strongest ($P<0.01$) increasing steadily compared to ck with an increase in synergism. Also, the $\rho_{\text{AsA}}/\rho_{\text{DHA}}$ ratio showed a downward trend; whereas, the $\rho_{\text{GSH}}/\rho_{\text{GSSG}}$ ratio was not significant. Thus, the GSH cycle showed stronger resistance to synergistic stress than the AsA cycle suggesting that *Ph. edulis* seedlings could protect themselves effectively from oxidative damage with a degree of heat, drought, and synergistic stress. [Ch, 4 fig. 1 tab. 36 ref.]

Key words: plant physiology; *Phyllostachys edulis*; heat, drought, and synergistic stress; active oxygen species; anti-oxidant enzymes; AsA-GSH cycle

在气候变暖的背景下, 高温和干旱等灾害天气出现更为频繁。温度和水分作为全球气候变化的两大重要表征, 是影响植物生长和分布的最重要的非生物因素^[1]。两者独立或交互作用, 都会对植物生长发育产生极大影响^[2]。活性氧(ROS)如过氧化氢(H_2O_2), 超氧阴离子($\text{O}_2^{\cdot-}$), 羟自由基($\cdot\text{OH}$)和单线态氧($^1\text{O}_2$)等, 是植物中氧化还原级联的有氧代谢产物, 如果不能被及时清除, 将产生很强的氧化性, 导致细胞脂质过氧化, 对细胞的蛋白质、核酸和脂质等生物大分子产生永久性伤害, 进而引起细胞死亡^[3]。此外, 随着 ROS 的积累, 生物膜不饱和脂肪酸分解产生的丙二醛(MDA)^[4], 一方面加剧细胞质膜过氧化程度, 导致膜系统损伤, 使细胞受到伤害^[5]; 另一方面植物细胞产量显著减少, 最终引起机体衰老^[6]。植物处于逆境下并不是被动受到伤害, 而是主动调节适应。植物在进化过程中形成了相应的酶促保护系统[如超氧化物歧化酶(SOD), 过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)等], 能有效清除 ROS, 提高植物耐受能力^[7]。RAMÍREZ 等^[8]研究发现, 拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 通过维持体内非酶系统[抗坏血酸-谷胱甘肽(AsA-GSH)循环]快速有效运转, 减轻逆境胁迫下植物的活性氧伤害, 使植物更好地适应环境。学者对单一逆境胁迫条件下植物抗氧化防御系统的研究已有报道, 并被认为是能够反映植物抗性大小的普遍标记^[2,9], 但是高温干旱复合胁迫对抗氧化防御系统的研究较为少见。毛竹 *Phyllostachys edulis* 在中国分布极广, 具有重要的社会、经济和生态价值^[10]。目前, 针对毛竹抗逆性的研究主要集中在光合作用^[11]、生长形态^[12]和单一逆境下的抗氧化酶活性^[13]等方面。本研究以毛竹为研究对象, 通过设置高温与干旱胁迫不同水平的处理, 分析高温和干旱叠加条件下毛竹体内 ROS 的产生情况, 探讨抗氧化酶系统和非酶系统抵御氧化胁迫的变化规律, 揭示高温和干旱双重胁迫下毛竹生理生化响应机制及其抗高温和干旱的能力, 为毛竹林培育提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料处理

试验材料为 3 年生毛竹实生苗, 苗高为 1.0 m 左右。于 2015 年 8 月下旬, 选取生长良好形态相近的毛竹幼苗移栽于塑料花盆中(花盆高为 50.0 cm, 内径为 60.0 cm), 取浙江临安当地的黄壤土作为栽培土壤, pH 6.9~7.0, 1 株·盆⁻¹, 在缓苗期间, 用自来水浇灌。选取生长良好, 无病虫害, 长势相近的毛竹 25 盆, 其中对照组 10 盆, 其余随机分成 3 组(处理), 5 盆·组⁻¹(重复), 在常温条件下(25 °C/20 °C, 昼/夜)栽培。将对照组中的 10 盆随机分为 2 组, 5 盆·组⁻¹, 其中 1 组作为干旱处理的对照组, 正常管理, 另一组作为高温处理组, 正常管理。

干旱处理: 在缓苗 30 d 后进行。设计 4 个梯度的处理: 对照 70.0%~80.0%田间持水量(FC), 轻度干旱(60.0%~70.0% FC), 中度干旱(40.0%~50.0% FC)和重度干旱(20.0%~30.0% FC)。采用称量法控制土壤水分含量, 每天 17: 00~18: 00 称量并补充消耗的水分, 干旱处理 10 d。选取毛竹植株中上部完

整的功能叶片取样,样品用液氮迅速冷冻,置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温冰箱内保存。温度处理:在8:00时将其中1组对照组和干旱处理过的毛竹盆栽苗放入 $40\text{ }^{\circ}\text{C}/30\text{ }^{\circ}\text{C}$ (昼/夜)人工气候箱,设定昼夜相隔时间12 h,光照强度设定为 $400\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,高温处理48 h后取毛竹植株中上部完整的功能叶片进行相关指标测定。

1.2 测试方法

1.2.1 $\text{O}_2^{\cdot-}$, 过氧化氢和 MDA 测定 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 测定参照 SHAH 等^[14]的方法并略作改进:取 0.2 g 冷冻样品,加 5.0 mL 磷酸缓冲液($100.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7.2, 含 $1.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 二乙基二硫代氨基甲酸钠)研磨,15 000 g 离心 30 min($4\text{ }^{\circ}\text{C}$)。3.0 mL 反应体系包含:2.0 mL 样品提取液和 1.0 mL 氮蓝四唑(NBT, $0.25\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$),在 540 nm 处测定 3 min 内吸光度的变化。结果表示为 $\Delta D(540)\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ 。过氧化氢测定参照 RAI 等^[15]的方法并略作改进:取 0.2 g 冷冻样品,加 5.0 mL 磷酸缓冲液($50.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 6.5)磨碎,3.0 mL 样品提取液与体积分数为 20% 的硫酸(含质量分数为 0.1%硫酸钛)1.0 mL 混合,16 000 g 离心 15 min ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$),取上清液测定 410 nm 处的吸光度。过氧化氢的质量摩尔浓度用吸光系数 $0.28\text{ }\mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ 来计算,结果表示为 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ 。MDA 测定参照 HODGES 等^[16]的方法。

1.2.2 抗氧化酶活性测定 取 0.2 g 冷冻样品液氮研磨,加 5.0 mL 磷酸缓冲溶液($50.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7.8)匀浆,10 000 g 离心 10 min($4\text{ }^{\circ}\text{C}$)。上清液用于 SOD, POD 和 CAT 活性的测定。SOD 活性测定参照 GIANNOPOLITIS 等^[17]的方法。POD 活性测定参照 KUMARI 等^[18]的愈疮木酚法。CAT 活性测定参照 KUMARI 等^[18]的方法。

1.2.3 AsA 和 GSH 测定 取 0.2 g 冷冻样品液氮研磨,加 $50.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 偏磷酸 5.0 mL 匀浆,15 000 g 离心 15 min ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$),上清液用于 AsA 和 GSH 的测定。AsA 和 GSH 测定参照 RAI 等^[19]的方法。

1.2.4 AsA-GSH 循环相关酶活性测定 取 0.2 g 样品用 5.0 mL 磷酸缓冲溶液(pH 7.4, 含 $1.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙二胺四乙酸 EDTA)冰浴研磨成匀浆,混匀后在 16 000 g 离心 20 min ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$)。上清液为毛竹 AsA-GSH 循环的相关酶活性测定的酶液。抗坏血酸过氧化物酶(APX)活性测定参照 NAKANO 等^[20]的方法。谷胱甘肽还原酶(GR)活性测定参照 SCHAEDLE 等^[21]的方法。单脱氢抗坏血酸还原酶(MDHAR)活性测定参照 HOSSAIN 等^[22]的方法。脱氢抗坏血酸还原酶(DHAR)活性测定参照 DOULIS 等^[23]的方法。

1.3 数据处理

数据分为 2 组进行统计分析:一组为干旱胁迫处理,另一组为高温干旱胁迫处理,高温对照组即高温处理组,所有的数据均取 5 次重复的平均值 $\pm$ 标准误。各组的数据利用 Origin 9 软件(美国 Origin Lab 公司)进行统计分析和作图。统计方法采用单因素方差分析(one-way ANOVA)进行检验,并进行 Turkey 多重比较。采用双因素方差分析(two-way ANOVA)评估高温胁迫 $\times$ 干旱胁迫的协同作用。

2 结果与分析

2.1 $\text{O}_2^{\cdot-}$, 过氧化氢和 MDA 变化

随干旱胁迫程度的增加毛竹叶片中的 $\text{O}_2^{\cdot-}$, 过氧化氢和 MDA 质量摩尔浓度逐渐上升(表 1),其中在轻度干旱胁迫条件下, $\text{O}_2^{\cdot-}$ 和 MDA 质量摩尔浓度分别比对照高 39.9%和 68.8%($P<0.01$);中度干旱胁迫时, $\text{O}_2^{\cdot-}$, MDA 和过氧化氢质量摩尔浓度分别比对照高 74.4%, 94.5%和 38.8%($P<0.01$)。在高温胁迫条件下, $\text{O}_2^{\cdot-}$, 过氧化氢和 MDA 质量摩尔浓度分别比对照高 44.2%, 21.9%和 140.9%($P<0.01$)。在协同胁迫下,三者质量摩尔浓度进一步增加,在轻度干旱和高温协同胁迫下, $\text{O}_2^{\cdot-}$, 过氧化氢和 MDA 质量摩尔浓度分别比对照高 67.6%, 28.8%和 170.5%($P<0.01$)。

2.2 SOD, POD 与 CAT 活性变化

随干旱胁迫程度的增加,毛竹叶片的 SOD, POD 和 CAT 活性均逐渐增加(图 1)。中度干旱胁迫下, SOD 和 POD 活性分别比对照高 1.7 倍和 1.7 倍($P<0.01$);轻度干旱胁迫下, CAT 活性比对照高 1.9 倍($P<0.05$)。在高温胁迫条件下, SOD, POD 和 CAT 活性分别比对照高 0.8 倍、0.6 倍和 1.6 倍,三者活性与其对照的差异均极显著($P<0.01$)。协同胁迫使 SOD 和 POD 活性呈先增加后降低,且均在中度干旱水平的协同胁迫下达到峰值,分别比对照高 2.9 倍和 3.2 倍($P<0.01$);CAT 活性呈逐渐增加趋势,在中度干旱和高温协同胁迫下与对照的差异极显著($P<0.01$)。

表 1 干旱和高温胁迫对毛竹活性氧(ROS)和丙二醛(MDA)的影响

Table 1 Effects of high temperature and drought stress on ROS and MDA contents in <i>Phyllostachys edulis</i>					
<i>T</i> /℃	项目	处理	超氧阴离子 O ₂ ⁻ /[<i>D</i> (540)·min ⁻¹ ·g ⁻¹]	过氧化氢/(μmol·g ⁻¹)	MDA/(μmol·g ⁻¹)
25		对照	7.5 ± 0.3 D	36.5 ± 2.8 B	9.6 ± 2.6 C
		轻度干旱	10.5 ± 0.5 C	42.4 ± 5.5 B	16.1 ± 1.6 B
		中度干旱	13.1 ± 0.3 B	50.7 ± 5.2 A	18.6 ± 1.1 AB
		重度干旱	14.7 ± 0.1 A	50.7 ± 5.2 A	20.6 ± 0.4 A
	平方和	组间(<i>d</i> _n =3)	118.0	861.1	276.1
		组内	1.2	463.0	31.2
40		对照	10.8 ± 0.1 d	44.5 ± 1.6 c	23.0 ±1.3 bc
		轻度干旱	12.6 ± 0.4 c	47.0 ± 3.5 c	25.8 ±3.0 b
		中度干旱	14.6 ± 0.3 b	53.1 ± 2.9 b	29.0 ±1.0 ab
		重度干旱	15.4 ± 0.1 a	57.6 ± 2.7 a	31.8 ± 0.5 a
	平方和	组间(<i>d</i> _n =3)	51.2	626.8	174.5
		组内	0.8	150.9	36.6
		<i>P</i> (<i>F</i> _m)	*	**	ns
		<i>P</i> (<i>F</i> _s)	**	*	**
		<i>P</i> (<i>F</i> _s × <i>F</i> _m)	ns	ns	ns

说明：同列不同大写字母表示 25 ℃ 时不同处理类型间差异显著, 同列不同小写字母表示 40 ℃ 时不同处理类型间差异显著。
*F*_s 表示不同温度间的差异; *F*_m 表示不同处理类型的影响; *F*_s×*F*_m 表示植物组织应对高温干旱胁迫的不同响应; * 表示 *P*<0.05; ** 表示 *P*<0.01; ns 表示差异不显著

2.3 抗氧化物的变化

随干旱胁迫程度的增加, 毛竹叶片的 AsA 和二十二碳六烯酸(DHA)质量摩尔浓度均呈逐渐上升趋势(图 2), 在中度干旱时 AsA 质量摩尔浓度比对照高 49.5%(*P*<0.01); 在轻度干旱时 DHA 质量摩尔浓度比对照高 30.6%(*P*<0.01); $\rho_{\text{AsA}}/\rho_{\text{DHA}}$ 呈先下降后上升, 在轻度干旱时达到最小值, 比对照降低 13.9% (*P*>0.05)。在高温条件下, AsA 质量摩尔浓度和 $\rho_{\text{AsA}}/\rho_{\text{DHA}}$ 分别比对照高 55.6%和 34.1%(*P*<0.01); DHA 质量摩尔浓度比对照高 15.6%(*P*<0.05)。协同胁迫下, 三者变化均不大: 其中 AsA 质量摩尔浓度呈先增加后降低, 在中度干旱和高温的协同胁迫时达最大值, 比对照高 72.9%(*P*<0.01), 随后降低; DHA 质量摩尔浓度总体变化不大, 轻度干旱和高温协同胁迫时, 比对照高 22.3%(*P*<0.05), 其他变化不显著; $\rho_{\text{AsA}}/\rho_{\text{DHA}}$ 变化不大, 在轻度干旱和高温协同胁迫时达最大值, 比对照高 37.3%(*P*<0.01)。

在干旱胁迫条件下, 毛竹叶片的还原型谷胱甘肽(GSH)质量摩尔浓度变化与对照差异不显著(*P*>0.05)(图 3); 氧化型谷胱甘肽(GSSG)质量摩尔浓度呈下降趋势, 中度干旱胁迫时其质量摩尔浓度比对照降低 30.6%(*P*<0.01); $\rho_{\text{GSH}}/\rho_{\text{GSSG}}$ 呈上升趋势, 中度干旱比对照高 55.3%(*P*<0.01)。在高温胁迫及协同胁迫下, 三者的变化与对照比较均不显著(*P*>0.05)。

2.4 AsA-GSH 循环系统相关酶活性变化

随干旱胁迫程度的增加, 毛竹叶片的 APX 酶活性先逐渐增加后变化缓慢(图 4), 在中度干旱胁迫下达到最大值, 比对照高 1.8 倍(*P*<0.01); GR 和 MDHAR 活性均呈上升趋势, 轻度干旱胁迫时其活性分别比对照高 0.7 倍和 0.9 倍(*P*<0.01); DHAR 活性先增加后降低, 中度干旱胁迫时达到最大值, 比对照高 2.3 倍(*P*<0.01)。高温胁迫时, APX 活性比对照高 0.3 倍(*P*<0.05); 而 GR, MDHAR 和 DHAR 活性分别比对照高 0.9 倍、1.1 倍和 0.6 倍(*P*<0.01)。在高温的基础上, 随着干旱胁迫程度的加深, 四者活性均呈先增加后降低, APX 和 GR 活性增加缓慢, MDHAR 和 DHAR 活性增加迅速, 中度干旱和高温协同胁迫时均达到最大值, 分别比对照高 1.2 倍、1.9 倍、3.9 倍和 1.9 倍(*P*<0.01), 随后降低。

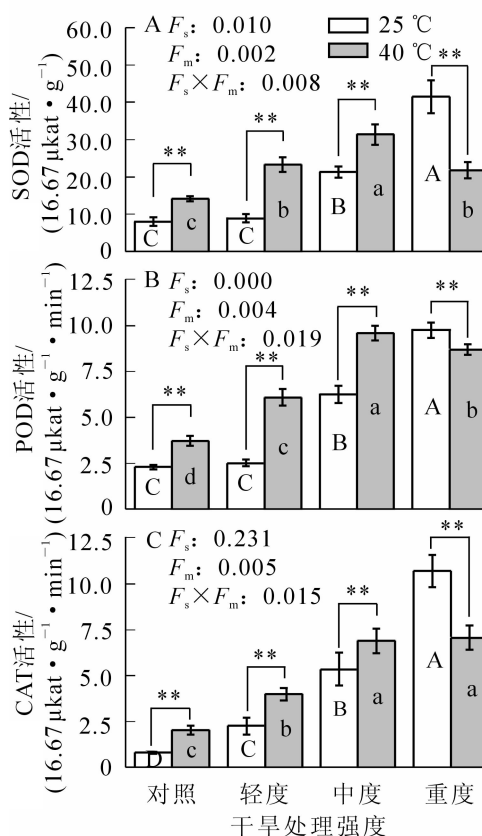
3 讨论

细胞膜对维持细胞正常生命活动具有至关重要的作用, 而 O₂⁻和过氧化氢是植物代谢过程中产生的 2 种活性氧, 对细胞膜脂质具有较强的氧化伤害作用; MDA 作为膜脂过氧化作用的终极产物, 其变化可解释逆境胁迫对植物细胞膜的破坏程度及植物对逆境的响应^[24]。本试验结果表明: 干旱胁迫下, 毛竹叶

片中的 $O_2^{\cdot-}$ 和 MDA 产生速率明显增加, 而高温胁迫下, 过氧化氢、 $O_2^{\cdot-}$ 和 MDA 产生速率增加均极显著, 且高温时 MDA 质量摩尔浓度较中度干旱胁迫显著增加。这与吴永波等^[2]的研究结果不一致, 表明高温比干旱对毛竹的影响更大, 可能是在不同温度和水分条件下, 不同植物体内活性氧对植物产生的伤害程度不同导致的。协同胁迫下, 随着干旱程度的增加, 三者质量摩尔浓度逐渐增加, 且在同等干旱程度下, 高温条件下的 $O_2^{\cdot-}$ 和 MDA 质量摩尔浓度均比正常温度下的质量摩尔浓度显著升高, 表明协同胁迫较单一胁迫对毛竹伤害更大, 可能协同胁迫已经伤害到抗氧化物质产生的机构, 削弱了对氧化物质的清除作用, 导致氧化物质不断累积。

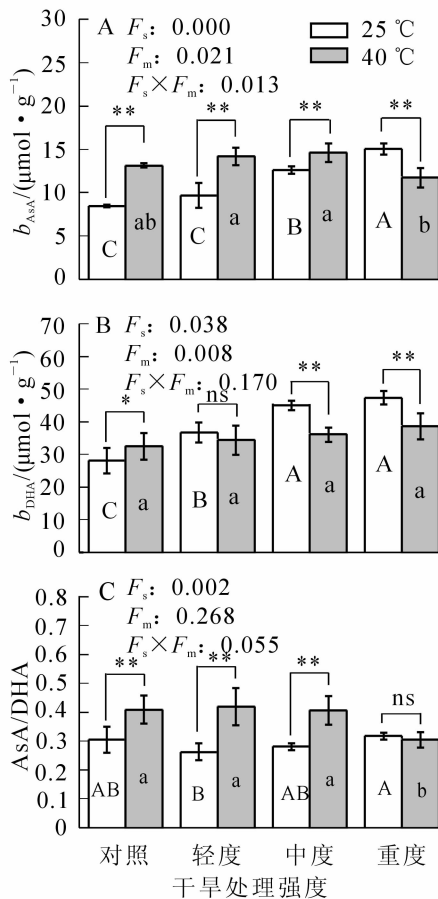
毛竹处于逆境中, 不仅体内过氧化氢、 $O_2^{\cdot-}$ 和 MDA 的产量大量增加, 还刺激抗氧化酶活性增强。SOD, POD 和 CAT 是植物抗氧化系统重要组成部分^[25]。其中 SOD 是抗氧化系统的第一道防线, 可以使植物体内过量的 $O_2^{\cdot-}$ 发生歧化反应, 生成过氧化氢(H_2O_2)和氧气(O_2); POD 和 CAT 与 SOD 具有协同作用, 将其氧化产生的 H_2O_2 和具有潜在危害的 $O_2^{\cdot-}$ 转化为水和氧气, 从而阻止 $O_2^{\cdot-}$ 和过氧化氢在植物体内的累积, 减少对植物体的伤害。本研究发现: 随干旱高温胁迫程度的增加, 毛竹叶片产生过量的 ROS, 且抗氧化酶活性升高。说明 $O_2^{\cdot-}$ 质量摩尔浓度增加, 它的积累刺激叶片中 SOD 应激反应使活性增强, 催化 $O_2^{\cdot-}$ 歧化生产基态分子氧和过氧化氢; 毛竹叶片中的过氧化氢和 MDA 逐渐增加, 由于 POD 和 CAT 的作用, 其质量摩尔浓度增幅缓慢; 而在重度干旱和高温协同胁迫下, SOD 和 POD 活性较中度干旱和高温协同胁迫显著降低, CAT 活性降低不明显, 可能是 SOD 活性表达受到抑制, 且过度胁迫导致一部分已经表达的 SOD 失活^[26]造成的, 而 POD 和 CAT 酶活性分别在高温干旱前期和后期对过氧化氢清除起主导作用^[27], 表明在持续时间较长的高温干旱条件下, CAT 效率更高, 耐性更稳定。总之, 在单一胁迫条件下, 毛竹在抗氧化酶防御系统作用下, 能有效消除因高温干旱胁迫积累的 ROS, 使过氧化氢、 $O_2^{\cdot-}$ 和 MDA 质量摩尔浓度增幅减缓, 表明一方面胁迫条件下毛竹体内产生的 ROS 能够对毛竹产生伤害, 另一方面毛竹在遇到胁迫会刺激抗氧化酶活性增加, 有效清除 ROS, 维持毛竹体内活性氧平衡, 防止氧化伤害, 适应环境变化。而在协同胁迫条件时, 过氧化氢、 $O_2^{\cdot-}$ 和 MDA 质量摩尔浓度显著增加, SOD, POD 和 CAT 活性有降低趋势, 表明协同胁迫比单一胁迫对植物造成的伤害更大。

AsA-GSH 循环是植物体内清除自由基的重要途径。AsA 不仅可以直接清除活性氧, 在 AsA-GSH 循环清除过氧化氢过程中也发挥着重要作用^[27]。APX 是以 AsA 为电子供体的一种过氧化物酶, 能够快速清除细胞中产生的过量的过氧化氢, 是植物体内尤其是叶绿体中清除过氧化氢的关键酶^[28]; 植物通过维持较高的 ρ_{AsA}/ρ_{DHA} 和 ρ_{GSH}/ρ_{GSSG} 比值, 使植物体内抗坏血酸库和谷胱甘肽库保持较高的还原态^[29-30]。本研究结果表明: 在单一胁迫下, 毛竹叶片产生过量的 H_2O_2 , AsA 和 DHA 质量摩尔浓度随之增加, 一方面直接消除过氧化氢降低伤害; 另一方面通过 AsA-GSH 循环清除过氧化氢。但轻度干旱胁迫下, ρ_{AsA}/ρ_{DHA} 比值最低, 可能是由于干旱胁迫初期, 毛竹叶片产生过量的过氧化氢, AsA 清除过氧化氢有所消耗, 而 AsA-GSH 循环不能及时补充 AsA, 使得 ρ_{AsA}/ρ_{DHA} 比值降低; 随胁迫程度增强, 毛竹适应此逆境后, AsA-GSH 循环达到一个新的稳态, 及时补充 AsA 的损失, 维持较高的 ρ_{AsA}/ρ_{DHA} 比值, 抵抗氧化胁迫; 同时,



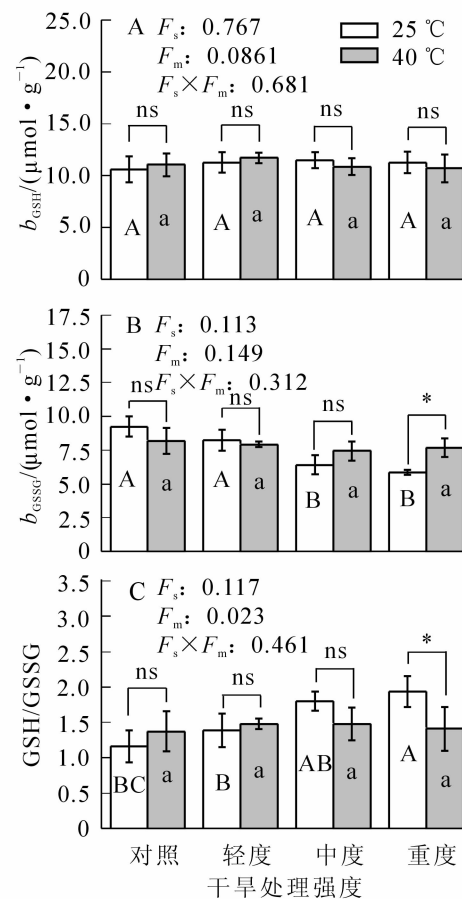
数据为平均值±标准误($n=5$)。根据 Tukey 检验($P<0.05$), 同列不同大写字母表示 25 °C 时不同处理类型间差异显著, 同列小写字母表示 40 °C 时不同处理类型间差异显著。 F_s 表示不同温度间的差异; F_m 表示不同处理类型的影响, $F_s \times F_m$ 表示植物组织应对高温干旱胁迫的不同响应。* 表示 $P<0.05$, ** 表示 $P<0.01$, ns 表示差异不显著

图 1 不同处理毛竹叶片抗氧化酶活性变化
Figure 1 Changes of antioxidant enzyme activities in *Phyllostachys edulis* under different treatments



数据为平均值 $\pm$ 标准误 ($n=5$)。根据 Tukey 检验 ($P<0.05$)，同列不同大写字母表示 25 °C 时不同处理类型间差异显著，同列不同小写字母表示 40 °C 时不同处理类型间差异显著。 F_s 表示不同温度间的差异； F_m 表示不同处理类型的影响， $F_s \times F_m$ 表示植物组织应对高温干旱胁迫的不同响应。* 表示 $P<0.05$ ，** 表示 $P<0.01$ ，ns 表示差异不显著

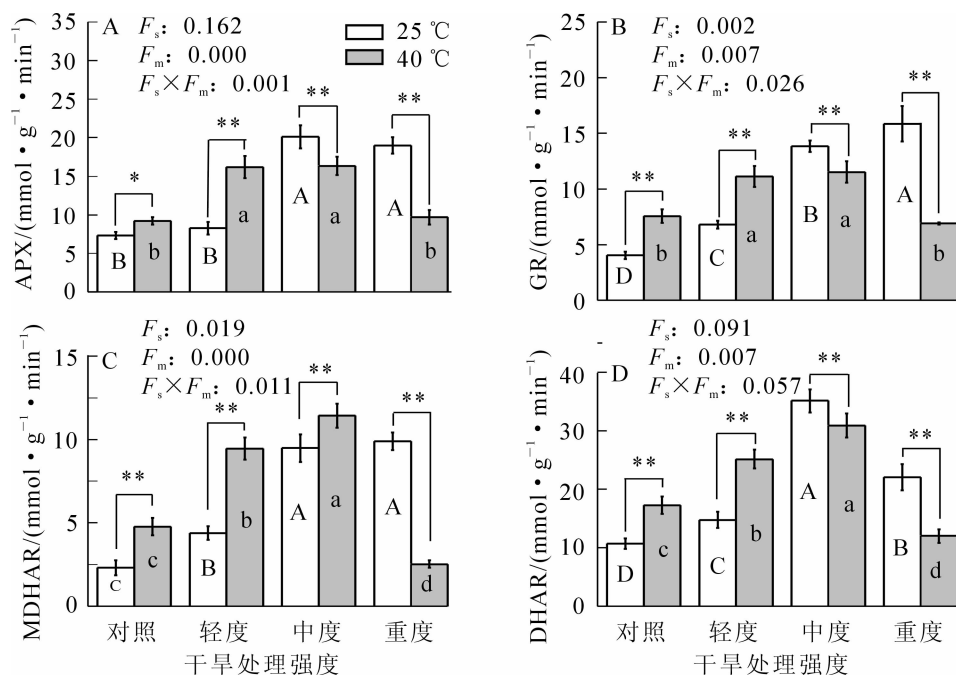
图 2 不同处理毛竹叶片抗坏血酸的变化
Figure 2 Changes in the content of ascorbic acid in *Phyllostachys edulis* under different treatments



数据为平均值 $\pm$ 标准误 ($n=5$)。根据 Tukey 检验 ($P<0.05$)，同列不同大写字母表示 25 °C 时不同处理类型间差异显著，同列不同小写字母表示 40 °C 时不同处理类型间差异显著。 F_s 表示不同温度间的差异； F_m 表示不同处理类型的影响， $F_s \times F_m$ 表示植物组织应对高温干旱胁迫的不同响应。* 表示 $P<0.05$ ，** 表示 $P<0.01$ ，ns 表示差异不显著

图 3 不同处理毛竹叶片谷胱甘肽的变化
Figure 3 Changes in the content of glutathione in *Ph. edulis* under different treatments

GSH 质量摩尔浓度变化较对照不明显，GR 活性增加，与 GSSG 质量摩尔浓度变化相反，说明 GR 在还原型烟酰胺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)的作用下，加速催化 GSSG 还原成 GSH，使毛竹叶片中的 $\rho_{\text{GSH}}/\rho_{\text{GSSG}}$ 比值增加，维持植物体内较高的还原态，减缓毛竹氧化伤害。这与杨颖丽等^[31]研究结果一致。在干旱和高温协同胁迫下，AsA，DHA，GSH 和 GSSG 质量摩尔浓度变化不大，而 APX，MDHAR，DHAR 和 GR 活性先增加后降低，均在中度干旱和高温协同胁迫时达到峰值，这是因为在 AsA-GSH 循环中，毛竹受到较强程度协同胁迫的刺激，使叶片中清除过氧化氢的 APX 和加快 AsA 循环再生的 MDHAR 和 DHAR 活性的增加，加快 AsA 和 DHA 大量快速生成，及时补充 AsA 清除过氧化氢的消耗；同时，毛竹叶片中 GSSG 在关键酶 GR 作用下催化产生 GSH，DHAR 利用 GSH 提供的电子供体将 DHA 还原成 AsA，使 AsA 质量摩尔浓度保持稳定，进而促进 AsA-GSH 循环，使 $\rho_{\text{AsA}}/\rho_{\text{DHA}}$ 比值维持在较强的还原性范围内，以利于抵御氧化胁迫；此时 $\rho_{\text{GSH}}/\rho_{\text{GSSG}}$ 比值较为稳定，说明 GSH 循环比 AsA 循环对过氧化氢的还原作用更为稳定，清除过氧化氢的作用更为持久有效，因此 GR 作为 AsA-GSH 循环中最后一步关键酶，在毛竹抵抗高温干旱胁迫中发挥重要作用。但在重度干旱和高温协同胁迫下，APX，MDHAR，DHAR 和 GR 活性降低，AsA 质量摩尔浓度随之降低，导致 $\rho_{\text{AsA}}/\rho_{\text{DHA}}$ 比值也略有降低，说明毛竹叶片在高强度的协同



数据为平均值 $\pm$ 标准误($n=5$)。根据 Tukey 检验($P<0.05$)，同列不同大写字母表示 25 °C 时不同处理类型间差异显著，同列不同小写字母表示 40 °C 时不同处理类型间差异显著。 F_s 表示不同温度间的差异； F_m 表示不同处理类型的影响， $F_s \times F_m$ 表示植物组织应对高温干旱胁迫的不同响应。* 表示 $P<0.05$ ，** 表示 $P<0.01$ ，ns 表示差异不显著

图 4 不同处理毛竹叶片 AsA-GSH 循环系统酶活性变化

Figure 4 Changes of enzyme activities in AsA-GSH cycle system in *Phyllostachys edulis* under different treatments

胁迫下，AsA-GSH 循环中的酶受温度和水分的影响，活性降低，此循环不能及时催化产生 AsA，补充 AsA 清除过氧化氢产生的消耗，导致 AsA-GSH 循环效率降低，抵御逆境的能力降低。而 DHA 质量摩尔浓度变化不大，这与 MOSTOFA 等^[32]研究结果不一致，这可能是过度胁迫条件下，由于 MDHA 极不稳定，既可还原成 AsA，也可进一步歧化为 DHA，又因为过多的 DHA 积累对细胞有害，所以 MDHAR 能限制 MDHA 产生以及进一步转化为 DHA；此外，由于 DHAR 活性降低，无法利用 GSH 提供的电子供体把 DHA 还原成 AsA^[33]，使得毛竹叶片中的 AsA 循环被打破，形成新的动态循环，也说明这些酶对胁迫的反应因物种而异。这也表明毛竹幼苗的 AsA 循环对逆境反应较 GSH 循环更敏感，而 GSH 循环在抵御逆境的能力更稳定。

4 结论

随高温干旱单一处理强度的增加，毛竹叶片中的过氧化氢、 O_2^- 与 MDA 质量摩尔浓度增加，且协同胁迫下，三者质量摩尔浓度进一步增加，表明高温干旱协同胁迫下较单一胁迫对毛竹伤害更大。干旱和高温协同胁迫下，毛竹叶片内抗氧化防御酶活性逐渐增强，且 CAT 清除过氧化氢较 POD 活性表现更为稳定，说明在抗氧化酶系统中 CAT 清除过氧化氢效果更为持久，在协同胁迫后期对防御氧化伤害起到主要作用；AsA-GSH 循环相关酶活性随处理的增强而增加，通过 AsA 和 GSH 的再生，AsA-GSH 循环动态平衡得以维持，有效消除过氧化氢，保护毛竹细胞不受损害，且在 AsA-GSH 循环中， $\rho_{\text{GSH}}/\rho_{\text{GSSG}}$ 比值较 $\rho_{\text{AsA}}/\rho_{\text{DHA}}$ 比值更为稳定，说明 GSH 循环清除过氧化氢比 AsA 循环的效果更为持久，对持续协同胁迫起到重要防御作用。但是在重度干旱和高温协同胁迫下，毛竹叶片抗氧化防御酶活性和 AsA-GSH 循环相关酶活性均表现下降趋势，说明毛竹的酶系统和非酶系统对高温干旱协同胁迫的抵御能力是有限的，在一定范围内可有效清除活性氧，超出一定范围则降低。

5 参考文献

- [1] GODOY O, LEMOS-FILHO J P D, VALLADARES F. Invasive species can handle higher leaf temperature under water stress than Mediterranean natives [J]. *Environ Exp Bot*, 2011, **71**(2): 207 – 214.

- [2] 吴永波, 叶波. 高温干旱复合胁迫对构树幼苗抗氧化酶活性和活性氧代谢的影响[J]. 生态学报, 2016, **36**(2): 403 – 410.
WU Yongbo, YE Bo. Effects of combined elevated temperature and drought stress on anti-oxidative enzyme activities and reactive oxygen species metabolism of *Broussonetia papyrifera* seedlings [J]. *Acta Ecol Sin*, 2016, **36**(2): 403 – 410.
- [3] 闫慧芳, 毛培胜, 夏方山. 植物抗氧化剂谷胱甘肽研究进展[J]. 草地学报, 2013, **21**(3): 428 – 435.
YAN Huifang, MAO Peisheng, XIA Fangshan. Research progress in plant antioxidant glutathione (review) [J]. *Acta Agrest Sin*, 2013, **21**(3): 428 – 435.
- [4] WANG Qinghai, QUE Xiaoe, ZHENG Ruilun, *et al.* Phytotoxicity assessment of atrazine on growth and physiology of three emergent plants [J]. *Environ Sci Pollut Res*, 2015, **22**(13): 9646 – 9657.
- [5] GILL S S, TUTEJA N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2010, **48**(12): 909 – 930.
- [6] PAWŁOWSKA B, BICZAK R. Evaluation of the effect of tetraethylammonium bromide and chloride on the growth and development of terrestrial plants [J]. *Chemosphere*, 2016, **149**: 24 – 33.
- [7] 李春燕, 徐雯, 刘立伟, 等. 低温条件下拔节期小麦叶片内源激素含量和抗氧化酶活性的变化[J]. 应用生态学报, 2015, **26**(7): 2015 – 2022.
LI Chunyan, XU Wen, LIU Liwei, *et al.* Changes of endogenous hormone contents and antioxidative enzyme activities in wheat leaves under low temperature stress at jointing stage [J]. *Chin J Appl Ecol*, 2015, **26**(7): 2015 – 2022.
- [8] RAMÍREZ L, BARTOLI C G, LAMATTINA L. Glutathione and ascorbic acid protect *Arabidopsis* plants against detrimental effects of iron deficiency [J]. *J Exp Bot*, 2013, **64**(11): 3169 – 3178.
- [9] WUJESKA-KLAUSE A, BOSSINGER G, TAUSZ M. The concentration of ascorbic acid and glutathione in 13 provenances of *Acacia melanoxylon* [J]. *Tree Physiol*, 2016, **36**(4): 524 – 532.
- [10] KUEHL Y, LI Y, HENLEY G. Impacts of selective harvest on the carbon sequestration potential in moso bamboo (*Phyllostachys pubescens*) plantations [J]. *For Tree Livelihoods*, 2013, **22**(1): 1 – 18.
- [11] 王玉魁, 郭慧媛, 阎艳霞, 等. 酸雨胁迫对毛竹叶片光合速率和叶绿素荧光参数的影响[J]. 生态环境学报, 2015, **24**(9): 1425 – 1433.
WANG Yukui, GUO Huiyuan, YAN Yanxia, *et al.* Effect of acid rain stress on photosynthetic rate and chlorophyll fluorescence parameters in leaves of *Phyllostachys pubescens* [J]. *Ecol Environ Sci*, 2015, **24**(9): 1425 – 1433.
- [12] 沈蕊, 白尚斌, 周国模, 等. 毛竹种群向针阔林扩张的根系形态可塑性[J]. 生态学报, 2016, **36**(2): 326 – 334.
SHEN Rui, BAI Shangbin, ZHOU Guomo, *et al.* The response of root morphological plasticity to the expansion of a population of *Phyllostachys edulis* into a mixed needle-and broad-leaved forest [J]. *Acta Ecol Sin*, 2016, **36**(2): 326 – 334.
- [13] LI Song, CHEN Junren, ISLAM E, *et al.* Cadmium-induced oxidative stress, response of antioxidants and detection of intracellular cadmium in organs of moso bamboo (*Phyllostachys pubescens*) seedlings [J]. *Chemosphere*, 2016, **153**: 107 – 114.
- [14] SHAH K, KUMAR R G, VERMA S, *et al.* Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion Generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings [J]. *Plant Sci*, 2001, **161**(6): 1135 – 1144.
- [15] RAI A C, SINGH M, SHAH K. Effect of water withdrawal on formation of free radical, proline accumulation and activities of antioxidant enzymes in ZAT12-transformed transgenic tomato plants [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2012, **61**(4): 108 – 114.
- [16] HODGES D M, DELONG J M, FORNEY C F, *et al.* Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds [J]. *Planta*, 1999, **207**(4): 604 – 611.
- [17] GIANNOPOLITIS C N, RIES S K. Superoxide dismutases (I) occurrence in higher plants [J]. *Plant Physiol*, 1977, **59**(2): 309 – 314.
- [18] KUMARI G J, REDDY A M, NAIK S T, *et al.* Jasmonic acid induced changes in protein pattern, antioxidative enzyme activities and peroxidase isozymes in peanut seedlings [J]. *Biol Plant*, 2006, **50**(2): 219 – 226.

- [19] RAI G K, RAI N P, RATHAUR S, *et al.* Expression of *rd29A::AtDREB1A/CBF3* in tomato alleviates drought-induced oxidative stress by regulating key enzymatic and non-enzymatic antioxidants [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2013, **69**(8): 90 – 100.
- [20] NAKANO Y, ASADA K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts [J]. *Plant Cell Physiol*, 1981, **22**(5): 867 – 880.
- [21] SCHAEDEL M. Chloroplast glutathione reductase [J]. *Plant Physiol*, 1977, **59**(5): 1011 – 1012.
- [22] HOSSAIN M A, NAKANO Y, ASADA K. Monodehydroascorbate reductase in spinach chloroplasts and its participation in regeneration of ascorbate for scavenging hydrogen peroxide [J]. *Plant Cell Physiol*, 1984, **25**(3): 385 – 395.
- [23] DOULIS A G, DEBIAN N, KINGSTONSMITH A H, *et al.* Differential localization of antioxidants in maize leaves [J]. *Plant Physiol*, 1997, **114**(3): 1031 – 1037.
- [24] 李力, 刘玉民, 王敏, 等. 3种北美红枫对持续高温干旱胁迫的生理响应机制[J]. 生态学报, 2014, **34**(22): 6471 – 6480.
- LI Li, LIU Yumin, WANG Min, *et al.* Physiological response mechanism of three kinds of *Acer rubrum* L. under continuous high temperature and drought stress [J]. *Acta Ecol Sin*, 2014, **34**(22): 6471 – 6480.
- [25] 朱启红, 夏红霞. 淹水胁迫对石菖蒲抗氧化酶系统的影响[J]. 水生态学杂志, 2012, **33**(4): 138 – 141.
- ZHU Qihong, XIA Hongxia. Effect of flooding stress on antioxidant enzyme system of *Acorus tatarinowii* Schott [J]. *J Hydroecol*, 2012, **33**(4): 138 – 141.
- [26] 王晓鹏, 叶梅荣, 王松华, 等. 梯度水分对鱼腥草生长和抗氧化酶活性的影响[J]. 东北林业大学学报, 2011, **39**(11): 50 – 52.
- WANG Xiaopeng, YE Meirong, WANG Songhua, *et al.* Effect of moisture gradient on growth and antioxidase activity of *Houttuynia cordata* [J]. *J Northeast For Univ*, 2011, **39**(11): 50 – 52.
- [27] 郭欣欣, 李晓峰, 朱红芳, 等. 淹水胁迫对不结球白菜抗坏血酸-谷胱甘肽循环的影响[J]. 植物生理学报, 2015, **51**(12): 2181 – 2187.
- GUO Xinxin, LI Xiaofeng, ZHU Hongfang, *et al.* Effects of waterlogging stress on ascorbate-glutathione cycle in *Brassica campestris* ssp. *chinensis* [J]. *Plant Physiol J*, 2015, **51**(12): 2181 – 2187.
- [28] 李泽琴, 李静晓, 张根发. 植物抗坏血酸过氧化物酶的表达调控以及对非生物胁迫的耐受作用[J]. 遗传, 2013, **35**(1): 45 – 54.
- LI Zeqin, LI Jingxiao, ZHANG Genfa. Expression regulation of plant ascorbate peroxidase and its tolerance to abiotic stresses [J]. *Hereditas*, 2013, **35**(1): 45 – 54.
- [29] TURAN S, TRIPATHY B C. Salt and genotype impact on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in two rice cultivars during de-etiolation [J]. *Protoplasma*, 2013, **250**(1): 209 – 222.
- [30] GILL S S, ANJUM N A, HASANUZZAMAN M, *et al.* Glutathione and glutathione reductase: a boon in disguise for plant abiotic stress defense operations [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2013, **70**(1): 204 – 212.
- [31] 杨颖丽, 马婷, 吕丽荣, 等. 盐胁迫对黄花补血草幼苗叶片抗坏血酸-谷胱甘肽循环的影响[J]. 西北师范大学学报(自然科学版), 2016, **52**(3): 84 – 89.
- YANG Yingli, MA Ting, LÜ Lirong, *et al.* Effects of salinity stress on ascorbate-glutathione cycle in the leaves of *Limonium aureum* (L.) Hill seedlings [J]. *J Northwest Norm Univ Nat Sci Ed*, 2016, **52**(3): 84 – 89.
- [32] MOSTOFA M G, HOSSAIN M A, FUJITA M. Trehalose pretreatment induces salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings: oxidative damage and co-induction of antioxidant defense and glyoxalase systems [J]. *Protoplasma*, 2015, **252**(2): 461 – 475.
- [33] 杨卫东, 李廷强, 丁哲利, 等. 旱柳幼苗抗坏血酸-谷胱甘肽循环及谷胱甘肽代谢对镉胁迫的响应[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2014, **40**(5): 551 – 558.
- YANG Weidong, LI Tingqiang, DING Zheli, *et al.* Responses of ascorbate-glutathione cycle and glutathione metabolism to cadmium stress in *Salix matsudana* Koidz seedlings [J]. *J Zhejiang Univ Agric Life Sci*, 2014, **40**(5): 551 – 558.