

CO₂ 激光处理对干旱胁迫小麦幼苗谷胱甘肽 抗氧化酶系统的影响

邱宗波^{1,2}, 李方民¹, 王芳¹, 岳明^{1*}

(1. 西部资源生物与现代生物技术省部共建教育部重点实验室(西北大学), 西安 710069;

2. 河南师范大学生命科学学院, 河南新乡 453007)

摘要: 用 CO₂ 激光(波长 10600 nm, 辐射剂量 20.1 mW/mm²) 对萌动小麦种子分别辐照 0、1、3、5 min, 待其长至 12 d 时, 用 10% (W/V) PEG 6000 胁迫其幼苗。结果表明: CO₂ 激光处理 1、3、5 min 显著提高了还原型谷胱甘肽(GSH)含量, 显著降低了氧化型谷胱甘肽(GSSG)含量(5 min 除外), 导致 GSH/GSSG 比率显著上升。3 min 激光处理显著提高了干旱胁迫下小麦幼苗叶片谷胱甘肽还原酶(GR)和谷胱甘肽-S-转移酶(GST)活性。通过参与降解因干旱胁迫而过量产生的过氧化产物, 实现了细胞解毒功能。此外, 1 min 和 3 min 激光处理可显著提高干旱胁迫下小麦幼苗抗坏血酸氧化酶(APX)活性和抗坏血酸(AsA)含量, 提高了组织内部的抗氧化能力, 从而起到保护作用。

关键词: CO₂ 激光; 小麦; 干旱胁迫; 谷胱甘肽

中图分类号: Q945.78

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2008)04-0402-05

Effects of CO₂ Laser on Glutathione-dependent Antioxidative System in Wheat Seedling under Drought Stress

QIU Zong-Bo^{1,2}, LI Fang-Min¹, WANG Fang¹, YUE Ming¹

(1. Key Laboratory of Resource Biology and Biotechnology in Western China (Northwest University), Ministry of Education, Xi'an 710069, China; 2. College of Life Science, Henan Normal University, Xinxiang, Henan 453007, China)

Abstract: The objective of this study was to determine the effects of CO₂ laser (wavelength 10600 nm, power density 20.1 mW/mm²) on glutathione dependent antioxidative system in wheat seedling under drought stress. Germinating seeds were exposed to CO₂ laser radiation for 0 min, 1 min, 3 min and 5 min, respectively, then they were treated with 10% (W/V) PEG6000 solution for 8 days. When the seedlings were 12-day-old, changes in the concentration of oxidized glutathione (GSSG), reduced glutathione (GSH), ascorbate (AsA) and the activities of glutathione reductase (GR), glutathione-S-transferase (GST), ascorbate peroxidase (APX) were measured to determine the effects of laser. The results showed that suitable laser treatment of seeds improved drought tolerance in wheat seedlings by decreasing the concentration of GSSG and increasing the activities of APX, GR, GST, AsA and GSH concentration. The results suggested that those changes in glutathione dependent antioxidative system were responsible for protection wheat against drought induced oxidative damage.

Key words: CO₂ laser; Wheat; Drought stress; Glutathione

激光作为一种技术,在遗传育种、生物刺激效应等方面的研究获得了广泛的尝试,并对 UV-B 辐射损伤具有一定的防护和修复作用。干旱是农业生产的巨大障碍,对作物造成的减产超过其它自然逆境减产之和^[1]。因此,如何提高作物的抗旱性是植物抗逆领域的重要科学问题。适当剂量的激光辐射可以提高种子的萌发率、种子内能(焓变和熵

变)^[2]、种子生物光子的辐射强度和酶活性^[3]。韩榕等^[4]用 He-Ne 激光辐照小麦可提高其酶活性,对细胞膜损伤具有修复作用,可增强抗逆性。齐智^[5,6]发现 He-Ne 激光辐射蚕豆幼苗可提高 SOD、POD、CAT 酶活性,改变 SOD、CAT 同工酶谱,从而对 UV-B 辐射损伤具有一定的防护和修复作用。然而,适当剂量的激光辐照对植物干旱胁迫损伤是否

收稿日期:2007-11-05,修回日期:2008-02-19。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30670366)。

作者简介:邱宗波(1978-),女,河南南阳人,博士,主要从事植物生理生态和分子生物学方面的研究(E-mail: zongboqiu7711@163.com)。

* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: yueming@nwnu.edu.cn)。

具有防护作用,这个问题目前并不清楚。目前普遍认为,除了活性氧清除酶外,植物体内还存在非酶抗氧化物质,例如谷胱甘肽(GSH)和抗坏血酸(AsA)等,同时GSH和AsA也是AsA-GSH氧化还原途径的重要组成部分,而AsA-GSH氧化还原途径也是植物组织中直接清除ROS的酶促催化系统^[7]。本研究以春小麦品种‘绵阳26号’为受试材料,研究CO₂激光处理对干旱胁迫小麦幼苗GSH及其相关抗氧化系统的调节作用,为激光辐照应用于提高植物抗旱性和胁迫生理生态研究提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

春小麦(*Triticum aestivum* L.)品种为‘绵阳26号’,由杨凌示范区种子公司提供。

1.2 材料培养及处理

选取籽粒饱满、大小均匀的小麦种子用0.1% HgCl₂消毒10 min、用自来水冲洗50 min后,培养于盛有湿滤纸的培养皿内,待种子露白时进行处理。无激光和干旱胁迫处理的种子为对照组(CK),进行激光照射的种子为处理组。所用CO₂激光器的波长为10600 nm,光斑直径为30 mm,辐射剂量为20.1 mW/mm²,距离为36 cm,辐射时间分别为0、1、3、5 min,然后置于25℃恒温箱中浸种36 h,播种在铺有2层滤纸的培养皿中催芽,40粒/皿,每组5个重复,培养皿直径为18 cm。待出芽后,培养于(25±1)℃人工气候室内,浇以Hoagland营养液,有效光量子密度为250 μmol·m⁻²·s⁻¹,光暗周期为12 h/12 h,昼夜温度为25℃/18℃,相对湿度为70%。待幼苗长至12 d时,用10%(W/V)PEG6000(聚乙二醇)溶液进行干旱胁迫处理。在干旱胁迫的第8 d取小麦幼苗测定各项指标。

1.3 生理生化指标测定

抗坏血酸过氧化物酶(ascorbate peroxidase, APX)活性测定 取0.5 g新鲜叶片,加入3 mL 50 mmol/L磷酸缓冲液(pH 7.8,含2 mmol/L AsA, 5 mmol/L EDTA,现用现配),冰浴研磨,4℃下15000 g离心20 min,上清液冰浴待用。活性测定按照Nakano等^[8]的方法。3 mL反应液为50 mmol/L磷酸缓冲液(pH 7.8,含0.1 mmol/L EDTA、0.1 mmol/L H₂O₂、0.5 mmol/L AsA),于290 nm下测定光吸收的下降。

谷胱甘肽还原酶(glutathione reductase, GR)活性测定 取0.5 g新鲜叶片,加入3 mL 50 mmol/L

Tris-HCl缓冲液(pH 7.0,含20%甘油,2% PVP, 1 mmol/L AsA, 1 mmol/L DTT, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L GSH和5 mmol/L MgCl₂),冰浴研磨,4℃下15000 g离心20 min,上清液冰浴待用。活性测定按照Foyer等^[9]的方法。3 mL反应液为50 mmol/L Tris-HCl缓冲液(pH 7.5,含5 mmol/L MgCl₂、0.5 mmol/L GSSG、0.2 mmol/L NADPH),于340 nm下测定光吸收的下降。

谷胱甘肽-S-转移酶(glutathione-S-transferase, GST)活性的测定 取0.5 g新鲜叶片,加入3 mL 50 mmol/L磷酸缓冲液(pH 7.8,含3% PVP, 0.1 mmol/L EDTA),冰浴研磨,4℃下15000 g离心20 min,上清液冰浴待用。活性测定按照Mannervik等^[10]的方法。3 mL反应液为50 mmol/L磷酸缓冲液(pH 7.4,含1 mmol/L CDNB、1 mmol/L GSH),于340 nm下测定光吸收的上升。

GSH含量测定按Ellman^[11]的方法。AsA含量测定按Arakawa^[12]的方法。GSSG含量的测定用GSSG检测试剂盒(南京建成生物工程研究所生产)。

1.4 统计分析

实验进行2次,每次3个重复。对所有数据进行方差分析,处理间的差异显著性用新复极差(Duncan's)检验。整个计算过程在SPSS和EXCEL软件系统下完成。

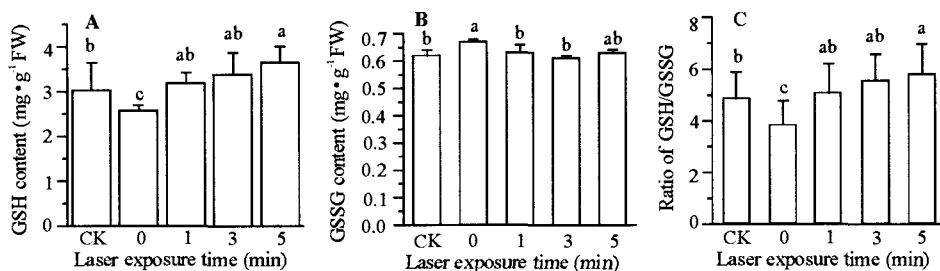
2 结果与分析

2.1 CO₂激光处理对干旱胁迫小麦叶片GSH和GSSG含量以及GSH/GSSG的影响

GSH是植物体内普遍存在的含-SH的还原物质,在防御自由基对膜脂过氧化中起重要作用。与对照(CK)相比,干旱胁迫处理(激光处理0 min)的小麦幼苗GSH含量显著下降,而GSSG含量显著上升,从而导致GSH/GSSG比率显著下降。从图1可以看出,CO₂激光处理1、3、5 min可使幼苗GSH含量显著提高,而使GSSG含量显著下降(5 min除外),从而导致GSH/GSSG比率显著上升,与激光处理0 min相比差异显著($p < 0.05$)。说明CO₂激光处理可通过分别提高或降低GSH和GSSG含量来增强干旱胁迫下小麦幼苗叶片的抗氧化能力,使小麦幼苗组织内部保持较高水平的GSH/GSSG,从而维持干旱胁迫下小麦幼苗合适的氧化还原环境,有利于提高耐旱性。

2.2 CO₂激光处理对干旱胁迫小麦叶片GR和GST活性的影响

GR是植物细胞内将GSSG还原为GSH的关键



不同字母表示不同处理之间方差分析结果的差异显著性 ($p < 0.05$, $n = 6$)

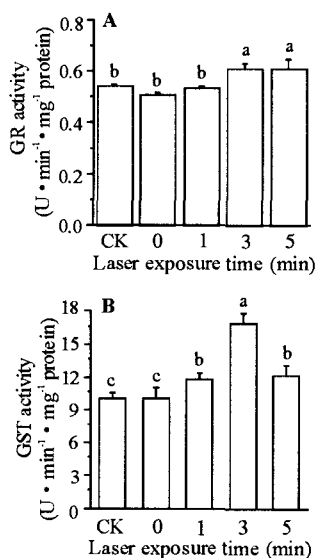
Means with different letters above bars were significantly different at 0.05 level according to Duncan's multiple range test

图1 CO_2 激光处理对干旱胁迫小麦叶片 GSH (A) 和 GSSG (B) 含量以及 GSH/GSSG (C) 的影响

Fig. 1 Effect of laser treatment on the content of GSH (A), GSSG (B) and ratios of GSH/GSSG (C) in wheat seedling leaves under drought stress

酶,也是清除植物细胞内部 H_2O_2 酶催化系统的组分之一。图 2:A 表明,干旱胁迫处理(激光处理 0 min)可使小麦幼苗叶片 GR 活性下降,而 3、5 min 激光处理可显著提高 ($p < 0.05$) 因干旱引起的小麦叶片 GR 下降的活性,这与其提高 GSH 含量的结果相一致。说明 3、5 min 激光处理可通过提高干旱胁迫下小麦幼苗叶片 GR 活性进而调节 GSH 和 GSSG 的水平以及 GSH/GSSG 的比率。

GST 是细胞内依赖于 GSH 的重要解毒酶。从图 2:B 可以看出,与对照(CK)相比,干旱胁迫处理对小麦幼苗叶片 GST 活性没有太大影响,而 3 min 激光处理可显著提高 ($p < 0.05$) 干旱胁迫下小麦幼苗叶片 GST 活性。



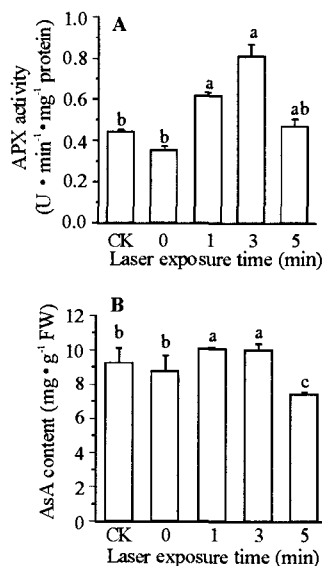
See notes to Fig. 1

图2 CO_2 激光处理对干旱胁迫小麦幼苗叶片 GR (A) 和 GST (B) 活性的影响

Fig. 2 Effect of laser treatment on the activities of GR (A) and GST (B) in wheat seedling leaves under drought stress

2.3 CO_2 激光处理对干旱胁迫小麦幼苗 APX 活性和 AsA 含量的影响

APX 是植物细胞内以 AsA 为底物的 H_2O_2 清除酶。从图 3 可以看出,干旱胁迫处理(激光处理 0 min)可使 APX 的活性下降,而 1、3 min 激光处理可显著提高干旱胁迫下小麦幼苗 APX 活性。AsA 是植物体内重要的非酶类抗氧化物质,它参与的 AsA-GSH 循环是植物体内重要的清除活性氧自由基系统。干旱胁迫处理(激光处理 0 min)可使 AsA 的含量下降,而 1、3 min 激光处理可显著提高干旱胁迫下小麦幼苗 AsA 的含量。说明 CO_2 激光处理通过调节干旱胁迫下小麦幼苗叶片的 APX 活性,提高组织内部的抗氧化能力,从而起到保护作用。



See notes to Fig. 1

图3 CO_2 激光处理对干旱胁迫小麦幼苗 APX (A) 活性和 AsA (B) 含量的影响

Fig. 3 Effect of laser treatment on the activity of APX (A) and the content of AsA (B) in wheat seedling leaves under drought stress

3 讨论

植物细胞内的 AsA-GSH 循环在清除活性氧方面起重要作用,AsA 被 APX 氧化为 MDA,MDA 可以自发歧化生成双脱氢抗坏血酸(DHA),DHA 通过酶或非酶过程被 GSH 还原,形成 AsA 和氧化型 GSSG,GSSG 再被光合作用产生的 NADPH 还原为 GSH,最终使 H₂O₂ 分解为 H₂O^[13]。实验结果表明,干旱胁迫处理可使小麦幼苗叶片 AsA 和 GSH 含量下降,而 3 min 激光处理缓解了干旱胁迫下小麦幼苗叶片 AsA 和 GSH 含量的下降,这可能与激光处理改变干旱胁迫下植物细胞内的氧化还原状态有关。激光对生物体的作用表现为光效应、电磁效应、热效应^[14],但在以前的研究中发现激光的光效应对植物体没有作用^[15]。所以激光对生物体的影响就主要为电磁效应或是一种协同效应。其本质是生物分子在激光的电磁场效应下,分子内发生能级跃迁,达到一定的震动能和产生自由基引起生物分子内分解、裂解或断裂,导致分子激活,从而改变细胞内的氧化还原状态^[16]。GSH 是催化 AsA 合成的关键酶双脱氢抗坏血酸还原酶(DHAR)的底物,激光处理提高了干旱胁迫下小麦叶片 GSH 的含量,植物细胞内高含量的 GSH 能促进 AsA-GSH 循环,部分促进了 AsA 含量的上升。这与 3 min 激光处理显著提高 AsA 含量的结果相一致(图 3)。同时,AsA 也是 H₂O₂ 清除酶 APX 的底物,AsA 含量的上升有利于小麦叶片 APX 活性的上调,使 APX 的活性增加^[17]。本研究结果表明,激光处理显著提高干旱胁迫小麦幼苗叶片 APX、GST 和 GR 活性。已经知道,GST 通过催化植物细胞内 GSH 与包括膜质过氧化物以及 DNA 氧化降解产物在内的有害代谢物的结合,从而实现细胞解毒功能^[18]。所以,这些酶之间的协调作用,可清除体内的活性氧,维持植物细胞内较低的膜脂过氧化水平,从而可提高小麦幼苗的耐旱性。这也与前人^[19]的实验结果相一致。即 CO₂ 激光处理对 10% PEG6000 胁迫下的小麦幼苗叶片氧化损伤有明显的缓解效应,这与其能显著诱导干旱胁迫下小麦幼苗叶片 SOD、POD 活性上升,延缓 O₂⁻ 和 H₂O₂ 的积累有关。蔡素雯等用 He-Ne 激光(波长 632.8 nm,辐射剂量 5.43 mW/mm²)辐照玉米幼苗,发现 He-Ne 激光可以提高幼苗 CAT、POD 活性和 GSH 含量,从而提高玉米幼苗抗氧化能力^[20]。不同波长激光促进植物抗氧化酶活性的增高与激光的刺激作用有关。当用激光照射时,生物分子吸收能量,分子内发

生能级跃迁,达到一定振动后,使机体当代产生光照活化效应。从而使 DNA-RNA-蛋白质系统活性提高以及核糖体上蛋白质合成作用的活化,导致生物合成水平的提高^[21]。

此外,激光处理可提高小麦幼苗叶片 GR 活性,还原 GSSG 为 GSH,从而维持干旱胁迫下小麦幼苗叶片高水平的 GSH 和合适的 GSH/GSSG 比例,并在保持细胞的氧化还原势方面发挥重要作用。这与 Uchida 等^[17]发现外源 SNP 提高盐胁迫 2 d 时水稻幼苗 GR 活性的结果相一致。同时,超量表达 GR 的转基因植物耐盐性也显著提高^[7]。已有证据表明,GSH/GSSG 比值(非 GSH 的绝对含量)可以作为细胞内的信号分子,从而对相关基因表达、翻译速率、蛋白质巯基化以及酶活性调节进行直接调控^[22]。从而暗示激光处理可通过上调 GR 活性,改变 GSH/GSSG,并通过其信号作用来完成对干旱胁迫下小麦幼苗耐旱性调节的可能性。激光辐照会使植物体内的 SOD 同工酶谱发生改变,SOD、POD、淀粉酶、酯酶、硝酸还原酶等活性上调,活性提高,从而使植物体代谢旺盛,抗逆性增强^[3-6]。

4 结论

激光预处理提高了干旱胁迫下小麦幼苗叶片 GSH 和 AsA 含量以及 APX、GR 和 GST 活性,改变了植物细胞内氧化还原状态。同时,这些酶之间的协调作用可有效清除植物体内的活性氧,维持植物细胞内较低的膜脂过氧化水平,从而可提高小麦幼苗的耐旱性。

参考文献:

- [1] Saba J, Moghaddam M, Ghassemi K. Genetic properties of drought resistance indices[J]. *J Agric Sci Technol*, 2001, 3: 43-49.
- [2] Chen Y P, Microwave treatment of eight seconds protects cells of *Isatis indigotica* from enhanced UV-B radiation lesions[J]. *Photochem Photobiol*, 2006, 82 (2): 503-507.
- [3] Chen Y P, Liu Y J, Wang X L, Ren Z Y, Yue M. Effect of microwave and He-Ne laser on enzyme activity and biophoton emission of *Isatis indigotica*[J]. *J Integrative Plant Biol*, 2005, 47: 849-855.
- [4] 韩榕,王勋陵,岳明. He-Ne 激光对小麦 DNA UV-B 损伤修复的影响[J]. *中国激光*, 2002, 29 (9): 859-863.
- [5] Qi Z, Yue M, Wang X L. Laser pretreatment protects cells of broad bean from UV-B radiation damage[J]. *J of Photochemistry Photobiology B: Biology*, 2000, 59: 33-37.
- [6] Qi Z, Yue M, Han R. The damage repair role of He-Ne laser in plant exposed to different intensities of ultraviolet-B irradiation[J]. *Photochem and Photobiol*, 2002, 75: 680-687.

- [7] Allen R D, Webb R P, Schake S A. Use of transgenic plants to study antioxidant defenses[J]. *Free Radic Biol Med*, 1997, 23: 473 – 479.
- [8] Nakano Y and Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts [J]. *Plant Cell Physiol*, 1981, 22: 867 – 880.
- [9] Foyer C H, Halliwell B. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts; a proposed role in ascorbic acid metabolism[J]. *Planta*, 1976, 133: 21 – 25.
- [10] Mannervik B, Gutenber C. Glutathione transferase (Human placenta) [J]. *Method Enzymol*, 1981, 77: 231 – 235.
- [11] Ellman G L. Tissue sulfhydryl groups[J]. *Archives of Biochem and Biophys*, 1959, 1: 70 – 77.
- [12] Arakawa N, Tsutsumi K, Sanceda N G. A rapid and sensitive method for the determination of ascorbic acid using 4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline [J]. *Agric Biol Chem*, 1981, 45: 1289 – 1290.
- [13] Asada K. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons [J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mot Biol*, 1999, 50: 601 – 639.
- [14] Chen Y P, Yue M, Wang X L. Influence of He-Ne laser irradiation on seeds thermodynamic parameters and seedlings growth of *Isatis indogotica* [J]. *Plant Sci*, 2005, 168: 601 – 606.
- [15] Qiu Z B, Zhu X J, Li F M. The optical effect of semiconductor laser on protecting wheat from UV-B radiation damage [J]. *Photochem Photobiol Sci*, 2007, 7: 788 – 793.
- [16] Garcia R F, Arza P L. Influence of a stationary magnetic field on water relations in lettuce seeds. Part I: theoretical considerations [J]. *Bioelectromagnetics*, 2001, 22: 589 – 595.
- [17] Uchida A, Jagendorf A T, Hibi T. Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice [J]. *Plant Sci*, 2002, 163: 515 – 523.
- [18] Edwards R, Dixon D P, Walbot V. Plant glutathione-S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health [J]. *Trends Plant Sci*, 2000, 5: 193 – 198.
- [19] Qiu Z B, Liu X, Tian X J. Effects of CO₂ laser pretreatment on drought stress resistance in wheat [J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 90(1): 17 – 25.
- [20] 蔡素雯, 齐智, 马小来. He-Ne 激光对玉米幼苗可溶性蛋白合成的影响 [J]. *中国激光*, 2000, A27 (3): 284 – 288.
- [21] 曹恩华. 激光对 DNA 的作用 [J]. *激光生物学*, 1993, 2: 290 – 295.
- [22] Foyer C H, Theodoulou F L, Delrot S. The functions of inter and intracellular glutathione transport system in plants [J]. *Trends Plant Sci*, 2001, 6: 486 – 492.