

干旱对银杏生理生化特性及 叶绿体超微结构的影响

刘 丹, 陈国祥, 魏晓东, 唐加红, 杨玉兰, 苑中原, 李 稳, 崔红云

(南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210046)

[摘要] 以五年生盆栽的银杏大佛指实生苗为实验材料, 通过持续自然干旱, 研究了持续干旱条件下银杏叶片生理生化指标和叶绿体超微结构的变化. 结果表明: 干旱处理 30 d 后, 银杏叶片叶绿素含量逐渐下降; MDA 含量和 SOD 活力逐渐上升, CAT 活力逐渐下降; 脯氨酸和可溶性糖含量逐渐上升, 可溶性蛋白质呈先下降后上升的趋势; 各项生理指标 (除 SOD 外) 均与对照有显著差异 ($p < 0.05$). 叶绿体逐渐膨胀变圆, 基质片层膨胀溶解, 嗜锲颗粒增大增多, 最终破裂解体. 说明持续 30d 的干旱, 对银杏叶片各项生理指标和叶绿体超微结构未产生显著影响, 银杏有一定抵御干旱的能力.

[关键词] 银杏, 旱胁迫, 生理指标, 叶绿体超微结构

[中图分类号] Q942.5; Q945.78 [文献标志码] A [文章编号] 1001-4616(2011)02-0064-06

Effects of Drought on Physiological and Biochemical Characteristics of Leaves and Ultrastructure of Chloroplasts in *Ginkgo biloba* L.

Liu Dan, Chen Guoxiang, Wei Xiaodong, Tang Jiahong, Yang Yulan,
Yuan Zhongyuan, Li Wen, Cui Hongyun

(School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China)

Abstract 5 year-old *Ginkgo biloba* L seedlings was selected to measure the changes in physiological and biochemical indexes of leaves and ultrastructure of chloroplasts under prolonged drought stress. The results show that chloroplasts (Chl) content decreased when the drought stress had lasted 30 days, while MDA content and the activities of SOD increased, which resulted in the reduction of the activities of CAT. At the same time, proline and soluble sugar content were gradually increased, while content of soluble protein decreased at first and then increased again. There were significant differences in every physiology indexes with the control except the activities of SOD. Chloroplast lamellae became loose gradually, whereas the number and size of osmophilic granule increased during drought stress till the chloroplast disappeared. There were no variations in some physiological indexes for the *Ginkgo biloba* L leaves and chloroplast ultrastructure under drought stress for 30 d. So *Ginkgo biloba* L has some adaptation for drought.

Key words *Ginkgo biloba* L., drought stress, physiological and biochemical indexes, ultrastructure of chloroplast

干旱是植物生存环境中主要逆境因子之一, 对植物的生长发育及农作物的产量等方面具有重要的影响. 正常情况下, 植物体细胞内自由基的产生的清除处于动态平衡状态. 在干旱胁迫下, 植物抗氧化酶系统的变化和紊乱, 导致体内的氧自由基增多, 植物体内过剩的自由基引发了膜脂过氧化作用, 造成膜系统的损伤, 严重时会导致植物细胞的死亡^[1]. 由于干旱胁迫加剧了细胞的膜脂氧化程度, 造成膜内不饱和脂肪酸的减少, 从而引起膜蛋白的不稳定性和膜结构功能的丧失, 导致叶绿体的基粒片层膨胀、溶解、基粒垛叠程度下降, 最终导致叶绿体破裂, 仅剩排列紊乱的片层结构, 造成其结构的不可逆的破坏^[2].

银杏 (*Ginkgo biloba* L.) 是中生代子遗的古老种植物, 俗称白果树、公孙树, 有世界“金色活化石”之称, 是我国特有的著名多用途珍稀树种^[3]. 目前关于干旱对银杏的研究主要集中于对其生长生理特性^[4]、

收稿日期: 2010-10-15

基金项目: 国家自然科学基金 (30771299).

通讯联系人: 陈国祥, 教授, 博士生导师, 研究方向: 植物生理生化. E-mail: gxchen@njnu.edu.cn

光合特性^[5]、内酯和黄酮的积累^[6]及叶肉细胞的超微结构^[7]等方面, 而对其生理生化特性和叶绿体超微结构未有综合系统的研究. 本文研究了干旱条件下, 银杏实生苗叶片叶绿素含量、细胞膜脂过氧化、保护酶、渗透调节物质的生理生化指标及叶绿体超微结构的变化, 为其在干旱和半干旱地区的栽培提供一定的理论依据.

1 材料与方法

1.1 材料与设计

本试验选取 5 年生银杏大佛指实生苗, 进行自然干旱处理. 2009 年 3 月将 40 株株高为 1.4~1.6 m、地径为 20~25 cm 的银杏苗木, 定植于内径 38 cm、高 25 cm 的塑料花盆中, 1 盆 1 株, 土壤为肥力较好的沙土, 试验地点在南京师范大学植物园塑料大棚内. 5 月 5 日开始试验, 5 月 20 日开始采样, 7 月 5 日试验结束. 试验设置为对照组和处理组 (每组分别 20 株): 对照组是给苗木浇清水至饱和, 以后每天持续浇灌清水; 处理组是先给苗木浇灌清水至饱和, 以后 60 d 内不再浇水. 2 种处理每隔 15 d 在苗木的同一部位取叶片样品进行生理生化指标测试.

1.2 指标测定方法

1.2.1 生理指标测定

于 5 月 20 日至 7 月 5 日上午 9:00~10:00 取相同位置的叶片数片, 用于各项生理生化指标的特定, 每个生理指标测定设 3 个重复. 测定指标及具体方法如下: 叶绿素含量参照 Amon^[8]的方法测定; MDA (丙二醛) 含量参照赵世杰等^[9]的硫代巴比妥酸 (TBA) 比色法测定; CAT (过氧化物酶) 活力参照李建勋等^[10]的方法测定; SOD (超氧化物歧化酶) 的测定参照李合生^[11]的 NBT 法测定; 脯氨酸含量参照朱广廉^[12]的磺基水杨酸法测定; 可溶性糖含量参照张志良等^[13]的蒽酮法测定; 可溶性蛋白含量采用考马斯亮蓝染色法测定.

1.2.2 叶绿体超微结构的观察

选取新鲜的银杏叶片, 切为 0.1 cm × 0.5 cm 的片断, 迅速地投入到 4% 的戊二醛固定液中, 以针筒抽气, 将叶片中的气体排出, 使叶片沉入固定液中, 保存于 4℃ 下至少 24 h. 经磷酸缓冲液漂洗后, 用 1% 四氧化锇固定 2 h, 然后用丙酮梯度脱水, Epon812 环氧树脂逐级渗透和包埋, 聚合后在 LKB-V 型超薄切片机上切片. 用醋酸铀染色 30 min, 再用柠檬酸铅复染 10 min, 在 Hitachi600A-2 透射电镜下观察.

1.3 数据处理

采用 Microsoft Excel 2003 和 SPSS 15.0 软件对数据进行分析.

2 结果与分析

2.1 干旱胁迫对银杏叶片叶绿素含量的影响

由图 1 可知, 干旱处理的前 15 d 对照组和处理组叶片叶绿素含量大致相同, 无显著差异 ($p > 0.05$); 随着干旱的加剧, 处理组叶绿素含量逐渐下降, 分别低于对照 20.72%, 54.07% 和 47.96%, 差异显著 ($p < 0.05$). 说明干旱处理 15 d 后, 银杏叶片叶绿素迅速下降, 可能由于干旱抑制了叶绿素的合成和积累导致.

2.2 干旱胁迫对银杏叶片 MDA 含量和抗氧化酶活性的影响

干旱胁迫下, 银杏叶片 MDA 含量、CAT 和 SOD 活力的变化分别见图 2、3、4. 由图 2 可知, 本研究中, 对照组和处理组 MDA 含量均逐渐升高. 干旱处理 30 d 后, 处理组 MDA 的含量迅速增大, 分别高于对照 49.57% 和 34.10%, 差异显著 ($p < 0.05$). 由图 3 可知, 干旱胁迫下, 处理组 CAT 活力始终高于对照, 并于干旱处理的第 30 d 升高至对照的 1.02 倍, 差异显著 ($p < 0.05$). 由图 4 可知, 本研究中, 对照组和处理组的 SOD 活性均呈上升趋势, 处理组 SOD 活性分别比对照高 3.83%、20.26%、22.18% 和 9.21%, 无显著差异 ($p > 0.05$). 说明干旱处理 30 d 后, CAT 活力迅速下降, 破坏了活性氧清除与产生的平衡, 膜脂过氧化加剧, MDA 含量迅速增大. 处理组 SOD 较对照无显著差异, 推测 SOD 在自由基的清除过程中可能不是起主要作用的酶, 而是 CAT 和其他的酶促或非酶促系统共同作用清除过剩的氧自由基.

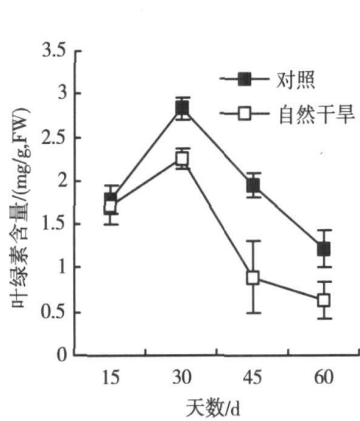


图 1 干旱胁迫对银杏叶片叶绿素含量的影响

Fig.1 Effects of drought stress on chlorophyll content of leaves in *Ginkgo biloba* L.

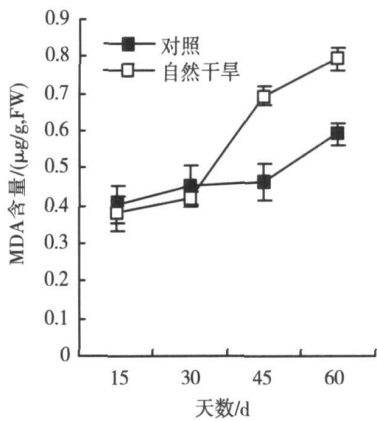


图 2 干旱胁迫对银杏叶片 MDA 含量的影响

Fig.2 Effects of drought stress on MDA content of leaves in *Ginkgo biloba* L.

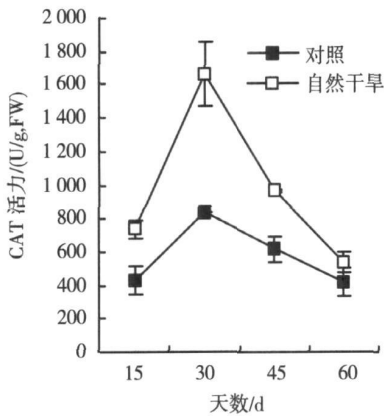


图 3 干旱胁迫对银杏叶片 CAT 活力的影响

Fig.3 Effects of drought stress on CAT activity of leaves in *Ginkgo biloba* L.

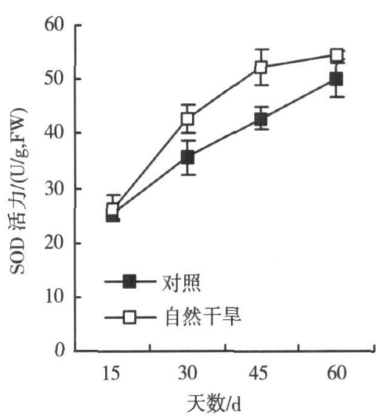


图 4 干旱胁迫对银杏叶片 SOD 活力的影响

Fig.4 Effects of drought stress on SOD activity of leaves in *Ginkgo biloba* L.

2.3 干旱胁迫对银杏叶片渗透调节物质的影响

干旱胁迫下, 银杏叶片脯氨酸、可溶性糖和可溶性蛋白含量的变化分别见图 5 6 7. 由图 5 可知, 干旱处理的前 30 d 对照组和处理组脯氨酸的含量大致相同; 随着干旱的加剧, 处理组脯氨酸的含量迅速升高, 上升至对照的 2.29 倍和 9.40 倍, 差异显著 ($p < 0.05$). 由图 6 可知, 干旱处理的前 15 d 处理组可溶性糖

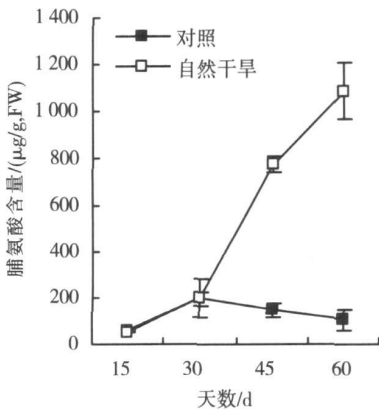


图 5 干旱胁迫对银杏叶片脯氨酸含量的影响

Fig.5 Effects of drought stress on proline content of leaves in *Ginkgo biloba* L.

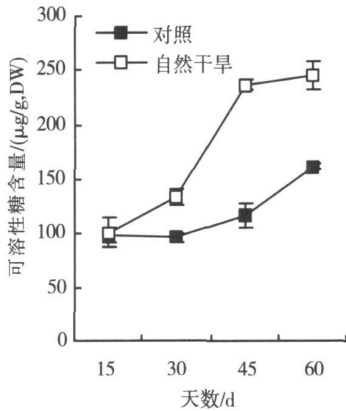


图 6 干旱胁迫对银杏叶片可溶性糖含量的影响

Fig.6 Effects of drought stress on soluble sugar content of leaves in *Ginkgo biloba* L.

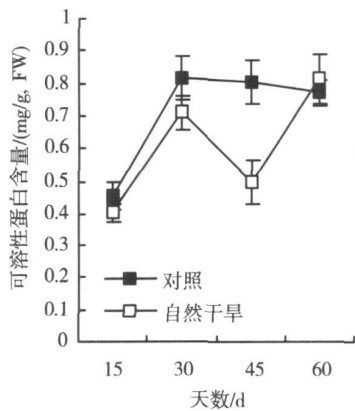


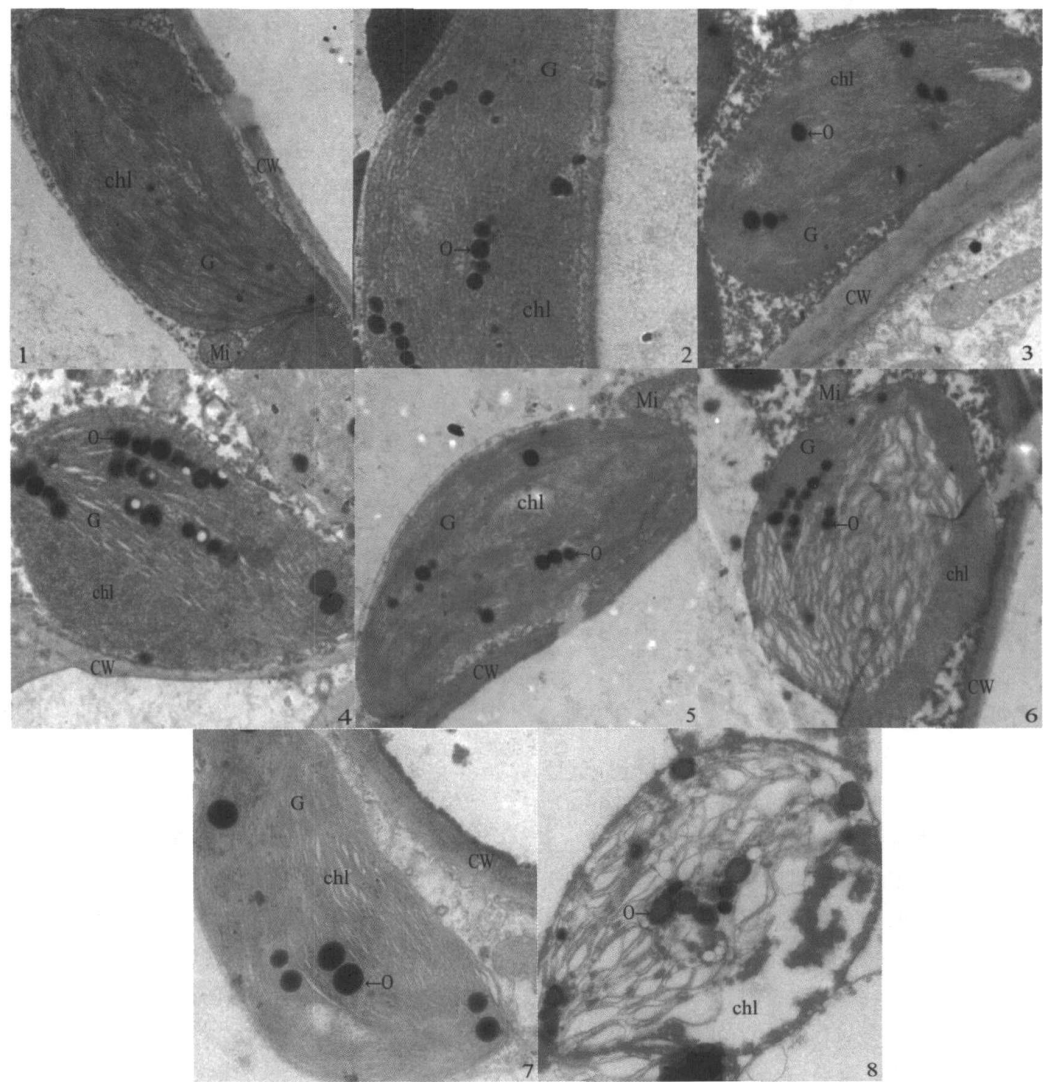
图 7 干旱胁迫对银杏叶片可溶性蛋白含量的影响

Fig.7 Effects of drought stress on soluble protein content of leaves in *Ginkgo biloba* L.

的含量比对照组高 3.22%, 无显著差异 ($p > 0.05$); 随着干旱的加剧, 处理组可溶性糖的含量高于对照 39.78%、101.73% 和 51.49%, 差异显著 ($p < 0.05$). 由图 7 可知, 在干旱处理的前 30 d 处理组可溶性蛋白含量低于对照 11.30% 和 13.21%, 无显著差异 ($p > 0.05$); 随着干旱的加剧, 处理组蛋白质含量迅速下降, 较对照下降了 37.92%, 差异显著 ($p < 0.05$); 随后处理组可溶性蛋白含量迅速增大, 高于对照组 5.16%, 无显著差异 ($p > 0.05$). 说明干旱胁迫下, 脯氨酸和可溶性糖是降低银杏叶片渗透势, 维持细胞膨压的重要渗透调节物质, 它们通过阻止水分的丧失, 达到保水目的, 从而进行自身调节, 以适应不利的环境条件.

2.4 干旱胁迫对银杏叶绿体超微结构的影响

银杏叶绿体超微结构观察如图 8 所示, 在试验的过程中, 对照组叶绿体外形规则, 呈梭形或椭圆形, 基



1. 15 d时对照组银杏叶片叶绿体 ($\times 25\,000$) 2. 15 d时处理组银杏叶片叶绿体 ($\times 25\,000$) 3. 30 d时对照组银杏叶片叶绿体 ($\times 30\,000$) 4. 30 d处理组银杏叶片叶绿体 ($\times 30\,000$) 5. 45 d时对照组银杏叶片叶绿体 ($\times 25\,000$) 6. 45 d时处理组银杏叶片叶绿体 ($\times 30\,000$) 7. 60d时对照组银杏叶片叶绿体 ($\times 25\,000$) 8. 60 d时处理组银杏叶片叶绿体 ($\times 25\,000$)

1. chloroplast of the control group in *Ginkgo biloba* L. on the 15th day ($\times 25\,000$) 2. chloroplast of the stress group in *Ginkgo biloba* L. on the 15th day ($\times 25\,000$) 3. chloroplast of the control group in *Ginkgo biloba* L. on the 30th day ($\times 30\,000$) 4. chloroplast of the stress group in *Ginkgo biloba* L. on the 30th day ($\times 30\,000$) 5. chloroplast of the control group in *Ginkgo biloba* L. on the 45th day ($\times 25\,000$) 6. chloroplast of the stress group in *Ginkgo biloba* L. on the 45th day ($\times 30\,000$) 7. chloroplast of the control group in *Ginkgo biloba* L. on the 60th day ($\times 25\,000$) 8. chloroplast of the stress group *Ginkgo biloba* L. on the 60th day ($\times 25\,000$)

Chl chloroplast CW: cellwall G: granum thylakoid Mi mitochondrion O osmophilic granule

图 8 干旱胁迫对银杏叶绿体超微结构的影响

Fig 8 Effects of drought on ultrastructure of chloroplasts in *Ginkgo biloba* L.

粒片层和基质片层清晰可见,基粒片层排列紧密且沿叶绿体长轴方向排列(图 8.1,3,5,7)。干旱处理 15 d 时,处理组叶绿体形状较规则,排列在细胞壁的周围,片层清晰结构发达(图 8.2);在干旱处理 30 d 时,叶绿体形状开始肿胀变圆,片层开始松散(图 8.4);在干旱处理 45d 时,叶绿体进一步肿胀,片层之间的间隔增大(图 8.6);在干旱处理 60 d 时,叶绿体肿胀变圆,片层松散且大部分已消失(图 8.8)。干旱处理下,处理组叶绿体片层逐渐松散消失,嗜锲颗粒数目增多增大,叶绿体结构受到严重破坏。

3 讨论

正常情况下,植物体细胞内自由基的产生与清除处于动态平衡状态。但是当植物处于逆境条件下(如干旱、强光、盐碱、高温、霜冻、缺素等),根据生物自由基伤害学说^[14],植物细胞内活性氧自由基的产生和清除代谢的平衡受到破坏,使活性氧自由基的产生占据主导地位从而导致自由基含量过多积累且超过阈值,进而引发或加剧了细胞的膜脂过氧化,给植物体造成伤害^[15,16]。但植物在遭受干旱处理时,可以通过提高保护酶的活性来有效地防御和清除自由基保护细胞免受氧化伤害。本研究中,干旱处理的前 30 d CAT 活力的迅速增大以清除体内活性氧,保护细胞免受干旱造成的伤害;随着干旱的加剧,细胞产生了过多的自由基对酶蛋白产生伤害,从而降低了 CAT 的酶活力,使得细胞内自由基的产生和清除不平衡,氧自由基在叶片中大量积累,膜脂过氧化程度加剧,MDA 逐渐积累。在干旱处理下,处理组 SOD 酶活力变化不显著,推测 SOD 可能不是银杏叶片中主要的清除活性氧的酶。

脯氨酸和可溶性糖主要渗透调节物质,它们共同作用使植物可以在一定时间内维持细胞膨压保持细胞的持续生长。本研究中,干旱处理 15 d 后,处理组可溶性糖含量迅速增大;干旱处理 30 d 后,脯氨酸含量开始迅速增加。说明干旱处理下,银杏叶片内可溶性糖逐渐积累达到了一定的浓度,可能激活了脯氨酸的合成,共同抵御干旱对银杏的伤害。王有年等^[17]对梨树在水分胁迫下的渗透调节的研究也得到了相同的结果。可溶性蛋白质也是重要的渗透调节物质之一,在干旱处理过程中可束缚更多的水分,从而大大增强了抗旱性。本研究中,干旱处理的前 45 d 处理组可溶性蛋白含量逐渐降低,可能与干旱处理条件下细胞内肽酶活性提高有关^[18],蛋白质加速分解的同时其合成也受到抑制导致其含量下降。随着干旱的加剧,可溶性蛋白含量上升,可能是银杏叶片细胞为了避免干旱处理造成的伤害,诱导某些抗旱基因的表达,产生某些抗逆性蛋白质;或者使不溶性蛋白转变为可溶性蛋白,来维持植物的正常生理生化反应。

叶绿素的植物光合作用的主要色素,它的改变影响着植物光合作用的强弱^[19]。叶绿体是光合作用的场所,在光合作用进行时不可避免地要产生超氧物自由基等活性氧。正常生理条件下,这些氧自由基的产生和清除是平衡的,因此对植物不存在任何伤害;在干旱的环境下,这种平衡被破坏引发膜脂过氧化,从而引起膜的渗漏和细胞超微结构的变化^[20]。本研究中,干旱处理 15 d 后,叶片叶绿素含量迅速下降,到干旱的后期与对照比有显著的差异;经相关性比较,处理组叶绿素含量与 MDA 含量呈显著负相关($r = -0.937$)。干旱处理前 30 d 处理组银杏叶绿体呈梭形并紧贴细胞壁,保持着良好的受光姿态,片层清晰完整;随着干旱的加剧,叶绿体形状开始肿胀变圆,片层逐渐松散降解,嗜锲颗粒增多增大,叶绿体被膜破裂,只剩下排列紊乱的片层,造成其结构的不可逆的破坏。干旱处理下,细胞膜脂氧化程度加剧,导致叶片叶绿素含量下降,叶绿体超微结构遭到破坏,银杏叶片的光合性能受到了破坏。

徐艳丽等^[21]研究表明,银杏的叶绿体光能转换的各项指标在 6 月中旬效率较高。本研究中,实验进行 30 d 时(即 6 月中旬),对照组银杏叶片的叶绿素含量、CAT 活性、蛋白质含量达到了最高值;叶绿体呈梭形,片层清晰,保持着良好的光合姿态。推测此时期银杏树苗的各项生长生理活性达到较高水平。

综上所述,在干旱处理的前 30 d 银杏叶片细胞内抗氧化系统积极响应,保持细胞内活性氧产生和清除的基本平衡,使各项生理指标可以维持在正常水平,叶绿体可以保持完整的结构和清晰的片层。随着干旱的加剧,抗氧化酶活力迅速下降,活性氧的产生和清除出现了不平衡,膜脂氧化程度加剧,MDA 大量积累,降低了叶片叶绿素的含量和破坏了叶绿体的结构;此时,银杏叶片细胞主要通过积累脯氨酸和可溶性糖,提供细胞的渗透调节能力,维持植株正常生长所需的膨压,以保持细胞各项代谢的进行。

[参考文献]

- [1] Chaves M M, Pereira J S, Maroco J P. Understanding plant response to drought from genes to the whole plant[J]. *Funct*

Plant Biol 2003, 89: 239-264

- [2] 吴凯, 周晓阳. 环境胁迫对植物超微结构的影响 [J]. 山东林业科技, 2007, 29(3): 80-83
- [3] 杨国平, 凯旋. 银杏的用途及效益 [J]. 中国林业, 1997, 48(10): 25
- [4] 王华田, 孙明高, 崔明刚, 等. 土壤水分状况对苗期银杏生长及生理特性影响的研究 [J]. 山东农业大学学报: 自然科学版, 2000, 31(1): 74-78
- [5] 景茂, 曹福亮, 汪贵斌, 等. 土壤水分含量对银杏光合特性的影响 [J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2005, 29(4): 83-86
- [6] 冷平生, 苏淑钗, 李月华, 等. 施肥与干旱胁迫对银杏生长及黄酮苷和萜类内酯含量的影响 [J]. 北京农学院学报, 2001, 16(1): 32-37
- [7] 汪贵斌, 曹福亮, 景茂, 等. 水分胁迫对银杏叶片叶肉细胞超微结构的影响 [J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2008, 32(3): 65-70
- [8] Amon D I. Copper enzymes in isolated chloroplast Polyphenol oxidase in Beta vulgaris[J]. Plant Physiol 1949, 24(1): 1-15
- [9] 赵世杰, 李德全. 现代植物生理学实验指南 [M]. 北京: 科学出版社, 1999: 305-306
- [10] 陈建勋, 王晓峰. 植物生理学实验指导 [M]. 广州: 华南理工大学出版社, 2002: 120-121
- [11] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 167-169
- [12] 朱广廉, 邓兴胜, 庄卫能. 植物体内游离脯氨酸的测定 [J]. 植物生理学通讯, 1983, 6(1): 35-37
- [13] 张志良, 瞿伟菁. 植物生理学指导 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2003: 127-128
- [14] Mehdy M C. Active oxygen species in plant defense against pathogens[J]. Plant Physiol 1994(105): 467-472
- [15] Snimoff N. The role of active oxygen in response of plants to water deficit and desiccation[J]. New Phytol 1993, 125: 27-58
- [16] Fridovich I. Superoxide dismutase[J]. Ann Rev Biochem, 1975, 44: 147-159
- [17] 王有年, 杨爱珍, 于同泉, 等. 水分胁迫对爱宕梨渗透调节的影响 [J]. 北京农学院学报, 2003, 18(1): 17-20
- [18] 曹慧, 王孝威, 韩振海, 等. 水分胁迫诱导平邑甜茶叶片衰老期间内肽酶与活性氧累积的关系 [J]. 中国农业科学, 2004, 37(2): 274-279
- [19] 杨艳华, 陈国祥, 刘少华, 等. H_2O_2 胁迫下两优培九和武运粳 7 号水稻幼苗抗性差异的研究 [J]. 农村生态环境, 2002, 18(3): 34-37
- [20] 武玉叶, 李德全. 土壤水分胁迫对冬小麦叶片渗透调节及叶绿体超微结构的影响 [J]. 华北农学报, 2001, 16(2): 87-93
- [21] 徐艳丽, 陈国祥, 魏晓东, 等. 银杏叶片叶绿体光能转换特性的变化 [J]. 植物研究, 2008, 28(2): 179-182

[责任编辑: 顾晓天]