

热锻炼对高羊茅 (*Festuca arundinacea*) 和多年生黑麦草 (*Lolium perenne*) 抗高温能力的影响

徐 胜^{1,2}, 何兴元¹, 陈 玮¹, 李建龙², 张剑岷³

(1. 中国科学院沈阳应用生态研究所, 沈阳 110016; 2. 南京大学生命科学院, 南京 210093;
3. 北京大学校园管理服务中心, 北京 100871)

摘要:夏季高温胁迫已成为限制冷季型草坪草生长和发育的一个主要问题。以两种耐热性不同的冷季型草坪草高羊茅和多年生黑麦草(前者较耐热)为材料,经过 3d 30℃ 的热锻炼预处理后,分别在 38、42、46℃ 的高温下处理 14h。在这些高温条件下,研究了经过热锻炼预处理的高羊茅和多年生黑麦草叶片膜脂过氧化、抗氧化剂含量以及叶绿体超微结构的变化。结果表明:(1) 热锻炼提高了高羊茅和多年生黑麦草的耐热性,显著减缓了高温条件下两种草坪草叶片膜脂过氧化程度的加剧,降低了叶片过氧化氢(H_2O_2)和超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)的产生速率。(2) 高温条件下,热锻炼使高羊茅和多年生黑麦草叶片中抗氧化剂抗坏血酸(AsA)和谷胱甘肽(GSH)的含量下降程度有所减缓。(3) 热锻炼减轻了高温胁迫对高羊茅和多年生黑麦草叶片叶绿体超微结构的损伤。这些结果说明热锻炼能够减轻高温对草坪草叶绿体的伤害可能与其在高温胁迫下和对照相比具有较高的抗氧化剂含量有关,这也可能是冷季型草坪草对高温的适应机制之一。

关键词:高羊茅;多年生黑麦草;活性氧;抗氧化剂;热锻炼;叶绿体超微结构

文章编号:1000-0933(2008)01-0162-10 中图分类号:Q142, Q945, Q948, S668.4 文献标识码:A

Effects of heat acclimation on high-temperature stress resistance and heat-tolerance mechanism of *Festuca arundinacea* and *Lolium perenne*

XU Sheng^{1,2}, HE Xing-Yuan¹, CHEN Wei¹, LI Jian-Long², ZHANG Jian-Min³

1 Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016, China

2 School of Life Science, Nanjing University, Nanjing 210093, China

3 Service Centre of Campus Management, Peking University, Beijing 100871, China

Acta Ecologica Sinica, 2008, 28(1): 0162 ~ 0171.

Abstract: High temperature stress is one of the major factors limiting the growth and development of cool-season grasses during hot summer in warm climatic regions. Changes in the membrane lipid peroxidation, antioxidant content, as well as ultrastructure of chloroplasts were investigated in leaves of two cool-season turfgrass species, *Festuca arundinacea* (moderately heat sensitive) and *Lolium perenne* (heat sensitive), exposed to three temperature levels (38, 42, 46℃) for 14 h respectively with a heat acclimation pretreatment at 30℃ for 3 d in a growth chamber. Relative water content (RWC), cell membrane thermostability, malondialdehyde (MDA) content, accumulation of hydrogen peroxide (H_2O_2) and production rate of superoxide ($O_2^{\cdot-}$), ascorbate (AsA) and glutathione (GSH) contents were measured in leaves of the two

基金项目:国家自然科学基金重点资助项目(90411019);国家博士启动基金资助项目(06SBS51001);中国科学院知识创新工程重要方向资助项目(KSCX2-YW-Z-035)

收稿日期:2006-10-30; **修订日期:**2007-11-06

作者简介:徐胜(1974~),男,内蒙古集宁市人,博士,主要从事植物生理生态学研究. E-mail: shengxu703@126.com

Foundation item: The project was financially supported by National Natural Science Key Foundation of China (No. 90411019), Doctoral Startup Foundation (No. 06SBS51001), and Knowledge Innovation-oriented Key Project of Chinese Academy of Sciences (No. KSCX2-YW-Z-035)

Received date: 2006-10-30; **Accepted date:** 2007-11-06

Biography: XU Sheng, Ph. D., mainly engaged in physio-ecology of plant. E-mail: shengxu703@126.com

turfgrass species. The results showed as follows: (1) Significant accumulation of H_2O_2 and high production rate of $O_2^{\cdot-}$ were observed in leaves of the two turfgrass species at all tested temperature levels regardless of whether heat-acclimated or not, but the degree of accumulation and the production rate in heat-acclimated turfgrass were lower than in non heat-acclimated turfgrass. (2) The changes in contents of AsA and GSH in the two turfgrass species showed significantly the trend of decrease with increase of high temperature. The contents of AsA and GSH in leaves of heat-acclimated turfgrass were higher than in non heat-acclimated turfgrass at same temperature level. (3) The degree of damage in chloroplasts increased with increasing of temperature. Ultrastructure of chloroplasts in heat-acclimated leaves was damaged less by high temperature stress than those plants without heat acclimation. The findings suggested that it might be helpful to protect the integrality of chloroplasts from the impact of high temperature stress by the heat acclimation pretreatment that induced lower membrane lipid peroxidation, higher AsA and GSH contents in leaves of two turfgrass species, which might be also one of the mechanisms for adaptation of cool-season turfgrass to heat stress.

Key Words: *Festuca arundinacea*; *Lolium perenne*; reactive oxygen species; antioxidant; heat acclimation; chloroplast ultrastructure

近年来,随着“温室效应”的不断加剧,全球气温的持续上升,高温对植物的影响已受到人们的普遍关注^[1,2]。在热带亚热带或过渡地带,如我国南京和武汉等地,夏季高温已成为限制冷季型草坪草生长和发育最主要的一个生态因子^[1,3,4]。高羊茅(*Festuca arundinacea*)和多年生黑麦草(*Lolium perenne*)作为冷季型草坪草,分别为高羊茅属和黑麦草属的多年生草本植物,二者具有分蘖能力强、成坪速度快、品质优良等特点,常作为建坪的先锋草种,是我国过渡地带及其以北广大温带地区建坪的重要材料,在长江以南也有一定的应用面积。这两个草种喜温暖湿润较凉爽的环境,在炎热的夏季常呈休眠状态,特别对黑麦草,夏枯现象更为严重^[5]。因此,开展冷季型草坪草的耐热性研究成为草坪科研中的重要课题之一。目前,国内外已有许多关于草坪草耐热性方面的研究^[4,6,7]。研究表明,对高羊茅叶片喷施 0.5mmol/L 的水杨酸(SA)能够显著提高幼苗在 42℃ 下的热胁迫,SA 因提高高羊茅叶片可溶性蛋白的含量、超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)的活性而提高它的耐热性^[8]。也有报道叶面喷施 Ca^{2+} 能够提高高羊茅的抗氧酶活性和降低膜脂过氧化而提高了植株的耐热性^[9]。许多研究表明,植物可以通过热锻炼提高其在忍受高温过程中的耐热性^[8,10,11]。以往对草坪草热锻炼的研究多集中在抗氧化酶活性、膜脂过氧化等方面^[8,9],但对草坪草抗氧化剂和超显微结构(如叶绿体)的研究较少,特别对短期高温胁迫下叶绿体的受损情况研究甚少。本实验拟通过研究和比较两种耐热性不同的冷季型草坪草在热锻炼后的膜脂过氧化程度、抗氧化剂如抗坏血酸(AsA)和谷胱甘肽(GSH)的含量以及叶绿体超显微结构等的变化规律,以期为进一步阐明热锻炼提高草坪草的耐热性机理奠定研究基础,也为耐热草坪草的选育提供生理学和细胞学方面的依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

材料选取高羊茅和多年生黑麦草,前者较耐热,后者为热敏感草坪草。两种草坪草均取自南京大学花卉苗圃内的草坪试验地,草坪草从播种到取样已经过两个生长季,于 2004 年 5 月 10 日选取健康并且株形比较整齐一致的整个草坪草植株(平均株高在 9cm 左右),将其快速移栽到直径为 12cm、高为 25cm 的花钵中,每花钵 9 株,花钵底部打有分布位置和数量相同的小孔以便通气和排水。花钵土壤基质为混合土壤(壤土:沙土 = 1:2, 体积比)。移栽的花钵在苗圃温室内培养 40d 后,再转移到一台人工气候箱(LRH-300-CS, 广东医疗器械厂生产)进行常温(22/16℃, 昼/夜)培养,箱内为 $160\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 的光照强度,光周期为 14h,相对湿度为 70% ± 10%。在整个实验过程中,各盆钵的浇水、施肥等管理条件均保持一致。草坪草每周用剪刀修剪一次,留茬为 7cm。

1.2 实验方法

人工气候箱内共设 64 个花钵(高羊茅和黑麦草各 32 个),花钵随机摆放并且每天互换位置以减少位置的影响,每天用 1/2 强度的 Hoagland 营养液^[12]浇灌花钵,每盆浇灌 250mL 营养液。在人工气候箱内培养 14d 后,每个草种的一半材料(16 个花钵)被转移到 30℃ 的光照培养箱热锻炼 3d,同时将每个草种的另一半材料置于光照培养箱常温(22/16℃,昼/夜)培养(图 1)。3d 后,将每个草种常温下培养的与经过热锻炼的材料各取 12 个花钵分别分成 3 组,分别转移到 38、42℃ 和 46℃ 的光照培养箱内进行高温胁迫,并把经过热锻炼后每个草种余下的 4 个花钵转移到常温下培养。14h 后,剪取各处理下草坪草叶片进行相关指标的测定。每个草种的每个处理为 4 个花钵,4 个重复。

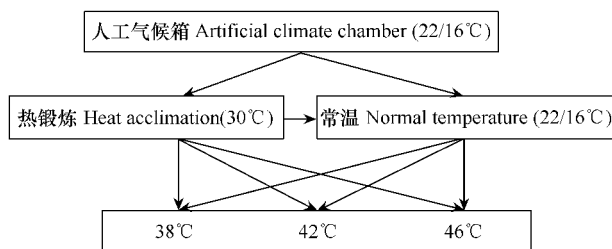


图 1 实验处理示意图

Fig. 1 Sketch map of experiment treatments

1.3 指标测定

1.3.1 叶片相对含水量(relative water content, RWC)和细胞膜的热稳定性

RWC 通过叶片鲜重、饱和重以及干重计算^[13]。叶片细胞膜热稳定性是通过叶片相对伤害率来评价,膜的相对伤害率越小,草坪草叶片细胞膜的热稳定性越好,反之越差。叶片相对伤害率(relative injury rate, RIR)由下列公式计算^[14]:

$$RIR(\%) = \{1 - [1 - (T_1/T_2)]/[1 - (C_1/C_2)]\} \times 100$$

式中, T 和 C 分别表示处理温度与对照温度(常温)下草坪草叶片的电导值,下标 1 和 2 所对应的电导值分别指初始和最终电导值。初始电导值和最终电导值分别指叶片在 25℃ 下自然释放电解质用电导仪(型号为 DDS-303A, 上海雷磁仪器有限公司生产)测定的电导值与叶片组织在完全被杀死后冷却至 25℃ 时所测定的电导值。论文中所有生理指标均按照每个处理重复 4 次(盆)取样测定。

1.3.2 叶片膜脂过氧化产物(MDA)、过氧化氢(H_2O_2)以及超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)含量的测定

MDA 含量的测定参照 Buege 和 Aust 的方法略加修改^[15]。称取 0.2g 新鲜叶片,加入 5ml、10% 的三氯乙酸和少量石英沙,研磨至匀浆,然后在 12 000g 下离心 15min,取上清液 2ml (对照用 2ml 蒸馏水),加入 2ml、0.6% 的 TBA,混匀后在沸水浴中反应 15min,迅速冷却后再离心,取上清液在 532nm 和 600nm 下比色。MDA 含量用如下公式计算: $MDA(\mu\text{mol/g FW}) = [(A_{532} - A_{600})/155] \times 10^3 \times \text{稀释倍数}$ ^[16]。

H_2O_2 含量的测定根据 Dagmar 等的方法稍加修改^[17]。称取 0.5g 新鲜叶片,加入 5ml 预冷的丙酮并加少量石英沙,在冷冻过的研钵中研磨至匀浆,匀浆在 1000g 下离心 10min,上清液中加入 5% 的硫酸钛和浓氨水,反应液在 1000g 下再离心 10min 后,弃取上清液,沉淀加入 2mol/L 的硫酸溶解后在 415nm 下比色。

$O_2^{\cdot-}$ 含量的测定根据 Ke 等的方法略加修改^[18]。称取 0.2g 新鲜叶片,提取液为 50mmol/L 的磷酸缓冲液(内含 1% 的聚乙烯吡咯烷酮)(pH 7.8)。提取的上清液加入 1mmol/L 的盐酸羟胺混匀后在 25℃ 下保温 60min,之后再加入 17mmol/L 的对氨基苯磺酸和 7mmol/L 的 1-萘胺在 25℃ 下显色反应 20min。

1.3.3 叶片抗坏血酸(AsA)和还原型谷胱甘肽(GSH)含量的测定

AsA 的测定参照 Mukherjee 和 Choudhurri 的方法,稍加修改^[19]。取 0.2g 新鲜叶片,加入 3ml 5% 的偏磷酸溶液研磨,12 000g 离心 10min,上清液定容至 3ml。测定时取样品液 0.2ml,与 0.4ml、75mmol/L 的 NaH_2PO_4 溶液(pH 7.4)混匀后,再依次加入 10% 的偏磷酸 0.4ml、44% 的磷酸 0.4ml、4% 的 2,2-二联吡啶(溶于 70% 乙醇)0.4ml 和 3% 的 $FeCl_3$ 0.2ml,摇匀,于 37℃ 下保温 1h,然后测定 525nm 波长下的光吸收值。

GSH 的测定参照 Griffith 的方法,稍加修改^[20]。样品液提取同 AsA。取样品液 0.2ml,加入 150mmol/L 的溶液 NaH_2PO_4 (pH 7.7) 2.6ml,混合后再加入 0.2ml 的 5,5-二巯基二硝基苯甲酸(DTNB)试剂(75.3mg DTNB 溶于 30ml、0.1mmol/L 的磷酸缓冲液, pH 6.8),以加磷酸缓冲液代替 DTNB 试剂作空白,摇匀,于 30℃ 下保

温 5min, 然后测定 412nm 波长下的光吸收值。

1.3.4 叶绿体超微结构的观测

迅速剪取新鲜叶片, 将其剪成 1mm^2 的片段用 3% 的戊二醛(用 0.2mol/L 磷酸缓冲液配制)4℃ 下固定, 然后用 1% 的四氧化锇后固定, 再用不同浓度梯度的乙醇逐级脱水, 最后用 Epon-812 树脂渗透包埋。超薄切片, 醋酸铀-柠檬铅双重染色^[21]。用电子显微镜(JEM-100CX)观测并拍照。

1.4 统计方法

所有数据运用 SPSS 和 EXCEL 进行统计和方差分析, 显著性运用最小极差法分析, 显著性包括 0.05 和 0.01 水平。

2 结果与分析

2.1 热锻炼对高温胁迫下高羊茅和黑麦草叶片相对含水量及其膜热稳定性的影响

由图 2A 可知, 两种草坪草叶片相对含水量(RWC)随着胁迫温度的升高而降低。与高羊茅相比, 黑麦草在高温胁迫下保持较低的 RWC 并且经过热锻炼的叶片比未经过热锻炼的叶片能够保持较高的 RWC。在对照温度(常温)下, 经过热锻炼预处理没有显著降低草坪型高羊茅的细胞膜相对伤害率(RIR) ($P > 0.05$), 但增加了黑麦草的 RIR ($P < 0.01$) (图 2B)。随着高温胁迫水平的上升, 两种冷季型草坪草叶片的 RIR 在明显增加, 并且黑麦草的 RIR 在 46℃ 几乎达到 100%, 尽管经过热锻炼预处理。然而, 在不同高温处理水平下, 经过热锻炼预处理的草坪草叶片 RIR 均有所降低。由此可知, 热锻炼提高了草坪草叶片细胞膜的热稳定性。

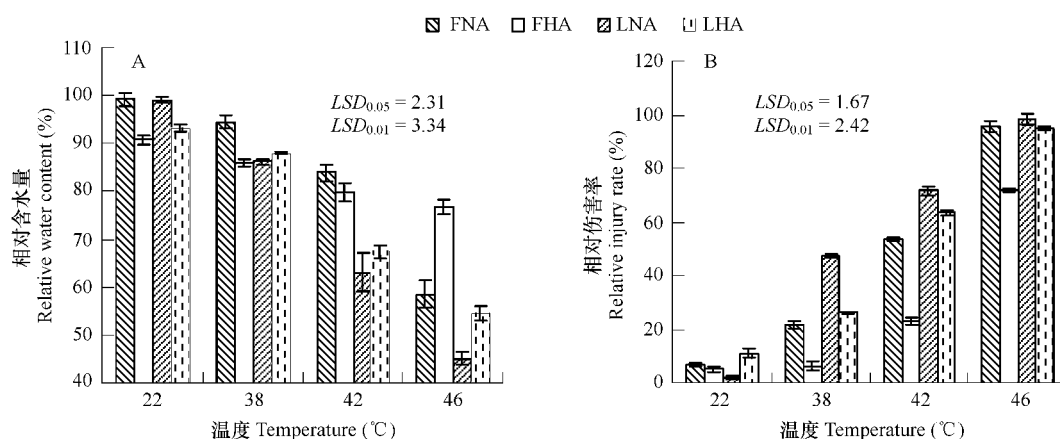


图 2 热锻炼对高温胁迫下高羊茅和黑麦草叶片相对含水量(RWC) (A) 和相对伤害率(RIR) (B) 的影响

Fig. 2 Effects of heat acclimation pretreatment on relative water content (RWC) (A) and relative injury rate (RIR) (B) in leaves of *Festuca arundinacea* and *Lolium perenne* under heat stress

误差棒代表平均值的标准误 ($n=4$); FNA: 未经过热锻炼处理的高羊茅; FHA: 经过热锻炼处理的高羊茅; LNA: 未经过热锻炼处理的黑麦草; LHA: 经过热锻炼处理的黑麦草; 最小显著差异在 0.05 和 0.01 水平 Error bars represent the standard error (S. E.) of mean ($n=4$); FNA, *Festuca arundinacea* with no heat-acclimated pretreatment; FHA, *Festuca arundinacea* with heat-acclimated pretreatment; LNA, *Lolium perenne* with no heat-acclimated pretreatment; LHA, *Lolium perenne* with heat acclimation pretreatment. Least significant differences (LSD) were shown at the 0.05 and 0.01 probability levels

2.2 热锻炼对高温胁迫下高羊茅和黑麦草叶片膜脂过氧化及其超氧自由基含量的影响

随着高温胁迫水平的增加, 两种草坪草叶片的膜脂过氧化产物丙二醛(MDA)含量均呈现出明显的上升趋势(图 3A)。然而, 经过热锻炼的草坪草叶片的 MDA 含量在高温胁迫下却有所降低, 在 42℃ 下经过热锻炼的高羊茅和黑麦草叶片的 MDA 含量比同胁迫水平下未经过热锻炼的分别降低 44.3% 和 42.9%。这些结果表明热锻炼有助于减缓高温胁迫下草坪草叶片细胞膜脂过氧化产物的积累。

过氧化氢(H_2O_2)和超氧阴离子($\text{O}_2^{\cdot-}$)是两种重要的活性氧, 与对照(常温)相比, 它们在两种草坪草叶片中随高温胁迫水平的增加在不断积累(图 3B-C)。在对照温度下, 经过热锻炼处理和未经过热锻炼预处理的

草坪草叶片的 H_2O_2 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 积累没有明显的差异 ($P > 0.05$)。高温胁迫下,黑麦草叶片的 H_2O_2 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 含量比高羊茅叶片的高。然而,在经过热锻炼预处理后,两草坪草的 H_2O_2 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 积累水平要比没有经过热锻炼的要低。在 46°C 下,没有经过热锻炼的黑麦草叶片内的 H_2O_2 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 积累显著,而经过热锻炼的黑麦草叶片内 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 积累比未经过热锻炼的相比降低 22.0%。这些结果表明,热锻炼减缓了草坪草在高温胁迫下氧自由基的积累,从而会减轻高温对细胞的伤害。

2.3 热锻炼对高温胁迫下高羊茅和黑麦草叶片抗坏血酸和还原型谷胱甘肽含量的影响

常温下,高羊茅和黑麦草叶片之间的抗坏血酸 (AsA) 和还原型谷胱甘肽 (GSH) 含量分别表现出明显的差异 (图 4A, 图 4B), 二者叶片的 AsA 含量分别为 538.4nmol/g FW 和 688.8nmol/g FW , GSH 含量分别为 408.9nmol/g FW 和 538.6nmol/g FW , 并且通过热锻炼的高羊茅叶片 AsA 和 GSH 含量得到了明显的提高。高温胁迫下,随高温胁迫水平的增加,两种草坪草叶片 AsA 和 GSH 含量呈现出明显的下降趋势。然而,二者经过热锻炼叶片中的 AsA 和 GSH 含量下降的幅度要比其未经过热锻炼下降的幅度要小 (图 4A)。经过热锻炼的黑麦草 AsA 含量和其同胁迫水平下未经过热锻炼的黑麦草 AsA 含量差异不显著 ($P > 0.05$)。在 42°C 和 46°C 胁迫下,经过热锻炼的黑麦草叶片内 GSH 含量比同胁迫水平下未经过热锻炼的 GSH 含量分别高 35.6% 和 73.9%, 而经过热锻炼高羊茅叶片的 GSH 含量比同胁迫水平下未经过热锻炼的 GSH 含量分别高 15.5% 和 43.3%。由此可知,热锻炼提高了这两种草坪草对高温胁迫的抗氧化能力。

2.4 热锻炼对高温胁迫下高羊茅和黑麦草叶片叶绿体超显微结构的影响

正常条件下,高羊茅和黑麦草的叶绿体为椭圆形 (图 5A, 图 5E 和图 6A, 图 6E)。然而,随高温胁迫水平的增加,二者的叶绿体形态发生了明显的变化,特别是未经过热锻炼预处理的叶绿体。由图 5 和图 6 可知,经过热锻炼和未经过热锻炼的草坪草叶绿体形态大致呈现出 3 种变化: (1) 叶绿体变圆而非椭圆,类囊体呈不规则,部分肿胀或完全肿胀并且有更多的内容物质渗出 (图 5B, 图 6B); (2) 叶绿体膜消失,类囊体呈不规则,部分撕裂或完全撕裂,类囊体空腔变大 (图 5C-D, 图 6C-D); (3) 叶绿体片层结构经高温胁迫后表现完整,特别是经过热锻炼过的草坪草 (图 5F-G, 图 6F-G)。此外,随高温胁迫水平的增加,特别在 46°C , 高羊茅和黑麦草

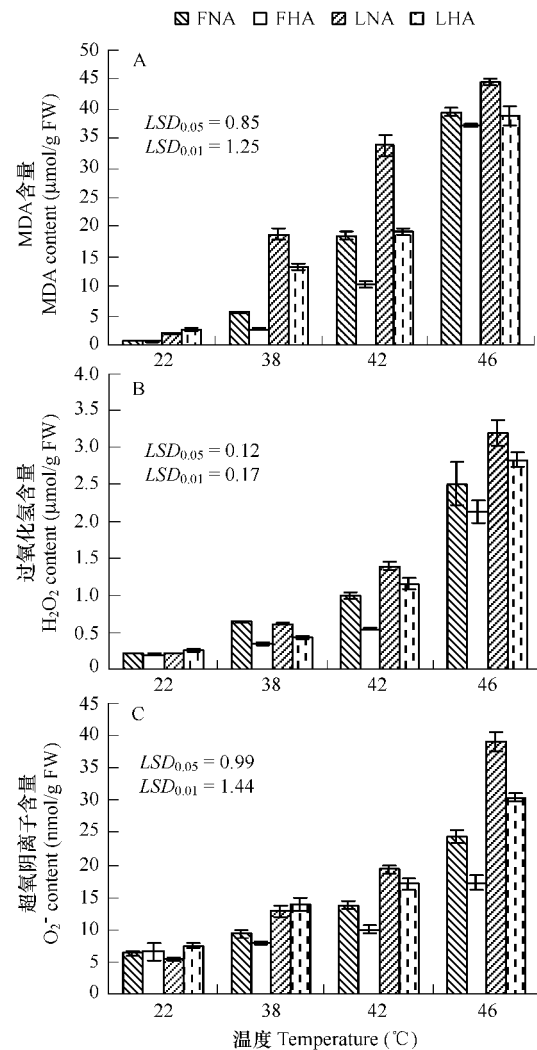


图3 热锻炼对高温胁迫下高羊茅和黑麦草叶片 MDA 含量(A)、 H_2O_2 含量(B)和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ (C) 含量的影响

Fig. 3 Effects of heat acclimation pretreatment on MDA (A), H_2O_2 (B), and $\text{O}_2^{\cdot-}$ (C) contents in leaves of *Festuca arundinacea* and *Lolium perenne* under heat stress

误差棒代表平均值的标准误 ($n = 4$); FNA: 未经过热锻炼处理的高羊茅; FHA: 经过热锻炼处理的高羊茅; LNA: 未经过热锻炼处理的黑麦草; LHA: 经过热锻炼处理的黑麦草; 最小显著差异在 0.05 和 0.01 水平 Error bars represent the standard error (S. E.) of mean ($n = 4$); FNA, *Festuca arundinacea* with no heat-acclimated pretreatment; FHA, *Festuca arundinacea* with heat-acclimated pretreatment; LNA, *Lolium perenne* with no heat-acclimated pretreatment; LHA, *Lolium perenne* with heat acclimation pretreatment. Least significant differences (LSD) were shown at the 0.05 and 0.01 probability levels

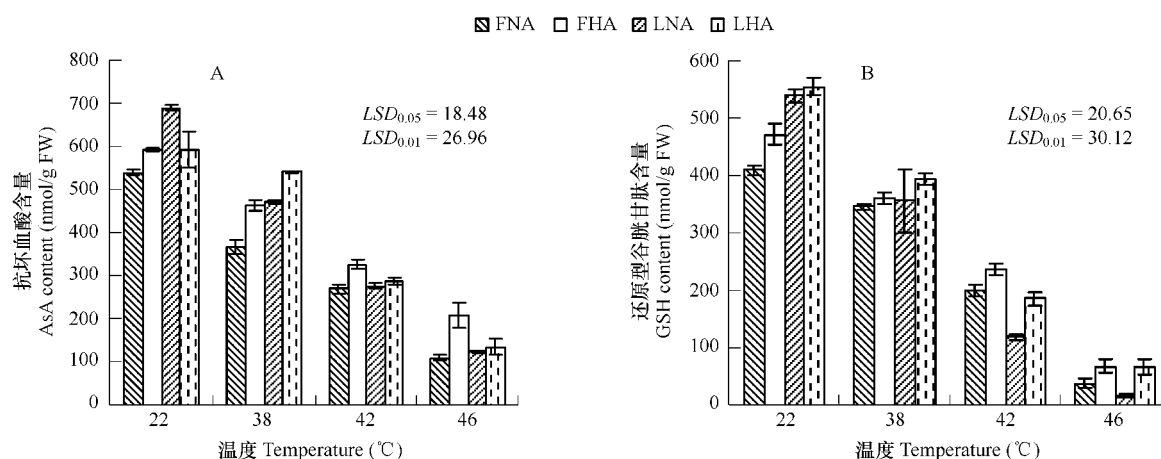


图4 热锻炼对高温胁迫下高羊茅和黑麦草叶片抗坏血酸(AsA)含量(A)和谷胱甘肽(GSH)含量(B)的影响

Fig. 4 Effects of heat acclimation pretreatment on AsA (A) and GSH (B) contents in leaves of *Festuca arundinacea* and *Lolium perenne* under heat stress

误差棒代表平均值的标准误($n=4$);FNA:未经过热锻炼处理的高羊茅;FHA:经过热锻炼处理的高羊茅;LNA:未经过热锻炼处理的黑麦草;LHA:经过热锻炼处理的黑麦草;最小显著差异在0.05和0.01水平 Error bars represent the standard error (S.E.) of mean ($n=4$); FNA, *Festuca arundinacea* with no heat-acclimated pretreatment; FHA, *Festuca arundinacea* with heat-acclimated pretreatment; LNA, *Lolium perenne* with no heat-acclimated pretreatment; LHA, *Lolium perenne* with heat acclimation pretreatment. Least significant differences (LSD) were shown at the 0.05 and 0.01 probability levels

的叶绿体在热锻炼和未热锻炼下均受到了较为严重的破坏。由此可知,极端高温严重破坏了叶绿体的形态结构,耐热性差的黑麦草受损程度最重,即使通过热锻炼也难以缓减极端高温对其的伤害。

3 结论与讨论

目前,提高植物的耐热性有多种方法,热锻炼处理是较为有效的一种。本研究结果表明,热锻炼提高了冷季型草坪草高羊茅和多年生黑麦草的抗高温能力,具体表现在二者在高温胁迫下经过热锻炼预处理其叶片细胞膜具有较高的热稳定性。这与马晓娣等人在小麦上报道的结果相似,小麦在34℃下经过48h热锻炼提高了其在49℃下小麦细胞核膜的热稳定性^[22]。在高温胁迫下,植物叶片相对伤害率越低,细胞膜的热稳定性就越高,耐热性就越强^[23]。植物细胞膜热稳定性的高低与其在高温胁迫下叶片细胞膜脂过氧化程度丙二醛(MDA)以及氧自由基的积累具有很大的关系。本实验结果表明,高羊茅和多年生黑麦草随高温胁迫的增加叶片内积累了更多的MDA,而经过热锻炼的草坪草与未经过热锻炼的草坪草相比其叶片内的MDA在高温下积累较为缓慢。由此可见,热锻炼减轻了草坪草在高温胁迫下叶片膜脂过氧化程度,提高了草坪草抗高温胁迫的能力,这与国内外许多在其它植物上研究和报道的结果相一致^[24, 25]。植物抗高温能力的高低还与其在高温胁迫下受高温氧化胁迫的程度特别是体内氧自由基的积累程度有关。过氧化氢(H_2O_2)和超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)是两种植物体内有害的氧自由基,特别在逆境胁迫下^[26]。植物受到高温胁迫会促使 H_2O_2 和 $O_2^{\cdot-}$ 显著积累,从而导致氧化胁迫程度的增加^[27]。本研究结果表明,随高温胁迫水平的增加高羊茅和黑麦草叶片 H_2O_2 和 $O_2^{\cdot-}$ 的含量在明显增加。然而,经过热锻炼的植株,其体内氧自由基的积累会有所减缓,因此热锻炼可能提高了植物的抗氧化能力而提高植物的耐热性^[25]。

在热锻炼处理下,植物之所以能够适应高温环境是由于在热锻炼过程中其体内的许多生理生化过程发生了积极的响应(如抗氧酶活性、抗氧化剂含量的增加、热激蛋白的表达等)。热锻炼可提高超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)的活性及蛋白质的稳定性,从而使膜的稳定性增加,延缓热胁迫对细胞结构的破坏^[22]。抗坏血酸(AsA)和谷胱甘肽(GSH)作为植物体内AsA-GSH循环体系中两种重要的抗氧化剂,在缓减氧化胁迫、抵御逆境伤害方面具有非常重要的作用^[28]。在逆境胁迫下,植物细胞中AsA和GSH具有较强抗

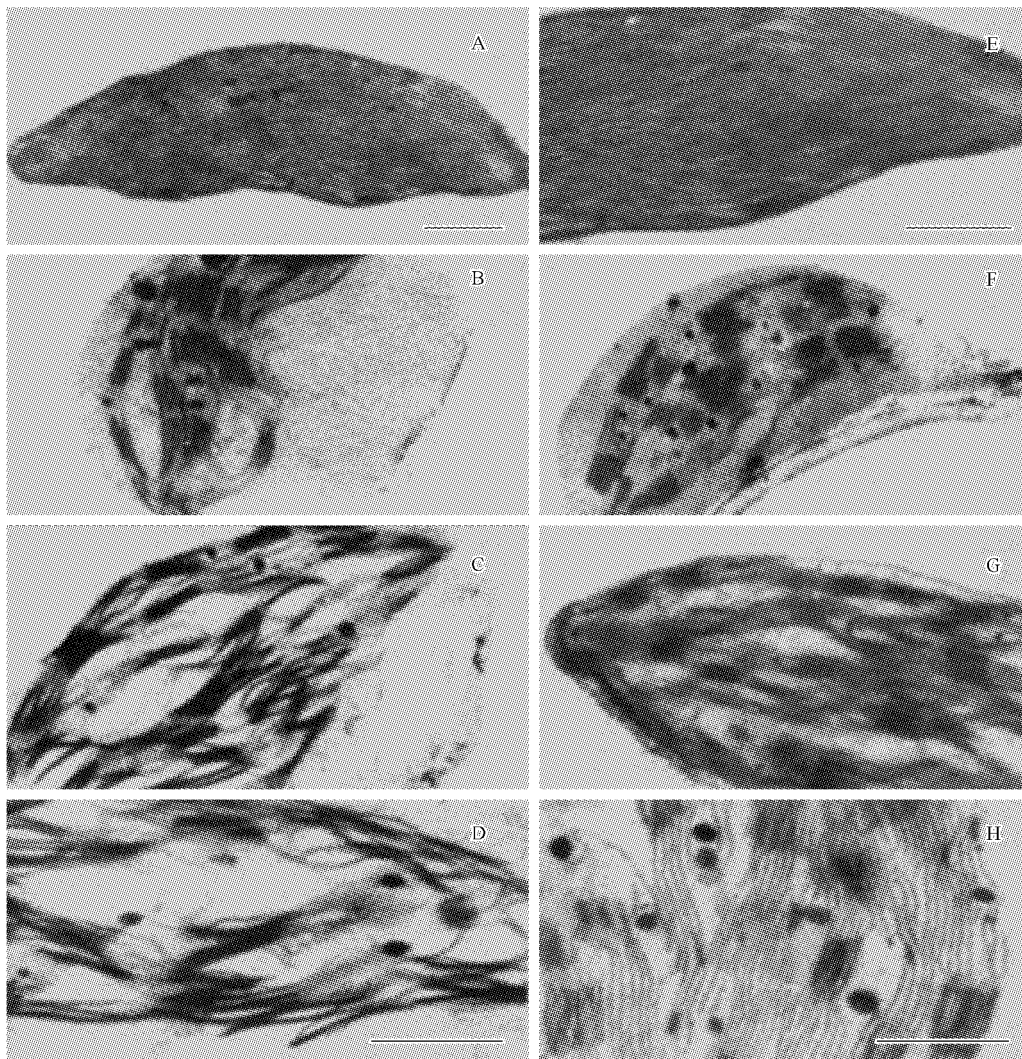


图5 热锻炼对高温胁迫下高羊茅叶片叶绿体超微结构的影响

Fig. 5 Effects of heat acclimation pretreatment on ultrastructure of chloroplasts in *Festuca arundinacea* leaves under high temperature stress

A~H: 高羊茅叶片内叶绿体; A, E: 正常温度下的叶绿体; B~D: 高温胁迫下未经过热锻炼的叶绿体; F~H: 高温胁迫下经过热锻炼的叶绿体; B: 经过 38°C 高温处理 14h 后, 叶绿体的类囊体大部分肿胀; C: 经过 42°C 高温处理 14h 后, 叶绿体内的基粒片和基粒间片层部分断裂; D: 经过 46°C 高温处理 14h 后, 叶绿体内的基粒片和基粒间片层大部分断裂; F: 经过 38°C 高温处理 14h 后, 叶绿体的类囊体轻微肿胀; G: 经过 42°C 高温处理 14h 后, 叶绿体内的基粒片和基粒间片层轻微断裂; H: 经过 46°C 高温处理 14h 后, 叶绿体内的基粒片和基粒间片层部分断裂; A 中短线代表 1μm; E 中短线代表 1.2μm; B~D 和 F~H 中的短线代表 1.5μm

A~H: Chloroplasts from mesophyll cell of *Festuca arundinacea* leaves; A, E: Chloroplast typical for normal temperature plants; B~D: Chloroplast from heat-stressed leaves without heat acclimation pretreatment; F~H: Chloroplast from temperature-stressed leaves with heat acclimation pretreatment; B: Leaf chloroplast with mostly swollen granal and intergranal thylakoids at 38°C for 14h; C: Chloroplast with partly ruptured granal and intergranal thylakoids at 42°C for 14h; D: Chloroplast with mostly ruptured granal and intergranal thylakoids at 46°C for 14h; F: Leaf chloroplast with partly swollen granal and intergranal thylakoids at 38°C for 14h; G: Chloroplast with lightly ruptured granal and intergranal thylakoids at 42°C for 14h; H: Chloroplast with partly ruptured granal and intergranal thylakoids at 46°C for 14h; Scale bar for A 1μm; E 1.2μm; B~D, F~H 1.5μm

氧化胁迫能力的适宜浓度范围分别在 5~20mmol/L 和 1~5mmol/L^[29]。本实验结果表明, 高温胁迫降低了高羊茅和多年生黑麦草 AsA 和 GSH 的含量, 而热锻炼减缓了二者在高温胁迫下 AsA 和 GSH 含量的下降。AsA 含量在高温处理下减少已被认为是一种普遍现象。在高温逆境下, AsA 含量下降可能其参与自由基清除反应的同时部分被氧化的结果, 也可能是 AsA-GSH 循环体系中抗坏血酸过氧化物酶、谷胱甘肽还原酶和 GSH 等活性氧清除酶(剂)的共同作用。自然条件下, 植物叶片的 GSH 含量会随着温度的变化而变化, 在不同季节

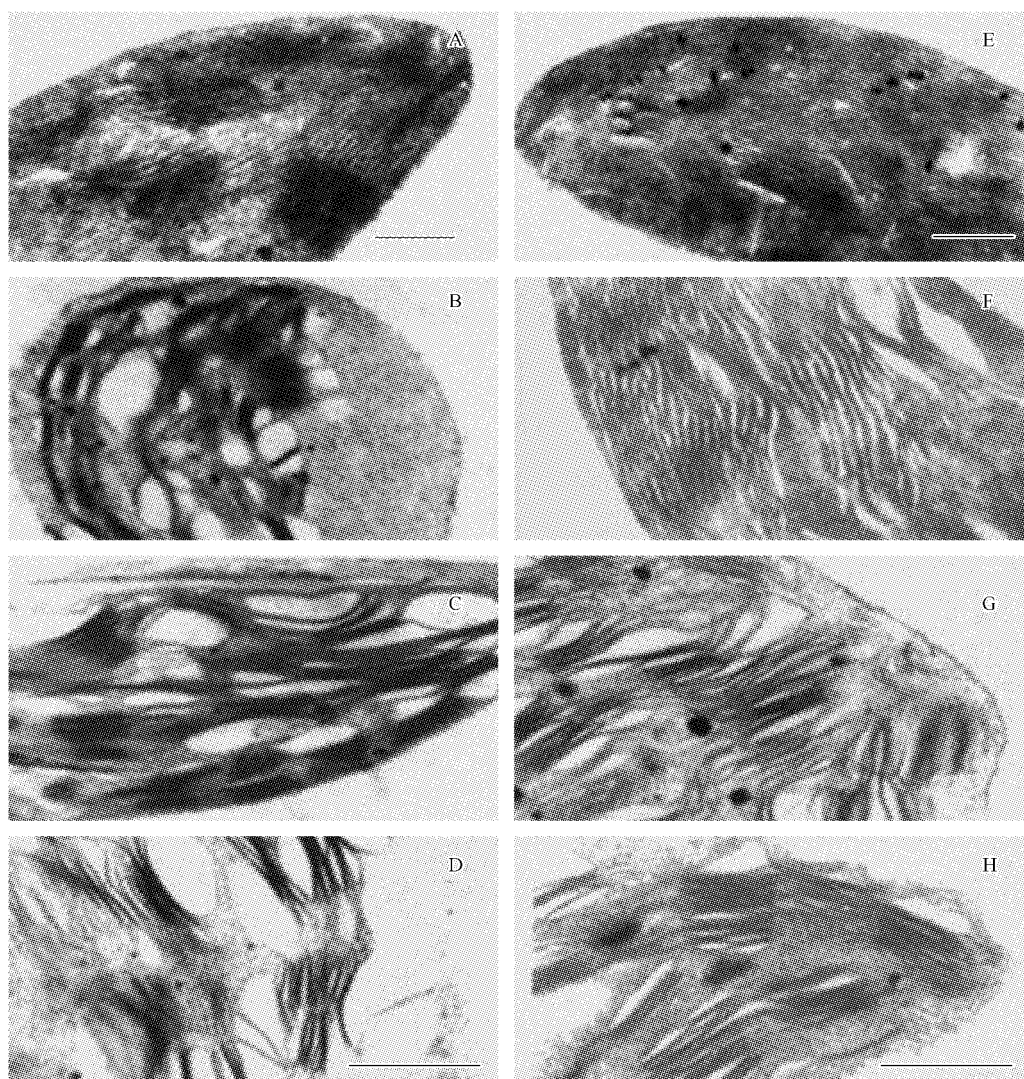


图6 热锻炼对高温胁迫下黑麦草叶片叶绿体超微结构的影响

Fig. 6 Effects of heat acclimation pretreatment on ultrastructure of chloroplasts in *Lolium perenne* leaves under high temperature stress

A~H: 黑麦草叶片内叶绿体; A, E: 正常温度下的叶绿体; B~D: 高温胁迫下未经过热锻炼的叶绿体; F~H: 高温胁迫下经过热锻炼的叶绿体; B: 经过 38℃ 高温处理 14h 后, 叶绿体的类囊体大部分肿胀; C: 经过 42℃ 高温处理 14h 后, 叶绿体内的基粒片和基粒间片层部分断裂; D: 经过 46℃ 高温处理 14h 后, 叶绿体内的基粒片和基粒间片层大部分断裂; F: 经过 38℃ 高温处理 14h 后, 叶绿体的类囊体轻微肿胀; G: 经过 42℃ 高温处理 14h 后, 叶绿体内的基粒片和基粒间片层轻微断裂; H: 经过 46℃ 高温处理 14h 后, 叶绿体内的基粒片和基粒间片层部分断裂; A、E 中短线代表 1μm; B—D 和 F—H 中的短线代表 1.5μm

A—H: Chloroplasts from mesophyll cell of *Lolium perenne* leaves; A, E: Chloroplast typical for normal temperature plants; B—D: Chloroplast from under temperature-stressed leaves without heat acclimation pretreatment; F—H: Chloroplast from heat-stressed leaves with heat acclimation pretreatment; B: Leaf chloroplast with mostly swollen granal and intergranal thylakoids at 38℃ for 14h; C: Chloroplast with partly ruptured granal and intergranal thylakoids at 42℃ for 14h; D: Chloroplast with mostly ruptured granal and intergranal thylakoids at 46℃ for 14h; F: Leaf chloroplast with partly swollen granal and intergranal thylakoids at 38℃ for 14h; G: Chloroplast with lightly ruptured granal and intergranal thylakoids at 42℃ for 14h; H: Chloroplast with partly ruptured granal and intergranal thylakoids at 46℃ for 14h; Scale bar for A, E 1μm; B—D, F—H 1.5μm

其含量也有所差异^[30]。一些高山植物的 GSH 含量会随着海拔高度的下降和温度的升高而下降^[31]。研究表明, 高温胁迫下高羊茅和多年生黑麦草的 GSH 含量随着胁迫温度水平的上升而降低, 这与许多报道的高温下 GSH 含量下降相一致^[32], 同时也与一些报道的结论相反, 即高温胁迫下植株体内 GSH 含量呈上升趋势^[33, 34], 产生这种差异的原因可能是由于实验材料差异所致, 因为不同植物材料在同一逆境处理下 GSH 合

成酶表达的量也有所差异^[29]。

叶绿体作为植物叶片细胞内最重要的细胞器,也是产生氧自由基的主要场所^[35],并且它是植物叶片中对高温最为敏感的细胞器^[36]。叶绿体是光反应的中心,高温对其伤害最明显的特征是膜的破坏如类囊体膜的肿胀和破裂。热锻炼减缓了高温对植物叶绿体超微结构的破坏^[37]。高温胁迫促使膜脂的流动性增加并导致膜脂双层结构的破坏及其膜脂构成的变化。类囊体膜的破坏部分是因为植物体内膜不饱和脂肪酸含量的下降而导致膜蛋白的稳定性降低^[38]。热锻炼过程中,蛋白质合成体系扮演着非常重要的角色,特别是热激蛋白的合成,而这些热激蛋白主要分布在基质或镶嵌在类囊体膜上,也许有助于防止高温下膜蛋白的变性^[39]。另外,热锻炼有助于提高植物饱和脂肪酸的含量^[40]和增加膜的稳定性,从而能够保持高温下叶绿体的稳定性和完整性。然而,随着温度的升高,尽管热锻炼能够减缓草坪草 AsA 和 GSH 含量的降低以提高清除氧自由基的能力,也难以防止高温对草坪草叶绿体的破坏,特别在极端高温下,如本实验设置的 46℃。

总之,热锻炼提高了高羊茅和多年生黑麦草的抗高温能力。热锻炼有助于减缓高温胁迫对抗氧化剂含量的下降、降低氧自由基的产生速率、减轻叶片膜脂过氧化,从而会减轻高温对植株的伤害。然而,这种耐热能力提高的机理也许相当复杂,研究抗氧化剂含量、一些抗氧化酶活性或叶绿体超微结构变化的同时,还有待于在蛋白质或分子水平如热激蛋白或耐热基因的表达等方面开展深入研究,这样才能加深了解草坪草对高温的适应机制,揭示其耐热机理,为草坪草耐热品种的选育以及草坪植物对气候变暖的生理响应提供更为全面的科学依据。

References:

- [1] Cui L, Li J, Fan Y, *et al.* High temperature effects on photosynthesis, PSII functionality and antioxidant activity of two *Festuca arundinacea* cultivars with different heat susceptibility. *Botanical Studies*, 2006, 47: 61—69.
- [2] Zhao F G, He L F, Luo Q Y. *Stress Physio-ecology of Plant*. Beijing: Chemistry Industry Press, 2004. 175.
- [3] Huang B, Liu X. Summer root decline production and mortality for four cultivars of creeping bentgrass. *Crop Science*, 2003, 43: 258—265.
- [4] Marcum K B. Cell membrane thermostability and whole-plant heat tolerance of Kentucky bluegrass. *Crop Science*, 1998, 38: 1214—1218.
- [5] Hu L, Bian X J, Yang X L. *Turf Science and Management*. Beijing: Chinese Agricultural University Press, 2001. 58—60.
- [6] Wang Z, Xu Q, Huang B. Endogenous cytokinin levels and growth responses to extended photoperiods for creeping bentgrass under heat stress. *Crop Science*, 2004, 44: 209—213.
- [7] Xu Q, Huang B. Lowering soil temperatures improves creeping bentgrass growth under heat stress. *Crop Science*, 2001, 41: 1878—1883.
- [8] He Y L, Liu Y L, Chen Q, *et al.* Thermotolerance related to antioxidation induced by salicylic acid and heat hardening in tall fescue seedlings. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 2002, 28(2): 89—95.
- [9] Jiang Y, Huang B, 2001. Effects of calcium on antioxidant activities and water relations associated with heat tolerance in two cool-season grasses. *Journal of Experimental Botany*, 2001, 355: 341—349.
- [10] Park S Y, Shivaji R, Krans J V, *et al.* Heat-shock response in heat-tolerant and nontolerant variants of *Agrostis palustris* Huds. *Plant Physiology*, 1996, 111: 515—524.
- [11] Chen H H, Zheng Y S, Li H P. Adaptability of crop plants to high temperature stress. *Crop Science*, 1982, 22: 719—723.
- [12] Hoagland C R, Arnon D I. The solution-culture method for growing plants without soil. *California Agriculture Experimental Station Circular*, 1950, 347: 39.
- [13] Sairam R K, Rao K V, Srivastava G C. Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. *Plant Science*, 2002, 163: 1037—1046.
- [14] Saadalla M M, Shanahan J F, Quick J S. Heat tolerance in winter wheat I. Hardening and genetic effects on membrane thermostability. *Crop Science*, 1990, 30: 1243—1247.
- [15] Buege J A, Aust S D. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, 1978, 52: 302—310.
- [16] Zhangyuan D, Bramlage W J. Modified thiobarbituric acid assay for measuring lipid oxidation in sugar-rich plant tissue extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1992, 40: 1566—1570.
- [17] Dagmar P, Sairam R K, Srivastava G C, *et al.* Oxidative stress and antioxidant activity as the basis of senescence in maize leaves. *Plant Science*, 2001, 161: 765—771.
- [18] Ke D S, Wang A G, Sun G C, *et al.* The effect of active oxygen on the activity of ACC synthase induced by exogenous IAA. *Acta Botany Sinica*,

2002, 44(5): 551—556.

- [19] Mukherjee S P, Choudhuri M A. Implications of water stress-induced changes in the levels of endogenous ascorbic acid and hydrogen peroxide in *Vigna* seedlings. *Physiologia Plantarum*, 1983, 58: 166—170.
- [20] Griffith O W. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Analytical Biochemistry*, 1980, 106(1): 207—211.
- [21] Reinolds E S. The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, 1963, 17: 208—212.
- [22] Ma X, Wang L, Wang M, *et al.* Difference in relative conductivity and ultrastructure of leaf between two wheat cultivars with different thermotolerance under heat acclimation and heat stress. *Journal of China Agricultural University*, 2003, 8(5): 4—8.
- [23] Abdelbagi M I, Anthony E H. Reproductive-stage heat tolerance, leaf membrane thermostability and plant morphology in cowpea. *Crop Science*, 1999, 39: 1762—1768.
- [24] Yu X Y, Lu X Y, Li X T, *et al.* Effects of heat acclimation on physiological and biochemical characters of *Senecio Hybridus* under heat stress. *Jiangsu Journal of Agricultural Science*, 2006, 22(2): 186—188.
- [25] Dat J F, Lopez D H, Foyer C H, *et al.* Parallel changes in H_2O_2 and catalase during thermotolerance induced by salicylic acid or heat acclimation in mustard seedlings. *Plant Physiology*, 1998, 116: 1351—1357.
- [26] Salin M L. Toxic oxygen species and protective systems of the chloroplast. *Physiologia Plantarum*, 1988, 72: 681—689.
- [27] Jeffrey A A. Catalase activity, hydrogen peroxide content and thermotolerance of pepper leaves. *Scientia Horticulturae*, 2002, 95: 277—284.
- [28] Noctor G, Foyer C H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1998, 49: 249—279.
- [29] Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 2002, 7: 405—410.
- [30] Anderson J V, Chevone B I, Hess J L. Seasonal variation in the antioxidant system of eastern white pine needles. *Plant Physiology*, 1992, 98, 501—508.
- [31] Wildi B, L tz C. Antioxidant composition of selected high alpine plant species from different altitudes. *Plant, Cell and Environment*, 1996, 19: 138—146.
- [32] Kocsy G, Gabriella S, J zsef S, *et al.* Heat tolerance together with heat stress-induced changes in glutathione and hydroxymethylglutathione levels is affected by chromosome 5A of wheat. *Plant Science*, 2004, 166: 451—458.
- [33] Kurganova L N, Veselov A P, Sinitsina Y V, *et al.* Lipid peroxidation products as possible mediators of heat stress response in plants. *Russ. Journal of Plant Physiology*, 1999, 46: 181—185.
- [34] Sotelo N J, Ho T H D. Effect of heat shock on the metabolism of glutathione in maize roots. *Plant Physiology*, 1986, 82: 1031—1035.
- [35] Sun W, Van Montagu M, Verbruggen N. Small heat shock proteins and stress tolerance in plants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2002, 1577(1): 1—9.
- [36] Krause G H, Santarius K A. Relative thermostability of the chloroplast envelope. *Planta*, 1975, 127, 285—299.
- [37] Wang G Y, Liu J M, Zhang Y, *et al.* Studies on ultrstructure in common bean leaves during heat acclimation and heat stress. *Journal of Agriculture Biotechnology*, 1999, 7(2): 151—156.
- [38] Thomas P G. Increased thermal stability of pigment-protein complexes of pea thylakoids following catalytic hydrogenation of membrane lipids. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1986, 849, 131—140.
- [39] Chou M. Thermotolerance of isolated mitochondria associated with heat shock proteins. *Plant Physiology*, 1989, 89, 617—621.
- [40] Larkindale J, Huang B. Changes of lipid composition and saturation level in leaves and roots for heat-stressed and heat-acclimated creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera*). *Environmental and Experimental Botany*, 2004, 51: 57—67.

参考文献:

- [2] 赵福庚,何龙飞,罗庆云. 植物逆境生理生态学. 北京:化学工业出版社,2004. 175.
- [5] 胡林,边秀琴,阳新玲. 草坪科学与管理. 北京:中国农业大学出版社,2001. 58~60.
- [8] 何亚丽,刘友良,陈权,等. 水杨酸和热锻炼诱导的高羊茅幼苗的耐热性与抗氧化的关系. 植物生理与分子生物学学报,2002,28(2):89~95.
- [18] 柯德森,王爱国,孙谷畴,等. 活性氧对外源 IAA 诱导的 ACC 合成酶活性的影响. 植物学报,2002,44(5):551~556.
- [22] 马晓娣,王丽,汪矛,等. 不同耐热性小麦品种在热锻炼和热胁迫下叶片相对电导率及超微结构的差异. 中国农业大学学报,2003,8(5):4~8.
- [24] 于晓英,卢向阳,李向婷,等. 热锻炼对瓜叶菊幼苗高温胁迫下生理生化特性的影响. 江苏农业学,2006,22(2):186~188.
- [37] 王光耀,刘俊梅,张仪,等. 热锻炼和热胁迫过程中菜豆叶肉细胞超微结构的变化. 农业生物技术学报,1999,7(2):151~156.