

## 高温胁迫对蛇足石杉生理特性的影响

马英姿, 张 慧, 宋 荣, 王志毅

中南林业科技大学生命科学与技术学院, 湖南 长沙 410004

**摘 要:** 目的 研究蛇足石杉的最高耐受温度及耐受时间, 为人工栽培蛇足石杉提供温度调控参考。方法 通过在 25、30、35、40 °C 的不同温度下胁迫处理蛇足石杉, 测定其叶片中的可溶性糖量、可溶性蛋白质量、游离脯氨酸量及超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)活性在不同处理时间的量, 并对其进行相关性分析。结果 随着温度的升高, 各项指标均有大幅度的变化, 可溶性糖和游离可溶性脯氨酸的量呈上升的趋势, 可溶性蛋白质量呈下降趋势, POD 和 SOD 活性均呈现下降的趋势。35 °C 高温胁迫达 8 d 后, 对蛇足石杉的各项生理指标有较大影响, 外部形态表现轻度失水, 继续处理至 12 d 后, 叶片发黄, 植株基本死亡; 40 °C 高温胁迫 6 d 后, 蛇足石杉的各项生理指标均出现较大幅度的变化, SOD 活性显著下降, 叶片发黄, 第 8 天植株完全死亡。结论 高温对蛇足石杉的生长有明显影响, 其生长温度在 25~30 °C 为宜, 长时间持续超过 35 °C 对其生长有明显的影响, 40 °C 为极限高温, 短期内会引起植株死亡。

**关键词:** 蛇足石杉; 高温胁迫; 生理特性; 可溶性物质; 抗氧化酶

中图分类号: R282.21

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2013)02-0224-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.02.022

## Effects of high temperature stress on physiological characteristics of *Huperzia serrata*

MA Ying-zi, ZHANG Hui, SONG Rong, WANG Zhi-yi

College of Life Science and Technology, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China

**Key words:** *Huperzia serrata* (Thunb.) Trev.; high temperature stress; physiological characteristics; soluble substance; antioxidase

蛇足石杉 *Huperzia serrata* (Thunb.) Trev. 又名千层塔、金不换等, 系石杉科 (Huperziaceae) 石杉属 *Huperzia* Bernh. 多年生蕨类植物, 为我国传统草药, 有清热、除湿、消痰和止血等功效<sup>[1]</sup>。近年来, 从中分离出一种低毒、强效、可逆并具高选择性的抗乙酰胆碱酯酶抑制剂——石杉碱甲, 具有治疗多种神经退行性疾病的潜在作用, 广泛用于老年痴呆症的治疗。由于目前石杉碱甲的人工合成工艺不成熟, 药品所需原料全部依赖于天然。蛇足石杉植株矮小, 生长缓慢, 野生资源数量有限, 过度挖掘进一步加剧了野生资源的枯竭。蛇足石杉对生长环境条件要求很高, 研究表明较低的光照度 (1 200 lx) 及 90% 的相对湿度条件较适合蛇足石杉的生长<sup>[2-3]</sup>; 且蛇足石杉对土壤的有机质量及湿度要求严格<sup>[4]</sup>。目前尚未见温度对蛇足石杉生理特性的影响的相关报道, 适宜的温度是植物生长发育的必要条件, 过高或过低的温度胁迫会抑制植物的整个发育过程, 长期

的逆境能对植物体产生遗传性或非遗传性效应<sup>[5]</sup>。在自然条件下, 蛇足石杉喜阴湿环境, 多生于山地密林或沟谷湿土中, 其群居地的土壤中含水量较高且腐殖质量丰富, 生长所需环境的空气湿度、郁闭度及年均降水量都较大。夏季是蛇足石杉新孢子产生、生长、成熟的重要时期<sup>[6]</sup>, 湖南等亚热带地区夏季阳光强烈, 温度常高达 35 °C 以上, 对其生长发育会有一定影响, 因此研究高温胁迫对蛇足石杉生理特性的影响对人工栽培的基本地理位置的选择及环境温度的调控具有重要的意义。

### 1 材料

蛇足石杉 *Huperzia serrata* (Thunb.) Trev. 活体植株采自湖南浏阳大围山。植株经中南林业科技大学喻勋林教授鉴定。主要仪器为 722S 可见分光光度计。

### 2 方法

#### 2.1 处理方法

将生长状况基本一致的蛇足石杉活体植株, 盆

收稿日期: 2012-06-26

基金项目: 湖南省科技厅科技计划项目 (2011NK3042); 湖南省教育厅学位与研究生教学教改项目 (JG2011B027); 湖南省教育厅重点研究项目 (2012A146)

作者简介: 马英姿 (1967—), 女, 河南省巩义人, 博士, 副教授, 主要从事药用植物资源保护与利用。

Tel: (0731)85623494 E-mail: ma\_yingzi@163.com

网络出版时间: 2012-12-18

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20121218.1014.004.html>

栽置于温度为 25 ℃、相对湿度为 90%的人工气候箱内,进行预培养 7 d,待长势稳定后再进行相关的高温胁迫处理。预培养后的蛇足石杉随机分为 4 组,每组 3 盆,放置于人工气候培养箱中进行高温胁迫处理。实验因素为温度(℃)和处理时间(d),处理温度分别为 25、30、35、40 ℃,以 25 ℃为对照(CK)。每个温度处理时间分别为 2、4、6、8 d,培养条件为两周期,光照 13 h,湿度 75%;黑暗 11 h,湿度 85%。

## 2.2 生理生化指标的测定方法

**2.2.1 可溶性物质的测定**<sup>[7]</sup> 可溶性糖测定采取萘酚法,葡萄糖标准曲线与回归方程为  $Y=0.2611X+0.0106$ ,  $r=0.9806$ 。可溶性蛋白质测定采用考马斯亮蓝 G-250 染色法,蛋白质标准曲线与回归方程  $Y=0.453X-0.0178$ ,  $r=0.9284$ 。游离脯氨酸量测定采用酸性茚三酮法,脯氨酸标准曲线与回归方程  $Y=0.0106X+0.007$ ,  $r=0.9848$ 。

**2.2.2 抗氧化系统保护酶的测定**<sup>[7-8]</sup> 超氧化物歧化酶(SOD)活性测定,以抑制 NBT 光还原的 50% 为一个酶活性单位,测定 SOD 总活性。过氧化物酶(POD)活性采用愈创木酚氧化法,以每分钟内  $A_{470}$  变化 0.01 为 1 个过氧化物酶活性单位( $\mu\text{g}/\text{min}$ ),计算 POD 活性。

**2.2.3 数据整理及分析** 分别采用 Excel 软件、SPSS17.0 统计软件进行数据整理和统计分析。

## 3 结果与分析

### 3.1 高温对蛇足石杉可溶性物质的影响

**3.1.1 可溶性糖量的变化** 从图 1 中可以看出,随着处理温度的升高及胁迫时间的持续,蛇足石杉叶片中可溶性糖量的积累基本呈现先升高后降低的趋势,不同温度处理 2 d 后,处理组的可溶性糖量均高于 CK,其中在 40 ℃时,可溶性糖量显著增加,是 CK 的 1.1 倍;处理 4 d 后各处理组可溶性糖量开始显著增加,40 ℃时是 CK 的 1.2 倍;处理 6 d 后,40 ℃处理组的可溶性糖量出现最大值,是 CK 的 1.4 倍,25、35 ℃组可溶性糖量开始下降,但仍然高于 CK;处理 8 d 之后,40 ℃处理组的可溶性糖量急剧下降,其他各组虽然整体下降,但是最终量仍然高于 CK。对 35 ℃和 40 ℃不同处理时间的蛇足石杉叶片中可溶性糖量变化进行相关性分析,发现高温胁迫时间与可溶性糖量的相关系数分别为 0.997、0.955,呈正相关性,即随着高温胁迫时间的持续,可溶性糖量相应增加。

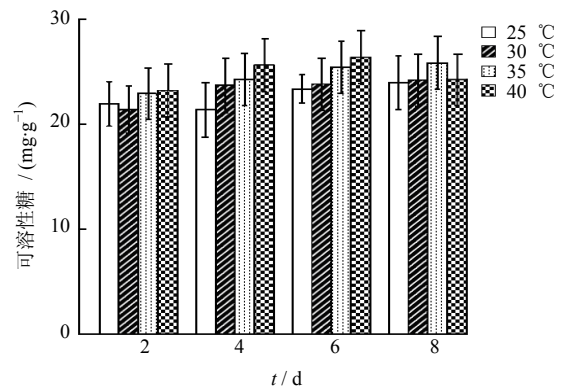


图 1 不同高温处理对可溶性糖量的影响

Fig. 1 Effects of different high temperature treatments on soluble sugar content

**3.1.2 可溶性蛋白质量的变化** 高温逆境直接可以引起植物体内蛋白质的变性和凝聚,从而使植物体受到伤害<sup>[9]</sup>。由图 2 可以看出,处理 2 d 后,处理组的可溶性蛋白质量均低于 CK,其中 40 ℃时的量仅为 CK 的 68%,35 ℃时的量为 CK 的 87%;4 d 后,30 ℃时可溶性蛋白质量较 CK 相比出现明显升高,是对照的 1.08 倍,35 ℃和 40 ℃时可溶性蛋白质量的量下降并低于 CK;处理 6 d 后,30 ℃时可溶性蛋白质量开始下降,并低于 CK;8 d 后,40 ℃处理组量极低,仅为 CK 的 39%,说明此时处理植株叶细胞片已经受到了严重的高温伤害。通过相关性分析表明,在 35 ℃和 40 ℃的高温胁迫下,胁迫时间和可溶性蛋白质量均呈负相关,相关系数分别为 -0.995、-0.987,即随着胁迫时间的延长,蛇足石杉叶片内可溶性蛋白质量降低。

**3.1.3 游离脯氨酸量的变化** 由图 3 可见,与 CK

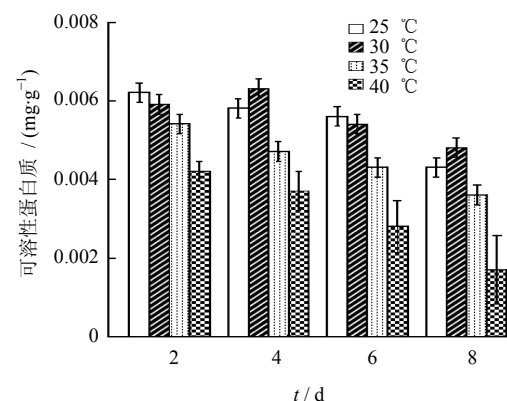


图 2 不同高温处理对可溶性蛋白质量的影响

Fig. 2 Effects of different high temperature treatments on soluble protein content

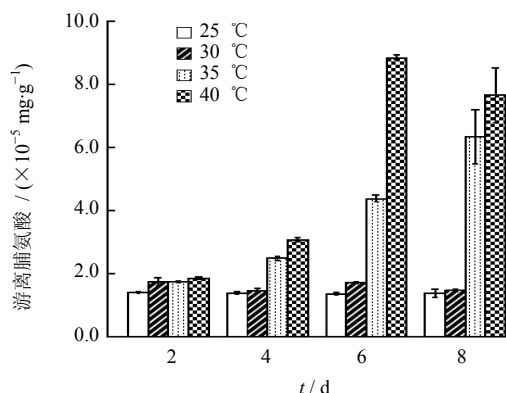


图3 不同高温处理对游离脯氨酸量的影响

Fig. 3 Effects of different high temperature treatments on free proline content

相比, 30 °C时游离脯氨酸量相对稳定, 呈现先降低后升高最后接近对照水平; 35 °C和 40 °C高温处理时, 游离脯氨酸量持续升高; 处理 6 d 后, 40 °C高温下脯氨酸量达到最高, 是 CK 的 6.4 倍, 处理 8 d 后, 脯氨酸量下降但仍远大于 CK。通过相关性分析, 35 °C和 40 °C时蛇足石杉的游离脯氨酸量与胁迫时间均呈显著的正相关, 相关系数分别为 0.986、0.937。

对 40 °C处理叶片中可溶性物质质量和处理时间进行相关性分析 (表 1), 表明可溶性蛋白质的量和可溶性糖、游离脯氨酸量均呈负相关; 由相关系数可以看出, 高温对可溶性蛋白质的影响更显著, 游离脯氨酸和可溶性蛋白质的关系较密切, 随着游离脯氨酸量的积累, 可溶性蛋白质质量不断减少。多重性检验表明, 可溶性物质质量与胁迫时间存在显著性差异, 其中可溶性蛋白质质量差异性更显著, 其量在处理 6 d 和 8 d 后与 CK 相比达到极显著水平。

### 3.2 高温对蛇足石杉抗氧化系统保护酶的影响

**3.2.1 SOD 活性的变化** 由图 4 可以看出, 25 °C时蛇足石杉体内的 SOD 活性基本稳定, 温度升高其活性产生明显变化, 处理 4 d 时, 不同温度处理

的 SOD 活性与 CK 相比显著升高, 在 40 °C时达到最高值, 是对照的 1.57 倍; 随着各个温度处理组处理时间的延长, SOD 活性开始下降, 35 °C处理组在处理 8 d 后, SOD 活性也明显低于对照水平; 40 °C处理 6 d 后, SOD 活性急剧下降, 仅为对照的 64%。说明 40 °C高温持续 6 d 后, 已经对蛇足石杉叶片细胞造成了的严重伤害; 35 °C持续 8 d 后也对蛇足石杉叶片细胞产生不良影响。相关性分析表明, 在 40 °C的高温胁迫下, 胁迫时间和 SOD 活性的相关系数为-0.743, 呈负相关。

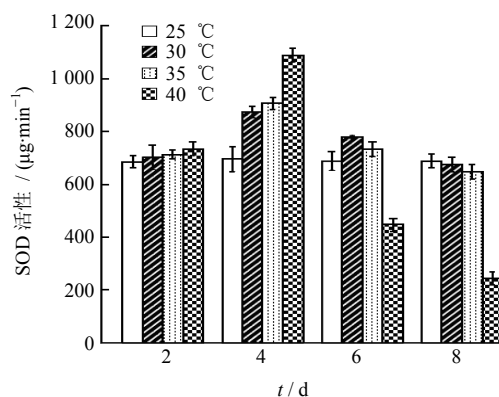


图4 不同高温处理对 SOD 活性的影响

Fig. 4 Effects of different high temperature treatments on SOD activity

**3.2.2 POD 活性的变化** POD 也是植物体内抗氧化保护酶系统的重要组成部分, 其活性也能作为判断植物耐热性的指标。由图 5 可以看出, 30 °C处理 4 d 后, POD 活性上升, 之后下降到对照水平; 35 °C和 40 °C处理组, 处理 2 d 后, POD 活性较对照显著升高, 其中 40 °C时活性是对照的 1.82 倍, 说明温度升高到 35 °C后, 已经对蛇足石杉叶片细胞产生了显著的影响, 之后 35 °C处理组的活性先降低后升高, 最后保持稳定, 但仍高于对照水平; 40 °C处理组, 随着时间的延长, POD 活性持续下降, 8 d 后仅为对照的 87%, 说明持续高温破坏了过氧化物酶的活性。相关性分析表明, 在 35 °C和 40 °C的高温胁迫下, 胁迫时间和 POD 量的相关系数分别为 -0.928、-0.994, 均呈负相关关系。

对 40 °C处理时, 蛇足石杉叶片中 SOD 和 POD 活性进行相关性分析, 表明二者呈现正相关关系 (0.809), 通过相关性比较发现, 随着胁迫时间的持续, 温度对蛇足石杉叶片中 POD 活性的影响更显著。多重检验表明, 40 °C高温处理下抗氧化系统保

表 1 40 °C高温胁迫时蛇足石杉可溶性物质的相关性分析

Table 1 Correlation analysis of solute content in *H. serrata* under 40 °C high temperature stress

| 影响因子   | 胁迫时间   | 可溶性糖   | 可溶性蛋白质 | 游离脯氨酸 |
|--------|--------|--------|--------|-------|
| 胁迫时间   | 1.000  |        |        |       |
| 可溶性糖   | 0.955  | 1.000  |        |       |
| 可溶性蛋白质 | -0.987 | -0.894 | 1.000  |       |
| 游离脯氨酸  | 0.937  | 0.791  | -0.981 | 1.000 |

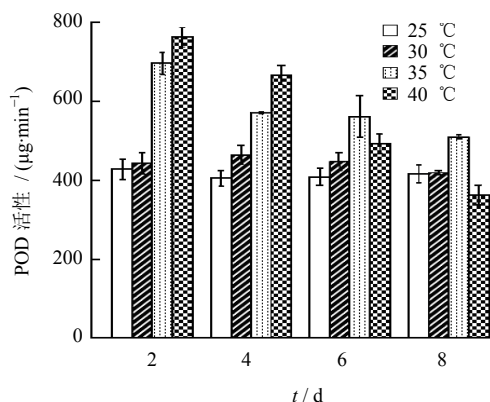


图5 不同高温处理对 POD 活性的影响

Fig. 5 Effects of different high temperature treatments on POD activity

护酶活性与胁迫时间呈显著差异 ( $P < 0.05$ ), SOD 活性在处理 6 d 和 8 d 后与 CK 呈极显著差异 ( $P < 0.05$ ), POD 活性在处理 4 d 和 6 d 后与 CK 呈极显著差异 ( $P < 0.05$ )。

#### 4 讨论

##### 4.1 高温胁迫对蛇足石杉叶片中可溶性物质的影响

渗透调节是植物在逆境胁迫下降低渗透势、抵抗胁迫的一种重要方式,可溶性糖、可溶性蛋白质和游离脯氨酸都是重要的渗透调节物质,在植物体遭受高温胁迫时,可溶性糖量通常会升高,但在某些植物体内其量随温度的升高而下降或呈现低、高、低的趋势<sup>[10-12]</sup>,可能是因为高温造成植物体内降解蛋白质的酶失活从而影响淀粉分解为可溶性糖,同时逆境的胁迫使植物细胞呼吸作用加强,消耗了细胞内贮存的糖类而造成可溶性糖量的下降。

高温可以破坏构成蛋白质的多肽键,直接引起植物体内蛋白质的凝聚和变性,合成蛋白质的酶失活,造成蛋白质合成受阻,因此,蛋白质在高温胁迫下表现出随温度升高而下降的趋势<sup>[9,13]</sup>。由于植物体内脯氨酸合成酶类有反馈抑制作用,所以正常情况下脯氨酸量不高,但是遭受逆境胁迫时,反馈抑制作用减弱,导致体内游离脯氨酸量上升<sup>[14]</sup>,同时脯氨酸具有较强的水合能力,逆境下积累的游离脯氨酸可以作为溶质来调节细胞内水环境的变化<sup>[15]</sup>。水分参与蛋白质的空间构型,在高温下植物受到水分的胁迫,蛋白质空间构型遭到破坏从而失活变性,造成植物体内酶钝化,使蛋白质合成速率下降,植物体内蛋白质的合成速率和植物体的抗热性是密切

相关的。脯氨酸的强水合作用可以加强高温胁迫下蛋白质的水合作用,从而减弱蛋白质的变性失活程度,有利于植物细胞维持正常的生理活性<sup>[16]</sup>。

本实验结果表明,蛇足石杉叶片中可溶性糖和游离脯氨酸的量随着高温胁迫时间的延长呈上升趋势,可溶性蛋白质呈下降趋势。说明在高温胁迫下,蛇足石杉通过积累体内的可溶性糖来稳定细胞膜结构,从而减少高温的迫害。但在 40 °C 高温处理 6 d 后,蛇足石杉叶片内可溶性糖量急剧下降,分析原因可能是叶片细胞内的淀粉酶及细胞膜上的蛋白质活性急剧下降甚至失活,从而影响淀粉水解并破坏了细胞膜的结构,从而使可溶性糖量急剧下降。

蛇足石杉叶片中的游离脯氨酸在 35 °C 和 40 °C 时量显著升高,说明胁迫温度越高,蛇足石杉叶片内游离脯氨酸积累就越快,在一定温度范围内,游离脯氨酸的积累与胁迫时间和胁迫强度呈正相关,在正常情况下游离脯氨酸主要参与蛋白质合成<sup>[13]</sup>,高温抑制了蛇足石杉叶片中蛋白质的合成,从而也抑制了脯氨酸参与蛋白质的合成作用,因此在蛇足石杉体内进一步积累。

蛇足石杉 30 °C 处理组叶片中可溶性蛋白质质量呈现先降低后升高再降低的趋势,可溶性蛋白质质量短时间内升高,可能是因为 30 °C 的高温激起蛇足石杉的热激反应,热激蛋白合成启动,其可以参与维持变性蛋白的可溶状态,并进一步使之复性<sup>[17]</sup>,从而使可溶性蛋白质质量呈现升高的趋势;当温度升高到 35 °C 和 40 °C 时,热激蛋白合成受到抑制,植物体受到高温的伤害,因此可溶性蛋白质的量开始下降并低于对照水平,随着处理时间的延长及相对高温的持续,各处理组的蛇足石杉体内可溶性蛋白质质量开始下降,并最终低于对照水平。

##### 4.2 高温胁迫对蛇足石杉叶片中抗氧化系统保护酶活性的影响

植物体在生长发育过程中受到各种不良环境的胁迫时,均能导致细胞产生大量的活性氧。在正常情况下,植物体内的活性氧的产生和清除处于动态平衡,一旦平衡被打破,细胞内活性氧会急剧积累从而使细胞受氧胁迫<sup>[18]</sup>。为了适应逆境环境,植物体在长期进化过程中形成了完善和复杂的酶类和非酶类抗氧化保护系统来清除活性氧,其中抗氧化保护酶类主要有 SOD、POD 和 CAT 等。

随着胁迫温度的升高,蛇足石杉体内超氧化物歧化酶和过氧化物酶活性都基本呈现先升高后下降



的趋势,这是因为短期的高温胁迫引起蛇足石杉叶片内超氧阴离子的产生,从而诱导清除活性氧的酶SOD、POD活性在短期内升高,维持细胞体内活性氧产生和清除的动态平衡;随着高温胁迫时间持续,40℃处理6d后,蛇足石杉体内SOD急剧下降,8d后SOD和POD活性均达到最低值,原因是40℃的高温持续6d后破坏酶的构象,从而使SOD、POD活性开始急剧下降,致使活性氧开始积累,打破了活性氧产生和清除的动态平衡,从而使植物体受到高温的伤害。

综上所述,35℃和40℃时的胁迫处理,各生化指标都出现了明显的变化,其中,40℃处理46d后SOD活性急剧下降,35℃处理8d后SOD也明显低于对照;对各处理组的形态观察发现,40℃处理6d时,蛇足石杉叶片开始下垂变黄,呈失水状态,处理8d后,蛇足石杉叶片枯黄下垂,植株死亡;35℃处理8d后,蛇足石杉的叶片也开始轻度失水,慢慢变黄。因此,可以得知,在40℃的极限高温下连续胁迫达6d以上时,蛇足石杉的形态结构和生理活性都会受到严重破坏,造成死亡。35℃以上的高温胁迫达到8d以上时,蛇足石杉的各项指标均出现明显的变化,表明持续8d以上的35℃高温已对其生理功能有较大的影响,继续培养达12d后叶片开始出现发黄的症状,15d后死亡。因此,在人工栽培蛇足石杉时,温度不宜长时间持续超过35℃,应在40℃的温度以下栽培。

#### 参考文献

- [1] 余红英,孙远明,杨跃进. 草药蛇足石杉的研究进展[J]. 中草药, 2001, 32(3): 279-281.
- [2] 韩邦兴,陈乃富,代剑平,等. 光照对蛇足石杉某些生理生化指标的影响[J]. 植物资源与环境学报, 2009, 18(3): 88-90.
- [3] 韩邦兴,陈乃富,姚勇,等. 相对湿度对蛇足石杉生理生化指标的影响[J]. 中华中医药杂志, 2009, 24(9): 1147-1149.
- [4] 鲁翠涛,梅兴国. 千层塔生物学特性的初步研究[J]. 中国野生植物资源, 2002, 21(4): 33-35.
- [5] 王锋尖,黄英金. 水稻高温胁迫及耐热性育种[J]. 中国农学通报, 2004, 20(3): 87-90.
- [6] Salinger M J. Climate variability and change: Past, present and future—an overview[J]. *Climatic Change*, 2005, 70(1): 9-29.
- [7] 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.
- [8] 李玲. 植物生理学模块实验指导[M]. 北京: 科学出版社, 2009.
- [9] 邹崎. 植物生理生化实验指导[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995.
- [10] 贾开志,陈贵林. 高温胁迫下不同茄子品种幼苗耐热性研究[J]. 生态学杂志, 2005, 24(4): 398-401.
- [11] 金兰,丁莉. 盐胁迫下星星草种子萌发过程中淀粉酶活性及可溶性糖量变化[J]. 青海师范大学学报: 自然科学版, 2003, 1: 86-87.
- [12] 涂三思,秦天才. 高温胁迫对黄姜叶片脯氨酸、可溶性糖和丙二醛量的影响[J]. 湖北农业科学, 2004(4): 98-100.
- [13] 胡永红,蒋昌华,秦俊. 植物耐热常规生理指标的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(1): 192-195.
- [14] 欧祖兰,曹福亮,郑军. 高温胁迫下银杏形态及生理生化指标的变化[J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2008, 32(3): 31-34.
- [15] Wyn Jones R G. *The Physiology and Biochemistry of Drought Resistance in Plants* [M]. New York: Academic Press, 1981.
- [16] 郑小林,董任瑞. 水稻热激反应的研究: I. 幼苗叶片的膜透性和游离脯氨酸量的变化[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 1997, 23(2): 109-112.
- [17] Waters E R, Lee G J, Vierling E. Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants[J]. *J Exp Bot*, 1996, 47(3): 325-338.
- [18] 张雅,傅鸿妃. 高温胁迫对茄子幼苗抗氧化系统和叶绿素荧光参数的影响[J]. 浙江农业科学, 2010(2): 246-250.