

低温胁迫对巨尾桉幼苗膜脂 过氧化及保护酶的影响

吕成群, 黄宝灵

(广西大学林学院, 广西南宁 530001)

摘要: 以木本植物巨尾桉幼苗为材料, 研究低温胁迫对巨尾桉膜脂过氧化及保护酶的影响, 测定了幼苗叶片的 O_2^- (超氧阴离子) 产生速率、 H_2O_2 (过氧化氢)、MDA (丙二醛) 含量、相对电导率和 SOD (超氧化物歧化酶)、POD (过氧化物酶)、CAT (过氧化氢酶)、APX (抗坏血酸过氧化物酶) 活性。结果表明: 低温胁迫使叶片 O_2^- 产生速率、 H_2O_2 、MDA 含量和相对电导率增加, 但抗寒锻炼植株的增幅远小于对照; 抗寒锻炼植株的 SOD、POD、CAT 和 APX 活性均低于对照。

关键词: 巨尾桉; 低温胁迫; 膜脂过氧化; 保护酶

中图分类号: Q945 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2004)01-0064-05

Effects of low temperature stress on membrane lipid peroxidation and cell defense enzyme activity in leaves of *E. grandis* × *E. urophylla* seedlings

LU Cheng-qun, HUANG Bao-ling

(Forestry College, Guangxi University, Nanning 530001, China)

Abstract: *E. grandis* × *E. urophylla* seedlings were used as materials, and effects of low temperature stress on membrane lipid peroxidation and cell defense enzyme in leaves were studied. O_2^- production rate, contents of H_2O_2 and malondialdehyde (MDA), relative conductance ratio, and activity of superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD), catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX) were determined. The results showed that the rate of O_2^- production, the contents of H_2O_2 , and malondialdehyde (MDA) and the relative conductivity rate were increased under low temperature stress, but the extent of raise on cold pretreated seedlings were lower than that of unpretreated. Activity of SOD, POD, CAT and APX on cold pretreated seedlings were lower than that of unpretreated.

Key words: *Eucalyptus grandis* × *E. urophylla*; low temperature stress; membrane lipid peroxidation; cell defense enzyme

自由基伤害学说 (Mccord 和 Fridovich, 1969) 认为, 在正常情况下, 植物细胞中存在着活性氧的产生和清除 2 个过程。逆境胁迫会促进活性氧产生,

损伤膜系统 (陈少裕, 1991)。有些酶如超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化物酶 (POD)、过氧化氢酶 (CAT) 和抗坏血酸过氧化物酶 (APX) 等可清除活

收稿日期: 2003-01-08 修订日期: 2003-03-20

作者简介: 吕成群 (1957-), 男, 广西平南人, 副教授, 博士, 从事植物生理学和林木生物技术工作。

性氧自由基,从而防止自由基的毒害,为此将它们称为保护酶系统(Fridovich, 1975)。根据这一理论,人们对活性氧自由基与植物抗寒性关系的研究正在日益深入(曾韶西等, 1987; 王丽雪等, 1996),但这些研究大多以农作物为材料。巨尾桉树干通直、材质优良,主伐期短, 5~7 a 即可采伐,属速生丰产树种,正在华南地区大面积推广种植(吕成群等, 2001)。我国种植的巨尾桉从澳大利亚引种,属热带亚热带喜温树种,它不耐低温,在低温胁迫下,树木非常容易受到伤害甚至被冻死,严重影响了桉树在更大范围的地区栽培。本文以巨尾桉为材料,研究低温胁迫对巨尾桉叶片膜脂过氧化及体内保护酶的影响,为巨尾桉的引种、栽培和育种等提供一些科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

选取根系发达、长势一致的巨尾桉(*Eucalyptus grandis* × *E. urophylla*)组培苗分成 2 组,一组温度控制在 5 °C,称为经过抗寒锻炼的植株;另一组温度控制在 25 °C,为对照即未经锻炼的植株。培养 20 d 后,将两组幼苗分别置于 -5 °C 下进行低温胁迫处理。处理 0、24、48、72、96 h 分别取叶片(从下自第二叶片起,同一测定指标取同一序号的叶片)测定。

1.2 相对电导率的测定

叶子用蒸馏水冲洗干净,然后切成块(1 cm × 1 cm),分成甲、乙两组,乙组样品置沸水浴中 15 min。然后分别浸于 20 mL 重蒸馏水中,经抽真空减压,2 h 后用 DDS-11A 型电导仪测定浸泡液中相对电导率。

1.3 丙二醛(MDA)测定

参照 Hendry 等(1993)的方法提取和测定 MDA 的含量。0.5 mL 提取液,3 mL 0.5% 硫代巴比妥酸,煮沸 15 min,迅速冷却,1 800 × g 离心 10 min 后,在 534 nm 和 600 nm 波长下测定光密度值。用标准 MDA 溶液作标准曲线,计算样品中 MDA 的含量。

1.4 超氧化物歧化酶(SOD)活性测定

参照 Donahue 等(1997), Schickler 和 Caspi (1999)的方法。3 mL 反应液中含甲硫氨酸 13 mmol/L,氯化硝基四氮唑蓝(NBT) 75 μmol/L,核黄素 16.7 μmol/L,EDTA 0.1 mol/L,磷酸缓冲液 50 mmol/L (pH 7.8)。以抑制 NBT 光氧化还原

50% 酶量为 1 个酶活单位,用 $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1} \text{protein}$ 表示酶活性。

1.5 过氧化物酶(POD)活性测定

参照 Amako 等(1994)的方法。3 mL 反应液中含磷酸缓冲液 0.2 mol/L (pH 6.0), 1.355 μL H_2O_2 , 愈创木酚 0.855 μL。以 $\Delta \text{A}_{470} \cdot \text{mg}^{-1} \text{protein} \cdot \text{min}^{-1}$ 表示酶活性。

1.6 过氧化氢酶(CAT)活性测定

用曾韶西等(1991)的方法,以 1 min 酶解 1 μmol H_2O_2 为 1 个酶活力单位,用 $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1} \text{protein}$ 表示酶活性。

1.7 抗坏血酸过氧化物酶(APX)活性测定

采用沈文飏和徐朗莱(1996)的方法。以 1 min 催化 1 μmol 抗坏血酸氧化的酶量为 1 个活力单位,用 $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1} \text{protein}$ 表示酶活性。

1.8 超氧阴离子(O_2^-)产生速率的测定

按照王爱国和罗广华(1990)的方法测定,用 $\text{nmol} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW} \cdot \text{min}^{-1}$ 表示。

1.9 过氧化氢(H_2O_2)含量的测定

取 0.5 g 鲜叶,加入 5 mL 冷丙酮研磨提取。按照林植芳等(1998)的方法测定 H_2O_2 含量。实验重复 3 次,文中数据均为 3 次实验结果的平均值。

2 结果与分析

2.1 低温胁迫对巨尾桉幼苗叶片活性氧自由基含量的影响

图 1:A 结果表明,在 0 h,经过抗寒锻炼植株的 O_2^- 产生速率略高于对照。但在低温胁迫过程中,锻炼植株的 O_2^- 产生速率的增加趋势明显低于未锻炼植株,在 24 h,锻炼植株的 O_2^- 产生速率为 0 h 的 1.4 倍,而对照则为 0 h 的 4.3 倍。在随后的胁迫处理时间里,无论是否经过抗寒锻炼, O_2^- 产生速率缓慢上升或稍有回落。

从图 1:B 可以看出,在 0 h,经过抗寒锻炼植株的 H_2O_2 含量稍高于对照,但在低温胁迫过程中,其 H_2O_2 含量的上升速度明显低于对照。在 48 h 达到峰值时,锻炼植株的 H_2O_2 含量是 0 h 的 2.0 倍,而对照植株是 3.9 倍。

2.2 低温胁迫对巨尾桉幼苗体内保护酶活性的影响

从图 2 可以看出,锻炼植株的 SOD、POD、CAT 和 APX 活性均比对照的低,且其变化趋势较小,酶活性保持相对的稳定性,而对照植株的这 4 种酶活

性则表现出先大起后大落的急剧变化趋势。在低温胁迫的前 24 h, 无论是否经过抗寒锻炼, 这 4 种酶的活性均升高。对照植株上升速度更快, 在 24 h, SOD 活性是 0 h 的 1.9 倍, POD 活性是 0 h 的 1.6 倍, CAT 活性是 0 h 的 1.6 倍, APX 活性是 0 h 的 1.6 倍; 而锻炼植株在 24 h, SOD 活性仅是 0 h 的 1.3 倍, POD 活性比 0 h 仅上升 14.0%, CAT 活性比 0 h 仅上升 25.0%, APX 活性比 0 h 仅上升 16.7%。在以后的低温胁迫过程中, 这 4 种酶的活性呈下降趋势, 对照植株下降的速度更剧烈, 到 96 h, SOD 活性比 24 h 时的下降 45.0%, POD 活性比 24 h 时的下降 50.0%, CAT 活性比 24 h 时的下降 45.8%, APX 活性比 24 h 时的下降 41.7%, 而锻炼植株的酶活性下降较慢, 保持相对的稳定。

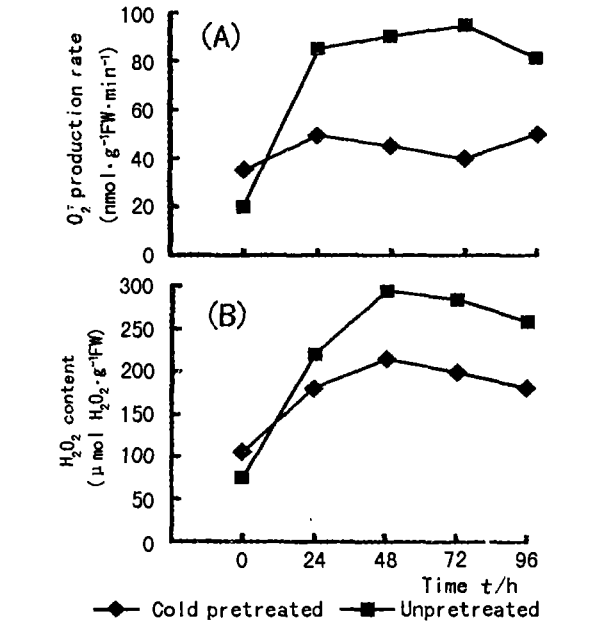


图 1 低温胁迫对 O_2^- 产生速率(A)和 H_2O_2 含量(B)的影响

Fig. 1 Effects of low temperature stress on O_2^- production rate (A) and H_2O_2 content (B)

2.3 低温胁迫对巨尾桉幼苗叶片相对电导率和 MDA 含量的影响

从图 3:A 可以看出, 低温胁迫都增加了巨尾桉幼苗叶片的相对电导率, 并随着胁迫的进程, 相对电导率在上升。在前 24 h, 抗寒锻炼植株的相对电导率稍低于对照。从 24 h 以后, 两者的差异明显加大, 在 96 h, 对照的相对电导率是锻炼植株的 1.8 倍, 锻炼植株保持相对平稳的变化趋势, 而对照则急剧上升。

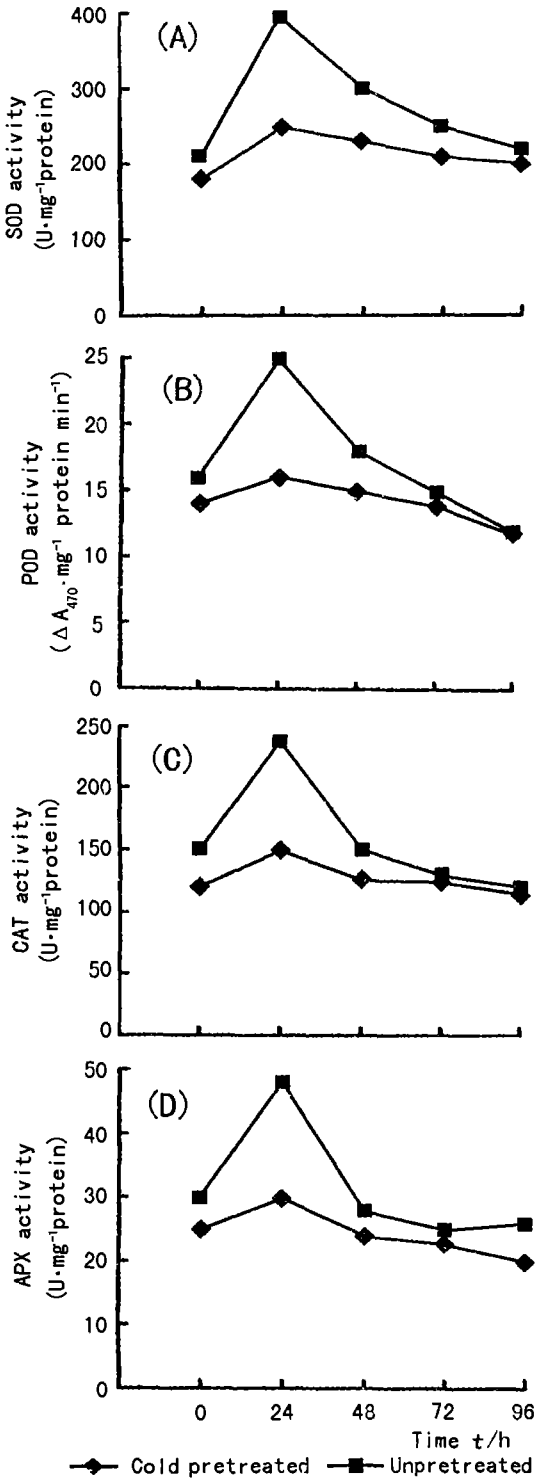


图 2 低温胁迫对 SOD(A)、POD(B)、CAT(C)和 APX(D)活性的影响

Fig. 2 Effects of low temperature stress on activities of SOD(A), POD(B), CAT(C) and APX(D)

图 3:B 结果表明, 在 0 h, 经过抗寒锻炼的植株 MDA 含量稍高于对照。但在低温胁迫过程中, 锻

炼植株的 MDA 含量只有微小的上升,在 96 h 内都保持相对的稳定。而对照植株的 MDA 含量在低温胁迫 24 h 内急剧上升,比 0 h 增高了 2.0 倍,并是锻炼植株 24 h 时的 2.0 倍,以后也明显高于锻炼植株。

3 讨 论

O_2^- 伤害植物的机理之一在于参与启动膜脂过氧化或膜脂脱酯作用(吕成群等,1996), H_2O_2 不是自由基,但由于其具有强氧化性,也是可以造成氧毒害的活性氧之一。在植物的生长过程中,植物体的一些氧不可避免地活化形成对细胞有伤害的活性氧。但巨尾桉幼苗经过抗寒锻炼后,虽然 O_2^- 产生速率和 H_2O_2 含量都有所上升,但它对低温的敏感程度却明显下降,在相同低温胁迫下,锻炼植株 O_2^- 和 H_2O_2 的增加趋势却远小于对照(图 1)。由此可见,低温胁迫下活性氧 O_2^- 产生速率和 H_2O_2 含量的增加与抗寒性密切相关,增加的速率越小,抗寒性越强,反之抗寒性越弱。

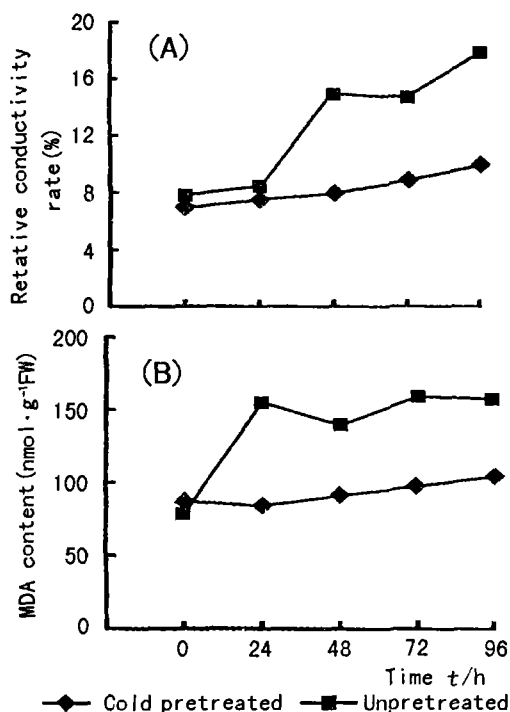


图 3 低温胁迫对相对电导率(A)和丙二醛含量(B)的影响

Fig. 3 Effects of low temperature stress on reative conductance ratio (A) and MDA content (B)

在低温胁迫过程中,体内产生过量 O_2^- , SOD 活性有随底物 O_2^- 浓度增加而上升的特性(田长恩等,1999)。在前 24 h, 无论是否经过抗寒锻炼, SOD 活性都明显升高, SOD 活性提高, 歧化产生较多的 H_2O_2 , 又诱导 POD、CAT 和 APX 活性提高(图 2)。值得注意的是, 经抗寒锻炼的巨尾桉的 4 种保护酶活性均低于对照, 但这并不意味着经抗寒锻炼的巨尾桉在遭受低温胁迫时这 4 种酶清除活性氧 O_2^- 和 H_2O_2 能力的下降, 因为在低温胁迫进程中, 与对照相比, 锻炼植株的这 4 种酶活性能保持相对稳定, 其活性下降的速度明显小于对照(图 2)。这些酶的相对稳定性利于保持活性氧与保护系统的平衡。而对照植株在低温胁迫过程中, 这 4 种酶活性呈先大起后大落的急剧变化, 会造成活性氧的突然大量产生, 从而使机体受伤害。

低温引起细胞膜系统受损是植物低温伤害的一个重要原因, 这是因为植物在低温胁迫下会导致活性氧代谢的失调和自由基的积累, 并进一步导致细胞结构的损伤和生理代谢的紊乱(陈亚华等, 2000)。在连续的低温胁迫下, 巨尾桉幼苗叶片相对电导率和作为膜系统损伤重要指标之一的 MDA 含量都在增加。值得注意的是, 对照植株在低温胁迫的前 24 h, 叶片相对电导率变化不大, 但 MDA 含量在前 24 h 就急剧上升, 并明显高于锻炼植株, 说明未经锻炼的巨尾桉在防止或降低 MDA 产生的能力较低。经过抗寒锻炼后, 虽然相对电导率和 MDA 含量都有所增加, 但在低温胁迫进程中其增加幅度远远小于对照(图 3)。说明经过抗寒锻炼, 在一定程度上阻止膜脂过氧化反应, 保护膜完整性, 这意味着抗寒性的提高。

经抗寒锻炼的植株, 其 O_2^- 产生速率与 H_2O_2 含量的增加相比较, 前者小得多; 而它的相对电导率和膜脂过氧化形成的 MDA 亦很小, 而未经低温锻炼过的植株则变化很大, 说明膜脂过氧化引起膜通透性的改变主要是由于 O_2^- 起作用。由于经抗寒锻炼过的植株对低温有较好的抗性, 故叶片内 O_2^- 的增加不大, 对膜的破坏性也不大, 而保护酶活性的变化也不大。因此, 经低温锻炼过的植株对低温有较强的抗性主要是抑制了 O_2^- 的产生速率。从未经抗寒锻炼的植株看, 在低温胁迫 24 h 内 O_2^- 的产生速率很快, 膜脂过氧化引起 MDA 在明显增加, 但由于保护酶活性也相应增强, 故膜遭受破坏较轻, 但当低温胁迫 24 h 后, O_2^- 的产生速率仍在增加, 而保护酶活

性明显下降, 尽管此时 MDA 含量无明显的增加, 但膜被破坏则较明显, 这也表明膜被破坏主要是由于 O_2^- 的产生。从以上实验的结果综合分析都说明了在低温胁迫下 O_2^- 是破坏膜的主要因素。保护酶一旦超出了它们清除 O_2^- 的能力, 即会造成 O_2^- 的累积, 加大对膜的破坏。

综上所述, 造成巨尾桉幼苗低温伤害的主要原因是体内活性氧代谢的失调。低温锻炼可以减弱低温胁迫引起的活性氧增加, 在低温胁迫过程中降低了活性氧对膜系统的伤害程度, 从而减轻了低温胁迫的伤害, 提高了巨尾桉的抗寒性。

参考文献:

- Amako K, Chen GX, Asade K. 1994. Separate assays specific for ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase and for the chloroplastic and cytosolic isozymes of ascorbate peroxidase in plants [J]. *Plant Cell physiol*, **35**: 497—504.
- Chen SY (陈少裕). 1991. Injury of membrane lipid peroxidation to plant cell (膜脂过氧化对植物细胞的伤害) [J]. *Plant Physiol Commun* (植物生理学通讯), **27** (2): 84—90.
- Chen YH (陈亚华), Shen ZG (沈振国), Liu YL (刘友良). 2000. Effects of chilling and high pH stresses on the ATPase activities of plasma membrane and tonoplast vesicles isolated from rice (*Oryza sativa* L) roots (低温、高 pH 胁迫对水稻幼苗根系质膜、液泡膜 ATP 酶活性的影响) [J]. *Acta Phytophysiol Sin* (植物生理学报), **26** (5): 407—412.
- Donahue JL, Okpodu MC, Cramer CL. 1997. Responses of antioxidants to paraquat in pea leaves [J]. *Plant Physiol*, **113**: 249—257.
- Fridovich I. 1975. The biology of oxygen radical [J]. *Science*, **201**: 875—880.
- Hendry GAF, Thorpe PC, Merzlyak MN. 1993. Stress indicators [A]; lipid peroxidation. In: Hendry GAF, Grime JP (des). *Methods in Comparative Plant Ecology* [C]. London: Chapman & Hall, 154—156.
- Lin ZF (林植芳), Li SS (李双顺), Lin GZ (林桂珠), 等. 1988. Senescing leaves and chloroplasts in relation to lipid peroxidation (衰老叶片和叶绿体中 H_2O_2 的累积与膜脂过氧化的关系) [J]. *Acta Phytophysiol Sin* (植物生理学报), **14** (1): 16—22.
- Lü CQ (吕成群), Huang BL (黄宝灵). 2001. Studies of the growth promoting and physiological effects of rare-earth on *E. grandis* × *E. urophylla* seedlings (稀土对巨尾桉苗木生长的影响及生理效应) [J]. *Journal of Central South Forestry University* (中南林学院学报), **21**: 61—64.
- Lü Q (吕庆), Zheng RL (郑荣梁). 1996. Membrane lipid peroxidation and deesterification of wheat induced by drought and active oxygen (干旱及活性氧引起小麦膜脂过氧化与脱酯化) [J]. *Sin Chin (Ser C)* (中国科学. C 卷), **26** (1): 26—30.
- Mccord JM, Fridovich J. 1969. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte (Hemocaprein) [J]. *Biol Chem*, **224**: 6 049—6 055.
- Schickler H, Caspi H. 1999. Response of antioxidative enzymes to nickel and cadmium stress in hyperaccumulator plants of the genus *Alyssum* [J]. *Physiol Plant*, **105**: 39—44.
- Shen WB (沈文飏), Xu LL (徐朗莱). 1996. Study on determination of ASP activity (抗坏血酸过氧化物酶活性测定的探讨) [J]. *Plant Physiol Commun* (植物生理学通讯), **32** (3): 203—205.
- Tian CE (田长恩), Liang CY (梁承邨). 1999. Effect of polyamine on the metabolism of protein, DNA, RNA and activated oxygen in the panicles of CMS rice and its maintainer line (多胺对水稻 CMS 系及其保持系幼穗蛋白质、核酸和活性氧代谢的影响) [J]. *Acta Phytophysiol Sin* (植物生理学报), **25** (3): 222—228.
- Wang AG (王爱国), Luo GH (罗广华). 1990. Quantitative relation between the reaction of hydroxylamine and superoxide anion radicals in plants (植物的超氧化物自由基与羟胺反应的定量关系) [J]. *Plant Physiol Commun* (植物生理学通讯), **26** (6): 55—57.
- Wang LX (王丽雪), Li RF (李荣富), Zhang FR (张福仁). 1996. Changes of total protein and peroxidase activity in grape shoots, and their relationships to cold resistance (葡萄枝条中蛋白质、过氧化物酶活性变化与抗寒性的关系) [J]. *Inner Mongolia Institute Agric Animal Husbandry* (内蒙古农牧学院学报), **17** (1): 45—50.
- Zeng SX (曾韶西), Wang YR (王以柔). 1987. The effect of chilling stress on the content of ascorbic acid in rice seedlings (低温胁迫对水稻幼苗抗坏血酸含量的影响) [J]. *Acta Phytophysiol Sin* (植物生理学报), **13** (4): 365—370.
- Zeng SX (曾韶西), Wang YR (王以柔), Liu HX (刘鸿先). 1991. Some enzymatic reactions related to chlorophyll degradation in cucumber cotyledons under chilling in the light (低温光照下与黄瓜子叶叶绿素降低有关的酶促反应) [J]. *Acta Phytophysiol Sin* (植物生理学报), **17** (2): 177—182.