

文章编号: 1001-1498(2007)05-0683-05

# 水分胁迫对板栗幼苗叶片活性氧代谢的影响

时忠杰<sup>1</sup>, 杜阿朋<sup>2</sup>, 胡哲森<sup>3</sup>, 徐大平<sup>1\*</sup>

(1. 中国林业科学研究院热带林业研究所, 广东 广州 510520; 2. 中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所, 北京 100091; 3. 福建农林大学林学院, 福建 福州 350002)

**摘要:**采用盆栽控水试验测定了板栗幼苗叶片的生理生化指标, 结果表明: 在土壤水分胁迫下, 随胁迫强度的增加, 板栗叶片相对含水量和可溶性蛋白含量呈逐渐减小趋势; 总叶绿素、叶绿素 a、叶绿素 b 及类胡萝卜素含量呈下降趋势, 但下降幅度不同; 活性氧保护酶 SOD、POD、CAT 随胁迫程度的增强呈先降后增再降低的变化趋势, 而 ASP 基本呈降低的变化趋势;  $O_2^-$  产生速率呈先增再降后增加的变化趋势, 而  $H_2O_2$  含量呈先增后降的变化趋势, 其中中度胁迫时含量最大; MDA 含量与质膜相对透性均随胁迫程度的增强而增大; SOD、CAT、ASP 等保护酶可以作为板栗幼苗抗旱力强弱的评价指标。

**关键词:**水分胁迫; 板栗幼苗; 活性氧化代谢

中图分类号: S718.43

文献标识码: A

## Effect of Soil Water Stress on Active Oxygen Metabolism of Chestnut Seedling Leaves

SHI Zhong-jie<sup>1</sup>, DU A-peng<sup>2</sup>, HU Zhe-sen<sup>3</sup>, XU Da-ping<sup>1</sup>

(1. Research Institute of Tropical Forestry, CAF, Guangzhou 510520, Guangdong, China; 2. Research Institute of Forestry Ecology, Environment and Protection, CAF, Beijing 100091, China; 3. College of Forestry, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian, China)

**Abstract:** Some indexes, such as the active oxygen protective system and some free radicles, were measured by the controlling the water in container seedlings. The results indicated that the total relative water contents and the protein contents dropped with the increase of stress intensity and the contents of total chlorophyll, chlorophyll a, chlorophyll b and carotenoid had a descending trend. The activities of the SOD, POD and CAT descended firstly, then ascended and descended lastly and the activity of ASP had a descending trend. The free radicles showed different changing trend: the  $O_2^-$  producing rates increased firstly, and then decreased and increased lately with the water stress intensity, but the  $H_2O_2$  contents raised firstly and then decreased. Both MDA content and membrane relative permeability had an ascending trend with the increasing stress. The activity of the enzymes such as SOD, CAT and ASP may evaluate the drought-resistant of the chestnut seedlings as indexes.

**Key words:** water stress; chestnut seedling; active oxygen metabolism

板栗 (*Castanea mollissima* BL.) 属壳斗科栗属植物, 原产于我国并被广泛栽培, 是我国北方广大山区

的重要经济树种。季节性干旱经常影响板栗的生长发育, 干旱胁迫使植物体内活性氧自由基增多, 直接

收稿日期: 2007-03-28

基金项目: 科技部社会公益研究专项“华南主要外来树种人工林生态环境影响的研究(2003DB3J116)”

作者简介: 时忠杰(1975—), 男, 山东临沂人, 博士, 助理研究员, 主要从事水分生理生态、森林生态与水文等方面的研究。E-mail: shijie1240@163.com

\* 通讯作者

或间接启动膜脂过氧化链式反应产生丙二醛等,降低膜的稳定性,促进膜的渗漏,造成膜损伤<sup>[1-4]</sup>;与此同时,一些植物在干旱胁迫时可调动细胞内的酶促或非酶促防御系统来清除活性氧自由基,防止膜脂过氧化物的发生,其中保护酶防御系统占有重要地位<sup>[5]</sup>。马双艳等<sup>[6]</sup>研究了干旱胁迫对不同品种板栗叶片渗透调节物质的影响,发现甜菜碱、丙二醛(MDA)、脯氨酸(PRO)的含量显著增加,且不同品种间的差异显著;于同泉等<sup>[7]</sup>研究了水分胁迫下板栗叶片超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性及丙二醛含量的变化;万善霞等<sup>[8]</sup>对水分胁迫下板栗幼苗的SOD、POD活力及其同工酶谱进行了研究,发现随胁迫时间延长,SOD、POD同工酶谱带都发生了变化,诱导出新的谱带。目前,对板栗在土壤水分胁迫状态下体内活性氧自由基代谢和抗氧化酶防御系统变化的研究较少,为研究板栗幼苗在水分胁迫下活性氧代谢变化及其响应机理,本实验以盆栽板栗1年生实生苗为试验材料,对土壤干旱胁迫下板栗体内保护酶体系、活性氧自由基的变化动态进行观测,以探讨板栗的抗氧化酶促保护机制和对土壤干旱的生理适应性,为抗旱育种和抗旱栽培提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

采用1年生板栗实生幼苗。板栗种子于10月采集于福建建瓯,在0~5℃的冰箱中贮藏和室内沙藏,次年3月份播种育苗。

### 1.2 处理方法

在遮雨棚内采用盆栽控水法进行水分胁迫处理,并保持与室外通风。5月中旬选择生长整齐一致的板栗幼苗移植入盆(花盆口径25cm,高30cm,内装微带黏性的砂壤土7.5kg,田间持水量为23.1%),每盆栽植3株幼苗,定量供水。生长2个月后的7—9月份,选取生长整齐一致有代表性的幼苗进行水分胁迫处理,以保持正常供水的幼苗为对照,每处理10盆,重复3次。水分胁迫用称质量法控制土壤水分含量,当土壤含水量达到要求时,分别取样测定。水分胁迫设对照、轻度胁迫、中度胁迫、重度胁迫4个处理,其土壤含水量分别为:25%、20%、15%、10%。

### 1.3 测定方法

(1)叶片相对含水量(RWC) 参照文献[9]的

方法测定。

(2)可溶性蛋白质 按Brandford<sup>[10]</sup>考马斯亮蓝G-250染色法测定。

(3)叶绿素及类胡萝卜素含量 叶绿素含量按沈其伟<sup>[11]</sup>的混合法测定;类胡萝卜素含量按邹琦<sup>[12]</sup>的方法测定。

(4)超氧化物歧化酶(SOD)活性 按改进的Dhinsa等<sup>[13]</sup>的方法测定,以单位时间内光还原50%的氮蓝四唑(NBT)为一个酶活性单位,即 $U \cdot g^{-1} DW$ 。

(5)过氧化物酶(POD)活性 参照文献[9]的方法测定,过氧化物酶活性以每克干质量材料每分钟光密度变化值来表示,即 $OD_{470} \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$ 。

(6)过氧化氢酶(CAT)活性 参照张宪政<sup>[14]</sup>的方法,其活性大小以单位时间内单位干质量材料被分解的 $H_2O_2$ 的量来表示,即 $mg \cdot g^{-1} DW \cdot min^{-1}$ 。

(7)抗坏血酸过氧化物酶(ASP)活性 按改进的X·H·波钦诺克<sup>[15]</sup>的方法测定,活性以每分钟每干质量材料叶片被氧化的抗坏血酸的微克分子数表示。

(8)过氧化氢( $H_2O_2$ )含量 参照林植芳等<sup>[16]</sup>的方法,以410nm下的光密度值作为 $H_2O_2$ 的相对含量大小表示其含量,即以 $OD_{410} \cdot g^{-1} DW$ 表示。

(9)超氧化物自由基( $O_2^-$ )产生速率 参照王爱国等<sup>[17]</sup>的羟胺反应定量法测定,以 $O_2^- \mu mol \cdot g^{-1} DW \cdot min^{-1}$ 作为产生速率的单位。

(10)丙二醛(MDA)含量 依据张宪政<sup>[14]</sup>的方法测定,MDA含量按 $Emol(532nm - 600nm) = 1.55 \times 10^{-1}$ 作为消光系数进行换算,以 $\mu mol \cdot g^{-1} DW$ 表示。

(11)质膜相对透性(RMP) 按刘宁等<sup>[18]</sup>的方法,利用DDS-11A型电导仪测定。

## 2 结果与分析

### 2.1 水分胁迫对板栗叶片含水量及蛋白质含量的影响

由表1表明:随着土壤水分胁迫强度的增大,叶片相对含水量(RWC)和可溶性蛋白质含量均呈现下降的趋势;轻度胁迫时RWC下降了5.64%,而可溶性蛋白含量下降了17.78%;当达重度水分胁迫时,RWC下降了14.39%,而可溶性蛋白含量下降了55.39%。

表 1 土壤水分胁迫对叶片相对含水量、可溶性蛋白质含量的影响

项目	水分胁迫处理			
	对照	轻度胁迫	中度胁迫	重度胁迫
相对含水量 / %	94.21	88.57	86.68	79.82
可溶性蛋白含量 / (mg · g <sup>-1</sup> )	8.72	7.17	4.37	3.89

### 2.2 水分胁迫对板栗叶片叶绿素及类胡萝卜素含量的影响

表 2 表明:随土壤水分胁迫强度的增大,板栗叶片的叶绿素 a、叶绿素 b、总叶绿素及类胡萝卜素的含量均变小,但其含量下降的幅度不同。由轻度胁迫至中度胁迫时,叶绿素及类胡萝卜素含量降幅较大,而由中度胁迫至重度胁迫时,叶绿素及类胡萝卜素含量降幅较小。

叶绿素 a/b 值随水分胁迫的增强表现为先升后降的趋势,这说明轻度水分胁迫对叶绿素 b 的破坏作用较叶绿素 a 的大,而随着胁迫强度的增加,对叶绿素 a 的破坏作用大于叶绿素 b。

总叶绿素/类胡萝卜素值随着水分胁迫程度的增强而减小,说明水分胁迫使叶绿素下降速率快于类胡萝卜素,而保持较高含量的类胡萝卜素有利于提高对各种活性氧自由基(如 O<sub>2</sub><sup>-</sup>、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>等)的清除,从而在一定程度上起到保护细胞免受伤害的作用<sup>[12]</sup>。

表 2 土壤水分胁迫对板栗叶片光合色素含量的影响

水分胁迫处理	叶绿素 a	叶绿素 b	总叶绿素	类胡萝卜素	叶绿素 a/b	总叶绿素/类胡萝卜素
	(mg · g <sup>-1</sup> )					
对照	4.19	2.10	6.29	0.79	2.00	7.96
轻度胁迫	3.88	1.88	5.76	0.77	2.06	7.48
中度胁迫	1.31	0.64	1.95	0.27	2.05	7.22
重度胁迫	0.92	0.47	1.39	0.24	1.96	5.79

### 2.3 土壤水分胁迫对板栗叶片保护酶活性的影响

表 3 表明:除对照外,随水分胁迫的增强,SOD、POD 和 CAT 的活性均先升后降,这与于同泉等<sup>[7]</sup>的研究结果一致;在中度胁迫时,SOD 和 POD 仍保持较高的活性,且活性值比对照大,分别是对照的 129.43% 和 158.67%;在胁迫状态下,CAT 的活性一直低于对照,重度胁迫下其活性为对照的 70.77%。

ASP 活性随胁迫强度的增大而降低,在重度胁迫下其活性又微弱回升,但一直低于对照,其活性仅为对照的 19.99%。4 种保护酶活性表明,水分胁迫对 ASP 活性的影响最大。

表 3 土壤水分胁迫对板栗叶片保护酶活性的影响

项目	水分胁迫处理			
	对照	轻度胁迫	中度胁迫	重度胁迫
SOD 活性 / (U · g <sup>-1</sup> )	591.23	486.98	765.23	588.58
POD 活性 / (OD <sub>470</sub> · g <sup>-1</sup> · min <sup>-1</sup> )	17.25	12.68	27.37	7.78
CAT 活性 / (mg · g <sup>-1</sup> · min <sup>-1</sup> )	6.50	4.52	5.51	4.60
ASP 活性 / (μg · g <sup>-1</sup> · min <sup>-1</sup> )	17.11	8.52	2.82	3.42

### 2.4 土壤水分胁迫对板栗叶片活性氧自由基的影响

由表 4 可见:随土壤水分胁迫程度的增强,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量呈先升后降的趋势,在中度水分胁迫时,其含量最大,为对照的 189.64%;而 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 产生速率以轻度水分胁迫时最高,为对照的 121.91%,随胁迫程度增强,O<sub>2</sub><sup>-</sup> 产生速率表现为先升高再下降后又升高的趋势,这与 SOD 酶的活性变化趋势相反。

表 4 土壤水分胁迫对活性氧自由基的影响

项目	水分胁迫处理			
	对照	轻度胁迫	中度胁迫	重度胁迫
O <sub>2</sub> <sup>-</sup> 产生速率 / (μmol · g <sup>-1</sup> · min <sup>-1</sup> )	4.29	5.23	3.36	4.17
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 含量 / (OD <sub>410</sub> · g <sup>-1</sup> )	2.51	4.07	4.76	4.19

### 2.5 土壤水分胁迫对板栗叶片丙二醛含量及质膜相对透性的影响

表 5 表明:随水分胁迫程度的增强,板栗叶片丙二醛(MDA)的含量呈上升趋势,重度胁迫时 MDA 的含量是对照的 247.88%。质膜相对透性的变化趋势与 MDA 含量的变化基本一致,重度胁迫时质膜相对透性是对照的 178.73%。这说明随胁迫程度加强,叶片膜脂过氧化程度更大,细胞膜受损伤也更强。

表 5 土壤水分胁迫对丙二醛(MDA)含量和质膜相对透性的影响

项目	水分胁迫处理			
	对照	轻度胁迫	中度胁迫	重度胁迫
MDA 含量 / (μmol · g <sup>-1</sup> )	83.32	145.65	174.80	206.53
质膜相对透性 / %	25.62	32.27	39.21	45.79

### 2.6 土壤水分胁迫下各指标间的关系

SOD 是清除 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 自由基的主要酶,POD、CAT、ASP 是清除 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 自由基的主要保护酶。相关性分析表明(表 6):SOD 活性与 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 产生速率呈负相关;ASP 和 CAT 活性与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量呈负相关;POD、CAT、ASP 三种酶活性与 MDA 含量、质膜相对透性(RMP)间均呈负相关关系,其中 ASP 与 MDA、RMP 的相关性最强,这说明它们的产生与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含

量有直接的关系,而与  $O_2^-$  产生速率相关性较差。

MDA 是膜脂过氧化作用的产物,其积累量反映了膜脂氧化的程度,RMP 反映了细胞膜受伤害的程度。相关分析表明(表 6):MDA 含量、RMP 与  $H_2O_2$  含量呈正相关关系,这说明,MDA 的积累和质膜的受损伤程度受活性氧自由基产生量控制,而  $H_2O_2$  又受各种保护酶的控制,因此保护酶系统能够对膜脂过氧化作用产生重要影响。

此外,叶片组织相对含水量(RWC)与保护酶系

统也有一定的相关性,RWC 与 SOD 呈微弱负相关关系,与 POD、CAT、ASP 呈较强的正相关关系;RWC 与  $H_2O_2$  含量、MDA 和 RMP 呈负相关关系;RWC 与  $O_2^-$  产生速率无明显相关性。这说明,叶片组织相对含水量变小,SOD 活性有微弱增强,而 POD、CAT、ASP 的活性减弱,产生的  $H_2O_2$  和 MDA 量增加,RMP 增强,细胞受害程度加大。

表 6 土壤水分胁迫下板栗叶片各生化指标间的相关系数

项目	蛋白质	$O_2^-$	$H_2O_2$	MDA	RMP	RWC	SOD	POD	CAT	ASP
蛋白质	1									
$O_2^-$	0.454 9	1								
$H_2O_2$	-0.868 5	-0.241 6	1							
MDA	-0.954 9	-0.170 4	0.871 9	1						
RMP	-0.972 7	-0.278 2	0.811 1	0.986 1	1					
RWC	0.904 7	0.082 5	-0.750 7	-0.977 3	-0.978 0	1				
SOD	-0.594 3	-0.972 4	0.454 2	0.330 8	0.410 1	-0.212 6	1			
POD	0.673 4	0.720 1	-0.237 5	-0.515 8	-0.650 3	0.559 6	-0.674 9	1		
CAT	0.466 7	-0.545 9	-0.663 3	-0.693 7	-0.577 4	0.686 0	0.355 8	-0.218 9	1	
ASP	0.951 5	0.306 3	-0.977 7	-0.945 7	-0.913 3	0.855 4	-0.496 9	0.417 9	0.630 4	1

### 3 结论与讨论

SOD 是植物活性氧代谢的关键酶,它可以催化植物体内分子氧活化的第 1 个中间产物 ( $O_2^-$ ) 的歧化反应而生成  $H_2O_2$  和  $O_2$ ,从而可能在保护系统中处于核心地位;而 CAT、ASP 及 POD 3 种酶反映了植物生理生化代谢及生长发育情况,亦可作为植物抗性强弱的标志之一。干旱条件下,植物体内的 SOD 和 POD 活性与植物抗氧化胁迫能力呈正相关,这一认识已趋于一致<sup>[19,20]</sup>;夏新莉<sup>[21]</sup>研究发现,土壤干旱轻度胁迫下(苗木水势下降到 -1.3 MPa),樟子松 (*Pinus sylvestris* L. var *mongolica* Litvin) 针叶的 SOD 活性随胁迫时间延长呈上升趋势,表明樟子松通过提高其保护酶 SOD 活性响应胁迫,提高 ( $O_2^-$ ) 清除能力;魏炜<sup>[22]</sup>研究表明,耐旱小麦品种经过轻度干旱胁迫、中度干旱胁迫以及重度干旱胁迫后其 SOD 的活力分别是对照的 3.5、4.2 倍和 2.8 倍。本研究再次证实了抗氧化酶活性与植物的抗旱性密切相关。

在正常的情况下,植物细胞产生的  $O_2^-$ 、 $H_2O_2$  等活性氧自由基被各种保护酶及时清除,并不会对细胞产生伤害,但当植物遭受严重水分胁迫等环境胁迫

时,植物机体代谢紊乱,由多条途径产生的活性氧自由基的含量增加,机体由于代谢受阻不能及时清除而发生自由基积累,而其中的  $H_2O_2$  和  $O_2^-$  自由基还可能通过 Harber-Weiss 反应产生毒性更强、数量更多的  $\cdot OH$ 、 $^1O_2$  自由基,这些大量积累的自由基有极强烈的氧化作用,它可能诱发了细胞膜中不饱和脂肪酸发生过氧化作用,其产物是具有强氧化性的脂质过氧化物和各种小分子的降解产物,导致丙二醛含量显著增高,最终使细胞膜的完整性受到破坏,细胞内含物大量的外渗,细胞质膜相对透性增大(即相对电导率增大)。本试验结果与 Fridovich<sup>[23]</sup> 的自由基伤害学说相吻合。

综上所述,活性氧清除酶 SOD、CAT、ASP 等酶活性是板栗对水分胁迫响应的重要生理指标,这些指标可用于板栗抗旱力强弱的评价和抗旱育种。

#### 参考文献:

- [1] 王爱国,罗广华. 羟自由基启动下的脱氧核糖降解及其产物的 TBA 反应 [J]. 生物化学与生物物理进展, 1993, 20(2): 150~152
- [2] Anora A, Sairam R K, Srivastava G C. Oxidative stress and antioxidative system in plants [J]. Current Science, 2002, 82: 1227~1238

- [3] 叶冰莹,陈由强,朱锦懋,等. 水分胁迫对三种木麻黄小枝活性氧伤害的研究 [J]. 福建师范大学学报 (自然科学版), 2000, 16 (1): 76 ~ 79
- [4] 陈立松,刘星辉. 水分胁迫对荔枝叶片活性氧代谢的影响 [J]. 园艺学报, 1998, 25 (3): 241 ~ 246
- [5] 时忠杰,胡哲森,李荣生. 水分胁迫与活性氧代谢 [J]. 贵州大学学报 (农业与生物科学版), 2002, 21 (2): 140 ~ 145
- [6] 马双艳,姜远茂,彭福田,等. 干旱胁迫对不同板栗品种渗透调节物质含量及光合的影响 [J]. 干旱地区农业研究, 2003, 21 (3): 114 ~ 118
- [7] 于同泉,秦岭,陈静,等. 水分胁迫对板栗幼苗抗氧化酶及丙二醛的影响 [J]. 北京农学院学报, 1996, 11 (1): 48 ~ 52
- [8] 万善霞,秦岭,于同泉,等. 水分胁迫对板栗幼苗过氧化物酶、超氧化物歧化酶活力及同工酶谱的影响 [J]. 北京农学院学报, 1997, 12 (3): 20 ~ 24
- [9] 华东师范大学生物系植物生理教研室. 植物生理学实验指导 [M]. 北京:人民教育出版社, 1980: 1 ~ 3; 143 ~ 144
- [10] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248 ~ 252
- [11] 沈其伟. 测定水稻叶片叶绿素含量的混合液提取法 [J]. 植物生理学通讯, 1988, 24 (3): 62 ~ 64
- [12] 邹琦. 植物生理生化实验指导 [M]. 北京:中国农业出版社, 1995: 70 ~ 72
- [13] Dhinsa R S, Dhinsa P P, Thorp T A. Leaf senescence correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation and decreased levels of superoxide dismutase and catalase [J]. *Tour Exp Bot*, 1980, 32: 93
- [14] 张宪政. 作物生理研究法 [M]. 北京:农业出版社, 1992: 208 ~ 209; 211 ~ 212; 210 ~ 211
- [15] X · H · 波钦诺克 (苏). 植物生物化学分析方法 [M]. 荆家海, 丁钟荣译. 北京:科学出版社, 1981: 203 ~ 207; 209 ~ 212
- [16] 林植芳,李双顺,林桂竹,等. 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]. 植物生理学报, 1988, 14 (1): 16 ~ 22
- [17] 王爱国,罗广华. 植物的超氧化物自由基与羟胺反应的定量关系 [J]. 植物生理学通讯, 1990, 26 (6): 55 ~ 57
- [18] 刘宁,高玉葆,贾彩霞,等. 渗透胁迫下多花黑麦草叶内过氧化物酶活性和脯氨酸含量以及质膜相对透性变化 [J]. 植物生理学通讯, 2000, 36 (1): 11 ~ 15
- [19] 王建华,刘鸿先,徐同. 超氧化物歧化酶 (SOD) 在植物逆境和衰老生理中的作用 [J]. 植物生理学通讯, 1989, 25 (1): 1 ~ 5
- [20] Scandalios J G. Oxygen stress and superoxide dismutase [J]. *Plant Physiol*, 1993, 101: 7 ~ 11
- [21] 夏新莉,郑彩霞,尹伟伦. 土壤干旱对樟子松针叶膜脂过氧化膜脂成分和乙烯释放的影响 [J]. 林业科学, 2000, 36 (3): 8 ~ 12
- [22] 魏伟,赵欣平,吕辉. 三种抗氧化酶在小麦抗干旱逆境中的作用初探 [J]. 四川大学学报, 2003, 40 (6): 1172 ~ 1175
- [23] Fridovich I. Superoxide dismutase [J]. *Ann Rev Biochem*, 1975, 44: 147 ~ 159