

干旱胁迫与菜心叶片活性氧代谢的研究

杨 暹 关佩聪

(华南农业大学园艺系, 广州, 510642)

摘要 干旱胁迫导致菜心叶片清除活性氧的平衡体系受到破坏, 叶片 SOD 活性和 ASA 含量逐渐下降. 轻度胁迫引起叶片 CAT 活性上升, 而高度胁迫 CAT 活性下降. 随着干旱胁迫时间的延长, 叶片的 AP、POD 活性逐渐上升, MDA 含量不断增加, 自动氧化速率逐步提高, 特别是在干旱胁迫的第 6 d 开始, 膜脂过氧化加剧, 明显地抑制了菜心植株的生长发育.

关键词 菜心; 干旱胁迫; 活性氧代谢; 膜脂过氧化

中图分类号 S 311

菜心 (*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* var. *utilis* Tsen et Lee Syn. *Brassica parachinensis* Bailey), 又称菜薹, 是中国特产蔬菜之一, 在华南地区蔬菜周年均衡供应与出口创汇中起着重要的作用. 氧是需氧生物生命活动不可缺少的元素, 但过量的氧是有毒害作用的. 在逆境条件下, 生物体内发生氧自由基的积累而引发膜脂过氧化作用, 但生物体本身又具有保护酶系统及各种内源抗氧化剂, 可防止膜脂过氧化作用或中断已发生的脂质过氧化作用. 干旱通过作用于作物的多种代谢途径而影响产量, 在众多的代谢途径与抗逆性关系的研究中, 生物体内活性氧代谢系统正日益受到人们的重视, 且进展颇快(王建华等, 1989). 干旱胁迫对作物活性氧代谢的影响, 在玉米、小麦等作物中有不同的反应(张敬贤等, 1990; 王振镒等, 1989). 关于蔬菜作物活性氧代谢与干旱关系的研究颇为薄弱, 尤其是与菜心抗旱关系的比较生理学研究报道甚少. 本文初步研究了干旱胁迫对菜心植株生长、膜保护酶(SOD、CAT、POD)和内源抗氧化剂(ASA)、膜脂过氧化产物(MDA)以及自动氧化速率的影响, 以探讨干旱胁迫与菜心活性氧代谢的关系, 为菜心的抗旱栽培提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 材料

供试菜心品种为迟心 2 号.

1.2 试验处理

试验在广州华南农业大学蔬菜地的温室内盆栽, 于 10 月 20 日播种, 幼苗具 3 片真叶时定植, 每盆 15 株, 4 个重复. 植株现蕾时断水 0、2、4、6、8 d 进行干旱胁迫处理, 断水 8 d 后恢复供水, 盆土含水量分别为 16.3%、13.6%(轻度胁迫)、11.8%、8.5%(高度胁迫)和 7.6%, 对照正常浇水.

1.3 生理生化指标测定

植株鲜质量测定: 于断水 6、8 d 后分别复水 2 d, 取样 10 株测定植株鲜质量.

膜保护酶活性测定: 于断水 0、2、4、6、8 d 和复水 2 d 取样测定. 每次每处理取 10 株

的叶片,切碎混匀,称取 0.5 g 按李柏林等(1989)方法提取酶液.超氧化物歧化酶(SOD)活性按略改进的 Dhindsa 等(1981)方法测定,3 mL 反应混合液含有 1.3 mmol/L 核黄素,13 mmol/L 甲硫氨酸,63 μ mol/L NBT,0.05 mol/L pH7.8 磷酸缓冲液,加入 0.1 mL 酶液后在 4 000 lx 光下照光 15 min,并立即在 560 nm 下比色,酶单位采用抑制 NBT 光化还原 50% 为一个酶单位(U)表示.过氧化氢酶(CAT)活性按略加修改的 Chance 等(1955)方法测定,5 mL 反应混合液中含 0.05 mol/L pH7.8 磷酸缓冲液,8 mmol/L H_2O_2 及 0.1 mL 酶液,30 $^{\circ}C$ 下反应 1 min,加入 2 mL 体积分数为 10% H_2SO_4 终止反应,用 2 mmol/L $KMnO_4$ 滴定剩余 H_2O_2 ,根据 H_2O_2 的消失量计算 CAT 活性.过氧化物酶(POD)活性按朱广廉(1990)方法测定,以每毫克鲜质量每分钟 470 nm 吸光度变化值(U)表示酶活性大小.

酸性磷酸酶(AP)活性测定:按林启美等(1991)的匀浆法进行.

抗坏血酸(ASA)含量测定:按朱广廉(1990)的方法进行,计算单位为 100 g 鲜质量的毫克数.

丙二醛(MDA)含量与自动氧化速率测定:按李柏林等(1989)的方法进行.

以上测定项目均重复 3 次,取均值.

2 结果与分析

2.1 干旱胁迫对菜心植株生长的影响

随着干旱胁迫时间的延长,菜心植株鲜质量逐渐下降.断水 6 d 后,复水 2 d 的植株鲜质量为 7.3 g/株,比正常浇水的植株鲜质量降低 4.2 g/株;断水 8 d 后,复水 2 d 的植株鲜质量为 6.8 g/株,比正常浇水的植株鲜质量降低 6.0 g/株.表明干旱胁迫明显地抑制了菜心植株的生长,亏缺水分的时时间愈长,复水后的植株生长也愈差.

2.2 干旱胁迫对菜心叶片 ASA 含量的影响

从图 1 可看到,菜心叶片 ASA 含量随干旱胁迫时间的延长而降低,以断水第 2~6 d 的 ASA 含量的下降幅度较大.断水 8 d 后,复水 2 d 时叶片 ASA 含量进一步下降并保持在较低的水平.这说明了干旱胁迫严重地影响菜心叶片内源抗氧化剂 ASA 合成,导致 ASA 含量的不可逆下降.

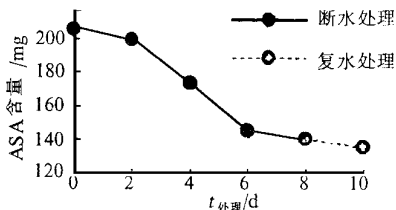


图 1 干旱胁迫对菜心叶片 ASA 含量的影响

2.3 干旱胁迫对菜心叶片 AP、SOD、CAT、POD 活性的影响

AP、SOD、CAT、POD 是植株体内广泛存在能清除活性氧的膜保护酶类,它们能把活性氧转变为低活性物质,从而保护细胞膜系统.从图 2 可看到,随着干旱胁迫时间的延长,叶片 AP 活性逐渐上升,但上升的幅度不大.断水 8 d 后恢复供水 2 d 时叶片的 AP 活性明显下降.

随着干旱胁迫时间的延长,菜心叶片 SOD 活性逐渐下降,以断水第 2~6 d 下降幅度较大,与叶片 ASA 含量的变化趋势基本一致.可见,水分亏缺明显地降低了菜心叶片 SOD 活性.干旱胁迫解除后,即断水 8 d 后恢复供水 2 d,叶片 SOD 活性显著提高,并恢复到断水处理前的水平.

CAT 活性在菜心受干旱胁迫的 4 d 内逐渐升高,而在干旱胁迫后的 4~8 d 则逐渐下降.断水 8 d 后,恢复供水 2 d 时的 CAT 活性下降更明显,比干旱胁迫前的 CAT 活性还低.表明轻度的水分亏缺有利于菜心叶片 CAT 活性的提高,而高度的水分亏缺则明显地降低叶片 CAT 活性.

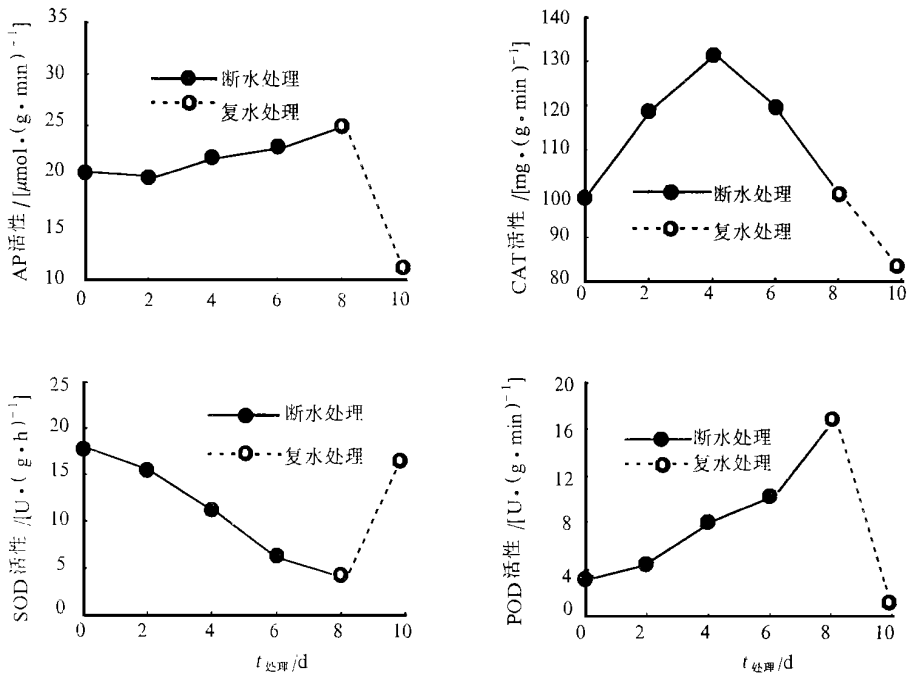


图2 干旱胁迫对菜心叶片 AP、SOD、CAT、POD 活性的影响

POD 活性在菜心受干旱胁迫期间逐渐上升,以断水第 2~4 d 和第 6~8 d 的上升幅度较大,而以断水 8 d 时叶片的 POD 活性最大.断水 8 d 后,恢复供水 2 d 时的叶片 POD 活性大幅度下降,比干旱胁迫前的 POD 活性还低.说明干旱胁迫与菜心叶片的 POD 活性密切相关,水分亏缺时间愈长,菜心叶片的 POD 活性也愈高.

2.4 干旱胁迫对菜心叶片膜脂过氧化作用与自动氧化速率的影响

类脂(磷脂和糖脂)是膜结构的主要组成部分,这些脂类通常含有不饱和脂肪酸,脂质过氧化作用是指非脂类自由基(如 O_2^- , $\text{OH}^\bullet$ 等)对类脂中不饱和脂肪酸进攻而产生一系列的自由基反应.MDA 为膜脂过氧化的产物,为膜脂过氧化的指标之一.机体中清除自由基的体系是很复杂的,其中某一种酶或某一物质的变化并不能代表机体中总的保护能力的变化,MDA 自动氧化速率即可代表组织中清除自由基能力的大小(李柏林等,1989).从图 3 可看到,随着干旱胁迫时间的延长,菜心叶片的 MDA 的积累量不断增加,MDA 自动氧化速率不断提高,特别是断水第 6~8 d 的 MDA 积累较快.断水 8 d 解除干旱胁迫后恢复供水 2 d 时的 MDA 含量明显降低,并基本降至断水处理前的水平.表明随着水分亏缺程度的加深,菜心植株

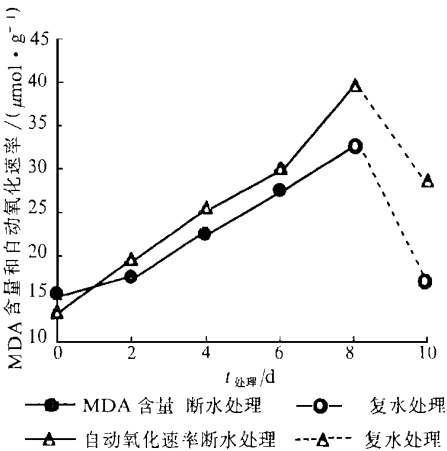


图3 干旱胁迫对菜心叶片 MDA 含量和自动氧化速率的影响

体内的膜脂过氧化作用明显加剧,细胞的自我保护能力逐渐降低,植株的受害程度不断加强。

3 讨论

自 McCord 和 Fridovich 在 1969 年发现了 SOD, 并证明其功能是清除超氧化物离子 (O_2^-) 以后, 有关活性氧对植物细胞的毒害作用引起人们的广泛注意 (Eltner, 1982)。许多研究表明, 植物细胞通过多种途径产生 O_2^- 、 $OH^\cdot$ 、 1O_2 、 H_2O_2 等自由基, 同时细胞内也存在着清除这些自由基的多种途径。自由基的清除系统有两大类: 一是保护酶系统, 主要有 SOD、CAT、POD、AP 等酶; 另一类是一些小分子内源抗氧化剂, 如 ASA、GSH 等。在正常情况下, 细胞内自由基的产生与清除是处于一种动态平衡之中, 但在植物器官的衰老劣变过程中 (林植芳等, 1984), 特别是当植物处于干旱、盐害和环境污染等逆境下 (Smirnoff, 1993; Singha et al, 1990; Tanaka et al, 1980) 这种平衡遭到破坏, 自由基的增加导致植物细胞的伤害, 首先受到自由基袭击的是膜系统 (Eltner, 1982)。膜的拟脂双分子层中不饱和脂肪酸易被过氧化分解, 造成整体膜的破坏, 表现在膜透性增大和离子泄漏, 引起叶绿素的漂白和破坏, 严重时导致植株伤害或死亡 (Mead, 1976)。

干旱胁迫对植株细胞保护酶活性的影响, 前人有不同的结果。张敬贤等 (1990) 认为, 随着干旱胁迫时间的延长, 玉米叶片细胞保护酶 SOD、POD、CAT 的活性不同程度地下降。而王振镒等 (1989) 则报道, 干旱胁迫可提高抗旱性玉米叶片细胞保护酶 SOD、POD 的活性。干旱胁迫导致细胞膜透性增大, MDA 含量增加 (张敬贤等, 1990; 沈秀瑛等, 1995)。本试验表明, 干旱胁迫明显地影响菜心叶片活性氧的产生与清除系统也即是细胞保护系统的平衡, 随着干旱胁迫时间的延长, 叶片 SOD 活性、内源抗氧化剂 ASA 含量逐渐下降。SOD 活性、ASA 含量的降低说明了 SOD 和 ASA 在清除因水分亏缺而导致菜心活性氧伤害细胞膜的能力较弱, 而且随着水分亏缺的加强, SOD、ASA 受到破坏的程度也增加。叶片 CAT 活性在干旱胁迫 4 d 即轻度的水分亏缺情况下逐渐上升, CAT 活性在轻度的水分亏缺下上升是菜心植株适应干旱的一种保护反应; 而在干旱胁迫的 4 d 后即高度水分亏缺的情况下则逐渐下降是细胞内的 CAT 受到破坏而降低其活性, 因而也降低其抗旱能力。叶片 AP、POD 活性在干旱胁迫的过程中逐渐提高, 干旱胁迫解除后则逐渐降低。在水分亏缺条件下, 菜心叶片 POD、AP 活性的增强可能是使正常代谢改组以适应干旱条件, 使活性氧及时清除并维持在一个较低的水平而使植株避免伤害, 从而提高植株的抗旱能力。膜脂过氧化产物 MDA 含量和自动氧化速率在干旱胁迫过程中不断提高, 水分亏缺时间愈长, MDA 积累量和自动氧化速率也愈高, 膜脂过氧化作用也愈强。

可见, 干旱胁迫导致菜心活性氧代谢系统的失调, 抵御活性氧危害的保护系统如 SOD、CAT 活性被削弱, 内源抗氧化剂 ASA 含量减少, 氧吸取量增加, 使清除活性氧的能力下降, 有利于形成更多的 1O_2 、 H_2O_2 、 $OH^\cdot$ 、 O_2^- 等活性氧, 同时伴有 MDA 含量的大量上升与自动氧化速率的提高, 叶片过氧化产物 MDA 的含量升高, 表明干旱胁迫引起过氧化作用加强, 积累较多的 MDA, 而 MDA 本身又是一种高活性的脂过氧化物, 它能交联脂类、糖类、核酸及蛋白质, 从而进一步对质膜的结构和功能造成不良的影响, 使其电解质泄漏量增加, 影响了构成细胞质膜的物质组分, 膜脂肪酸的组成发生了变化, 引起脂肪酸不饱和度降低, 原因是

过氧化作用造成不饱和脂肪酸双键的破坏及碳 18 不饱和脂肪酸的合成受阻. 膜结构的改变影响到膜的流动性及其结合酶的活力, 质膜透性增大, 叶绿体和线粒体膜系统超微结构受损, 引起植株伤害, 导致叶片叶绿素含量减少, 叶绿体希尔反应活力下降, 净光合强度减弱, 抑制了植株生长发育, 加速植株衰老.

从以上结果还表明, 菜心植株抗旱能力的强弱受细胞内多种代谢的综合影响, 某个单一的生理过程或指标的变化尚不足以表征其抗旱能力的强弱, 植株体内各种代谢是互相联系, 互相制约的, 在众多的细胞膜保护系统中, 叶片的 POD、AP 活性与提高菜心的抗旱性关系较为密切, CAT、SOD 活性与菜心的抗旱能力也有一定的联系, 它们在菜心的细胞膜稳定性维护中起着重要作用.

参 考 文 献

- 王建华, 刘鸿先, 徐 同. 1989. 超氧化物歧化酶(SOD)在植物逆境和衰老生理中的作用. 植物生理学通讯, (1): 1~7
- 王振镒, 郭蔼光, 罗淑萍. 1989. 水分胁迫对玉米 SOD 和 POD 活力及同功酶的影响. 西南农业大学学报, 17(1): 45~49
- 朱广廉. 1990. 植物生理学实验. 北京: 北京大学出版社, 226~248
- 沈秀瑛, 徐世昌, 戴俊英. 1995. 干旱对玉米叶 SOD、CAT 及酸性磷酸酯酶活性的影响. 植物生理学通讯, 31(3): 183~186
- 李柏林, 梅慧生. 1989. 燕麦叶片衰老与活性氧代谢的关系. 植物生理学报, 15(1): 6~12
- 张敬贤, 李俊明, 崔四平, 等. 1990. 玉米细胞保护酶活性对苗期干旱的反应. 华北农学报, 5(增刊): 19~23
- 林启美, 黄德明. 1991. 应用酸性磷酸酶进行番茄磷素诊断. 华北农学报, 6(2): 78~83
- 林植芳, 李双顺, 林桂珠, 等. 1984. 水稻叶片的衰老与超氧化物歧化酶活性及脂质过氧化作用的关系. 植物学报, 26(6): 605~615
- Chance B, Maehly A C. 1955. Assay of catalases and peroxidases. In: Colowick S P, Kaplan N O ed. Methods in Enzymology; Vol 2. New York: Academic Press. 764~775
- Dhindsa R S, Matowe W. 1981. Drought tolerance in two mosses; correlated with enzymatic defence against lipid peroxidation. J Exp Bot, 32: 79~91
- Elstner E F. 1982. Oxygen activation and oxygen toxicity. Ann Rev Plant Physiol, 33: 73~96
- Mead J F. 1976. Free radical mechanism of lipid damage and consequence for cellular membrane. In: Pryor W A, ed. Free radicals in Biology; Vol 1. New York: Academic Press, 51~56
- Singha S, Choudhuri M A. 1990. Effect of salinity (NaCl) stress on H₂O₂ metabolism in vigna and oryza seedlings. Biochem Physiol Pflanzen, 186: 69~74
- Smirnov N. 1993. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. New Phytol, 125: 27~58
- Tanaka K, Sugahara K. 1980. Role of superoxide dismutase in defence against SO₂ toxicity and increase in superoxide dismutase activity with SO₂ fumigation. Plant Cell Physiol, 21: 601~611

(下转 111 页)

molecular weight of AEL was 36 600 determined by gel filtration; In vitro cell culture , no direct killing effect of AEL to lung adenoma strain P18 was found. The effects of various physical—chemical factors , such as pH、temperature and denatural reagents, to the stability of AEL were also discussed.

Key words *Alocasia eucullata* (Dour) Schott; lectin; anticancer test

(上接第 85 页)

STUDY ON THE RELATIONSHIP BETWEEN DROUGHT STRESS AND ACTIVATED OXYGEN METABOLISM OF FLOWERING CHINESE CABBAGE (*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* var. *utilis*) LEAVES

Yang Xian Guan Peicong

(Dept. of Hortic., South China Agric. Univ., Guangzhou, 510642)

Abstract

Effects of drought stress on plant growth, activities of AP, SOD, CAT and POD, ASA content, MDA level and autoxidation rate in flowering Chinese cabbage leaves were studied. The results showed that with the time and intensity of drought stress, activities of AP and POD, MDA content and autoxidation rate increased gradually, while activity of SOD and ASA content decreased gradually. Activity of CAT under lighter drought stress increased sharply, but under higher drought stress above 4 days it decreased rapidly. When the drought stress was removed and restored to supply water 2 days, activities of AP, POD and CAT, ASA content, MDA level and autoxidation rate decreased gradually, but activity of SOD increased rapidly. The data suggested that the equilibrium systems of activated oxygen eliminated were destroyed in flowering Chinese cabbage leaves because of drought stress, and membrane lipid peroxidation was enhanced and the growth and development of plant was inhibited markedly.

Key words flowering Chinese cabbage; drought stress; activated oxygen metabolism; membrane lipid peroxidation