

文章编号: 1001-1498(2000) 04-0391-06

渗透胁迫和钙处理对杉木幼苗膜脂过氧化及保护酶活性的影响

苏梦云¹, 范铭庆²

(1. 中国林业科学研究院 亚热带林业研究所, 浙江 富阳 311400;

2. 福建省三明市岩前林业技术推广站, 福建 三明 365005)

摘要: 杉木幼苗用 PEG6000 渗透胁迫 (-1.5 MPa, -2.5 MPa), 在 48 h 内其叶片中 H₂O₂ 含量和 MDA 含量明显增加, H₂O₂ 含量从 35.5 μmol·g⁻¹ 分别增加到 43.0 μmol·g⁻¹ 和 48.0 μmol·g⁻¹; MDA 含量从 170.5 μmol·mg⁻¹ 分别增加到 349.5 μmol·mg⁻¹ 和 365.2 μmol·mg⁻¹, 其变化与胁迫强度成正比; 48 h 后 H₂O₂ 含量下降, 但 MDA 含量继续增加。与此同时 SOD 和 POD 活性随胁迫强度加大和胁迫时间的延长而下降, 在 -1.5 MPa 和 -2.5 MPa 下渗透胁迫 72 h, SOD 活性从 61.8 U·mg⁻¹·min⁻¹ 分别下降到 44.5、39.7 U·mg⁻¹·min⁻¹, 而 POD 活性从 34.8 U·mg⁻¹·min⁻¹ 下降到 6.2 U·mg⁻¹·min⁻¹。CAT 活性在 -1.5 MPa 和 -2.5 MPa 胁迫 24 h, 分别下降了 13.5% 和 23.8%, 随后升高。表明杉木叶片在渗透胁迫下的膜脂过氧化是由氧自由基引起的。用 CaCl₂ 溶液 (7 mmol·L⁻¹) 喷布幼苗叶片, H₂O₂ 和 MDA 的含量在渗透胁迫下增加的速率明显降低, SOD、POD 和 CAT 活性下降的速率也明显缓慢, 而且对 CAT 活性的回升有促进作用。说明 Ca²⁺ 处理在渗透胁迫下对杉木叶片的膜系统有一定的保护作用, 可能有助于提高杉木幼苗的抗旱能力。

关键词: 钙; 杉木; 渗透胁迫; 膜脂过氧化; 保护酶

中图分类号: S718.43

文献标识码: A

随着植物渗透胁迫机理研究的深入, 探索提高植物抗水分亏缺逆境能力的途径, 一直是各国科学家关注的重要问题之一, 已成为当前研究的热点^[1]。已经知道, 钙离子具有稳定膜结构、保鲜和抗衰老的作用。用 Ca²⁺ 和 GA 处理春小麦 (*Triticum aestivum* L.) 种子能提高在干旱条件下的成苗率^[2], 钙处理可降低在渗透胁迫下的细胞膜透性^[3]。表明钙离子对渗透胁迫的伤害可能有一定的缓解作用。这方面的研究正在深入, 但未见以树木为试材的研究报道。

本文以杉木 (*Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook.) 幼苗为材料, 研究渗透胁迫下的膜脂过氧化作用和体内保护酶 SOD、POD、CAT 的活性变化以及钙对它们的调节作用, 以期为提高杉木的抗旱性提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

杉木容器苗按常规方法在苗圃播种育苗, 容器 (直径 7.5 cm, 高 10 cm) 基质为黄土和沙

收稿日期: 1999-11-15

基金项目: 浙江省重点课题“杉木杂交新品种选育及其利用”(691102169) 和国家林业局岩前乡土树种苗木培育基地项目的部分内容

作者简介: 苏梦云 (1942-), 女, 福建莆田人, 副研究员。

(体积比为 1 : 1), 并含有 0.5% 的过磷酸钙。苗龄为 8 个月, 平均高为 7.52 cm, 平均地径为 0.16 cm。

1.2 实验处理

实验苗分为两组: 一组用 CaCl_2 溶液 ($7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 进行喷布处理, 以叶片湿润为度; 另一组喷水作对照。喷布处理 7 d 后将两组苗从容器中取出, 用水漂洗附着在根系上的泥土, 然后用吸水纸吸去根系表面的附着水, 晾干。同时进行根际渗透胁迫的处理, 并以未胁迫处理的土杯苗作对照。胁迫溶液是用 PEG6000 配成的 -1.5 MPa 和 -2.5 MPa 两种不同水势的溶液, 处理时间为 0、24、48、72 h, 每个处理 5 株苗。取成龄叶片, 混合制样, 进行分析测定。重复 3 次, 取平均值。实验结果经 t 检验测定其显著性。

1.3 测定方法

1.3.1 组织相对含水量 按华东师范大学生物系植物生理教研室方法^[4]。相对含水量以百分率表示。

1.3.2 过氧化氢(H_2O_2)含量 按 Patterson B D 等方法^[5]。单位含量以每克新鲜叶片所含的 H_2O_2 数(μmol)表示。

1.3.3 丙二醛(MDA)含量 按林植芳等方法^[6]。单位含量以每毫克蛋白质所含的 MDA (μmol)表示。

1.3.4 超氧化物歧化酶(SOD)活性 根据 Giannopolitis C N、Ries S R 方法^[7], 并参照王爱国等方法^[8]进行测定。酶活性以抑制氮蓝四唑(NBT)还原的 50% 为一个酶活性单位(U)。

1.3.5 过氧化氢酶(CAT)活性 按别洛杰尔斯基等方法^[9]。酶活性单位(U)以每毫克蛋白每分钟作用的 H_2O_2 (μg)表示。

1.3.6 过氧化物酶(POD)活性 基本按 Jasdanwala 等方法^[10], 以 OD 值变化 0.01 为一个酶活性单位(U)。酶活性以每毫克蛋白质每分钟所含的酶活性单位(U)表示。

1.3.7 蛋白质含量 按 Nessler 试剂比色法, 再转换成蛋白质含量。

2 结果与分析

2.1 渗透胁迫和钙处理对杉木叶片含水量的影响

在渗透胁迫下, 杉木苗叶片含水量下降, 在 -1.5 MPa 下 24 h, 叶片含水量从 73.0% 降低到 68.6%, 此后未进一步下降。但在 -2.5 MPa 下, 随着胁迫时间延长至 72 h, 叶片含水量进一步下降到 64.9%。 Ca^{2+} 处理的叶片含水量变化趋势, 与对照没有明显差别。

2.2 渗透胁迫和钙处理对杉苗叶片中 H_2O_2 含量的影响

活性氧对生物体具有毒害作用, 能诱发膜脂过氧化作用, H_2O_2 是植物体内最重要的活性氧形式之一。在渗透胁迫条件下, 杉木幼苗叶片中 H_2O_2 含量明显积累。在 -1.5 MPa (低) 胁迫条件下 48 h, 叶片中 H_2O_2 含量从 $35.5 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ 增加到 $43.0 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ 。随着胁迫强度增加到 -2.5 MPa (高), 叶片中 H_2O_2 的积累也增加, 胁迫 48 h, H_2O_2 含量增加到 $48 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$, 但随后又下降到胁迫前的水平。用 CaCl_2 溶液 ($7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 处理, 对渗透胁迫条件下的 H_2O_2 含量积累有一定的缓解作用(图 1)。

在 -1.5 MPa (低) 胁迫下 48 h, 经 Ca^{2+} 处理的叶片中 H_2O_2 含量为 $37.5 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$, 比未经 Ca^{2+} 处理的对照下降了 12.8%。差异极显著 ($P < 0.01$)。在 -2.5 MPa (高) 胁迫条件下 48

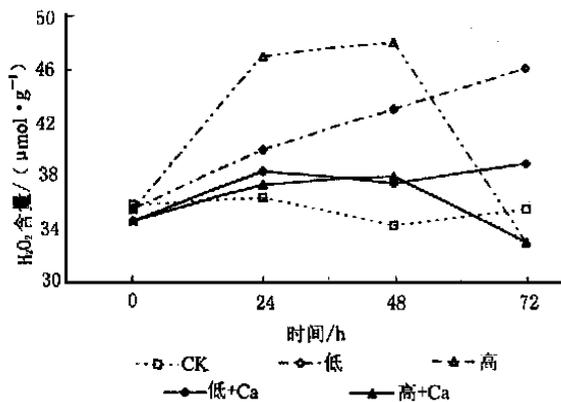


图1 渗透胁迫和钙处理对 H₂O₂ 含量的影响

钙处理可抑制在渗透胁迫下的 MDA 含量的增加速率。在 -1.5 MPa 和 -2.5 MPa 下胁迫 24 h, 经 Ca²⁺ 处理的 MDA 含量分别从未处理的 345.0 μmol·mg⁻¹ 和 346.7 μmol·mg⁻¹ 下降到 173.0 μmol·mg⁻¹ 和 229.2 μmol·mg⁻¹, 分别比未经钙处理的减少了 49.9% 和 33.9%。随着胁迫时间的延长, 钙处理的效果有所减弱, 但对生物膜仍起一定的保护作用。

2.4 渗透胁迫和钙处理对体内保护酶活性的影响

2.4.1 SOD 活性变化 杉木苗在渗透胁迫条件下, SOD 活性随胁迫时间的延长而逐渐下降。

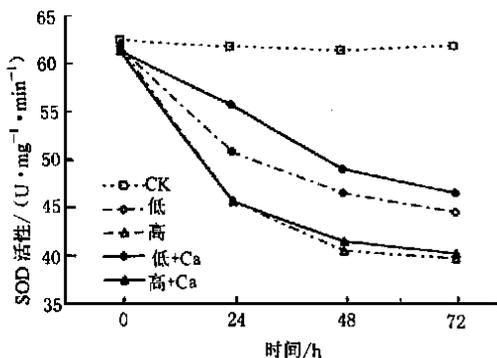


图3 渗透胁迫和钙处理对 SOD 活性的影响

h, 经 Ca²⁺ 处理的叶片中 H₂O₂ 含量下降了 20.8% ($P < 0.01$)。但胁迫 72 h, Ca²⁺ 处理已不表现缓解作用。

2.3 渗透胁迫和钙处理对杉木叶片膜脂过氧化作用的影响

MDA 是膜脂过氧化作用的主要产物之一。其含量可表示膜脂过氧化作用的程度^[11]。杉木幼苗在渗透胁迫下 MDA 含量明显增加。在 -1.5 MPa (低) 和 -2.5 MPa (高) 下胁迫 24 h, MDA 含量增加了一倍。当渗透胁迫时间延至 48 h 和 72 h 时, MDA 含量仍有所增加 (图 2)。

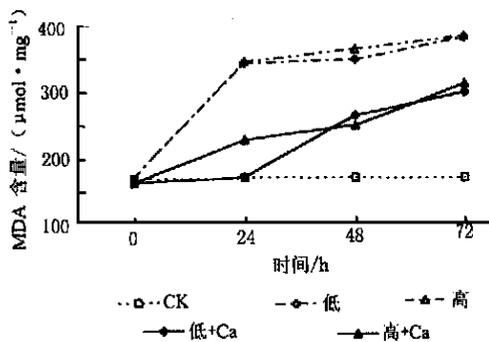


图2 渗透胁迫和钙处理对 MDA 含量的影响

这种 SOD 活性下降速率也随胁迫强度增高而加大。在 -1.5 MPa (低) 和 -2.5 MPa (高) 下胁迫 24、48、72 h, SOD 活性分别比未胁迫处理的下降了 17.8%、24.8%、28.0% 和 26.1%、34.5%、35.8%。钙处理对胁迫时 SOD 活性的下降速率有抑制作用 (图 3)。在 -1.5 MPa 下 24、48、72 h, SOD 活性只比未胁迫处理的分别下降了 9.1%、20.1%、24.1%。实际上, Ca²⁺ 处理在一定的浓度下对 SOD 活性起保护作用。在 -2.5 MPa 下, Ca²⁺ 处理未表现出保护作用。这可能与 Ca²⁺ 浓度有关。

2.4.2 CAT 活性变化 在 -1.5 MPa (低) 和 -2.5 MPa (高) 胁迫下 24 h, 杉木苗叶片中 CAT 活性分别下降了 13.5% 和 23.8%; 随后又迅速上升到胁迫前的水平。钙处理对 CAT 活性的回升表现促进作用。在胁迫 72 h 时, 经钙处理的 CAT 活性比对照增加了 70% 左右 (图

4), 差异极显著($P < 0.01$)。

2.4.3 POD 活性变化 在渗透胁迫条件下, POD 活性随胁迫的时间(24、48、72 h)的延长和强度(-1.5 MPa 和-2.5 MPa)的加大而下降。钙处理可减缓 POD 活性的下降速率, 尤其是在胁迫 24 h 后更为明显。在-1.5 MPa(低)和-2.5 MPa(高)下 48 h, POD 活性分别比未经 Ca^{2+} 处理的增加了 92.9% 和 1 倍(图 5)。胁迫 72 h 增加的效果更显著。

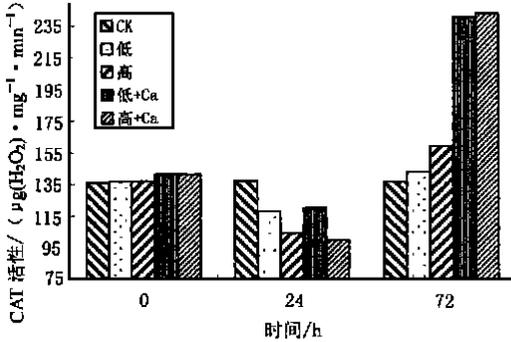


图 4 渗透胁迫和钙处理对 CAT 活性的影响

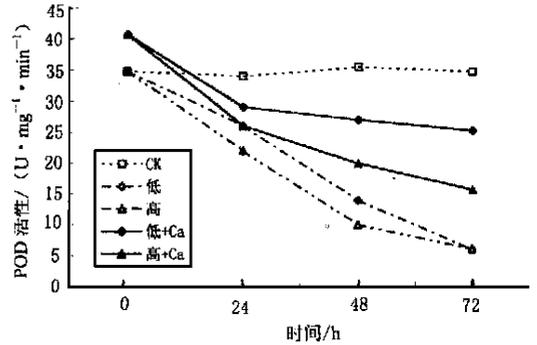


图 5 渗透胁迫和钙处理对 POD 活性的影响

3 讨论

杉木幼苗在渗透胁迫 24 h 时, 叶片中的 H_2O_2 含量迅速增加, 与此同时 MDA 含量也急剧增加。这表明杉木幼苗在渗透胁迫条件下产生了膜脂过氧化作用, 而这种膜脂过氧化作用与 H_2O_2 的积累和诱发伤害有关。这与青杨(*Populus cathayana* Rehd.) 在水分逆境下活性氧积累和 MDA 含量增加的结果相类似^[12]。

一般说来, 在水分胁迫下植物体内 SOD 活性与植物的抗氧化能力呈正相关^[13]。在多数作物中, 在水分胁迫下 SOD 活性下降。但有的作物的 SOD 活性在水分胁迫时表现先上升后下降的趋势^[14]; 也有一些作物却相反, SOD 活性随渗透胁迫时间(或强度)先下降而后回升, 出现反弹现象^[15]。杉木幼苗在渗透胁迫时, SOD 活性随胁迫的强度和时间的下降, 这与刺槐(*Robinia pseudoacacia* L.) 的结果一致^[16]。POD 的活性变化趋势同 SOD。CAT 活性在胁迫 24 h 下降, 随后又回升。这种回升现象与此时 H_2O_2 含量下降的趋势相吻合。与水稻(*Oryza sativa* L.) 中 SOD 活性的反弹现象一样^[15], 对 CAT 活性的回升机制尚不完全清楚, 有待进一步研究。从本文的试验结果看, 在渗透胁迫下杉木苗体内保护酶活性的降低, 使清除活性氧自由基的能力下降, 也是诱发膜脂过氧化作用的原因之一。说明杉木体内的保护酶系统与其抗水分胁迫能力关系密切。

通常认为 Ca^{2+} 是一种膜的保护剂。本试验中杉木幼苗用 Ca^{2+} 处理可减缓叶片在渗透胁迫下的膜脂过氧化速率。表明 Ca^{2+} 对生物膜有一定的保护作用。 Ca^{2+} 对保护酶活性也有一定促进作用。适当的 Ca^{2+} 溶液喷布或浇根能提高小麦叶片中的 SOD 活性^[17]。本试验中得到, Ca^{2+} 处理能提高杉木幼苗叶片在渗透胁迫条件下的 SOD 和 POD 活性, 从而减缓了渗透胁迫使酶活性下降的速率; 同时对 CAT 活性在渗透胁迫条件下的回升, 也有明显的促进作用。表明 Ca^{2+} 处理对 SOD、POD 和 CAT 活性具有调节作用, 有助于提高对水分逆境的适应能力。 Ca^{2+} 处理需要适当的浓度, 浓度过高或处理时间过长对 SOD 活性的调节没有效果或产生负效

应^[17]。杉木在 -2.5 MPa 下, Ca^{2+} 处理不表现对SOD活性的调节作用,可能与 Ca^{2+} 的浓度不当有关。但是,适当的 Ca^{2+} 处理技术有可能成为提高植物抗旱性的一个调节途径。

参考文献:

- [1] 汤章城. 植物对渗透和淹水胁迫的适应机理[A]. 见: 余叔文主编. 植物生理与分子生物学[M]. 北京: 科学出版社, 1992. 404~416.
- [2] 郭礼坤, 徐萌, 山仑. 干旱条件下钙与赤霉素混合处理种子的增产效果[J]. 华北农学报, 1990, 5(增刊): 118~121.
- [3] 杨根平, 高爱丽, 荆家海. 钙与渗透胁迫下大豆细胞透性的关系[J]. 植物生理学通讯, 1993, 29(3): 179~181.
- [4] 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, 2~5.
- [5] Patterson B D, Mackae E A, Fegusen I B. Estimation of hydrogen peroxide in plant extracts using Titanium () [J]. Anal Biochem, 1984, 139: 487~492.
- [6] 林植芳, 李双顺, 林桂珠. 水稻叶片的衰老与超氧化物歧化酶及脂质过氧化作用的关系[J]. 植物学报, 1984, 26: 605~615.
- [7] Giannopolitis C N, Ries S K. Superoxide dismutase I. Occurrence in higher plants[J]. Plant Physiol, 1977, 59: 309~314.
- [8] 王爱国, 罗广华, 邵从本, 等. 大豆种子超氧化物歧化酶的研究[J]. 植物生理学报, 1983, 9(1): 77~84.
- [9] 别洛杰尔斯基, 普洛斯库利亚科夫. 植物生物化学实验指导[M]. 曹宗翼等译. 北京: 高等教育出版社, 1956, 303~306.
- [10] Jasdanwala R T, Singh Y D, Chiony J J. Auxin metabolism in developing cotton hairs [J]. J Exp Bot, 1977, 28: 1111~1116.
- [11] Placer Z A, Cushman L L, Johnson B C. Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems [J]. Anal Biochem, 1966, 16: 359~364.
- [12] 孙昌祖. 渗透胁迫对青杨叶片氧自由基伤害及膜脂过氧化的影响[J]. 林业科学, 1993, 29(2): 104~109.
- [13] 蒋明义, 郭绍川. 水分亏缺诱导的氧化胁迫和植物的抗氧化作用[J]. 植物生理学报, 1996, 32(2): 144~150.
- [14] 蒋明义, 荆家海, 王韶唐. 渗透胁迫对水稻膜脂过氧化作用及体内保护系统的影响[J]. 植物生理学报, 1991, 17(1): 80~84.
- [15] 姚允聪, 曲泽洲, 李树仁. 土壤干旱与柿叶膜脂过氧化的关系[J]. 林业科学, 1993, 29(6): 485~491.
- [16] 沈惠娟, 曾斌. 渗透胁迫下多效唑对刺槐幼苗体内多胺、脯氨酸和保护酶系统的影响[J]. 植物生理学报, 1993, 29(1): 53~60.
- [17] 韩阳, 李珍珍, 刘坤荣. CaCl_2 对小麦叶片超氧化物歧化酶活性的影响[J]. 植物生理学通讯, 1996, 32(2): 125.

Effect of Osmotic Stress and Calcium Treatment on Membrane-lipid Peroxidation and Protective Enzyme in Chinese Fir Seedling

SU Meng-yun¹, Fan Ming-qing²

(1. Research Institute of Subtropical Forestry, CAF, Fuyang 311400, Zhejiang, China;

2. Yanqian Forestry Extension Station of Sanming City, Fujian Province, Sanming 365005, Fujian, China)

Abstract: The effects of osmotic stress induced by PEG (-1.5 MPa, -2.5 MPa) on hydrogen peroxide (H_2O_2) content, membrane-lipid peroxidation and activities of superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD) and catalase (CAT) in leaves of Chinese fir (*Cunninghamia lanceolata*) were studied. The results showed that malondialdehyde (MDA) content increased and activities of SOD and POD decreased with osmotic stress time (24, 48, 72 h) and osmotic stress strength (-1.5 MPa, -2.5 MPa), but H_2O_2 content increased for 48 h then fell and CAT activity decreased for 24 h then raised under osmotic stress (-2.5 MPa). When seedlings were sprayed with $CaCl_2$ ($7\text{ mmol} \cdot L^{-1}$) solution, raising rates of contents of H_2O_2 and MDA, and decreasing rates of activities of SOD and POD obviously slowed down, respectively. CAT activity quickly raised after it decreasing under osmotic stress, when seedlings were sprayed with $CaCl_2$ solution.

Key words: calcium; Chinese fir; osmotic stress; membrane-lipid peroxidation; protective enzyme