

文章编号: 1001-1498(2002)02-0197-06

# 低温胁迫对喜树幼苗 SOD 活性、MDA 和脯氨酸含量的影响

冯建灿<sup>1</sup>, 张玉洁<sup>2</sup>, 杨天柱<sup>3</sup>

(1. 河南农业大学林学院园艺学院, 河南 郑州 450002; 2. 河南省林业技术推广站, 河南 郑州 450008;

3. 河南省南阳市林业技术推广站, 河南 南阳 473056)

**摘要:** 本文对低温胁迫下喜树幼苗叶片内超氧化物歧化酶(SOD)活性与叶绿素、游离脯氨酸、丙二醛(MDA)含量的变化进行了研究。结果表明:喜树幼苗经低温胁迫后叶内叶绿素含量下降;SOD活性先下降、后上升、再下降,其变化规律不同于其它植物;低温造成喜树幼苗的膜脂过氧化,MDA含量明显升高,SOD活性的增强可以降低MDA的含量;脯氨酸随着胁迫的进行其含量升高,表明叶内脯氨酸的升高也有助于提高它的抗寒性,进一步可以认为叶片内脯氨酸含量的高低可作为衡量喜树抗寒性指标。

**关键词:** 喜树;超氧化物歧化酶(SOD);叶绿素;丙二醛(MDA);脯氨酸;低温胁迫

**中图分类号:** Q945.78

**文献标识码:** A

喜树(*Camptotheca acuminata* Dence.)属珙桐科(Nyssaceae)旱莲属(*Camptotheca*)植物,落叶乔木。Monroe E. Wall从喜树的皮中分离出喜树碱(Camptothecin, CPT),经肿瘤试验证明这种色氨酸-萜烯类生物碱具有抗癌活性<sup>[1]</sup>,从而引起了人们的广泛关注。70年代初用CPT进行人体胃肠癌的实验性治疗,对部分病人的症状有所缓解。由于CPT的毒性和令人难以忍受的副作用如恶心、呕吐,以及制成水溶性的钠盐后抗癌活性降低等原因,使试验受阻,CPT的研究由此进入低潮阶段。Y. H. Hsiang发现CPT能阻断拓扑异构酶(topoisomerase, topo)的合成,说明CPT的作用靶是topo而不是拓扑异构酶(topo),这正是CPT独特的抗癌机理<sup>[2]</sup>。这一发现掀起了喜树与CPT研究的新高潮。进入90年代后,美国、日本、加拿大和英国等国家投入大量的人力、物力进行喜树研究和CPT的开发。使喜树成为继红豆杉(*Taxus* spp.)之后第二个重要的木本抗癌药用植物,已成为世界性热门研究课题。

科学研究工作者对喜树和喜树碱进行了多方面的研究<sup>[3]</sup>,主要集中在喜树体内生物活性成分的分析、分离与鉴定,喜树碱在喜树体内的含量与分布规律,喜树碱及其类似物的提取、分离与生产工艺,人工合成喜树碱及其类似物,但对于喜树的基础生理代谢以及生态因子胁迫对它的影响方面还没有相关的报道。对喜树在低温胁迫下保护系统的反应的研究可为喜树药用林定向培育和工厂化生产提供理论依据和实验基础,帮助我们获取更多的喜树碱,为此对此进行了初步研究。

收稿日期: 2000-10-08

基金项目: 河南农业大学与美国路易斯安那州州立大学农业中心合作研究项目(970001)

作者简介: 冯建灿(1963-),男,河南新密人,副教授,博士。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

将1年生喜树苗于根颈处剪去上部,洗净泥土,植入500 mL培养瓶中,培养液为1/4 Arnon全营养液,常温下室内培养,每天用市售加气机向营养液中充气2次,每次10 min。7 d左右开始抽生新根,萌芽,试验期间苗木生长正常。

### 1.2 研究方法

所用苗木为1年生平茬水培苗。平茬后30 d,苗高25 cm左右时开始进行处理。

低温处理在人工气候箱内进行,设8 ℃和4 ℃2组处理,以25 ℃为对照,相对湿度85%,光源为气候箱自带日光灯管,有效辐射强度为 $76 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 。每处理4瓶,重复3次,分别在低温处理的第0、0.5、3、7、10 d采摘中部叶片,测定各项生理指标。

8 ℃处理的初始温度为常温(25 ℃左右),利用人工气候箱的自动降温装置,经3 h降至8 ℃。4 ℃处理的初始温度亦为常温,先降至8 ℃,经过12 h锻炼,然后再在2 h内降至4 ℃。

### 1.3 分析测定方法

叶绿素测定:采用分光光度计法,叶绿素用96%乙醇提取。

游离脯氨酸含量测定:测定采用磺基水杨酸提取,茚三酮比色方法进行<sup>[4]</sup>。

超氧化物歧化酶(SOD)活性测定:依据SOD抑制NBT(氮蓝四唑)在光下的还原程度来确定SOD活性的大小。活性单位以抑制NBT光化还原的50%为一个酶活性单位(u)。具体测定及计算方法见参考文献<sup>[4]</sup>。

丙二醛(MDA)含量测定:采用硫代巴比妥酸法<sup>[5]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 低温对叶绿素含量的影响

叶片中叶绿素的含量可在一定程度上反映叶片的光合能力。与对照(25 ℃)相比,4 ℃和8 ℃低温胁迫使喜树叶片的叶绿素含量显著降低。对照的叶绿素含量基本保持不变,胁迫至第7 d时叶绿素的含量分别降低了23.61%(4 ℃)和22.49%(8 ℃)。两种低温间叶绿素的含量有一定差异,但经方差分析差异没有达到显著水平。

从图1可以看出,4 ℃和8 ℃处理对叶

片中叶绿素含量的影响基本一致,均为逐渐下降,但4 ℃的下降速度明显快于8 ℃的速度。8 ℃低温胁迫的前3 d,叶绿素含量变化为缓慢下降;此后的下降速度较快。这说明喜树这种原产长江流域的亚热带树种只能忍耐较短时间的低温。

### 2.2 低温对SOD活性的影响

与对照相比,低温胁迫使叶片中SOD活性发生了显著变化,但变化规律相似(图2),均为先下降,然后上升,此后又下降。

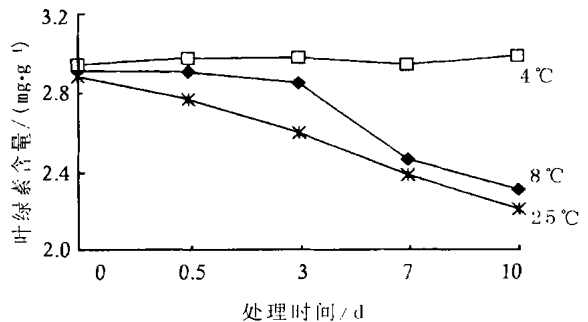


图1 低温胁迫对喜树叶内叶绿素含量的影响

4 胁迫下 SOD 活性变化剧烈, 0.5 d 即降至最低值, 酶活性降低了 55.8% (降低量为  $372.7 \text{ u g}^{-1}$ )。而 8 胁迫下, SOD 活性变化较为平稳且变幅较小, 到第 3 d 酶活性才出现最低值, 活性仅降低了 16.2% ( $118.9 \text{ u g}^{-1}$ )。两种处理的 SOD 活性于第 7 d 回升到较高水平, 此后又有所下降。

### 2.3 低温对叶内 MDA 含量的影响

与对照相比, 低温胁迫使叶片内 MDA 的含量增加。由图 3 可知, 无论是 4 还是 8 的低温胁迫, 胁迫结束时细胞内 MDA 的含量、整个胁迫过程中的各次测定结果均较胁迫开始时细胞内 MDA 的含量要高。第 7 d 时, 4 使细胞内 MDA 含量增加 48.32%, 8 处理使细胞内 MDA 增加了 29.82%。两种温度胁迫对喜树的影响规律相似。4 处理的影响大于 8 的处理。首先 4 胁迫下 MDA 的含量上升迅速, 0.5 d 即接近最大值; 而 8 胁迫则缓慢上升, 至第 7 d 达到最大值。其次是 MDA 的含量水平, 4 胁迫条件下 MDA 的含量始终高于同时期 8 处理的含量水平。表明 4 造成更强的脂质过氧化作用, 产生的超氧自由基要多, 这与 SOD 活性的变化规律相吻合。

尽管两种处理对细胞内 MDA 含量的影响结果相同, 但 MDA 含量的变化过程却不相同。低温胁迫的初始阶段, 4 胁迫使细胞内 MDA 的含量快速增加, 在 12 h (0.5 d) 时达到一峰值。8 胁迫下细胞内 MDA 的含量只是缓慢增加, 前 3 d 的增幅不大, 到第 7 d 才达到高值。此后, 两种处理条件下细胞内 MDA 含量均有所下降, 这是由于喜树对低温环境逐步适应的结果。

### 2.4 低温对脯氨酸含量的影响

由图 4 看出, 与对照相比, 低温胁迫使喜树叶内脯氨酸的含量逐步升高。4 与 8 的低温胁迫条件下, 叶片内脯氨酸含量的变化规律基本一致。不同的是, 4 胁迫引起的变化更为剧烈, 胁迫后 12 h (0.5 d) 即出现一个峰值, 含量增加达 75.9%; 而 8 的胁迫直到第 3 d 才达到最大值, 脯氨酸含量增加 54.1%。在 4 胁迫下, 脯氨酸在高水平维持时间较长, 而 8 处理的高峰期则较短。

低温对叶片内脯氨酸含量有较大的影

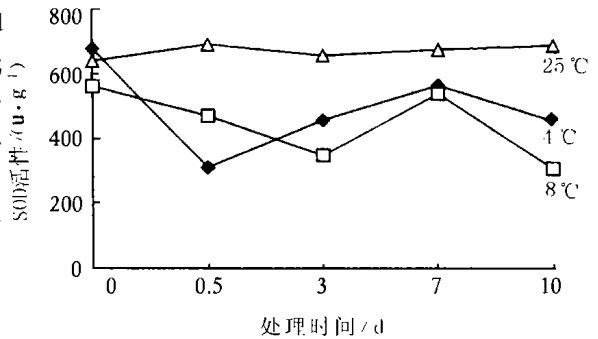


图 2 低温胁迫对喜树叶内 SOD 活性影响

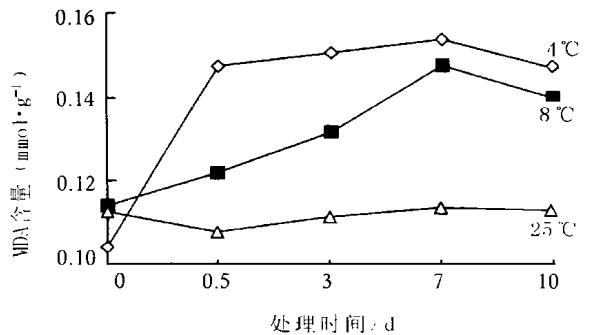


图 3 低温胁迫对喜树叶内 MDA 含量的影响

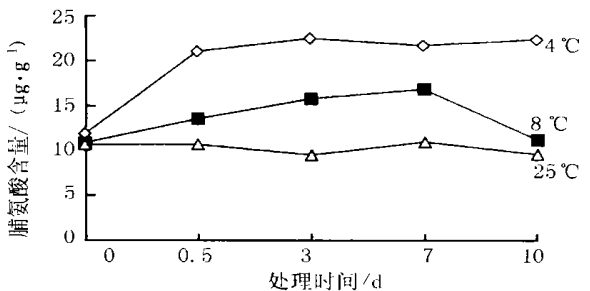


图 4 低温胁迫对喜树叶内脯氨酸含量的影响

响,短时间内使脯氨酸含量提高,随着胁迫时间的延长,脯氨酸含量会逐渐恢复到原来的水平,这是由于喜树逐渐对低温环境适应的结果。这反映出植物对低温的抵抗能力可以通过逐渐锻炼得以提高。

## 2.5 低温下喜树叶片内 SOD 活性与 MDA、脯氨酸含量关系

低温胁迫对喜树叶片内的 SOD 活性、MDA 和脯氨酸含量均产生了一定的影响,三者间的关系如图 5、6。

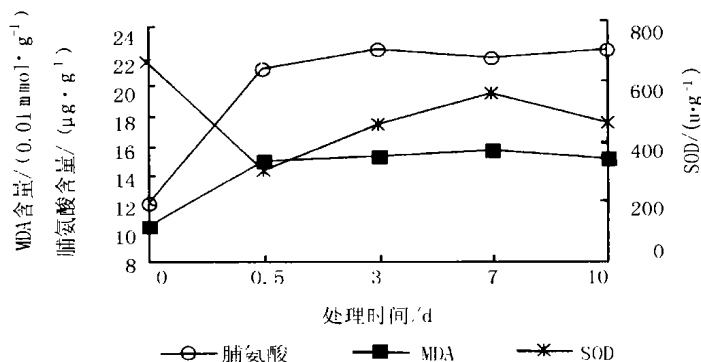


图 5 4 胁迫下喜树叶内 SOD 活性、MDA、脯氨酸含量间关系

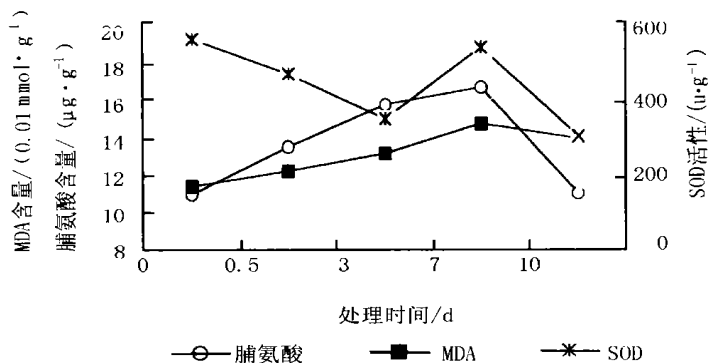


图 6 8 胁迫下喜树叶内 SOD 活性、MDA、脯氨酸含量间关系

从图 5、6 可见,细胞内 SOD 活性的变化与 MDA 和脯氨酸含量变化存在着一定的相关性,无论是在 4 还是 8 胁迫下,0.5 d 的胁迫使 SOD 活性降低,同时伴有 MDA 和脯氨酸含量上升,此后 SOD 活性逐步上升,MDA 和脯氨酸含量则有所降低。再进一步延长胁迫时间,SOD 活性和 MDA 与脯氨酸含量则都迅速下降,这表明喜树的防御系统已受到较严重的危害。

## 3 小结与讨论

(1) 低温使喜树叶片内叶绿素含量持续下降。这与杨阿明<sup>[15]</sup>对黄瓜 (*Cucumis sativus* Lin. in.) 的研究结果一致,表明喜树叶片内叶绿素对低温的胁迫比较敏感。

(2) 低温能增加植物体内 O<sub>2</sub> 等活性氧含量,降低 SOD 活性,膜脂过氧化作用加强<sup>[7]</sup>,这在香蕉 (*Musa nana* Lour.) 和大蕉 (*Musa sapientum* L.)<sup>[8]</sup>、栌树 (*Koelreuteria paniculata* Laxm.)<sup>[9]</sup>、黄

瓜<sup>[10]</sup>等多种植物上得到证实。但 SOD 活性的变化规律则不一致,一种结论是 SOD 活性随着温度降低而逐步降低,另一种则认为在临界温度之上时,SOD 活性逐步升高,达到临界温度时则迅速下降<sup>[11]</sup>。喜树在低温条件下 SOD 的活性表现为先下降,后上升,然后再下降,与上述两种意见不甚相同。

SOD 是植物本身应具备的一种保护酶,短时间的低温处理能使喜树叶片内 SOD 活性上升,这表明 SOD 是一种诱导酶。罗广华<sup>[12]</sup>研究表明高氧能使大豆(*Glycine max* (Linn.) Merr.) 幼苗细胞内  $O_2^-$  产生速度增加,同时又使幼苗内 SOD 活性水平提高,以减轻  $O_2^-$  伤害,这也说明高氧能诱导 SOD 酶的产生。2 贮藏芒果(*Mangifera indica* L.),前期 SOD 活性呈下降趋势,此后逐渐上升,随着冷害的加剧,SOD 也受到伤害,活性下降<sup>[13]</sup>的结果与喜树在低温条件下 SOD 活性的变化相似。

(3)MDA 含量是细胞膜脂质过氧化作用水平的反映<sup>[7]</sup>。低温胁迫使喜树叶片内 MDA 含量增加,这表明喜树在低温胁迫时产生了膜脂氧化作用。

(4)脯氨酸也被认为是植物在逆境胁迫下的产物<sup>[14]</sup>。喜树在低温胁迫下,叶片内脯氨酸表现出升高趋势,这表明脯氨酸的含量的高低与喜树处于逆境下保护性或有害物质的产生有关脯氨酸升高的生理作用尚不清楚。有报道认为在干旱胁迫下脯氨酸的升高有利植物对干旱胁迫的抵抗<sup>[14]</sup>。由此可以认为低温胁迫下喜树叶内脯氨酸的升高也有助于提高它的抗寒性,因此可以认为叶片内脯氨酸含量的高低可作为衡量喜树的抗寒性指标。

伴随着 SOD 活性的变化,细胞内的 MDA、脯氨酸含量也发生相应的变化,SOD 活性与 MDA、脯氨酸含量之间存在着一定程度的负相关,这表明较高的 SOD 活性能够抑制膜脂质过氧化作用,使 MDA 含量保持在较低水平。随着胁迫的加深,氧自由基的积累,从而使膜系统的脂质过氧化作用增强,MDA 含量也随之升高。这表明低温降低了保护酶的活性,对生物膜造成了一定的伤害。

## 参考文献:

- [1] Wall M E, Wani M C, Cook C E, et al. Plant antitumor agent, I. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata* [J]. J Amer Chem Soc, 1966, 88:3880~3890
- [2] Hsiang Y, Liu L F. Identification of Mammalian DNA topoisomerase I as an intracellular target of the anti-cancer drug camptothecin [J]. Cancer Research, 1988, 48: 1722~1726
- [3] 冯建灿,张玉洁,谭运德,等. 喜树与喜树碱开发利用进展[J]. 林业科学,2000,36(5): 100~108
- [4] 邹琦. 植物生理生化实验指导[M]. 北京:中国农业出版社,1995
- [5] 林植芳. 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[J]. 植物学报,1984,26(6):605~619
- [6] Liu Z, John Adams. Camptothecin yield and distribution within *Camptotheca acuminata* trees cultivated in Louisiana [J]. Can J Bot, 1996, 74:36~365
- [7] 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,(1):1~7
- [8] 周碧燕,梁立峰,黄辉白,等. 低温和多效唑对香蕉及大蕉超氧化物歧化酶和脱落酸的影响[J]. 园艺学报,1995,22(4):331~335
- [9] 刘西平,胥耀平,王妹清,等. 低温对栎树幼苗衰老与脂质过氧化关系[J]. 西北林学院学报,1995,10(4):72~75
- [10] 刘鸿先,曾韶西,王以柔,等. 低温对不同耐寒力的黄瓜幼苗子叶各细胞器中 SOD 的影响[J]. 植物生理学报,1985,(1):48~57

- [11] 石雪晖,陈祖玉,杨会卿,等. 低温胁迫对柑桔离体叶片中 SOD 及其同工酶活性的影响[J]. 园艺学报,1996,23(4):384~386
- [12] 罗广华,王爱国,郭俊彦. 几种外源因子对大豆幼苗 SOD 活性的影响[J]. 植物生理学报,1990,16(3):239~244
- [13] 王燕,节雪萍,季作梁. 芒果冷害对两种自由基清除剂的影响[J]. 园艺学报,1995,22(3):235~239
- [14] 汤章诚. 逆境条件下植物脯氨酸的累积及可能意义[J]. 植物生理学通讯,1984,(1):15~27
- [15] 杨阿明,沈征言. 低温锻炼提高黄瓜幼苗耐寒性效应[J]. 园艺学报,1992,19(1):61~66

## Effect of Low Temperature Stress on the Membrane-lipid Peroxidation and the Concentration of Free Proline in *Camptotheca acuminata* Seedling

FENG Jiarcan<sup>1</sup>, ZHANG Yurjie<sup>2</sup>, YANG Tianzhu<sup>3</sup>

(1. Forestry and Horticultural College, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, Henan, China;

2. Forestry Technique Extension Station of Henan Province, Zhengzhou 450008, Henan, China;

3. Nanyang Forestry Technique Extension Station of Henan Province, Nanyang 473056, Henan, China)

**Abstract :** The activity of superoxide dismutase (SOD) and the concentration of chlorophyll, free proline (Pro), and malondialdehyde (MDA) of *Camptotheca acuminata* seedling under low temperature stress were studied. The results are as follows. The low temperature stress (4 and 8 ) decreased the concentration of chlorophyll. The SOD activity became lower at the beginning of stressing and higher later on. After 7 days' stressing, SOD activity became higher comparing to the former phase. This was quite different from other plant's reaction. With the stressing, the concentration of MDA became higher. At the same time, the concentration of Pro was also higher and higher. The results also show that there was a negative relationship between the SOD activity and the concentration of MDA and Pro. The concentration of MDA and Pro can be used as indexes to show how the seedling can endure the cold.

**Key words :** *Camptotheca acuminata*; superoxide dismutase (SOD); chlorophyll; malondialdehyde (MDA); proline; low temperature stress