

水分胁迫对黄檗幼苗保护酶活性及脂质过氧化作用的影响*

李霞^{1,2} 阎秀峰^{1**} 于涛¹

(¹ 东北林业大学生命科学学院, 哈尔滨 150040; ² 吉林师范大学生命科学学院, 四平 136000)

【摘要】 以轻度干旱、重度干旱和水涝处理黄檗幼苗, 测定丙二醛(MDA)和游离脯氨酸含量及超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)活性的动态变化。结果表明, 处理 40 d 以后, 轻度干旱、重度干旱和水涝处理的叶片 MDA 含量始终显著高于对照, 最高分别达对照的 2.49、2.37 和 4.12 倍, 三者之间在处理 80 d 以后 MDA 含量差异不显著。水涝处理和对照的游离脯氨酸含量在处理期间没有明显变化, 干旱处理的游离脯氨酸含量从处理后 40 d 开始增加, 80 d 后回落, 重度干旱处理的增加幅度显著大于轻度干旱处理。SOD、POD 和 CAT 活性的变化趋势缺乏一致性, 但重度干旱处理的黄檗幼苗, 叶片的 SOD、POD 和 CAT 活性在处理期间始终显著高于轻度干旱、水涝处理和对照。

关键词 水分胁迫 黄檗 保护酶 脂质过氧化
文章编号 1001 - 9332(2005)12 - 2353 - 04 **中图分类号** Q945.79 **文献标识码** A

Effects of water stress on protective enzyme activities and lipid peroxidation in *Phellodendron amurense* seedlings. LI Xia^{1,2}, YAN Xiufeng¹, YU Tao¹ (¹ College of Life Science, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China; ² School of Life Science, Jilin Normal University, Siping 136000, China). -Chin. J. Appl. Ecol., 2005, 16(12): 2353 ~ 2356.

This paper studied the effects of water stress on the dynamic variations of malondialdehyde (MDA) and free proline contents, and of superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD) and catalase (CAT) activities in *Phellodendron amurense* seedlings. The results showed that after treated with light drought, heavy drought and waterlogging for 40 days, the MDA content in corktree seedlings was significantly higher, being 2.49, 2.37 and 4.12 times of the control, respectively, but after treated for 80 days, there was no significant difference among the three treatments. The free proline content had no obvious variation under waterlogging and in the control, but increased after 40 days of light and heavy drought while declined after 80 days of drought stresses, with the increment being higher under heavy drought than under light drought. No regularity was found for the dynamic variations of SOD, POD and CAT activities, but they were significantly higher under heavy drought than under light drought, waterlogging, and the control.

Key words Water stress, *Phellodendron amurense*, Cell protective enzyme, Lipid peroxidation.

1 引言

水分条件是植物生长的重要环境因子之一, 影响着植物形态、生理生化代谢及地理分布范围^[5,9,17,19]。水分胁迫是各种胁迫环境中最常见、最普遍的逆境因子之一。植物对土壤水分胁迫的响应包含着极其复杂的生理生化变化, 并形成了受遗传性制约的适应机制^[6,11,15,21]。植物体在代谢过程中可通过多种途径产生超氧阴离子($\cdot O_2$)、羟自由基($\cdot OH$)、过氧化氢(H_2O_2)和单线态氧(1O_2)等, 统称为活性氧。在正常情况下, 植物细胞中产生的活性氧与其清除系统保持平衡。当植物受到水分胁迫时, 干扰了植物细胞中活性氧产生与清除之间的平衡, 引发膜脂过氧化作用^[12,20]。植物体在长期进化过程中形成了酶促和非酶促两大类保护系统以清除活性

氧, 减轻或避免活性氧对细胞造成的伤害, 如超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)等抗氧化酶类和脯氨酸等渗透调节物质。这些抗氧化酶系的表达量和渗透调节物质的积累量与植物对逆境胁迫的抗性具有相关性, 最终体现为植物对水分胁迫的适应或产生抗性^[10,18]。近年来, 关于红松、白桦和杨树等的研究工作, 使水分胁迫下活性氧对植物伤害及植物防御系统反应的研究不断深入^[8,22~24]。

黄檗(*Phellodendron amurense*)为芸香科黄檗属植物, 是东北地区的珍贵用材树种, 也是我国名贵中药黄柏的药源植物, 在东北林区的天然林中具有

*国家自然科学基金项目(30271045)和黑龙江省杰出青年基金资助项目(JC-02-11)。

**通讯联系人。

2005 - 03 - 14 收稿, 2005 - 05 - 23 接受。

特殊地位,主要分布于我国大兴安岭以东(黑龙江、吉林、辽宁、内蒙古、河北等省),为国家二级保护植物. 本研究通过改变土壤含水量,以干旱和水涝环境处理黄檗幼苗,旨在弄清水分胁迫条件下黄檗幼苗的脂质过氧化作用及保护酶活性的变化规律,探讨黄檗对水分的生理生态适应性,为黄檗的资源保护、确定人工栽培驯化的环境条件提供基础资料.

2 材料与方法

2.1 试验处理

实验在吉林省四平市的吉林师范大学温室内进行(43° 9 N,124° 20 E,海拔高度 169 m). 黄檗种子于 0~5℃ 冰箱内沙藏 3 个月 after 在温室中播种育苗,其后移栽进行水分胁迫处理. 黄檗幼苗的水分处理采用崔晓阳等^[5]的池栽法和渗灌控水方式. 将育好的黄檗幼苗移栽于长 4 m、宽 1.2 m、深 0.35 m 的处理土壤池(划分为 4 个小池)中,株、行距均为 15 cm,每池约 200 株黄檗幼苗. 水分处理设对照、轻度干旱、重度干旱和水涝 4 种,土壤水势分别控制在 - 20~-40 kPa、- 60~-80 kPa、< - 80 kPa 和 0~-20 kPa,每处理重复 5 次(5 小池),按随机区组排列. 控水 120 d.

2.2 测定方法

于 2004 年 6 月 10 日开始控水处理至 10 月 8 日,每隔 20 d 于 8:00~9:00 从幼苗顶端取完全展开的成熟叶片测定各指标,共取样 7 次. 各处理分别在每个重复池内生长正常的黄檗幼苗中随机抽取 1 株,重复 5 次. SOD 活性测定采用氮蓝四唑(NBT)法,以单位时间内抑制光化还原 50% 的氮蓝四唑为一个酶活性单位 U^[13];CAT 活性采用高锰酸钾滴定法测定,以每毫克蛋白每分钟作用的 H₂O₂ (μg) 表示^[16];POD 活性采用愈创木酚法测定,以每分钟内 A₄₇₀ 变化 0.01 为 1 个过氧化物酶活性单位 U^[11];游离脯氨酸含量的测定为磺基水杨酸法^[28];MDA 采用以 pH 7.5 的 50 mmol L⁻¹ 磷酸缓冲液于冰浴中研磨提取方法^[28],752 型紫外可见分光光度计测定吸光值. 测定重复 3 次.

所得数据用 SAS Ver 8.1 for Windows 进行数学统计分析,多重比较采用 Duncan 法.

3 结果与分析

3.1 黄檗幼苗叶片中 MDA 含量的变化

表 2 水分胁迫下黄檗幼苗叶片的 SOD、POD 和 CAT 活性

处理时间 Treatment time (d)	SOD 活性				POD 活性				CAT 活性			
	SOD activity(U·g ⁻¹ FW)				POD activity(U·g ⁻¹ FW)				CAT activity(mg H ₂ O ₂ ·g ⁻¹ protein·min ⁻¹)			
	CK	LD	HD	WL	CK	LD	HD	WL	CK	LD	HD	WL
20	316.20b	275.97c	386.19a	258.24c	936.55a	551.42b	584.44b	175.19c	0.517c	0.676ab	0.691a	0.501c
40	214.00b	193.88c	286.95a	186.18c	1175.04c	1841.93b	2289.40a	379.35d	0.669c	0.512d	1.178a	0.914b
60	209.97c	287.48b	422.67a	305.46b	669.18c	1205.19b	1875.82a	666.28c	0.624c	0.351d	0.880a	0.690b
80	195.13d	243.45c	389.64a	305.21b	859.49c	948.29b	1683.74a	768.38d	0.538c	0.462d	0.708a	0.640b
100	175.21c	207.13b	330.40a	222.01b	819.90c	1123.33b	2213.97a	675.81d	0.439c	0.474c	0.764a	0.536b
120	193.04cd	203.11c	389.82a	299.42b	2041.11b	2047.16b	2768.50a	1008.04c	1.087c	1.114b	1.274a	1.289a

由表 1 可见,在水分处理初期(20 d),无论是干旱、水涝处理还是对照处理,黄檗幼苗叶片中的 MDA 含量都呈上升趋势,其中水涝处理的 MDA 含量增加最明显,显著高于其它处理($P < 0.01$). 其后,所有处理幼苗叶片的 MDA 含量都明显降低. 处理 80 d 以后,干旱胁迫 MDA 含量趋于稳定上升的趋势,轻度干旱、重度干旱和水涝处理的 MDA 含量均显著高于对照($P < 0.01$),但 3 个处理间的 MDA 含量差异不显著.

表 1 水分胁迫下黄檗幼苗叶片的 MDA 和游离脯氨酸含量
Table 1 Content of MDA and free proline in the leaves of corktree seedlings under water stress

处理时间 Treatment time (d)	MDA 含量				游离脯氨酸含量			
	MDA content (nmol·g ⁻¹ FW)				Free proline content (μg·g ⁻¹ FW)			
	CK	LD	HD	WL	CK	LD	HD	WL
20	5.73c	9.13b	6.47c	13.21a	27.95a	25.67a	26.76a	8.63b
40	2.49c	3.70b	3.53b	6.13a	21.91c	25.78b	58.62a	9.49d
60	3.02c	8.17a	8.46a	4.63b	71.31b	59.89c	380.35a	8.64d
80	2.68b	6.86a	6.41a	6.52a	207.50c	354.82b	1143.96a	50.67d
100	2.56b	8.74a	9.09a	8.47a	33.30c	274.23b	788.04a	29.08c
120	2.17c	8.49a	9.19a	7.75a	120.95c	162.91b	291.51a	87.03d

CK:对照 Control;LD:轻度干旱 Light drought;HD:重度干旱 Heavy drought;WL:水涝 Waterlogging. 同一行数据中字母不同者表示差异显著($P < 0.05$) Data with different letters are significantly different ($P < 0.05$) in the same column. 下同 The same below.

3.2 黄檗幼苗叶片中脯氨酸含量的变化

由表 1 可以看出,水涝处理和对照处理黄檗幼苗叶片中游离脯氨酸的含量在整个处理过程中没有显著的变化,重度干旱和轻度干旱的游离脯氨酸含量分别在处理 40 d 和 60 d 以后开始显著增加,并均在处理 80 d 以后开始回落. 重度干旱处理的游离脯氨酸含量的最大值显著高于轻度干旱处理和对照($P < 0.01$),而轻度干旱处理与对照之间差异较小($P < 0.05$).

3.3 黄檗幼苗叶片中保护酶活性的变化

由表 2 可以看出,重度干旱处理的黄檗幼苗叶片 SOD 活性始终显著高于其他处理($P < 0.01$),轻度干旱和水涝处理在处理 40 d 以后也高于对照.

处理 20 d 以后的黄檗幼苗叶片 POD 活性为重度干旱处理始终高于其他各处理($P < 0.01$),轻度

干旱处理高于对照和水涝处理 ($P > 0.05$),而水涝处理始终处于最低水平.

重度干旱处理、水涝处理和对照的黄檗幼苗叶片的 CAT 活性在处理第 40 天时呈现一个峰值,其后回落,并且在处理后期再度明显增加.轻度干旱处理的 CAT 活性变化趋势与前三者类似,只是峰值在处理 20 d 出现.重度干旱处理的 CAT 活性始终高于其他各处理,水涝处理也基本维持在高于对照的水平,只有轻度干旱处理的 CAT 活性从处理 40 d 以后低于对照(表 2).

3.4 水分胁迫下黄檗幼苗保护酶活性与 MDA 及游离脯氨酸含量的相关性

由表 6 可见,轻度干旱、重度干旱处理的 MDA 含量与 SOD、POD、CAT 活性和脯氨酸含量都为正相关关系,而水涝处理均为负相关关系,但相关性均未达到显著水平.轻度干旱处理的脯氨酸含量与 POD 和 CAT 活性为正相关关系,但与 SOD 活性为负相关关系.重度干旱处理的脯氨酸含量与 CAT 活性呈负相关关系,而与 SOD、POD 活性呈正相关关系,但也均未达到显著水平.水涝处理的脯氨酸含量与 SOD、POD、CAT 活性均呈正相关关系,且与 POD 活性之间达到显著相关水平.分析表明,除对照和轻度干旱处理的 SOD 与 CAT、POD 呈负相关关系外,其他都呈正相关关系,但只有轻度干旱的 CAT 和 POD 之间达到显著相关水平.

表 3 水分胁迫下黄檗幼苗抗性生理指标的相关性分析
Table 3 Relational analyses of the physiological resistance indexes of corktree seedlings under waters

	CK	LD	HD	WL
MDA - CAT	- 0.4178	0.3446	0.1715	- 0.1275
MDA - POD	0.0217	0.4508	0.5763	- 0.0077
MDA - SOD	0.9217	0.3482	0.6466	- 0.0797
MDA - PRO	- 0.4089	0.2712	0.394	- 0.0635
PRO - CAT	0.3251	0.0161	- 0.0975	0.6385
PRO - POD	0.3251	0.0161	0.5679	0.6385
PRO - SOD	0.4708	0.5292	0.6494	0.9056
CAT - POD	0.5768	0.7827	0.0247	0.2848
CAT - SOD	- 0.2849	- 0.3915	0.2735	0.1939
POD - SOD	- 0.1165	- 0.449	0.2201	0.3558

PRO:游离脯氨酸含量 Content of free proline.

4 讨 论

4.1 水分胁迫与 MDA 和游离脯氨酸含量

水分胁迫会扰乱植物体内活性氧产生和清除的平衡,引起活性氧的积累,而作为膜脂过氧化产物的 MDA 能使膜中的酶蛋白发生交联并失活,进一步损伤细胞膜的结构和功能,因此 MDA 含量的变化是质膜损伤程度的重要标志之一^[2,3,7].轻度干旱、重

度干旱和水涝处理的 MDA 含量从处理的第 40 天开始均极显著高于对照,最高分别达对照的 2.49、2.37 和 4.12 倍,说明 3 种胁迫处理都引发了黄檗幼苗的膜脂过氧化作用.但从 MDA 含量上难以反映质膜损伤的程度,因为轻度干旱、重度干旱和水涝处理的黄檗幼苗,MDA 含量在处理的第 80 天以后是相近的(表 1).

脯氨酸是水溶性最大的氨基酸,被认为是有效的渗透调节物质,有助于植物细胞或组织的持水能力以增加植物抗旱性.尽管脯氨酸与水分胁迫之间的关系仍有争论,但脯氨酸作为渗透调节物质对活性氧的产生和清除确有一定的影响^[27].虽然游离脯氨酸含量变化对胁迫反应相对比较迟缓,但在胁迫 40 d 以后游离脯氨酸则在重度干旱处理的黄檗幼苗体内大量积累.水涝处理的黄檗幼苗虽然质膜损伤(表现为 MDA 含量增加),但游离脯氨酸含量在整个处理过程中始终保持很低的平稳水平,表明游离脯氨酸累积在黄檗幼苗中只对干旱等渗透胁迫有反应.

4.2 水分胁迫与黄檗幼苗保护酶系统

SOD 作为抵御活性氧伤害的“第一道防线”,能使 $\cdot O_2$ 发生歧化作用而转化为 H_2O_2 ,而 SOD 与 H_2O_2 清除酶 POD 和 CAT 的平衡对维持细胞功能至关重要.正常情况下,其协调作用使活性氧维持在较低的水平^[13].研究表明,SOD、POD 和 CAT 活性能够较好地反应植物对逆境的适应能力^[25,26].本文对黄檗幼苗抗性生理指标间的相关性分析表明,对照幼苗的 SOD、POD 和 CAT 活性与 MDA 含量呈负相关,表明正常情况下,较高的 SOD、POD 和 CAT 活性能够抑制膜脂质过氧化作用,MDA 含量表现为较低水平.重度干旱处理黄檗幼苗的 SOD、POD 和 CAT 活性始终高于轻度干旱和水涝胁迫,并且随胁迫进程先升高(40 ~ 60 d),体现了植物细胞减轻细胞伤害的适应性反应,但当持续干旱胁迫时(80 ~ 100 d),自由基产生与清除平衡失调,SOD、POD 和 CAT 活性降低.水涝处理的初始阶段,黄檗幼苗的 SOD、POD 和 CAT 活性均较低,说明黄檗幼苗的保护酶系统对水涝胁迫难以做出迅速而适当的调整,膜系统受到损伤,MDA 含量急剧增加(为对照的 2.31 倍).

参考文献

1 Cakmak I, Marschner H. 1992. Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase ascorbate peroxidase ,and glutathione reductase in bean leaves. *Plant Physiol* ,

- 98:1222 ~ 1227
- 2 Cao H(曹 慧), Wang X-W(王孝威), Cao Q(曹 琴). 2001. Effects of water stress on accumulation of superoxide free radicals and membrane lipid peroxidation of Starkrimson apple young leaves. *J Fruit Sci* (果树学报), **18**:196 ~ 199 (in Chinese)
 - 3 Chen S-Y(陈少裕). 1989. Relationship between membrane lipid peroxidation and the stressed plants. *Chin Bull Bot* (植物学通报), **6**(4):211 ~ 217 (in Chinese)
 - 4 Cui X-Y(崔晓阳), Song J-F(宋金凤), Zhang Y-H(张艳华). 2004. Some photosynthetic characteristics of *Fraxinus mandshurica* seedlings grown under different soil water potentials. *Acta Phytocool Sin* (植物生态学报), **28**(6):794 ~ 802 (in Chinese)
 - 5 Damiano R, Rossano M. 2003. Comparison of water status indicators for young peach trees. *Irriga Sci*, **22**:39 ~ 46
 - 6 Egert M, Tevini M. 2002. Influence of drought on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress in leaves of chives (*Allium schoenoprasum*). *Environ Exp Bot*, **48**:43 ~ 49
 - 7 Fang Y-Z(方允中), Li W-J(李文杰). 1989. Free Radical and Enzyme. Beijing: Science Press. 126 ~ 146 (in Chinese)
 - 8 Feng Y-L(冯玉龙), Zhang Y-J(张亚杰), Zhu C-Q(朱春全). 2003. Relationship between photo-inhibition of photosynthesis and reactive oxygen species in leaves of poplars suffering root osmotic stress. *Chin J Appl Ecol* (应用生态学报), **14**(8):1213 ~ 1217 (in Chinese)
 - 9 Fernández RJ, Reynolds JF. 2000. Potential growth and drought tolerance of eight desert grasses: Lack of a trade-off? *Oecologia*, **123**:90 ~ 98
 - 10 Fernández RJ, Wang M, Reynolds JF. 2002. Do morphological changes mediate plant responses to water stress? A steady-state experiment with two C₄ grasses. *New Phytol*, **155**:79 ~ 88
 - 11 Fornca MGC, Thi ATP, Pimentel C, et al. 2000. Differences in growth and water relations among *Phaseolus vulgaris* cultivars in response to induced drought stress. *Environ Exp Bot*, **43**:227 ~ 237
 - 12 Fridovich I. 1978. The biology of oxygen radicals. *Science*, **201**:875 ~ 880
 - 13 Gannopolitis CN, Ries SK. 1977. Superoxide dismutase II. Purification and quantitative relationship with water-soluble protein in seedlings. *Plant Physiol*, **59**:315
 - 14 Gutteridge JM. 1982. Superoxide dependent formation of hydroxyl radicals and lipid peroxidation in the presence of iron salts. *Biochem J*, **206**:605 ~ 609
 - 15 Jiang Y, Huang B. 2001. Drought and heat stress injury to two cool-season turfgrasses in relation to antioxidant metabolism and lipid peroxidation. *Crop Sci*, **41**:436 ~ 442
 - 16 Li H-S(李合生). 2000. Principle and Technologies to Plant Physiological Biochemical Experiment. Beijing: Higher Education Press. 164 ~ 165 (in Chinese)
 - 17 Li M(李 明), Wang G-X(王根轩). 2002. Effect of drought stress on activities of cell defense enzymes and lipid peroxidation in *Glycyrrhiza uralensis* seedlings. *Acta Ecol Sin* (生态学报), **22**(4):503 ~ 507 (in Chinese)
 - 18 Lima ALS, Da Matta FM, Pinheiro HA, et al. 2002. Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. *Environ Exp Bot*, **47**(3):239 ~ 247
 - 19 Lis SWL, Pezeshki SR, Goodwin S. 2004. Effects of soil moisture regimes on photosynthesis and growth in cattail (*Typha latifolia*). *Acta Oecol*, **25**:17 ~ 22
 - 20 Mccord JM, Fridovich J. 1969. Superoxide dismutase: An enzymic function for erythrocuprein (Herrxcaprein). *Biol Chem*, **224**:6049 ~ 6055
 - 21 Media BV. 1999. Regulation of gene expression during water deficit stress. *Plant Grow Regul*, **29**:23 ~ 33
 - 22 Sun G-R(孙国荣), Peng Y-Z(彭永臻), Yan X-F(阎秀峰). 2003. Effect of drought stress on activity of cell defense enzymes and lipid peroxidation in leaves of *Betula platyphylla* seedlings. *Sci Silvae Sin* (林业科学), **39**(1):165 ~ 167 (in Chinese)
 - 23 Wang M-B(王孟本), Feng C-P(冯彩平), Li H-J(李洪建). 2000. The relationship between the activities of protecting enzymes and water parameters from pressure-volume curves in six tree species. *Acta Ecol Sin* (生态学报), **20**(1):173 ~ 176 (in Chinese)
 - 24 Yan X-F(阎秀峰), Li J(李 晶), Zu Y-G(祖元刚). 1999. Effect of drought stress on activity of cell defense enzymes and lipid peroxidation in Korean pine seedlings. *Acta Ecol Sin* (生态学报), **19**(6):850 ~ 854 (in Chinese)
 - 25 Yang M-S(杨敏生), Fei B-H(裴保华), Cheng Z-P(程志鹏). 1997. Physiological indices of cold resistance in hybrid white poplar clones. *Acta Phytocool Sin* (植物生态学报), **21**(3):367 ~ 375 (in Chinese)
 - 26 Zhang W-H(张文辉), Duan B-L(段宝利), Zhou J-Y(周建云). 2004. Water relations and activity of cell defense enzymes to water stress in seedling leaves of different provenances of *Quercus variabilis*. *Acta Phytocool Sin* (植物生态学报), **28**(4):483 ~ 490 (in Chinese)
 - 27 Zhao F-G(赵福庚), Sun C(孙 诚), Liu Y-L(刘友良). 2001. Ornithine pathway in proline biosynthesis activated by salt stress in barley seedlings. *Acta Bot Sin* (植物学报), **43**(1):36 ~ 45 (in Chinese)
 - 28 Zhu GL(朱广廉), Zhong H-W(钟海文), Zhang A-Q(张爱琴). 1990. Plant Physiology Experimentation. Beijing: Peking University Press. (in Chinese)

作者简介 李 霞,女,1959 年生,副教授,博士生.主要从事植物次生代谢生态学研究. Tel:0434-3290095; E-mail:lixiaa0095@163.com
