

冷锻炼对低温胁迫下夏威夷椰子膜脂过氧化及保护酶活性的影响

杨盛昌¹, 谢潮添¹, 张平¹, 蒋雪玄¹, 廖启², 耶龙²

(1. 福建省厦门大学生命科学院, 福建 厦门 361005; 2. 福建省厦门市厦门园林植物园, 福建 厦门 361003)

摘要: 在 -5°C 低温胁迫下, 夏威夷椰子(*Pritchardia gaudichaudii* H. Wendl.) 幼苗叶片的丙二醛(MDA)含量逐渐增加, 表明膜脂过氧化作用逐渐增强; 含水量不断下降; 细胞保护酶中的超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)酶活性均先升高, 然后下降。冷锻炼处理可以减缓夏威夷椰子膜脂过氧化作用的增强, 促进SOD酶活性的提高, 同时抑制POD和CAT酶活性的变化, 因而使夏威夷椰子幼苗的抗寒性得以提高, 在 -5°C 低温胁迫下的半致死时间从1.6 d延长到2.2 d。

关键词: 夏威夷椰子幼苗; 冷锻炼; 膜脂过氧化; 保护酶

中图分类号: Q945.78 文献标识码: A 文章编号: 1004-0978(2002)04-0025-04

Effects of cold hardening on membrane lipid peroxidation and activities of cell defense enzymes in leaves of *Pritchardia gaudichaudii* seedling under low temperature stress YANG Sheng-chang¹, XIE Chao-tian¹, ZHANG Ping¹, JIANG Xue-xuan¹, LIAO Qi-liao², DING Yin-long² (1. Life Science College, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2. Xiamen Botanical Garden, Xiamen 361003, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2002, 11(4): 25-28

Abstract: Under -5°C low temperature stress, malondialdehyde (MDA) content in leaves of *Pritchardia gaudichaudii* H. Wendl. seedling gradually increased, reflecting that membrane lipid peroxidation aggravated. Water content lowered. Cell defense enzymes SOD (superoxide dimutase), POD (peroxidase) and CAT (catalase) activity raised at early stage, and then lowered. Cold hardening treatment could lessen the increase of membrane lipid peroxidation, promote SOD activity, and inhibit the change of POD and CAT activity under low temperature stress, so the resistance to chilling stress had been enhanced for *P. gaudichaudii* seedling. By cold hardening, the half lethal time had been extended to 2.2 d from 1.6 d under -5°C low temperature stress.

Key words: *Pritchardia gaudichaudii* H. Wendl. seedling; cold hardening; membrane lipid peroxidation; cell defense enzymes

夏威夷椰子 (*Pritchardia gaudichaudii* H. Wendl.) 又名夏威夷棕, 是具有较高观赏价值的热带棕榈科植物, 在我国南方城市栽培较为广泛。由于夏威夷椰子的抗寒性较差, 在北移引种过程中, 常面临低温伤害而难以存活, 因此探讨夏威夷椰子的抗寒机制及提高抗寒性的措施, 既能为夏威夷椰子的北移引种栽培服务, 同时也丰富了对夏威夷椰子抗寒生理学的认识。目前有关夏威夷椰子等棕榈植物抗寒生理学研究的报道还很少, 本文以夏威夷椰子幼苗为材料, 研究了冷锻炼处理对低温胁迫下叶片膜脂过氧化作用及超氧化物歧化酶、过氧化氢酶和过氧化物酶等保护酶的影响, 为阐明夏威夷椰子抗寒机制及北移引种栽培提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料及处理

供试材料为厦门市园林局植物园苗圃培育的1龄盆栽夏威夷椰子幼苗, 每盆3~4株, 平均株高29.4 cm, 生长状况良好, 土壤肥力中等, 常规管理。2001年6月11日, 取24盆夏威夷椰子幼苗, 平均分为2组, 一组进行冷锻炼处理, 即将幼苗置于低温光

收稿日期: 2002-05-28

基金项目: 国家建设部和厦门市建设委员会资助项目

作者简介: 杨盛昌(1966-), 男, 山东泰安人, 博士, 副教授, 从事植物生理学与分子生物学研究。

照培养箱中依次进行 5 d 20℃、5 d 15℃和 10 d 10℃的冷处理, 每日光照 12 h, 平均光强约为 2 000 lx。另一组置于室温作为对照。冷锻炼结束后, 将 2 组材料置于 -5℃冰柜中进行 0、1、2、3、4 和 5 d 的低温胁迫处理。处理期间未加以光周期处理。每一处理结束后移出 2 盆幼苗于室温放置, 立即取样进行叶片各项生理指标的测定。

1.2 测定方法

1.2.1 酶液制备 取 2 g 鲜叶片, 剪碎, 加入 10 mL 62.5 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.8) 于冰浴研磨, 15 000 g 4℃离心 20 min, 上清液用于 MDA、超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化物酶 (POD) 和过氧化氢酶 (CAT) 酶活性及可溶性蛋白质含量的测定。

1.2.2 丙二醛 (MDA) 含量的测定 取上述上清液 2 mL, 按刘祖祺和张石诚的方法^[1]测定 MDA 含量。

1.2.3 超氧化物歧化酶 (SOD) 酶活性的测定 按 Giannopolitis 和 Ries 的方法^[2]测定 SOD 酶活性。以每毫克蛋白质每分钟内抑制光还原 50% 的氮蓝四唑 (NBT) 作为 1 个酶活性单位 (U)。

1.2.4 过氧化物酶 (POD) 酶活性的测定 采用愈创木酚显色法^[1]测定, 以每毫克蛋白质每分钟内导致 1 个 OD₄₇₀ 的变化值作为 1 个酶活性单位 (U)。

1.2.5 过氧化氢酶 (CAT) 酶活性的测定 以硫代硫酸钠滴定法^[3]测定, 以每毫克蛋白质每分钟催化生成 1 mg H₂O₂ 作为 1 个酶活性单位 (U)。

1.2.6 可溶性蛋白质含量的测定 按 Bradford 法^[4]测定。

1.2.7 电解质渗出率的测定 参见文献^[5]。电解质渗出率增至 50% 时所对应的低温处理时间即为低温半致死时间。

2 结果与分析

2.1 低温胁迫下夏威夷椰子 MDA 含量的变化

低温胁迫下, 夏威夷椰子幼苗叶片 MDA 含量的变化如图 1 所示。从图 1 看出, 冷锻炼和对照处理的夏威夷椰子幼苗叶片 MDA 含量随胁迫时间延长而上升, 其中低温胁迫处理 2 d 后, 冷锻炼处理组出现略微波动, 增幅减缓, 而对照仍维持大幅上升。显然, 在低温胁迫下, 冷锻炼后的夏威夷椰子幼苗的叶片 MDA 含量变化幅度低于未经冷锻炼者。MDA 是膜脂过氧化作用的终产物, 也是反映细胞膜系统受

害的重要指标之一。因此, 低温胁迫下夏威夷椰子幼苗叶片中 MDA 含量增加, 表明低温伤害致使细胞膜脂过氧化作用增强, 细胞膜系统受害加重, 而冷锻炼可以增强细胞膜系统的稳定性, 降低低温胁迫的伤害。

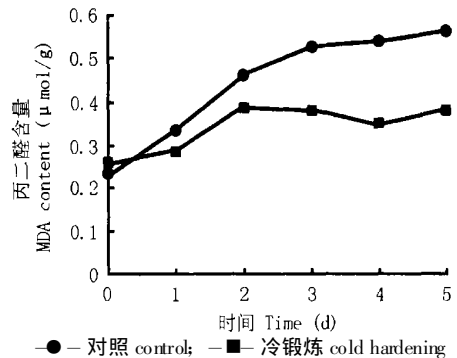


图 1 低温胁迫下夏威夷椰子幼苗叶片丙二醛含量的变化
Fig. 1 Changes of malondialdehyde (MDA) content in leaves of *Pritchardia gaudichaudii* H. Wendl. seedling under low temperature stress

2.2 低温胁迫下夏威夷椰子电解质渗出率的变化

低温胁迫下, 夏威夷椰子幼苗叶片电解质渗出率的变化如图 2 所示。结果表明, 随着低温胁迫时间的延长, 夏威夷椰子叶片电解质渗出率呈现“S”形曲线增长。其中在低温胁迫的初期 (2 d 内), 冷锻炼者的增幅小于对照。电解质渗出率的变化可以反映细胞膜透性的改变, 因此冷锻炼对植物细胞膜系统的稳定性有一定的增强作用。如果以电解质渗出率达到 50% 时所对应的时间作为半致死时间, 则经冷锻炼和未经冷锻炼的夏威夷椰子幼苗的低温半致死时间分别为 2.2 d 和 1.6 d, 表明冷锻炼可以延长植物的半致死时间, 提高植物的抗寒性。

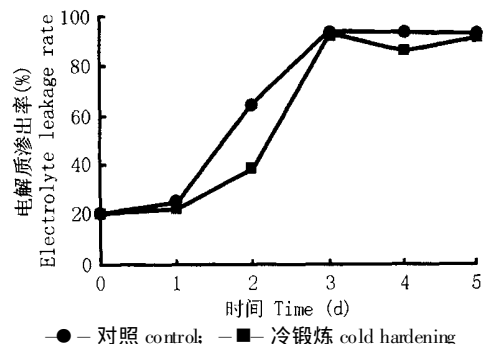


图 2 低温胁迫下夏威夷椰子幼苗叶片电解质渗出率的变化
Fig. 2 Changes of electrolyte leakage rate in leaves of *Pritchardia gaudichaudii* H. Wendl. seedling under low temperature stress

2.3 低温胁迫下夏威夷椰子叶片含水量的变化

低温胁迫下, 夏威夷椰子幼苗叶片含水量的变化如图 3 所示。随着低温胁迫时间的延长, 夏威夷椰子幼苗叶片的含水量逐渐降低, 其中冷锻炼处理的叶片含水量均小于对照。通常情况下, 含水量的高低可以反映细胞代谢活性的强弱^[9], 冷锻炼可以降低细胞含水量, 也降低了细胞代谢活性, 相应增强了细胞对低温胁迫的耐性。

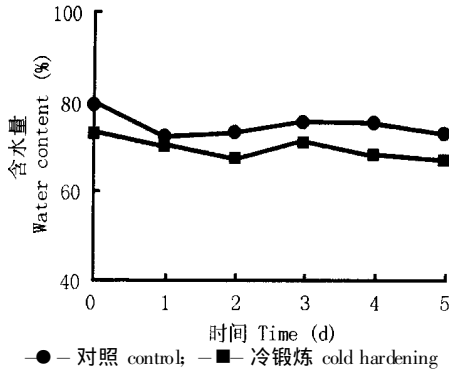


图 3 低温胁迫下夏威夷椰子幼苗叶片含水量的变化

Fig. 3 Changes of water content in leaves of *Pritchardia gaudichaudii* H. Wendl. seedling under low temperature stress

2.4 低温胁迫下夏威夷椰子细胞保护酶的变化

2.4.1 SOD 酶活性的变化 低温胁迫下夏威夷椰子幼苗 SOD 酶活性的变化如图 4 所示。结果表明, 在低温胁迫下, 夏威夷椰子幼苗叶片 SOD 酶活性呈现出先升后降的趋势, 最大值出现在第 2 天。冷锻炼植株 SOD 酶活性明显大于对照植株, 表明冷锻炼显著提高了夏威夷椰子幼苗叶片的 SOD 酶活性。

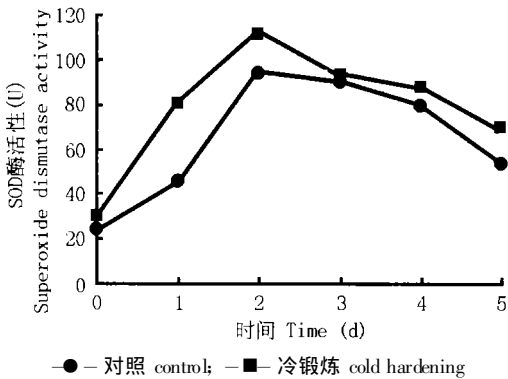


图 4 低温胁迫下夏威夷椰子幼苗叶片 SOD 酶活的变化

Fig. 4 Changes of superoxide dismutase (SOD) activity in leaves of *Pritchardia gaudichaudii* H. Wendl. seedling under low temperature stress

2.4.2 POD 酶活性的变化 在低温胁迫下, 夏威夷椰子幼苗叶片 POD 酶活性的变化如图 5 所示。与

SOD 酶活性的变化相似, 在低温胁迫下, POD 酶活性也呈现先升后降的趋势, 但最大值出现在第 3 天。比较冷锻炼与对照间的 POD 酶活性变化, 可以发现低温胁迫处理前冷锻炼植株的 POD 酶活性略大于对照, 但在低温胁迫期间, 其 POD 酶活性(第 1 天除外)及其变化幅度均小于对照植株, 因此冷锻炼并不是通过提高夏威夷椰子幼苗叶片的 POD 酶活性, 而是通过增强 POD 酶活性在低温胁迫下的稳定性来增加其抗寒性。

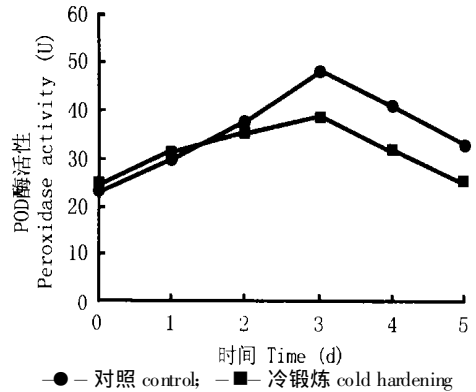


图 5 低温胁迫下夏威夷椰子幼苗叶片 POD 酶活性的变化

Fig. 5 Changes of peroxidase (POD) activity in leaves of *Pritchardia gaudichaudii* H. Wendl. seedling under low temperature stress

2.4.3 CAT 酶活性的变化 在低温胁迫下, CAT 酶活性也呈现出先升后降的变化趋势, 且最大值出现在第 2 天(见图 6)。比较冷锻炼与对照间的 CAT 酶活性变化, 结果表明, 在低温胁迫处理前及处理期间, 冷锻炼植株的 CAT 酶活性及其变化幅度均小于对照, 因此冷锻炼并不能提高夏威夷椰子幼苗叶片的 CAT 酶活性, 但却能通过增强 CAT 酶活性在低温胁迫下的稳定性来增加其抗寒性, 这与前述 POD 酶活性变化较为相似。

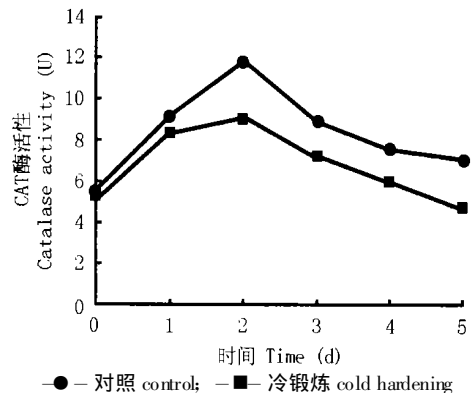


图 6 低温胁迫下夏威夷椰子幼苗叶片 CAT 酶活的变化

Fig. 6 Changes of catalase (CAT) activity in leaves of *Pritchardia gaudichaudii* H. Wendl. seedling under low temperature stress

3 讨 论

在 -5°C 低温胁迫下,夏威夷椰子幼苗叶片 MDA 含量随胁迫时间延长而上升,表明细胞的膜脂过氧化作用增强,细胞膜受害加剧,这与水稻(*Oryza sativa* L.)^[7]、玉米(*Zea mays* L.)^[8]和红松(*Pinus koraiensis* Sieb. et Zucc.)幼苗^[9]等植物在低温胁迫下的变化趋势相似。经冷锻炼后,夏威夷椰子幼苗叶片 MDA 含量有所上升,但在低温胁迫期间 MDA 含量的增加幅度小于对照植株,表明冷锻炼可以降低夏威夷椰子幼苗对低温的敏感性,提高植物抗寒性。另外,从电解质渗出率(细胞膜透性)的变化动态来看,冷锻炼可以使夏威夷椰子幼苗在 -5°C 低温胁迫下的半致死时间从 1.6 d 延长至 2.2 d,进一步说明冷锻炼使植物抗寒性得以提高。

SOD、POD 和 CAT 是植物对膜脂过氧化的酶促防御系统中重要的保护酶。SOD 在细胞保护酶系统中的作用是清除超氧自由基 $\text{O}_2^{\cdot-}$,同时产生歧化产物 H_2O_2 ,避免超氧自由基对膜的伤害。POD 和 CAT 在保护酶系统中主要是起到酶促降解 H_2O_2 的作用,避免细胞膜的过氧化伤害。因为 H_2O_2 的过量积累会导致毒性更大的 $\cdot\text{OH}$ 含量增加,进而对细胞膜产生伤害。一般情况下,细胞内的活性氧与防御系统之间保持着平衡^[10,11]。本文中,低温胁迫初期,SOD、POD 和 CAT 酶活性的上升可能是植物细胞对低温胁迫因子的一种保护性应激反应。随着低温胁迫时间延长,3 种保护酶的酶活性下降,表明低温胁迫对 3 种保护酶产生伤害,从而加剧了膜脂过氧化作用。

冷锻炼可以降低植物叶片的含水量,相应地降低了植物叶片细胞的代谢活性。但冷锻炼对 3 种保护酶的影响有所不同。在低温胁迫处理之前,冷锻炼植株的 SOD 和 POD 酶活性大于对照植株,而 CAT 却略小于对照植株。在低温胁迫处理期间,冷锻炼植株的 SOD 酶活性仍大于对照植株,CAT 酶活性仍小于对照植株,而 POD 酶活性逐渐变成小于对照植株,CAT 和 POD 酶活性的变化幅度小于对照植株,这说明冷锻炼可以提高夏威夷椰子叶片的 SOD 酶活性,降低 CAT 和 POD 在低温胁迫处理期间的活

性,但却增加了 CAT 和 POD 酶活性的稳定性。稳定性高有利于保持活性氧与防御系统之间的平衡^[9],防止因代谢紊乱造成的膜伤害。此外,在低温胁迫期间,冷锻炼植株的高 SOD 酶活性及低 POD 和 CAT 酶活性也有利于维持植物细胞的低代谢活性,降低细胞内的贮存物质及能量的消耗,进而提高植株的抗寒性。

综上所述,在低温胁迫下,夏威夷椰子幼苗叶片的膜脂过氧化作用增强。冷锻炼可以通过提高 SOD 酶活性、降低低温胁迫时的 POD 和 CAT 酶活性,同时增加 POD 和 CAT 的稳定性来提高保护功能,降低膜脂过氧化作用对膜系统的伤害,相应地提高了植物的抗寒性。

参考文献

- [1] 刘祖祺,张石诚.抗性生理学[M].北京:中国农业出版社,1990.371-372.
- [2] Giannopolitis C N, Ries S K. Superoxide dimutase II. Purification and quantitative relationship with water-soluble protein in seedlings [J]. Plant Physiol, 1977, 59: 315-318.
- [3] 山东农学院,西北农学院.植物生理学实验指导[M].济南:山东科学技术出版社,1980.109-114.
- [4] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantity of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Anal Biochem, 1976 72: 248-254.
- [5] 杨盛昌,林 鹏.海岸红树林抗低温适应的生态学研究 [J]. 植物生态学报, 1998, 22(1): 60-67.
- [6] 潘瑞炽,董愚得.植物生理学(第三版)[M].北京:高等教育出版社,1995.374.
- [7] 曾韶西,王以柔,李美茹,等.冷锻炼和 ABA 诱导水稻幼苗提高抗冷性期间膜保护系统的变化 [J]. 热带亚热带植物学报, 1994, 2(1): 44-50.
- [8] Prasad T K, Anderson M P, Martin B A, et al. Evidence for chilling induced oxidative stress in maize seedling and a regulatory role for hydrogen peroxide [J]. Plant Cell, 1994 6(1): 65-74.
- [9] 李 晶,严秀峰,祖元刚.低温胁迫下红松幼苗活性氧的产生及保护酶的变化 [J]. 植物学报, 2000 42(2): 148-152.
- [10] Bowler C, Van Montagu M, Inze D. Superoxide dismutase and stress tolerance [J]. An Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1990, 41: 187-223.
- [11] Prasad T K. Mechanism of chilling-induced oxidative stress injury and tolerance; changes in antioxidant system, oxidation of proteins and lipids and protease activities [J]. Plant J, 1996, 10: 1017-1026.