

# 低温胁迫下新铁炮百合幼苗叶片活性氧的产生及保护酶活性的变化

李智辉, 王新颖, 周广柱, 刘兴宇

(沈阳农业大学 林学院, 辽宁 沈阳 110161)

**摘要:** 试验通过在不同低温胁迫时间以及恢复时间内, 对新铁炮百合幼苗叶片内的超氧阴离子自由基  $O_2^{\cdot-}$  的产生速率、POD 和 SOD 活性以及膜脂过氧化产物(MDA)含量进行了测定。结果表明: 不同程度的低温胁迫对新铁炮百合细胞内活性氧代谢的平衡均产生不同程度的破坏, 上述指标通过明显的变化来减轻损伤程度, 从而增强了新铁炮百合幼苗的抗低温能力。

**关键词:** 新铁炮百合; 幼苗; 低温胁迫; 活性氧; 保护酶

**中图分类号:** S 682.2<sup>+</sup>9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2007)12-0106-03

新铁炮百合是近十年引入国内并迅速扩大的百合切花品种, 以实生苗直接生产切花为特色, 种球也可促成栽培。植株高大, 茎秆硬度高。叶形多样, 变化大, 从长披针形到卵形皆有, 叶色灰绿到深绿, 花蕾较大, 多直立, 饱满粗壮, 外观好。花开喇叭形, 开口不大, 花形好, 花芳香, 花瓣排列紧密, 内外瓣常斜向外伸展, 罕见反卷, 具有一定的耐热性, 是优良的切花品种<sup>[1]</sup>。

目前, 我国北方地区冬季生产新铁炮百合质量差、切花率低、生产成本低, 很难进行周年生产。分析原因, 可能主要是由于我国北方冬季的温度和光照条件影响了该百合的生长发育。因而试验拟通过对在不同持续时间的低温胁迫条件下新铁炮百合幼苗活性氧代谢, MDA 及保护酶的变化进行研究, 以期从活性氧的产生和清除的角度探讨新铁炮百合在低温条件下的生理反应机理, 并为其低温生理研究及进一步有效地防御低温冷害, 提供理论依据。

在环境胁迫下, 绿色植物中由活性氧造成的氧化胁迫是一种普遍现象<sup>[2-3]</sup>。近年来, 活性氧自由基与植物抗逆性关系的研究日益深入<sup>[4-6]</sup>。自由基伤害学说认为, 在正常情况下, 植物细胞中存在的活性氧的产生和消除这两个过程处于平衡状态, 不会导致细胞伤害<sup>[7]</sup>。但是逆境胁迫会促进活性氧产生, 损伤膜系统, 严重时导致植物伤害或死亡<sup>[8-9]</sup>。植物细胞内存在清除活性氧自由基的保护酶系统, 如超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)等, 它们三者协调一致使生物自由基维持在正常水平从而防止自由基伤害<sup>[7]</sup>, 并且在

很多植物的抗寒机理研究中都应用了这一理论<sup>[5, 10-11]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 品种的选择及培养

试验于 2006 年 1 月在沈阳农业大学林学院园林植物与观赏园艺实验室和沈阳农业大学植物园温室进行, 温室内温度 12~26℃, 湿度 70%~85%, 光照有塑料薄膜(聚乙烯)覆盖。

供试的百合品种为新铁炮百合——“sayaka”, 种子经 5℃低温浸润处理催芽后, 播于装有草炭土的穴盘中, 萌芽后定期浇水、拔草, 直到长出 10~15 cm 时移栽, 且长出 3 片真叶时, 将幼苗置于人工气候箱内进行模拟低温处理。

### 1.2 温度条件调控

将上述幼苗分为 2 组, 分别置于昼夜温度 12℃/8℃(T1), 8℃/5℃(T2)条件下, 光照时间为 12 h。首先在昼夜温度 20℃/15℃的条件下预处理 24 h, 然后分别在各处理过程中的 12、24、48 h 取样测定; 处理结束后, 将幼苗置于 20℃/15℃条件下恢复, 分别在恢复的 3、6、12、24 h 取样测定; 取样部位为幼苗叶片, 取样时间为处理末期, 各处理的预处理 24 h(20℃/15℃)即为对照, 每组处理均重复 3 次。

### 1.3 试验方法<sup>[12]</sup>

**1.3.1 超氧阴离子自由基  $O_2^{\cdot-}$  产生速率的测定** 采用羟胺法, 取样品 1 g, 放入 10 mL 试管中并加入 5 mL 10 mmol·L<sup>-1</sup> 盐酸羟胺, 真空渗入后, 置于 30℃温箱温育 45 min 后, 吸取 2 mL 溶液, 与 1 mL 对氨基苯磺酸和 1 mL α-苯胺充分混合, 10 min 显色完毕后, 取上清液测 A<sub>550</sub>, 单位为 nmol·min<sup>-1</sup>·g<sup>-1</sup> FW。

**1.3.2 抗氧化酶活性测定** POD 活性测定: 愈创木酚显色法测定酶活性, 以  $\Delta A_{470} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$  表示酶活性单位。SOD 活性测定采用 NBT 光化还原法, 以还

第一作者简介: 李智辉(1975-), 男, 讲师, 在读博士, 主要从事园林植物栽培生理方面的教学和研究。E-mail: zhihui.li@126.com。

基金项目: 沈阳农业大学青年教师科研基金资助项目(2004034)。

收稿日期: 2007-06-04

原 NBT50% 为一个酶活力单位。MDA 含量测定采用硫代巴比妥酸法, 单位为  $\mu\text{mol/g FW}$ 。

1.3.3 数据分析 使用 spss12.0 数据分析软件, 采用 LSD 和 S-N-K 分析方法检验。

2 结果与分析

2.1 超氧阴离子自由基  $\text{O}_2^-$  的产生速率

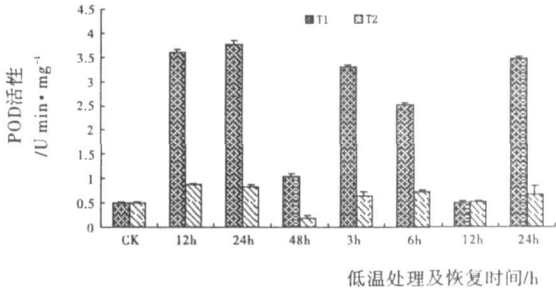


图 2 低温胁迫下新铁炮百合幼苗 POD 活性的影响

(图 2)。T1 ( $12^\circ\text{C}/8^\circ\text{C}$ ) 和 T2 ( $8^\circ\text{C}/5^\circ\text{C}$ ) 低温处理后的 POD 活性变化趋势相似。T1 ( $12^\circ\text{C}/8^\circ\text{C}$ ) 和 T2 ( $8^\circ\text{C}/5^\circ\text{C}$ ) 低温处理的幼苗, 活性氧的产生速率在 48 h 的低温胁迫进程中 POD 活性迅速升高, 分别是对照的 6.63 倍和 70%, T1 ( $12^\circ\text{C}/8^\circ\text{C}$ ) POD 活性明显高于 T2 ( $8^\circ\text{C}/5^\circ\text{C}$ ), 两者差异达极显著水平(表 1)。当温度条件恢复到对照水平时, T1 ( $12^\circ\text{C}/8^\circ\text{C}$ ) 和 T2 ( $8^\circ\text{C}/5^\circ\text{C}$ ) 低温处理后的 POD 活性均在恢复 3 h 时上升, 而后降低, 在恢复 12 h 时基本达到对照水平。

2.2.2 超氧化物歧化酶活性的变化 低温胁迫使新铁炮百合幼苗超氧化物歧化酶活性的变化趋势与过氧化物酶的变化趋势相似, 呈现先升高后降低的变化趋势(图 3)。T1 ( $12^\circ\text{C}/8^\circ\text{C}$ ) 和 T2 ( $8^\circ\text{C}/5^\circ\text{C}$ ) 低温处理后的 POD 活性变化趋势相似, 在 48 h 的低温胁迫进程中 SOD 活性逐渐升高。当温度条件恢复到对照水平时, T1 ( $12^\circ\text{C}/8^\circ\text{C}$ ) 和 T2 ( $8^\circ\text{C}/5^\circ\text{C}$ ) 低温处理后的 SOD 活性均在恢复 3 h 时上升, 而后降低, T1 ( $12^\circ\text{C}/8^\circ\text{C}$ ) 在恢复 24 h 时达到对照水平, T2 ( $12^\circ\text{C}/8^\circ\text{C}$ ) 在恢复 12 h 时达到对照水平。

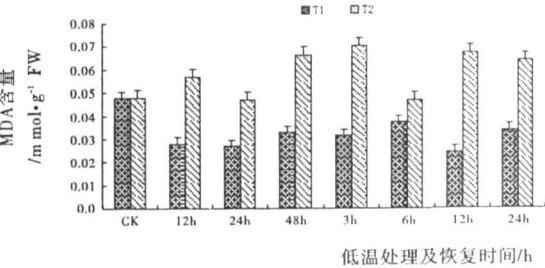


图 4 低温胁迫下新铁炮百合幼苗 MDA 含量的影响

表 1 不同低温胁迫下新铁炮百合幼苗  $\text{O}_2^-$  的产生速率、POD、SOD 活性和 MDA 含量变化方差分析

指标	平方和	均方	F 值	相伴概率
超氧阴离子自由基 $\text{O}_2^-$ 的产生速率	1	54.499	26.026	0.000 **
POD 活性	1	11.789	11.227	0.005 **
SOD 活性	1	156163.063	18.895	0.001 **
MDA 含量	1	2.600E-03	31.717	0.000 **

注: “\*\*”表示统计检验的相伴概率小于等于 0.01。

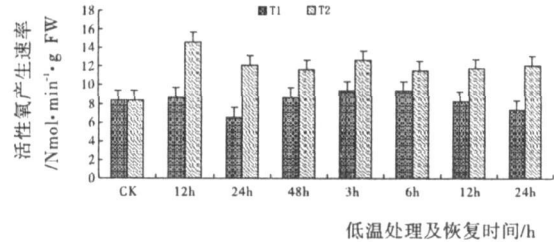


图 1 低温胁迫下新铁炮百合幼苗  $\text{O}_2^-$  的产生速率的变化

$\text{O}_2^-$  是形成其它活性氧的主要分子, 其伤害植物的机理之一在于参与启动膜脂过氧化或膜脂脱脂作用, 从而破坏膜结构<sup>[3]</sup>。T1 ( $12^\circ\text{C}/8^\circ\text{C}$ ) 低温处理的幼苗, 活性氧的产生速率在 48 h 的低温胁迫进程中, 初期逐渐升高, 略高于对照水平。T2 ( $8^\circ\text{C}/5^\circ\text{C}$ ) 低温处理的幼苗, 活性氧的产生速率在 48 h 的低温胁迫进程中, 初期迅速升高后期下降, 但高于对照。T2 ( $8^\circ\text{C}/5^\circ\text{C}$ ) 低温胁迫下的活性氧产生速率明显高于 T1 ( $12^\circ\text{C}/8^\circ\text{C}$ ) 低温胁迫下的活性氧产生速率, 两者差异达显著水平(见表 1)。

当温度条件恢复到对照水平时, T1 和 T2 相比, T1 ( $12^\circ\text{C}/8^\circ\text{C}$ ) 低温处理的幼苗, 活性氧的产生速率在温度恢复至 3 h 时已基本达到对照水平; T2 ( $8^\circ\text{C}/5^\circ\text{C}$ ) 在温度恢复 6 h 时活性氧的产生速率还在增大, 直到恢复 12 h 才缓慢趋于稳定但仍高于对照水平, 说明 T2 ( $8^\circ\text{C}/5^\circ\text{C}$ ) 低温诱导破坏了新铁炮百合细胞内活性氧代谢的平衡。

2.2 低温胁迫新铁炮百合幼苗叶片保护酶活性的变化

2.2.1 过氧化物酶活性的变化 低温胁迫使新铁炮百合幼苗过氧化物酶活性呈现先升高后降低的变化趋势

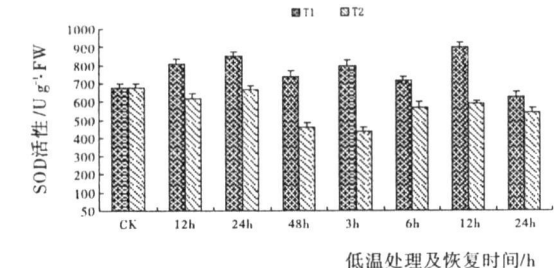


图 3 低温胁迫下新铁炮百合幼苗 SOD 活性的影响

2.3 低温胁迫新铁炮百合幼苗叶片膜脂过氧化产物(MDA)的变化

MDA 是膜脂过氧化作用的最终产物, 是膜系统受害的重要标志之一。由图 4 可知, T1 ( $12^\circ\text{C}/8^\circ\text{C}$ ) 的 MDA 含量略高于对照, 含量相对稳定; 而 T2 ( $8^\circ\text{C}/5^\circ\text{C}$ ) 的 MDA 含量明显高于对照水平, 并且在温度恢复至对照水平 24h

以后仍未降低至对照水平, 并且  $T_2(8^{\circ}\text{C}/5^{\circ}\text{C})$  的 MDA 含量明显高于  $T_1(12^{\circ}\text{C}/8^{\circ}\text{C})$  的 MDA 含量。

### 3 结论

植物的大多数生理生化过程中都有活性氧的产生, 一般认为活性氧是一种有害的氧化代谢中间物, 是引起细胞结构和功能损伤的主要因素<sup>[15-16]</sup>。随着低温胁迫时间的延长, 各种酶的活性逐渐降低, 从而削弱了对活性氧的清除作用。在  $T_1(12^{\circ}\text{C}/8^{\circ}\text{C})$  和  $T_2(8^{\circ}\text{C}/5^{\circ}\text{C})$  低温处理的 24 h, SOD、POD 活性升高(图 2、3), 此时植物体内清除自由基的能力提高, 从而抑制了活性氧的产生, 是活性氧的产生速率下降(图 1)。随着胁迫时间的延长, SOD、POD 活性开始下降, 活性氧产生速率升高; 在温度条件恢复到对照水平时, 前 3 h 内 SOD、POD 活性均升高, 此时  $T_1(12^{\circ}\text{C}/8^{\circ}\text{C})$  低温处理的新铁炮百合幼苗叶片内的活性氧产生的速率已恢复至对照水平, 而  $T_2(8^{\circ}\text{C}/5^{\circ}\text{C})$  直到恢复 12 h 仍高于对照水平, 说明  $T_2(8^{\circ}\text{C}/5^{\circ}\text{C})$  低温诱导可能破坏了新铁炮百合细胞内活性氧代谢的平衡, 并且  $T_2(8^{\circ}\text{C}/5^{\circ}\text{C})$  低温诱导的新铁炮百合幼苗叶片的膜脂过氧化的最终产物 MDA 的含量明显高于  $T_1(12^{\circ}\text{C}/8^{\circ}\text{C})$ 。

因此, 活性氧代谢失调是新铁炮百合幼苗叶片低温胁迫下受伤害的主要原因之一。另外, 结果表明新铁炮百合对不同强度的低温反应不同。适当的低温胁迫温度和时间(如温度为  $12^{\circ}\text{C}/8^{\circ}\text{C}$  和胁迫时间不超过 48 h 的情况下), 即在胁迫强度和胁迫时间不超过植物活性氧调控限度时, 可诱导 SOD、POD 的活性提高(图 2、3), 以清除植物体内由于环境胁迫所产生的活性氧自由基, 从而避免活性氧自由基对植物的伤害。在较低的温度胁迫下, 即胁迫强度较大时(图 2~4), SOD 和 POD 活性提高不显著, 不能达到调节作用, 导致细胞活性氧的产生速率升高, 膜质过氧化产物含量升高, 破坏了膜结构, 此结论恰与吴建慧和李晶的结论相似<sup>[8-14]</sup>。

综上所述, 低温诱导破坏新铁炮百合细胞内活性氧代谢的平衡, 而膜脂过氧化的酶促防御系统中的保护酶

通过提高酶活性来增强保护功能的, 特别是植株在适当的低温胁迫温度和时间内低温具有一定的适应能力时, 可以进一步的增强保护酶的活性, 从而减少了膜脂过氧化产物 MDA 的含量, 减轻了质膜损伤程度, 增强了新铁炮百合幼苗的抗低温能力。若进一步判定新铁炮百合幼苗的抗低温能力, 则需要多种生理指标来综合判断, 还有待于进一步研究。

### 参考文献

- [1] 周厚高, 江如蓝, 王凤兰, 等. 专家教你种花卉——百合[M]. 广州: 广东科技出版社, 2004, 1.
- [2] Bowler C, Van Montagu M, Inze D. SuperOxide dismutase and stress tolerance[J]. Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol. 1992, 43: 8.
- [3] Mishra N P, Mishra R K, Singhal G S. Changes in the activities of antioxidant enzymes during exposure of intact wheat leaves to strong visible light at different temperature of intact in the presence of protein synthesis inhibitors[J]. Plant Physiol. 1993, 102: 903-912.
- [4] Fridovich I. The biology of oxygen radical[J]. Science. 1975, 201: 875-880.
- [5] 陈善娜, 梁斌, 张蜀君, 等. 云南高原水稻幼苗的抗冷性与其活性氧清除系统的关系[J]. 中国水稻科学, 1995, 17(4): 452-458.
- [6] Hodges D M, Andrews C J, Johnson D A, et al. Antioxidant enzyme responses to chilling stress in differentially sensitive inbred maize lines[J]. J Exp Bot. 1997, 8: 1105-1113.
- [7] McCord J M, Fridovich I. Superoxide dismutase: An enzymic function for erythrocuprein (Hemocuprein)[J]. J Biol Chem. 1969, 244: 6049-6055.
- [8] 李晶, 阎秀峰, 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.
- [9] Mea J F. Free radical mechanism of lipid damage, a consequence of cellular membranes. In: Pryor WA (ed). Free Radical in Biology Chapter 2[M]. New York: Academic Press. 1986.
- [10] 杨柏云, 熊冬金, 黄亚萍, 等. 适度低温对棉花细胞保护酶系统的影响. 南昌大学学报. 1996, 12(4): 320-323.
- [11] 孙昌祖, 刘家琪. 低温胁迫对青杨叶片  $\text{O}_2^-$ 、MDA、膜透性、叶水势及保护酶的影响[J]. 内蒙古林学院学报. 1998, 8(3): 32-34.
- [12] 郝建军, 刘延吉. 植物生理学实验技术[M]. 辽宁科学技术出版社. 2001.
- [13] Lu Q, Zheng R L. Membrane lipid per oxidation and desertification of wheat induced by drought and active oxygen[J]. Sci Chin Ser C. 1996, 26: 26-30.
- [14] 吴建慧, 杨玲, 孙国荣. 低温胁迫下玉米幼苗叶片活性氧的产生及保护酶活性的变化[J]. 植物研究. 2004, 24(4): 456-459.
- [15] 柯德森, 孙谷畴, 王爱国. 低温诱导绿豆黄化幼苗乙烯产生过程中活性氧的作用[J]. 植物生理与分子生物学学报. 2003, 29(2): 127-132.

## Generation of Activated Oxygen and Change of Defense Enzyme Activity in *L. formolongi* Seedling under Low Temperature

LI Zhi-hui, WANG Xin-ying, ZHOU Guang-zhu, LIU Xing-yu

(Forestry College, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110161, China)

**Abstract:** The research exposed the physiology active mechanism of *Lilium. formolongi Hort-sayaka* under different time of low temperature stress, in order to resolve the difficult production problem of *L. formolongi Hort* in northern winter. Changes of activated oxygen  $\text{O}_2^-$ , malondialdehyde (MDA) content and activity of enzymes involving cell defense in leaves of *L. formolongi* seedling under different time of low temperature stress and recovering were studied. With the increase of stress temperature, the equilibrium of activated oxygen  $\text{O}_2^-$  metabolize was broken, all these indexes showed marked changes and different ways of adaptivity to cold stress; thus enhanced the cold tolerance of the plant.

**Key words:** *Lilium. formolongi*; Seedling; Low temperature stress; Activated oxygen; Defense enzyme