

低温胁迫对两种丛生竹抗氧化剂活性影响的研究

易守理¹, 雷 霆², 高素萍²

(1. 四川农业大学 林学院园林系, 四川 雅安 625014; 2. 四川农业大学 园林研究所, 四川 温江 611130)

摘 要:以慈竹和大叶慈竹为材料,在不同低温条件(5、0、-5、-10、-20℃)处理下,研究其叶片 SOD、CAT、POD,3 种抗氧化酶活性的变化。结果表明:低温处理后,慈竹和大叶慈竹的 SOD、CAT 均表现为先降后升的趋势,慈竹 POD 活性随温度降低而降低,大叶慈竹 POD 活性维持在较低水平。大叶慈竹主要依靠较高的 SOD 和 CAT 活性抵御低温伤害,慈竹则凭借较高的 SOD 和 POD 活性使活性氧(AOS)在相对较低的水平来抵御低温伤害。

关键词:低温;丛生竹;SOD;CAT;POD

中图分类号:S 795 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2010)19-0153-04

竹子属禾本科(Gramineae)竹亚科(Bambusoideae)多年生常绿植物,四季常青,枝叶茂盛,是极其重要可再生林业资源之一,也是一种特殊而重要的园林绿化植物类群^[1]。四川优越的气候条件为竹子的生长创造了良好的生境,其丛生竹资源占全国 22.3%^[2]。丛生竹比散生竹具有更大的开拓利用优势,其中慈竹(*Neosinocalamus affinis*)和大叶慈竹(*Dendrocalamus farinosus*)是四川的广布种和主要的竹浆产业资源。然而,受 2008 年雨雪冰冻灾害影响,四川竹林受灾面积达 30 万 hm²,经济损失近 30 亿元。

低温胁迫不仅影响丛生竹的生长发育,也是竹种“南竹北移”的主要限制因子。抗氧化酶是重要的活性氧清除剂,它能够清除胁迫条件下植物产生的活性氧,从而使植物在一定程度上能耐、减缓或抵抗逆境胁迫。其中超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和过氧化物酶(POD)是抗氧化酶系统中重要的 3 种酶,因此常被作为研究植物抗逆性的指标^[3]。现以 SOD、CAT 和 POD 这 3 种抗氧化酶为对象,研究低温对其活性的动态变化的影响,以期揭示低温伤害过程中竹子叶片抗氧化酶活性的变化规律,为进一步研究竹子的抗寒机理及防寒越冬措施提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验于 2009 年 10~12 月进行,材料采自四川省成

都市川龙苗圃,选择生长状况一致,无虫无病 1 a 生竹,在同一高度从东南西北 4 个方向采摘叶片,放入自封袋,立即带回实验室。

1.2 试验方法

1.2.1 试材处理 材料带回实验室后依次用自来水、蒸馏水洗干净,用纱布吸干水分,然后将叶片平均分为处理组和对照组。对照组置于暗处,处理组立即放入生化培养箱,在暗处条件下处理。处理温度梯度为 5、0、-5、-10、-20℃,降温速度为 2.0℃/h。处理组于 5℃处理 24 h 后,第 1 次取样;降温至 0℃,停留 24 h 后第 2 次取样;依次类推,直至-20℃为止;处理组取样时对照组同时取样,独立重复 5 次。

1.2.2 酶活性分析 酶液的提取参照 XIE Zhi-xia^[4]的方法,略做修改。取竹叶 0.5 g,加入液氮,15 mL 50 mM pH 7.0 磷酸缓冲液(包含 0.1 mM EDTA-Na₂、1%(w/v)PVP 和 0.05%(w/v)Triton X-100),迅速研磨成匀浆,4℃,3 750 r/min,离心 30 min,上清液用于 SOD、CAT 和 POD 活性分析。SOD 活性测定方法:采用 NBT 还原法^[5],略做修改,在 2 200 lx 光强下反应 20 min,用提取缓冲液代替酶液调零后,测定 A₅₆₀。POD 活性测定方法:参考何冰等^[6]的方法,略做修改。向 3 mL 反应混合液(混合液由 500 mL 50 mM pH 7.0 磷酸缓冲液、0.28 mL 愈创木酚和 0.19 mL 30% H₂O₂ 配制而成)中加入粗酶液 0.1 mL,迅速摇匀,立即测定 A₄₇₀,每 10 s 读数 1 次,共 90 s。以 1 min 内 1 g 鲜重的吸光值的降低来表示酶活性大小,单位为 ΔA₄₇₀·min⁻¹·g⁻¹FW,用提取缓冲液代替酶液调零。CAT 活性测定方法:参考 Sarita Verma^[7]和 Aebi H E^[8]的方法,略做修改。取 1 mL 0.1% H₂O₂ 和 2 mL 50 mM pH 7.0 磷酸缓冲液于石英比色皿中,加入酶液 0.1 mL 迅速混匀,立即测定 A₂₄₀,于 0、30、60、90、120 和 180 s 读数。以 1 min 内 1 g 鲜重

第一作者简介:易守理(1988-),男,在读本科,现从事园林植物研究工作。E-mail: 197297138@qq.com.

通讯作者:高素萍(1966-),女,博士,教授,现从事生态学及园林植物种质资源研究工作。E-mail: 86262444@qq.com.

基金项目:科技部“十一五”科技支撑计划资助项目(2008BADC2B00)。

收稿日期:2010-06-07

的吸光值的降低来表示酶活性大小,单位为 $\Delta A_{240} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$,用浸提缓冲液代替酶液调零。

1.3 数据分析方法

应用 Excel 2007、SAS 9.1.3 软件进行数据统计分析。

2 结果与分析

2.1 低温胁迫下 2 种丛生竹 SOD 活性的变化

SOD 被认为是抗氧化酶中的关键酶, SOD 是目前在植物或其它组织中发现的唯一能把 O_2^- 还原为 H_2O_2 , 同时将 O_2^- 氧化为 O_2 的抗氧化酶^[9]。2 种丛生竹的 SOD 活性随低温胁迫程度的加剧, 表现出一定的波动性, 并观察到大叶慈竹与慈竹有类似的变化趋势(图 1-a)。0℃处理后, 慈竹的 SOD 活性较 5℃时上升 8.36%, 但和此时的 CK 几乎相当(图 1-b); -5℃处理

后, 慈竹的 SOD 活性下降, 且低于对照(图 1-b)。说明低温已对慈竹的活性造成了抑制。随着低温锻炼效果的累积, 锻炼诱导 SOD 活性迅速上升, 在 -10℃时上升显著($P=0.0271$)。5、0、-10℃处理后, 大叶慈竹 SOD 活性不仅高于慈竹 SOD 活性(图 1-a), 而且高于自身的对照(图 1-c), -5℃处理后, 大叶慈竹的 SOD 活性低于 CK(图 1-c), 但其 SOD 活性仍高于慈竹(图 1-a)。-20℃处理后慈竹 SOD 活性超过了大叶慈竹(图 1-a), 同时, 尽管 2 种丛生竹处理组 SOD 活性均低于 CK, 但慈竹中的差异也是小于大叶慈竹的。胁迫一开始, 大叶慈竹就表现出较高的 SOD 活性, 对低温胁迫可能较为敏感, 有利于通过进行低温锻炼来提高抗寒性; 随着胁迫程度加深, 慈竹中 SOD 活性表现逐渐优于大叶慈竹, 可能有更强忍受极端低温的能力。

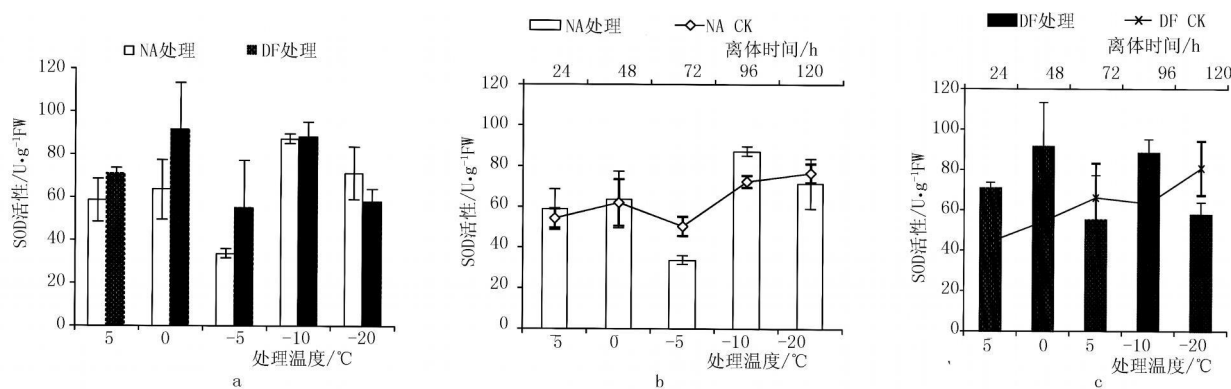


图1 低温对 SOD 活性的影响

注: NA, 代表慈竹; DF, 代表大叶慈竹。每个值的均数标准误差由 5 次独立重复试验结果计算得到。主横坐标表示处理温度梯度, 为处理组横坐标; 次横坐标表示材料离体时间, 为 CK 横坐标。下同。

2.2 低温胁迫下 2 种丛生竹 CAT 活性的变化

CAT 能淬灭 H_2O_2 ^[10], 直接分解 H_2O_2 产生 H_2O 和 O_2 。由图 2-a 可知, 随着低温胁迫程度的加剧, 2 种丛生竹的 CAT 活性均表现为先降后升的趋势。对照组中 2 种丛生竹的 CAT 活性差异极显著($P<0.0001$), 可以认为存在极显著的竹种差异。0℃处理后, 慈竹的 CAT 活性上升, 且高于 CK(图 2-b)。这是慈竹对低温胁迫的适应性反应。-5℃处理后, 慈竹的 CAT 活性显著下降($P=0.0303$), 之后的处理组均维持在较低的活性水平, 且变化平缓(图 2-b)。经低温处理后, 和对照组一样 CAT 在大叶慈竹体内维持着较高的活性, 并极显著($P<0.0001$)高于慈竹(图 2-a)。5℃处理时, 大叶慈竹的 CAT 活性保持着较高水平, 温度降至 0℃之后 CAT 活性对照组均高于处理组(图 2-c)。说明 5℃处理对大叶慈竹的 CAT 活性有促进作用, 0℃以下低温会抑制大叶慈竹 CAT 活性, 特别是一 5℃处理后, 大叶慈竹的 CAT 活性极显著下降($P=0.0006$), 与 -5℃时 SOD 活性表现类似。-10℃处理后, 大叶慈竹的 CAT 活性极显著上

升($P=0.0021$), 表明 -5℃对于 2 种丛生竹来说具有重要的生理学意义。CAT 和 SOD 组成的防线在大叶慈竹对抗低温伤害时起重要作用。

2.3 低温胁迫下 2 种丛生竹 POD 活性的变化

POD 作为细胞内清除活性氧系统中的重要酶, 它能催化 H_2O_2 与酚类的反应^[11], 达到清除过氧化物的作用。经低温处理后, POD 活性均表现处轻微波动, 但在慈竹叶片内总体呈下降趋势, 大叶慈竹没有显著变化(图 3-a)。2 种丛生竹的 POD 活性在处理组($P=0.0006$)和对照组($P<0.0001$)中均表现出极显著差异, 但变化趋势是类似的(图 3-b,c)。POD 在慈竹体内维持较高的活性, 在大叶慈竹体内则表现相反(图 3-a)。在整个处理过程中, 2 种丛生竹的 POD 活性变化均较为平缓。在对照组中, 慈竹的 POD 活性则表现出较大的波动。96 h 时 POD 活性下降显著($P=0.0155$), 而在 120 h 时 POD 活性上升极显著($P=0.0002$)(图 3-b)。处理组与对照组的大叶慈竹的 POD 活性始终维持在较低的水平(图 3-c), POD 在其对抗低温伤害时发挥的作用是很

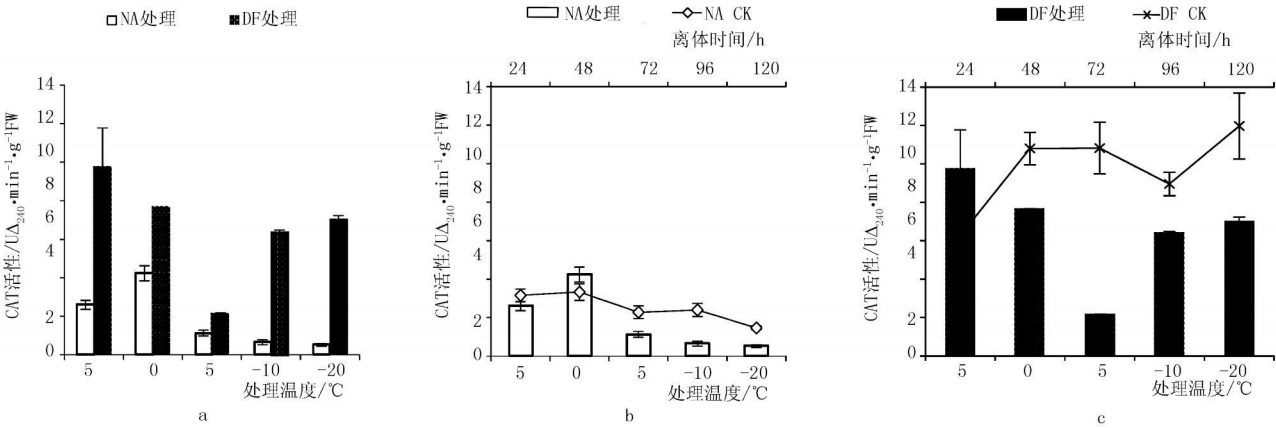


图2 低温对 CAT 活性的影响

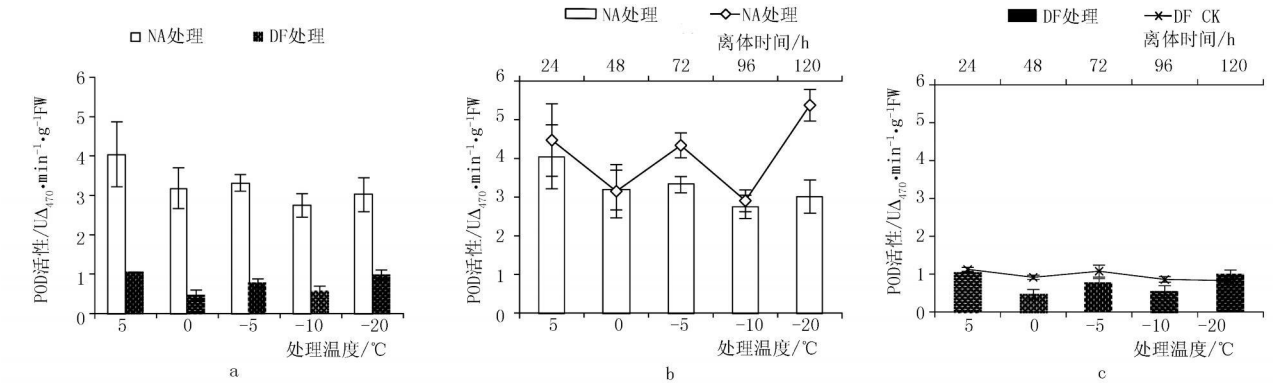


图3 低温对 POD 活性的影响

有限的。POD 活性处理内没显著差异,若 POD 活性较高,POD 对低温不敏感,有利于抵抗低温伤害;但是,若 POD 活性很低,这种不敏感性不利于低温锻炼,也就不利于抵御低温胁迫。慈竹在对抗低温伤害时 POD 起着重要作用。

3 结论与讨论

试验研究黑暗条件下连续降温对 2 种慈竹 3 种抗氧化酶活性的变化的影响,因为材料的生物学特点限制,只能以离体叶片为处理对象。由于材料离体之后诱导的抗逆反应可能会干扰研究者做出判断,如姜微波等^[12-14]研究了离体欧芹叶片中可溶蛋白质含量随时间的变化。无论处理组还是对照组,第 2 天组织中可溶性蛋白的降解都会达到离体前蛋白的 25%以上,这就直接影响到可溶性蛋白含量和蛋白酶比活力的计算。宋松泉等^[15]在研究杂交水稻离体叶片衰老与蛋白质代谢的关系时,也有类似的结果。因此,必须特别小心地从使用离体材料的化验结果中得出结论。而在已有的研究中无论是采用绝对数值还是相对数值表示,通常只设有一个对照,将处理组的数据都与其比较,这有一定局限

性。若试验采用逐渐降温的方法或研究生理指标数据随胁迫时间动态变化,此时还应该考虑材料自身生理周期等因素,每次对处理组测定时都应该测定一次对照组值,以此作为相应的对照值,特别是使用离体材料,随着离体时间增加引起的胁迫同样会诱导材料的抗逆反应。以 CAT 为例, -10 °C 和 -20 °C 处理后,大叶慈竹的 CAT 活性极显著上升 ($P=0.0021$ 和 $P=0.0017$),但其活性仍低于各自 (96 h 和 120 h) 的对照值,说明 -10 °C 处理后,低温抑制了大叶慈竹的 CAT 活性,而非促进;若仅设置一个对照 (24 h),用 -10 °C 和 -20 °C 的处理值与 24 h 对照值相比,就会得出相反的结论 (图 2-c)。

该试验中 2 种丛生竹的 SOD、CAT、POD 活性都在一定程度上受低温抑制。慈竹和大叶慈竹的 SOD、CAT 均表现为先降后升的趋势,慈竹 POD 活性随温度降低而降低,大叶慈竹 POD 活性维持在较低水平。大叶慈竹和慈竹的 SOD 活性没有显著差异,但 CAT 和 POD 活性表现出极显著差异。低温处理后,大叶慈竹维持着较高的 CAT 活性,而慈竹则表现相反。在正常情况下,细胞代谢过程中产生的活性氧和活性氧清除剂之间处于

动态平衡状态,由超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)组成的防御系统可以清除体内一定量的活性氧^[16]。其中SOD是植物体内防御氧化逆境下自由基形成的关键酶,是对抗氧化损伤的第一道防线^[17],它主要将所产生的超氧阴离子自由基(O_2^-)歧化成 H_2O_2 和 O_2 ;而CAT直接分解 H_2O_2 产生 H_2O 和 O_2 ,POD以过氧化物为底物,以植物体内多种还原剂为电子受体清除过氧化物,三者之间的协同作用能使植物体内自由基维持相对较低的水平,从而减少其对植物细胞膜的伤害^[18]。因此,CAT和SOD在大叶慈竹对抗低温伤害时起重要作用,慈竹则以较高的POD和SOD活性使体内的AOS在遭受胁迫时仍然维持在较低水平。

参考文献

- [1] 卢萍,罗明灿,刘清江.我国北方地区竹子引种中存在的问题及对策分析[J].林业调查规划,2009,34(4):100-104.
- [2] 陈其兵,高素萍,刘光立,等.丛生竹集约培育模式技术[M].北京:中国林业出版社,2009:28-48.
- [3] 郝峰鸽,杨立峰,周建.7种木本豆科植物抗氧化酶活性研究[J].安徽农业科学,2006,34(19):4909-4911.
- [4] XIE Zhixia, DUAN Lirong, TIAN Xiaoli, et al. Coronatine alleviates salinity stress in cotton by improving the antioxidative defense system and radical-scavenging activity[J]. Journal of Plant Physiology, 2008, 165: 375-384.
- [5] Robert R Stewart C, Derek B. Lipid Peroxidation Associated with Accelerated Aging of Soybean Axes[J]. Plant Physiol, 1980, 65: 245-248.
- [6] 何冰,叶海波,杨肖娥.铅胁迫下不同生态型东南景天叶片抗氧化酶

- 活性及叶绿素含量比较[J].农业环境科学学报,2003,22(3):274-278.
- [7] Sarita V, Shyam N, Mishra. Putrescine alleviation of growth in salt stressed Brassica juncea by inducing antioxidative defense system[J]. Journal of Plant Physiology, 2005, 162: 669-677.
 - [8] Aebi H E. Catalase. In Bergmeyer H U(ed). Methods of Enzymatic Analysis[J]. Weinheim; Verlag Chemie, 1983(3): 273-282.
 - [9] Asada K. The water-water cycle as an alternative photon and electron sinks. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B[J]. Biological Sciences, 2000, 355(1402): 1419-1431.
 - [10] 施溯筠,陈翠云.外源一氧化氮供体 SNP 对 UV-B 辐射下红芸豆叶片中 SOD, CAT 和 POD 同工酶的影响[J]. 兰州大学学报(自然科学版), 2009, 45(4): 78-82.
 - [11] 段云青,王艳,雷焕贵.锡胁迫对小白菜 POD、PPO 和 SOD 活性的影响[J].河南农业科学,2006(7):88-91.
 - [12] 姜微波. GA 对离体欧芹叶片中蛋白质代谢的影响[J]. 中国农业大学学报, 1996, 4(1): 36.
 - [13] 姜微波. 乙烯对欧芹离体叶片中蛋白质代谢的影响[J]. 植物生理通讯, 1998, 34(5): 359-361.
 - [14] 姜微波, Amnon L, Nehemia A. CO₂ 对离体欧芹叶片中蛋白质代谢的影响[J]. 植物学通报, 2000, 17(2): 185-187.
 - [15] 宋松泉,苏卫珍,彭晓南.杂交水稻离体叶片衰老与蛋白质代谢的关系[J]. 中山大学学报论丛, 1995(1): 20-22.
 - [16] 杨德光,吴广霞,唐心龙,等.植物在低温胁迫下的分子反应机制研究进展[J]. 玉米科学, 2009, 17(2): 99-101.
 - [17] 罗娅,汤浩茹,张勇.低温胁迫对草莓叶片 SOD 和 AsA-GSH 循环酶系统的影响[J]. 园艺学报, 2007, 34(6): 1405-1410.
 - [18] 龚双姣,马陶武,姜业芳,等.锡胁迫下 3 种蕈类植物抗氧化酶活性变化的比较研究[J]. 西北植物学报, 2008, 28(9): 1765-1771.

Change of SOD, CAT, POD Activity in Two Sympodial Bamboos under Low Temperature Stress

YI Shou-li¹, LEI Ting², GAO Su-ping²

(1. College of Forestry Department of Landscape Architecture, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan 625014; 2. Landscape Research Institute Sichuan Agricultural University, Wenjiang, Sichuan 611130)

Abstract: Change of SOD, CAT, and POD activity in *Neosinocalamus affinis* and *Dendrocalamus farinosus* were assayed under low temperature (5, 0, -5, -10, -20 °C). The results showed that SOD and CAT activity in both two sympodial bamboos leaves decreased first and then increased, and POD activity in *Neosinocalamus affinis* decreased while the temperature fell down, but there was marginal change in *Dendrocalamus farinosus*. Higher SOD and CAT activity protective *Dendrocalamus farinosus* under low temperature, and higher SOD and POD activity kept reactive oxygen species (AOS) at a lower level protective *Neosinocalamus affinis* under low temperature.

Key words: low temperature; sympodial bamboo; SOD; CAT; POD