

干旱胁迫对甘草幼苗保护酶活性及脂质过氧化作用的影响

李 明, 王根轩*

(兰州大学干旱农业国家重点实验室, 兰州 730000)

摘要:甘草(*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.)幼苗用 PEG6000(−2.5Mpa, −1.5Mpa)模拟干旱处理,测定了 4d 中叶的 MDA 含量、膜相对透性及几种保护酶(SOD、POD、ASP、CAT)活性变化情况。结果表明:−2.5Mpa 胁迫下,MDA 含量总体呈上升趋势;−1.5 Mpa 胁迫下,前两天略有降低,至第 4 天时,上升到与处理前基本持平的水平。细胞膜透性在处理前期下降,后期升高,低渗透胁迫较高渗透胁迫变化平缓。几种保护酶活性在干旱处理期间都有变化:POD 除第 1 天降低外,其余几天均呈上升趋势;在处理前期,SOD 活性升高,CAT 活性下降,而在后期其变化为 SOD 活性降低,CAT 活性升高;ASP 活性变化波动较大,−2.5Mpa 胁迫下,第 1、第 3 天有两次上升峰,第 4 天较处理前下降了 104.3%。在−1.5 Mpa 胁迫下的几种保护酶活性变化幅度较小。表明了高渗透胁迫能使膜脂过氧化而引起膜的损伤,低渗透胁迫程度对细胞膜脂过氧化及膜的透性影响较小,且可能对膜脂过氧化起到一定的防御作用。植物在干旱胁迫下保护酶系统的作用,可能是通过它们之间相互协调且保持一个稳定的平衡态而进行的。

关键词:甘草幼苗;干旱胁迫;保护酶;丙二醛

Effect of Drought Stress on Activities of Cell Defense Enzymes and Lipid Peroxidation in *Glycyrrhiza uralensis* Seedlings

LI Ming, WANG Gen-Xuan* (The State Key Laboratory of Arid Agroecology of Lanzhou University, Lanzhou, 730000 China). *Acta Ecologica Sinica*, 2002, 22(4): 503~507.

Abstract: It is well known that the drought stress may induce active oxygen species (AOS) generation and cause injuries to plants at various degrees. Defense enzymes such as SOD, POD and CAT etc, which clean AOS, exist in plant cells. AOS such as $O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$, H_2O_2 were cleansed effectively and the degrees of lipid peroxidation and cell membrane injury were decreased by the compatible functions of these enzymes. Liquorices(*Glycyrrhiza uralensis*) can survive in some extreme environmental conditions such as dehydration, high and low temperature, high salt or alkali concentrations in the arid or subarid areas. Liquorices are very important in hampering wind, fixing sand and improving soil construction, but it is known a little about the mechanism of its tolerance to drought stress. In this study, Liquorices seedlings were treated with the osmotic stress solution PEG 6000(−2.5MPa, −1.5MPa). The content of MDA, cell membrane electrolyte leakage and several defense enzymes activities were measured at the different times after treatments. The content of MDA increased generally under −2.5MPa PEG stress, but decreased in the early stages of stress then increased to that of originating state approximately under −1.5MPa PEG stress. The levels of the cell membrane electrolyte leakage were decreased in the early stages and increased in the later stages, the changed rate was slower under −1.5MPa stress than that under −2.5MPa stress. Several defense enzymes activities varied under −2.5MPa or −1.5MPa PEG osmotic stress; POD activities in-

基金项目:国家重点基础研究专项经费资助项目(G1999011705);国家自然科学基金资助项目(30170161)

* 通讯联系人 Author for correspondence

收稿日期:2001-11-15 修稿日期:2001-09-03

作者简介:李 明(1963~),女,黑龙江人,博士。主要从事植物生理生化、分子生态学方面的研究。

creased in all days except the first day; SOD activities raised and CAT activities declined, at 1 or 2d after treatment, but SOD activities decreased and CAT activities increased; ASP activities changed, which given a peak at the first and third day respectively under -2.5 MPa stress. All of the alterations were in less extent under -1.5 MPa stress than under -2.5 MPa correspondingly. This results suggested that the system of the defense enzymes might play a key role by balancing all of the responding enzymes under drought condition in plants.

Key words: drought stress; Liquorice seedlings; cell defense enzyme; MDA

文章编号:1000-0933(2002)04-0503-05 中图分类号:Q948 文献标识码:A

干旱胁迫与植物膜脂过氧化及保护酶系统关系的研究已受到普遍重视。植物在逆境条件下的膜脂过氧化反应和保护酶系统包括超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)和抗坏血酸氧化酶(ASP)等活性的变化,已广泛用于植物对逆境的反应机理的研究^[1]。植物在某些营养胁迫下的保护酶系统的变化亦见诸报道^[2~6]。1975年 Fridovich 提出生物自由基伤害学说^[7],认为植物体内自由基大量产生会引发膜脂过氧化作用,造成细胞膜系统破坏,严重时导致植物细胞死亡。植物细胞中存在着能清除活性氧自由基的保护酶系,如超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)等,它们的协调作用能有效地清除 O_2^- 、 OH^- 、 H_2O_2 等自由基,防御着膜脂过氧化,从而使细胞膜免受其伤害。目前已经有众多的报道,小麦^[8]、杉木^[9]、红松^[10]、花生^[11]等方面的工作均证明保护酶活性与植物的抗旱性有一定的关系。甘草是常用中药,也是一种耐旱、耐寒、抗盐碱性极强的干旱、半干旱地区重要的植物资源之一,对防风固沙、改善土壤结构起到重要的作用^[12]。有关甘草耐旱机理方面的研究还未见报道。本实验通过模拟干旱胁迫处理甘草幼苗,测定幼苗叶内的 MDA 含量、膜相对透性及几种保护酶活性,旨在探讨干旱胁迫对甘草幼苗的伤害与膜脂过氧化的关系以及保护酶系统与抗旱性的关系,为甘草耐旱机理的研究提供依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料及处理

精选甘草 *Glycyrrhiza uralensis* 种子,用 $0.1\% \text{ HgCl}_2$ 消毒 15min 后再用 $50\% \text{ H}_2\text{SO}_4$ 处理 60 min,经自来水、无离子水漂洗后,置于经过消毒垫有双层滤纸的培养皿中,在黑暗中 $25\text{ }^\circ\text{C}$ 萌发 3d 后,选出芽一致的种子,置于 Hogland 营养液中,进行水培育苗。培养条件:温度 $(25\pm 1)\text{ }^\circ\text{C}$,光照 12h/12h(昼夜),光强 $100\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 。待幼苗长至 8d 龄时,将其取出,分别移入 -1.5 MPa 、 -2.5 MPa 两种不同水势的 PEG6000 溶液中进行根际胁迫处理,以水培幼苗为对照。处理后甘草幼苗叶片的相对含水量(水分占干重的百分比)的变化情况见表 1。

表 1 干旱胁迫过程甘草幼苗叶片相对含水量(%)的变化

Table 1 Change of relative water content in <i>Glycyrrhiza uralensis</i> seedlings under drought stress					
干旱处理	干旱时间 Drought time(d)				
Drought stress	0	1	2	3	4
$-1.5(\text{MPa PEG})$	84.35 ± 1.07	82.61 ± 1.57	80.49 ± 2.41	75.58 ± 2.03	70.37 ± 1.85
$-2.5(\text{MPa PEG})$	85.62 ± 0.83	83.28 ± 2.17	80.25 ± 1.86	72.37 ± 1.83	66.16 ± 0.95

分别在处理后 0、1、2、3、4d 取甘草幼苗叶测定各项指标,每项测定选定 3 盆,测定时重复 3 次。

1.2 测定方法

SOD 活性根据 Giannopolitis 和 Ries 的方法^[13]测定,以每单位时间内抑制光化还原 50% 的氮蓝四唑(NBT)为一个酶活性单位(U);POD 活性基本按 Jasdanwala 等方法^[14]测定,以每毫克蛋白质每分钟所含的酶活性单位(U)表示;CAT 活性采用洛杰尔斯基等方法^[15],以每毫克蛋白每分钟作用的 $\text{H}_2\text{O}_2(\mu\text{g})$ 表示;ASP 活性按沈文飏、徐朗莱的方法^[16]测定,膜相对透性按李锦树等的方法^[17]测定,以样品煮前电导率占煮后电导率的百分数表示;MDA 含量按林植芳等方法^[18],以每毫克蛋白质所含的 MDA(μmol)表示。蛋白质含量测定采用 Lowry 的方法^[19]进行。

2 结果与分析

MDA 是膜脂质过氧化作用的主要产物之一,其含量可表示膜脂过氧化作用的程度。甘草幼苗在两种渗透胁迫下的变化情况,−2.5MPaPEG 胁迫下,在不同胁迫时间中,MDA 含量总体呈上升趋势,虽然在处理两天时有所下降,但仍高于处理前;−1.5 MPaPEG 胁迫下,在处理的前两天里 MDA 含量有所下降,第 2 天较处理前降低了 17.0%,后两天升高,但第 4 天的 MDA 含量与处理前相比,差别不大,在整个处理期间的 MDA 含量较−2.5MPaPEG 胁迫下的低,变化幅度也较小。(图 1)。

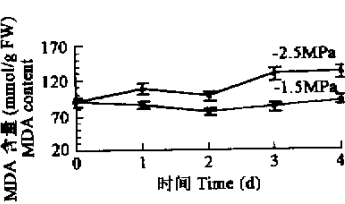


图 1 PEG 干旱胁迫对 MDA 含量的影响

Fig. 1 Effect of PEG drought stress on MDA content

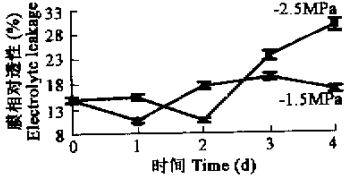


图 2 干旱胁迫对膜相对透性的影响

Fig. 2 Effect of PEG drought stress on electrolyte leakage

膜透性在两种胁迫处理的后两天中,比处理前升高。在−2.5MPa 胁迫 4d 时,膜透性较处理前提高了 100%,而在处理第 2 天时,膜透性较处理前下降了 28.3%;在−1.5 MPa 胁迫下,膜透性除第 1 天低于处理前的 28.3%外,其余几天均高于处理前。第 3 天达到最大值,比处理前增加了 29.6%,第 4 天时略高于处理前,总体变化幅度较前者小。两种胁迫下的膜透性都在处理初期有个下降过程,整个过程呈波动变化。MDA 含量与膜透性变化趋势比较,−2.5MPa 胁迫下,两者更趋接近。(图 2)。

经两种胁迫处理后,甘草幼苗几种保护酶活性都有所变化(图 3~图 6)。POD 活性在两种胁迫下都是第 1 天有所降低,之后随处理时间的增加而升高,−1.5 MPa 胁迫下的变化幅度较−2.5MPa 的小;SOD 活性变化是先升高后降低;CAT 活性是先降低而后升高。ASP 活性在−2.5MPa 胁迫下,变化波动较大,在第 1 和第 3 天时,有两个上升峰,第 4 天时,比处理前下降了近一倍;−1.5 MPa 胁迫下除在第 2 天略有上升外,呈平缓下降趋势。两种胁迫相比,−2.5MPa 胁迫下,几种酶的活性变化幅度较大,而−1.5 MPa 胁迫下的几种酶活性变化较平缓。膜的透性大时,POD、CAT 活性相应升高,ASP 活性呈波动变化,SOD 活性则下降。说明渗透胁迫破坏了保护酶系统的动态平衡,且这几种酶是相互协调而起作用的。

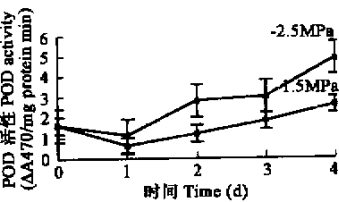


图 3 PEG 干旱胁迫对 POD 活性的影响

Fig. 3 Effect of PEG drought stress on POD activity

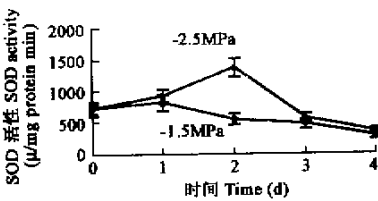


图 4 PEG 干旱胁迫对 SOD 活性的影响

Fig. 4 Effect of PEG drought stress on SOD activity

3 讨论

植物在长期进化过程中形成了受遗传性制约的逆境适应机制,活性氧代谢在其中占据重要地位,是植物对逆境胁迫的原初反应^[20]。大量研究指出,当植物处于逆境条件(如高光强、干旱、盐渍、高温、冷冻、营养元素缺乏)及衰老等都会导致植物细胞内自由基产生和消除的平衡受到破坏而出现自由基积累,并由此引发或加剧了细胞的膜脂过氧化。MDA 是膜脂过氧化作用的主要产物之一,具有很强的细胞毒性,对膜和细

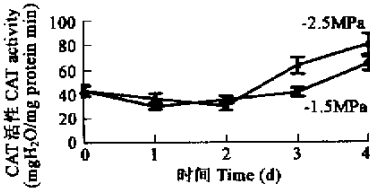


图 5 PEG 干旱胁迫对 CAT 活性的影响

Fig. 5 Effect of PEG drought stress on CAT activity

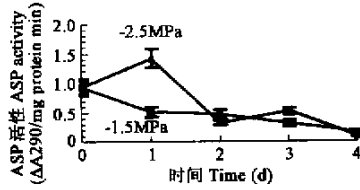


图 6 PEG 干旱胁迫对 ASP 活性的影响

Fig. 6 Effect of PEG drought stress on ASP activity

胞中的许多生物功能分子如蛋白质,核酸和酶等均有很强的破坏作用,并参与破坏生物膜的结构与功能。MDA 含量高低和细胞质膜透性变化是反映细胞膜脂过氧化作用强弱和质膜破坏程度的重要指标^[21]。在模拟干旱处理甘草幼苗的过程中,−2.5MPa 胁迫下的 MDA 含量变化趋势与膜透性的变化趋势相似,可以认为是膜的过氧化引起了膜的损伤,也说明了该实验处理的有效性;而−1.5 MPa 胁迫下的 MDA 含量与膜透性的变化趋势不一致,变化幅度也较前者的小,胁迫第 4 天时,MDA 含量基本与胁迫前的含量持平,膜的相对透性也基本恢复到了胁迫前的水平。说明干旱胁迫程度较低时,对细胞膜脂过氧化及膜的透性的影响相应地减小,且可能对膜脂过氧化起到一定的防御作用,也暗示了可能有其它生理反应参与了膜损伤的过程。这与阎秀峰等^[10]研究的结果是一致的。在干旱处理过程中,MDA 含量及膜透性在胁迫前期都有个降低过程,可能是植物的一种避旱反应。植物体内活性氧自由基的产生是多部位和多途径的。植物体内的多数氧化还原反应都有可能产生少量的超氧化物自由基(O₂^{·−}),特别是线粒体呼吸链和叶绿体照光时的光化学反应 O₂^{·−}。可通过启动自由基的链式反应及其它类型的再氧化等产生羟基自由基(OH[·])、单线态氧(¹O₂)和过氧化氢(H₂O₂)。这些活性氧与细胞内的成分具有很强的反应能力,它们能够直接或间接启动膜脂的过氧化作用,导致膜的损伤和破坏。在生物进化过程中细胞内形成了防御活性氧毒害的保护机制,即被称为保护酶系统的超氧化物歧化酶、过氧化物酶、过氧化氢酶和非酶系统 VitE、GSH、ASA 等。SOD、CAT 和 POD 等酶类是细胞抵御活性氧伤害的重要保护酶系统,它们在清除超氧自由基、过氧化氢和过氧化物以及阻止或减少羟基自由基形成等方面起着重要作用^[7]。超氧化物歧化酶以催化 O₂^{·−} 发生歧化作用起到清除 O₂^{·−} 的解毒作用,超氧化物歧化酶将 O₂^{·−} 歧化产生的 H₂O₂ 由细胞内 CAT 和 POD 清除。本实验结果表明,几种保护酶活性在干旱处理期间都有变化,POD 除第 1 天有所降低外,其余几天均呈上升趋势;在处理前期,SOD 活性升高,CAT 活性降低,而在后期其变化为 SOD 活性降低,CAT 活性上升;ASP 活性变化波动较大。在两种处理下,−2.5MPa 胁迫下的酶活性变化幅度较−1.5 MPa 处理的大。说明在水分胁迫下,植物体内保护酶系统的活力和平衡受到破坏,使活性氧累积,启动并加剧膜脂过氧化而造成整体膜的损伤。低渗透胁迫较高渗透胁迫对保护酶系统的动态平衡影响较小,变化也很平缓,对膜脂的过氧化及膜透性的影响也较小。有关保护酶系统与植物耐旱关系的研究已有许多报道,结果都不尽相同。这可能与不同植物的抗旱能力不同,体内的保护酶系统的活力及钙离子等营养元素的含量、分布和抗氧化物质含量等因子的不同都有关系^[22]。保护酶系统对自由基的清除能力的变化可能是植物抗逆性的共同机制。植物体在逆境胁迫下保护酶的作用,可能是通过它们之间相互协调且保持一个稳定的平衡态所进行的。

参考文献

[1] Bowler C, Van Montagu M, Inze D. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu Rev Plant Mol Biol.*, 1992, **43**: 83~116.

[2] Vaughan D, DeKock P C, Ord B G. The nature and localization of superoxide dismutase in fronds of *Lemna gibba* L. and effect of copper and zinc deficiency on its activity. *Physiol Plant*, 1982, **54**: 253~257.

[3] Cakmak I, Marschner H. Magnesium deficiency and high light intensity enhance activity of superoxide dismutase

- ascorbate peroxidase and glutathione reductase in bean leaves. *Plant Physiol.*, 1992, **98** (1): 222~1 227.
- [4] Cakmak I, Marschner H. Effect of zinc nutritional status on activities of superoxide radical and hydrogen peroxide scavenging enzymes in bean. *Plant Soil*, 1993, **156**:127~130.
- [5] Mehlhorn H, Wenzel A. Manganese deficiency enhance ozone toxicity in bush beans (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Saxa). *J. Plant Physiol.*, 1996, **148**:155~159.
- [6] Wu Z Q(吴振球), Wu Y X(吴岳轩). Effect of Copper and Zinc on growth and superoxide dismutases in rice seedlings. *Acta Phytophysiol Sinica*(in Chinese)(植物生理学报), 1990, **16** (2):139~146.
- [7] Fridovich, I. Superoxide dismutase. *Ann. Rev. Biochem.*, 1975, **44**: 147~159.
- [8] Wang B S(王宝山), Zhao S Q(赵思齐). Effect of drought stress on membrane-lipid peroxidation and defense enzymes in wheat seedlings. *J of Shandong Pedag Univ(Natural Science)*(in Chinese)(山东师范大学学报(自然科学版)), 1987, (2):29~39.
- [9] Shu M Y(苏梦云), Fan M Q(范铭庆). Effect of osmotic stress and Calcium on membrane-lipid peroxidation and the activity of defense enzymes in fir seedling. *Forest Research*(in Chinses)(林业科学研究), 2000, **13** (4): 391~396.
- [10] Yan X F(阎秀峰), L J(李 晶), Zu Y G(祖元刚). Effect of drought stress on activity of cell defense enzymes and lipid peroxidation in Korean pine seedling. *Acta Ecologica Sinica*(in Chinese)(生态学报), 1999, **19** (6): 850~854.
- [11] Chen Y Q(陈由强), Ye B Y(叶冰莹), Zhu J M(朱锦懋), *et al.* Effect of osmotic stress on activity oxygen damage and membrane-lipid peroxidation of leaves in varieties of peanut (*Arachis hypogaea*). *Acta China Oil Agronomica Sinica*(in Chinese)(中国油料作物学报), 2000, **11** (4):24~25.
- [12] Zhang J(张 继), Yao J(姚 健), Ding L(丁 兰), *et al.* Study Advances on the utilization of *Glycyrrhiza. Grassland and Turf*(in Chinese)(草原与草坪), 2000, **89** (2): 12~17.
- [13] Giannopolitis C N, Ries S K. Superoxide dismutase I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiol.*, 1977, **59**: 309~314.
- [14] Jasdanwala R T, Singh Y D, Chiony J J. Auxin metabolism in developing cotton hairs. *J. Exp. Bot.*, 1997, **28**: 1111~1116.
- [15] Bielujier S J, Pulusklya K F. *Experiment guidance on plant biochemistry*. Chao Z X(曹宗巽,等译), *et al.* translate. Beijing:High Education Press, 1956. 303~306.
- [16] Shen W B(沈文飏), Xu L L(徐郎莱) and Ye M B(叶茂炳), *et al.* Discussion on assay the activity of ascorbic acid peroxidase. *Plant Physiol Commun.* (in Chinese)(植物生理学通讯), 1996, **32** (3): 203~205.
- [17] Li J S(李锦树), Wang H C(王洪春), Wang W Y(王文英). Effect of drought stress on cell membrane-lipid and membrane peretrability in maize leaves. *Acta Phytophysiol Sinica*(in Chinese)(植物生理学报), 1983, **9** (3): 223~229.
- [18] Lin Z F(林植芳), Li S S(李双顺), Lin G Z(林桂珠). Relationship between superoxide dismutase as well as lipid peroxidation and the senescence in rice leaves. *Acta Bot Sinica*(in Chinese)(植物学报), 1984, **26**: 605~615.
- [19] Lowry DH. Protein measuement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, **193**: 267~275.
- [20] Zhang M Q(张木清), Chen R K(陈如凯), Yu S L(余松烈). Analysis on the metabolism of reactive oxygen species in sugar cane leaves under water stress. *Acta Agronomica Sinica*(in Chinese)(作物学报), 1996, **22** (6): 263~267.
- [21] Chen S Y(陈少裕). Relationship between membrane lipid peroxidation and the stressed plants. *Chin. Bull. Bot.* (in Chinese)(植物学通报), 1989, **6** (4): 211~217.
- [22] Wan M L(万美亮), Kuang Y H(邝炎华), Chen J X(陈建勋). Effect of phosphorus deficit on membrane-lipid peroxidation and the activity of defense enzymes systems in sugar cane. *J. of South China Agric. Univ.* (in Chinese)(华南农业大学学报), 1999, **2** (2): 58~61.