

干旱胁迫下甜橙叶片保护酶体系的变化研究

杨方云¹, 魏朝富², 刘英¹

(1 中国农业科学院柑桔研究所, 重庆 400712; 2 西南大学资源环境学院, 重庆 400716)

摘要: 对 2 年生枳 [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] 砧无病毒奉节 72-1 脐橙 [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Fengjie 72-1 navel] 嫁接苗进行持续性干旱胁迫处理, 研究干旱胁迫期间甜橙叶片保护酶活性和丙二醛(MDA)含量随土壤和植株水分变化的生理适应性。结果表明, 干旱胁迫明显导致了过氧化氢酶(CAT)活性下降, 过氧化物酶(POD)和超氧化物歧化酶(SOD)活性上升, 而 MDA 含量变化不明显。干旱胁迫初期或轻度胁迫期, 保护酶活性已具有明显的适应性反应; 当处于中度胁迫时, POD 和 SOD 依然保持很高活性。在防止 MDA 产生中, CAT 的作用不明显, POD 和 SOD 起主要的协同作用。

关键词: 干旱胁迫; 甜橙; 保护酶

中图分类号: S601

文献标识码: A

文章编号: 1008-505X(2006)01-0119-06

Protective enzyme systems in orange leaves under drought stress

YANG Fang-yun¹, WEI Chao-fu², LIU Ying¹

(1 Citrus Research Institute, CAAS, Chongqing 400712, China;

2 College of Resour. and Envir., Southwest Univ., Chongqing 400716, China)

Abstract: Two years old of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Fengjie 72-1 navel oranges grafted onto *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. were planted in containers filled with artificial nutrient soil (sand : peat : rice husk = 5:4:1). Different duration of continuous drought stress, 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, or 14 day, was imposed on different treatments. For each drought treatment, soil sample and five plants were picked out periodically to determine the soil water content and water potential (Ψ_1), relative water content (RWC), activities of catalase (CAT), peroxidase (POD) and superoxide dismutase (SOD), and content of malondialdehyde (MDA) of the leaves. Meantime, physiological responses of protective enzyme activities and content of MDA to soil and plant water changes were studied. Results showed that activity of CAT was depressed, while activity of POD and SOD was promoted and content of MDA changed little under drought stress. At the earlier stage of drought stress or under light drought stress, the activities of protective enzymes are of evident adaptive response. Being in a condition of moderate stress, POD and SOD retained high activity. POD and SOD together played a dominant synergistic effect in restraining the produce of MDA, while CAT contributed little.

Key words: drought stress; orange; protective enzyme

水资源的短缺和分布不均往往造成农业生产的干旱、半干旱或季节性干旱, 植物的生长发育也因此受到影响。已有研究表明, 干旱胁迫使植物体内活性氧增多, 直接或间接启动膜脂过氧化链式反应产生 MDA 等, 降低膜的稳定性, 促进膜的渗漏, 造成膜损伤^[1-4]。活性氧和 MDA 含量是目前已知的水分胁迫对植物伤害的主要生理响应特征。但植物在干旱胁迫时可使用自由基清除剂来有效防范活性氧的

伤害, 其中保护酶防御系统占有重要地位。因此, 研究干旱胁迫下植物的保护酶体系反应, 可以从深层次把握植物适应干旱的部分机制和策略, 从而为抗旱育种和抗旱栽培提供理论依据。

柑桔业在我国三峡库区、南方广大山区的农村经济中占有重要地位。但是, 季节性干旱经常影响柑桔的生长和发育。已有研究显示, 逆境胁迫对柑桔植物叶片中的 3 种保护酶和脂质过氧化产物

MDA 均产生影响^[5-6]；水分胁迫使柑桔实生苗叶片 POD 活性上升^[7]；葡萄柚在水分胁迫下叶片 POD 活性变化不稳定^[8]；水分胁迫使柚树苗叶片 SOD 活性上升、CAT 活性先上升后下降、MDA 含量增加^[6,9]。但是,同时研究干旱下柑桔 3 种保护酶反应和 MDA 变化还很少见,而且不同柑桔种类在水分胁迫下的生理反应存在较大差异,对甜橙的研究未见报道。为此,以国内普遍栽培的脐橙类柑桔为对象,对持续性干旱胁迫期间甜橙叶片中 SOD、POD、CAT 活性和 MDA 含量随土壤和植株水分的动态变化进行研究,以探讨甜橙对于干旱胁迫的部分生理适应性变化规律。

1 材料与方法

1.1 试验设计

试验在中国农科院柑桔研究所避雨网室内进行。试材为 2 年生枳砧无病毒奉节 72-1 脐橙嫁接苗,栽植容器为直径 15 cm,高 20 cm 的塑料盆,选用沙:泥炭:糠壳(5:4:1)配比的人工营养土作基质。

2003 年 9 月利用夏季自然高温条件,对容器苗分别进行灌水(CK)和持续性干旱 2、4、6、8、10、12 和 14d 处理,每个处理 5 株,每株每项指标重复取样 3 次,每次取土壤和叶片样时间统一在上午 8:30~9:00 进行。叶片样品的采取:叶水势和叶相对含水量的测定用随机取整叶法采样,即在每株不同枝梢上随机采取 3 张成熟叶片(功能叶)作为供试叶样;其它生理指标的测定用混合取样法,即将每株试材剩余成熟叶片(功能叶)全采下,擦净表面污物,然后剪碎、充分混匀、称样,每份 0.2g。土样采用通盆土柱取样法:即用相同大小的中空圆柱型取样器,由上至下纵向贯穿整个容器土层取样,为避免容器周边和中间土壤含水量的差异,3 次取样分别从容器断面的外、中、内处进行。

1.2 测定方法

土壤水分含量用烘干法测定,以重量含水量表示(%)。参照《植物生理生化实验原理和技术》一书的方法^[10]测定部分生理指标,并稍作改动:用压力室法测定叶水势;用称重法测定叶相对含水量;用巴比妥酸法测定丙二醛含量;用愈创木酚法测定 POD 活性,以鲜重计算酶活单位,单位为 $U/(g \cdot min)$,FW;用氮蓝四唑法测定 SOD 活性,于光照培养箱中 27℃、10 盏 40W 日光灯下光照 10min,然后于 560nm 比色,以鲜重计算酶活单位,单位为 U/g ,FW。参照《植物生理学实验指导》一书的方法^[11]并参考西南农业大学生理实验指导方法,用光度法测定 CAT 活

性:定义 25℃ 下,100 秒钟内过氧化氢酶在任何浓度的过氧化氢溶液中将过氧化氢分解一半的过氧化氢酶量作为一个酶活性单位(U),以鲜重计算酶活单位,单位为 U/g ,FW。

2 结果与分析

2.1 持续性干旱胁迫下土壤和甜橙植株水分的变化

在重庆 9 月的天气条件下(日均温 28~30℃),试验容器土壤水分含量呈现近似直线型下降,试验植株叶片水势和相对含水量呈抛物线型下降(图 1)。由图 1 可看出,干旱第 6~8d,土壤含水量降幅最大,下降了 17% 左右;干旱第 10~12 或 12~14d,植株叶水势和叶相对含水量降幅最大,分别下降 1~2MPa 和 20% 左右。因此,容器土壤和植株水分分别在干旱第 6d 和第 10d 时开始表现迅猛下降。由此说明,在本试验条件下,干旱一周左右时间,土壤水分开始迅速减少;干旱一个旬期左右的时间,植株水分开始迅速减少,滞后土壤水分迅速变化约 4d。参考 Hsiao^[12]和郭惠清等^[13]对土壤含水量水平的划分标准:轻度胁迫(18.6% 以上),中度胁迫(6%~18.6%),严重胁迫(6% 以下),因此本试验中干旱 2~6d 处于轻度胁迫下,干旱 8~14d 处于中度胁迫水平。

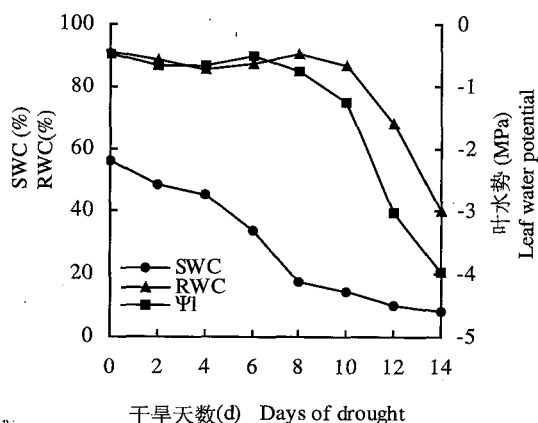


图 1 持续干旱下土壤和植株水分的变化情况

Fig.1 Changes of soil and plants water during experiment

(SWC: 土壤含水量 Soil water content; RWC: 叶片相对含水量 Leaf relative water content; Ψ_l : 叶水势 Leaf water potential)

2.2 干旱胁迫下甜橙叶片 CAT 活性的变化

干旱胁迫下植物体内的活性氧增多,在清除活性氧的任务中,SOD 负责催化活性氧 $O_2^{\cdot-}$ 或 $HO_2^{\cdot-}$ 歧

化为 O_2 与 H_2O_2 , POD 和 CAT 负责清除 H_2O_2 ^[13]。试验结果显示(图 2a), CAT 活性随着土壤含水量的下降而降低,二者呈极显著相关($R = 0.52^{**}$, $n = 164$),CAT 活性变化中的 26.82%由土壤含水量变化引起($R^2 = 0.2682$)。土壤水分阈值定义为引起某种生理指标明显变化的土壤水分含量,它可以反映生理指标随土壤水分含量变化的特性。对图示回归方程求导得到 CAT 活性的土壤水分阈值约为 57%。由此表明,甜橙叶片中 CAT 活性的下降明显受到土壤干旱胁迫的影响,但其变化的大部分不能由土壤水分的变化来解释;在土壤干旱初期 CAT 活性就有较明显的下降,干旱胁迫使 CAT 清除活性氧的能力

大幅降低。

对比 CAT 与植株水分的变化(图 3a 和图 4a),可看出 CAT 活性随着植株水分的减少而下降。进一步分析发现 CAT 活性的降低与 Ψ_l 、RWC 的下降表现极显著相关($R_{\Psi_l, CAT} = 0.57^{**}$, $n = 55$; $R_{RWC, CAT} = 0.53^{**}$, $n = 55$),说明植株水分的减少明显引起了 CAT 活性的下降;CAT 活性变化的 30%左右可解释成叶片水分变化引起($R^2_{\Psi_l, CAT} = 0.3306$; $R^2_{RWC, CAT} = 0.2828$),可见甜橙叶片水分的变化也不能主要解释 CAT 活性的下降。

2.3 干旱胁迫下甜橙叶片 POD 活性的变化

POD 活性随着土壤含水量的下降而升高(图

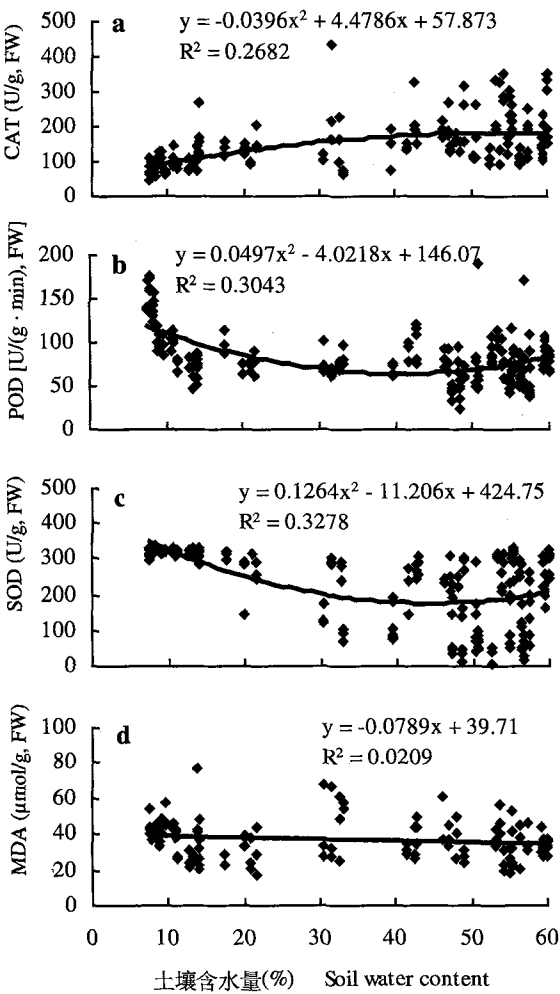


图 2 干旱胁迫下甜橙叶片保护酶活性和 MDA 含量随土壤含水量的变化

Fig.2 Changes of protective enzyme activities and MDA content in orange leaves with soil water content under drought stress

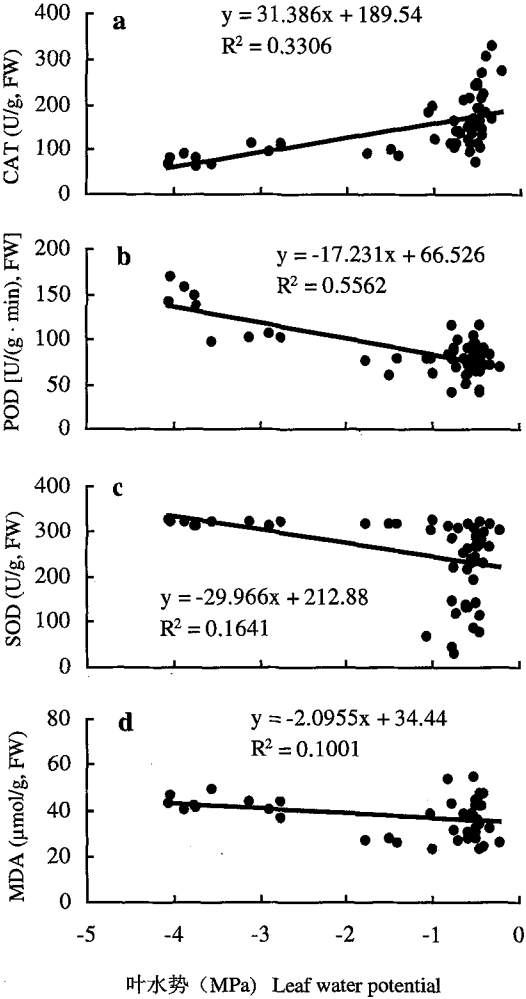


图 3 干旱胁迫下甜橙叶水势与保护酶活性、MDA 含量变化关系

Fig.3 Relations of water potential with protective enzyme activities and MDA content in orange leaves under drought stress

2b),二者呈极显著相关($R = 0.55^{**}$, $n = 195$), POD 活性变化中的 30.43% 可解释为土壤含水量变化引起($R^2 = 0.3043$),求导计算出土壤水分阈值约为 40%。说明甜橙叶片中 POD 活性的上升明显受到土壤干旱胁迫的影响,其变化的大部分不能由土壤水分的变化来解释;在土壤轻度干旱时 POD 活性就有较明显的上升,在试验期末的中度干旱下,POD 活性依然保持很高水平,意味着 POD 在防御活性氧伤害中起着重要作用。

统计分析表明,POD 活性与 Ψ_1 、RWC 变化表现极显著相关($R_{\Psi_1, \text{POD}} = -0.75^{**}$, $n = 55$; $R_{\text{RWC}, \text{POD}} = -0.77^{**}$, $n = 55$)。由图 3b 和图 4b 看出,POD 活性随着植株水分的减少而上升,且影响明显;POD 活性变化的 55%~60% 左右可解释成叶片水分变化引起($R_{\Psi_1, \text{POD}}^2 = 0.5562$; $R_{\text{RWC}, \text{POD}}^2 = 0.5936$),可见甜橙叶片水分的变化能较好解释 POD 活性的变化。

2.4 干旱胁迫下甜橙叶片 SOD 活性的变化

SOD 活性随着土壤含水量的下降而升高(图 2c),二者表现极显著相关($R = 0.57^{**}$, $n = 194$),SOD 活性变化中的 32.78% 由土壤含水量变化引起($R^2 = 0.3278$),求导计算出土壤水分阈值约为 44%。说明甜橙叶片中 SOD 活性的上升明显受到土壤干旱胁迫的影响,但存在其他未知因素主要决定着其变化;在土壤轻度干旱时 SOD 活性就有较明显的变化。在试验期末的中度干旱下,SOD 活性依然保持很高水平,意味着 SOD 在防御活性氧伤害中亦起着重要作用。

分析显示,SOD 活性与 Ψ_1 、RWC 变化分别表现极显著与显著相关($R_{\Psi_1, \text{SOD}} = -0.41^{**}$, $n = 55$; $R_{\text{RWC}, \text{SOD}} = -0.31^*$, $n = 55$)。由图 3c 和图 4c 看出,SOD 活性随着植株水分的减少而有上升现象,但甜橙叶片 SOD 活性变化仅 10%~15% 可解释为叶水分变化引起($R_{\Psi_1, \text{SOD}}^2 = 0.1641$; $R_{\text{RWC}, \text{SOD}}^2 = 0.097$)。

2.5 干旱胁迫下甜橙叶片 MDA 含量的变化

MDA 是脂质过氧化的主要产物之一,其大量积累可反映活性氧毒害的程度。防止 MDA 大量积累需要植物体内多种保护物质的参与,如保护酶 SOD、POD、CAT 和抗氧化物质抗坏血酸 AsA、谷胱甘肽 GSH 等。试验结果显示,甜橙叶片 MDA 含量随土壤含水量的降低变化不明显(图 2d),但相关显著($R = -0.26^*$, $n = 135$);随植株叶片水分的减少有轻微的上升(图 3d 和图 4d),但幅度小,相关显著或极显著($R_{\Psi_1, \text{MDA}} = -0.32^*$, $n = 45$; $R_{\text{RWC}, \text{MDA}} = -0.41^{**}$, $n =$

45)。单个比较 MDA 与三种保护酶的变化看出,水分胁迫期间随着 CAT 活性下降,MDA 含量有轻微的上升,相关不显著($R = -0.29$, $n = 45$)(图 5a);随着 POD 活性增强,MDA 含量有上升趋势,相关极显著($R = 0.48^{**}$, $n = 45$)(图 5b);随着 SOD 活性增强,MDA 含量有下降趋势,相关显著($R = 0.32^*$, $n = 45$)(图 5c)。因此,干旱下甜橙叶片 CAT 的下降使得 CAT 在防止 MDA 的产生中不起重要作用,而 POD 的增强并不能减少 MDA 的产生,SOD 活性增强时抑制了 MDA 含量的上升趋势。根据前述,干旱下 CAT 活性的下降(而非活性增强)与土壤、植株水分的减少表现显著相关,意味着干旱明显导致了 CAT 活性

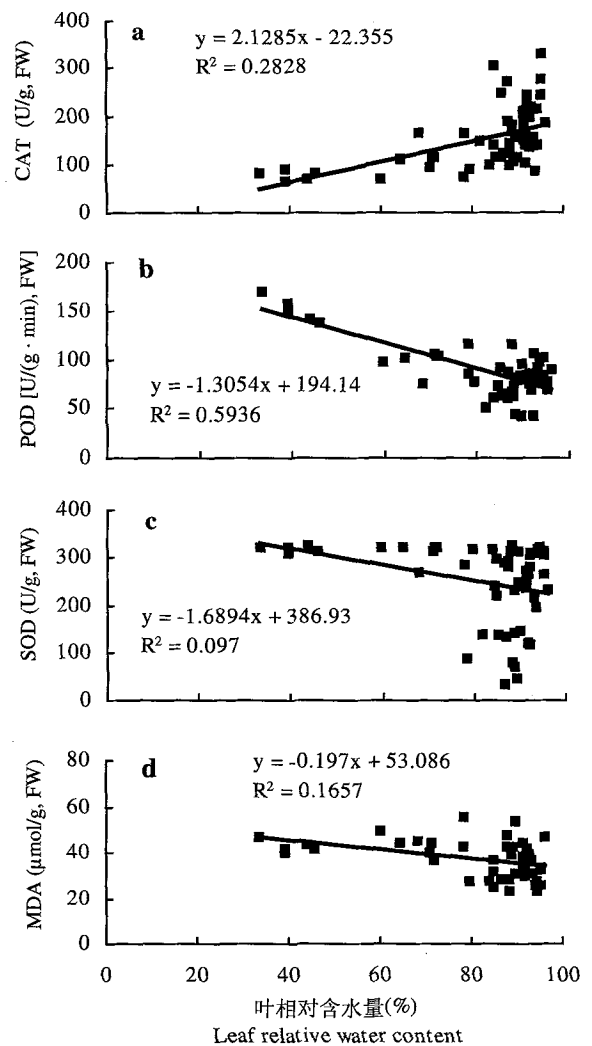


图 4 干旱胁迫下甜橙叶相对含水量与保护酶活性、MDA 含量变化关系

Fig.4 Relations of relative water content with protective enzyme activities and MDA content in orange leaves under drought stress

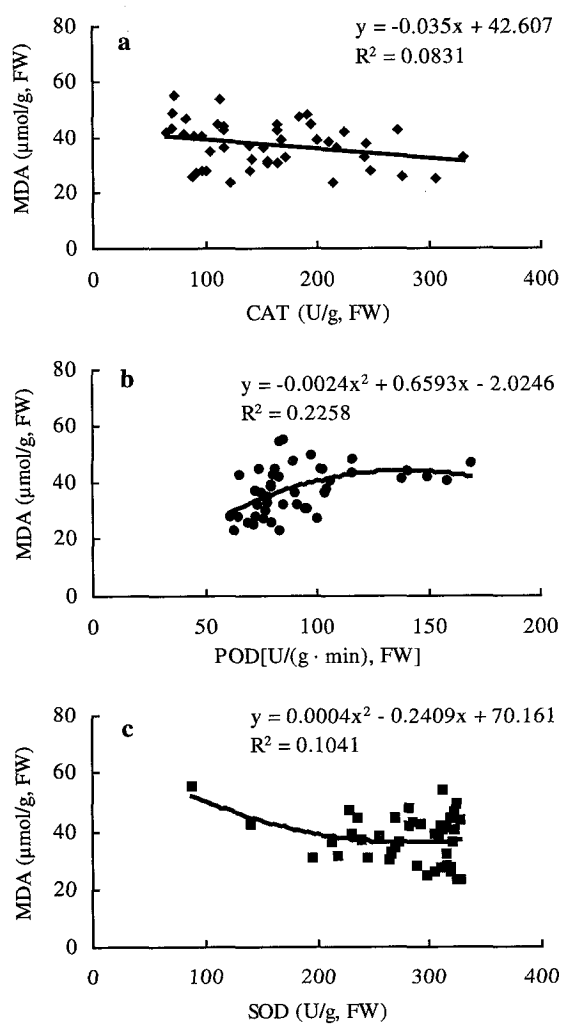


图 5 干旱胁迫下甜橙叶片保护酶活性与 MDA 含量间的变化关系

Fig.5 Relations between protective enzyme activities and MDA content in orange leaves under drought stress

的减弱,使其在清除活性氧任务中的作用很小,而 POD 和 SOD 活性均表现出随干旱的增强而上升的现象,并且相关显著,结合上述结果表明只有 POD、SOD 对防止 MDA 的产生起主要协同作用。由于 POD 和 SOD 清除活性氧的类别不同,而每种活性氧均能造成植株的伤害,因此两者在防止 MDA 产生的过程中具有同等重要的作用。

3 讨论

一般认为,干旱胁迫会激发植物体内的保护酶系统参与清除活性氧的任务,主要包括 SOD、POD 和 CAT 三种酶。已有研究得出,植物的抗旱性与其保

护酶系统清除活性氧的能力相关^[3]。本研究显示,胁迫开始前或轻度胁迫时 CAT、SOD 和 POD 活性就已有明显变化,干旱期间 SOD、POD 活性表现上升,CAT 活性下降,在中度胁迫时 SOD、POD 依然保持很高活性水平,证明甜橙叶片保护酶对干旱的生理响应比较敏感,甜橙柑桔品种具有较强的抗旱适应性,这与实际生产中叶片干旱萎焉的甜橙植株在灌水后仍能恢复良好生长相吻合。在清除活性氧的任务中,主要靠 SOD 和 POD 同时起作用,虽然缺少 CAT 的参与,不能直接将活性氧 H₂O₂ 变为 H₂O,但可由 POD 催化 H₂O₂ 氧化其他底物后转化为 H₂O^[13],仍能完成清除活性氧的任务。其它柑桔材料上的研究也有相似的结果^[6-7,9],说明不同柑桔材料在适应干旱胁迫的生理响应方面存在某些共性。

许多研究发现干旱胁迫下 SOD、POD、CAT 活性先上升而后下降的现象,并且不同植物的表现不完全一致^[6,15-16]。本试验植株没有明显的保护酶活性先上升而后下降的现象。由于试验结束时仍处于中度胁迫,所以尚需进一步的试验来确认甜橙上 SOD 和 POD 活性在严重胁迫时是否会降低。

干旱胁迫使活性氧产生过多,会造成活性氧清除不及时,从而引发膜脂过氧化链式反应进程,导致脂质过氧化产物如 MDA 含量的增加。有研究^[17]认为,高等植物中脂类过氧化物的产生有多种途径,MDA 也不是脂质过氧化的主要产物^[14],不能仅凭 MDA 的多少来判断脂质过氧化的强弱^[15]。研究显示干旱胁迫下 MDA 含量变化不明显,与聂磊等^[6,9]在柚树苗上的结果不一致;而与韩蕊莲等^[16]在沙棘上的结果近似。试验结果不能表明干旱胁迫对植株的膜脂损害程度。干旱期间 SOD 和 POD 活性呈上升趋势正好阻抑了 MDA 的显著积累,由此证明甜橙叶片保护酶,特别是 SOD 和 POD 在抑制膜脂过氧化链式反应产生 MDA,减轻干旱胁迫对植物的伤害方面起有重要作用。

探讨生理指标与土壤含水量的变化关系可以明确它们之间的密切程度,找出能够体现土壤干旱状况的土壤水分生理指标。由于已在许多植物上证明逆境胁迫对植物的效应有一定共性^[18],即具有交叉抗性的能力,因此土壤水分生理指标还可参考用作抗盐、抗寒性的生理指标。试验表明 SOD 和 POD 活性与土壤含水量均呈极显著相关,并在干旱胁迫初期即开始发生变化,中度胁迫下仍保持很高活性,说明二者均可很好充当甜橙的抗旱性生理指标。

参考文献:

- [1] Tuner N. Concurrent comparison of stomatal behavior, water status, and evaporation of maize in soil at high or low water potential[J]. *Plant Physiol.*, 1975, 55: 932-936.
- [2] Pauk K P, Thompson J E. Invitro simulation of senescence-related membrane damage by ozone-induced lipid peroxidation[J]. *Nature*, 1980, 28(3): 504-506.
- [3] Dhindsa A S, Mutoue W. Drought tolerance in two mosses: Correlated with enzymatic defense against lipid peroxidation[J]. *J. Exp. Bot.*, 1981 (32): 79-91.
- [4] 鲁剑巍, 陈防, 王运华, 等. 氮磷钾肥对红壤地区幼龄柑橘生长发育和果实产量及品质的影响[J]. *植物营养与肥料学报*, 2004, 10(4): 413-418.
Lu J W, Chen F, Wang Y H *et al.* Effect of N, P, K fertilization on young citrus tree growth, fruit yield and quality in area of red soil[J]. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 2004, 10(4): 431-418.
- [5] Almansa M S, Hernandez J A, Jimenez A *et al.* Effect of salt stress on the superoxide dismutase activity in leaves of citrus limonum in different rootstock-scion combinations[J]. *Biologia plantarum*, 2002, 45 (4): 545-549.
- [6] 聂磊, 刘鸿先, 彭少麟. 水分胁迫对长期 UV-B 辐射下柚树苗生理特性的影响[J]. *植物资源与环境学报*, 2001, 10(3): 19-24.
Nie L, Liu H X, Peng S L. Effects of water stress on physiological characteristics in leaves of pomelo seedlings under long-term UV-B treatment[J]. *J. Plant Resour and Envir.*, 2001, 10(3): 19-24.
- [7] 聂华堂, 陈竹生, 计玉. 水分胁迫下柑桔的生理生化变化与抗旱性的关系[J]. *中国农业科学*, 1991, 24(4): 14-18.
Nie H T, Chen Z S, Ji Y. Relationship between physiological changes of citrus under water-stress and drought-resistant ability[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 1991, 24(4): 14-18.
- [8] Escalona M, Nieves N, Acosta J F *et al.* Physiological and biochemical aspects of water stress in marsh grapefruit (*Citrus paradisi* Macf.) [J]. *Centro Agricola*, 1994, 21(2): 31-37.
- [9] 聂磊, 刘鸿先, 彭少麟. CPPU 提高柚树苗抗旱性的研究[J]. *植物学通报*, 2001, 18(1): 90-95.
Nie L, Liu H X, Peng S L. Enhancement of drought resistance in pomelo seedlings by CPPU[J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2001, 18 (1): 90-95.
- [10] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 1999.
Li H S. Principle and technology of plant physiological and biochemical experiment [M]. Beijing: Higher Education Press, 1999.
- [11] 邹琦. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000. 168-169.
Zou Q. Handbook of plant physiological experiment [M]. Beijing: China Agricultural Press, 2000: 168-169.
- [12] Hsiao T C. Plant response to water stress[J]. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 1973 (24): 519-670.
- [13] 郭惠清, 田有亮. 杨幼树水分生理指标和光合强度与土壤含水量关系的研究[J]. *干旱资源与环境*, 1998(12): 101-106.
Guo H Q, Tian Y L. Relationship of a few physiologic indexes and soil water contents for poplar seedlings[J]. *J. of Arid Land Resour. And Envir.*, 1998, (12): 101-106.
- [14] 孙存普, 张建中, 段绍瑾. 自由基生物学导论[M]. 合肥: 中国科学技术大学出版社, 1999. 48-93, 160-179.
Sun C P, Zhang J Z, Duan S J. Introduction of free radical biology [M]. Hefei: Chinese Scientific and Technologic Univ. Press, 1999. 48-93, 160-179.
- [15] 顾继杰, 陈富裕, 郑荣梁. 干旱诱导作物叶片膜损伤和膜脂过氧化的关系[J]. *兰州大学学报(自然科学版)*, 1996, 32(2): 90-94.
Gu J J, Chen F Y, Zheng R L. Relationship between membrane damage and lipid peroxidation in crop leaves induced by drought[J]. *J. of Lanzhou Univ. (Natural Sci.)*, 1996, 32(2): 90-94.
- [16] 韩蕊莲, 李丽霞, 梁宗锁, 等. 干旱胁迫下沙棘膜脂过氧化保护体系研究[J]. *西北林学院学报*, 2002, 17(4): 1-5.
Han R L, Li L X, Liang Z S *et al.* Seabuckthorn membrane-lipid peroxidation system under drought stress[J]. *J. of Northwest Forestry Univ.*, 2002, 17(4): 1-5.
- [17] Vick B A, Zimmerman D C. Metabolism of fatty acid hydroperoxides by *Chlorella Pyrenoidosa* [J]. *Plant Physiol.*, 1989, 90: 125.
- [18] Foyer C H, Lelandais M, Kunert K J. Photooxidative stress in plants [J]. *Physiol. Plant*, 1994, 92(4): 696-717.