

冷锻炼对水稻和黄瓜幼苗 SOD、GR 活性及 GSH、AsA 含量的影响*

王以柔 曾韶西 刘鸿先

(中国科学院华南植物研究所, 广州 510650)

摘 要

水稻(*Oryza sativa* L.)和黄瓜(*Cucumis melo* L.)幼苗在昼夜温度为 15 °C/10 °C、白天光照 12 h, 光强为 $250 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 的条件下锻炼 3 d, 明显地提高幼苗叶片中膜保护酶——超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽还原酶(GR)活性和内源抗氧化剂——还原型谷胱甘肽(GSH)、抗坏血酸(AsA)的含量。经冷锻炼和未锻炼的幼苗移置 4 °C、光强为 $250 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 下胁迫处理 2 d, 未锻炼苗叶片中 SOD、GR 活性和 GSH、AsA 含量明显下降, 而经冷锻炼的苗则相对比较稳定。从脂质过氧化产物——丙二醛(MDA)含量及幼苗的存活率亦看出: 冷锻炼苗具有较低的脂质过氧化水平和较高的幼苗存活率。由此认为: 冷锻炼能提高水稻和黄瓜幼苗细胞膜的稳定性, 从而增强了耐低温光胁迫的能力。

关键词 冷锻炼; 超氧化物歧化酶; 谷胱甘肽还原酶; 还原型谷胱甘肽; 抗坏血酸; 水稻; 黄瓜

EFFECT OF COLD HARDENING ON SOD AND GLUTATHION REDUCTASE ACTIVITIES AND ON THE CONTENTS OF THE REDUCED FORM OF GLUTATHION AND ASCORBIC ACID IN RICE AND CUCUMBER SEEDLINGS

Wang Yi-rou, Zeng Shao-xi and Liu Hong-xian

(South China Institute of Botany, Academia Sinica, Guangzhou 510650)

Abstract

Rice and cucumber seedlings were employed in the study on changes of superoxide dis-

收稿日期:1994-02-19 接受日期:1994-06-28

* 国家自然科学基金资助项目。

matase (SOD) and glutathion reductase (GR) activities, the contents of the reduced form of glutathion (GSH) and ascorbic acid (AsA) in leaves and the chilling resistance as well as the level of lipid peroxidation products after cold hardening and chilling stress under light. The seedlings hardened under a day/night temperature variation of 15 °C/10 °C and photon flux density (PFD) of 250 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ for 12 h/d indicated an increase of the activities of SOD and GR, and the contents of GSH and AsA. The resistance of the seedlings to chilling and light stress was enhanced by cold hardening. Under the stress condition, the stabilities of SOD and GR activities, and contents of GSH and AsA in hardened seedlings were higher than those in the unhardened seedlings; the lipid peroxidation was also less than that in the latter. It was thus concluded that cold-hardening under appropriate light leads on to the enhancement of function of membrane protective system and increase of cell membrane stability which is an important part of chilling-resistance mechanism in the plant.

Key words Cold-hardening; Superoxide dismutase; Glutathion reductase; Reduced form of glutathion; Ascorbic acid; Rice; Cucumber

植物在特定的环境条件诱导下提高植物抗冷性的机理有不少研究^[1~5]。近年来有关各种环境胁迫因子对植物的伤害,特别是低温诱导下的光胁迫对光合器官的伤害,都证明逆境引起活性氧的产生,破坏植物细胞膜的酶促和非酶促的保护系统^[6,7]。有人认为增加抗氧化剂的含量、提高抗氧化作用的酶的活性可以减轻有毒的氧化作用^[8]。本文以冷敏感黄瓜幼苗及两个抗冷力不同的水稻幼苗为材料,用冷锻炼方法提高其抗冷力,研究其叶片内膜保护酶活性及内源抗氧化剂含量的变化,以探讨冷适应机理。

1 材料和方法

1.1 材料

水稻(*Oryza sativa* L.)种子由广东省农业科学院水稻研究所提供,品种为“桂朝2号”(冷敏感)和“Lemont”(美国品种,耐冷及耐高光强)。黄瓜(*Cucumis melo* L.)种子由广东省农业科学院经济作物研究所提供,品种为“全青3号”。水稻和黄瓜种子经浸种催芽后播于装有蛭石的培养皿中,于28 °C和白天光照为60 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ PFD(光流密度)下生长,水稻苗龄为10 d,黄瓜为7 d的幼苗供试验用。

1.2 处理

两个品种的水稻和黄瓜幼苗各分成3组,第一组移置人工气候箱内,以昼夜温度为15 °C/10 °C,白天光照12 h,光强为250 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$,锻炼3 d。第二组在原培养条件下,其中一组作对照,另一组待锻炼组锻炼结束后一起移置4 °C、PFD为250 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 的低温光照箱内进行低温光胁迫2 d。在冷锻炼后和胁迫处理后分别取样测定叶片中SOD、谷胱甘肽还原酶(GR)活性和还原型谷胱甘肽(GSH)、抗坏血酸(AsA)和丙二醛(MDA)含量。

1.3 分析测定

SOD 活性按 Giannopolitis 和 Ries 方法^[9], AsA 和 GSH 含量以及 MDA 含量测定按曾韶西等的方法^[10], GR 活性测定按王以柔等的方法^[11]。

2 实验结果

2.1 冷锻炼对水稻和黄瓜幼苗 SOD、GR 活性的影响

两个品种的水稻和黄瓜幼苗在昼夜温度为 15 °C/10 °C、白天光照 12 h 和光强为 250 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 下锻炼 3 d, 明显地提高膜保护酶类的活性(图 1)。

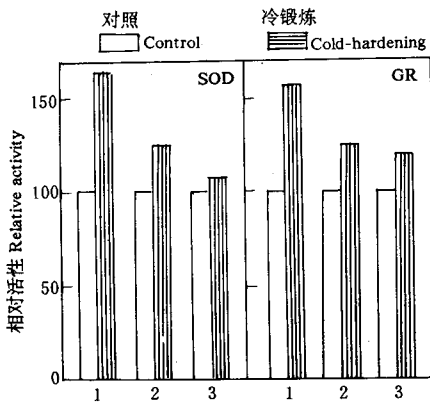


图 1 冷锻炼对 SOD 和谷胱甘肽还原酶 (GR) 活性的影响

1. 水稻 Lemont
2. 水稻桂朝 2 号
3. 黄瓜夏青 3 号

Fig. 1 Effect of cold-hardening on SOD and glutathione reductase (GR) activities

1. Rice Lemont
2. Rice Guichao No. 2
3. Cucumber Xiaqing No. 3

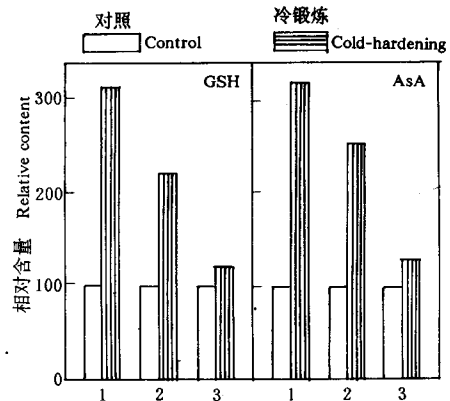


图 2 冷锻炼对还原型谷胱甘肽 (GSH) 和抗坏血酸 (AsA) 含量的影响

1. 水稻 Lemont
2. 水稻桂朝 2 号
3. 黄瓜夏青 3 号

Fig. 2 Effect of cold-hardening on reduced form of glutathione (GSH) and ascorbic acid (AsA) contents

1. Rice Lemont
2. Rice Guichao No. 2
3. Cucumber Xiaqing No. 3

2.2 冷锻炼对水稻和黄瓜幼苗叶片中 GSH、AsA 含量的影响

测定经 3 d 冷锻炼后的水稻和黄瓜幼苗叶片的内源抗氧化剂——GSH、AsA 含量表明(图 2): 冷锻炼明显地提高 GSH 和 AsA 含量, 尤其是水稻幼苗, 提高了一倍以上。

2.3 低温光胁迫处理后, 冷锻炼幼苗叶片中 SOD、GR 活性和 GSH、AsA 含量的变化

经冷锻炼的水稻和黄瓜幼苗与一组对照苗一起移置 4 °C、光强为 250 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 的光照箱内 2 d, 对照苗发生明显的伤害, SOD、GR 活性和 GSH、AsA 含量显著下降, 而冷锻炼过的苗则相对稳定。从图 3 可看出, 低温光胁迫尽管都引起了 SOD 及 GR 活性的下降, 但锻炼过的苗下降程度较小。内源抗氧化剂含量亦有类似变化(图 4)。从而使这些经冷锻炼的水稻和黄瓜幼苗, 在低温光胁迫条件下比未锻炼的苗具有较高的耐冷力和较低的脂质过氧化作用(表 1)。

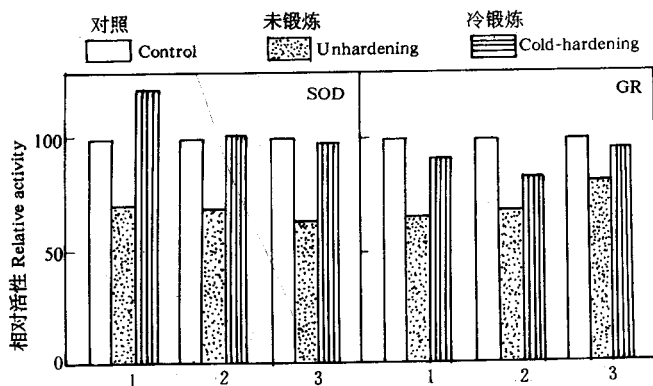


图 3 冷锻炼和未冷锻炼的水稻和黄瓜幼苗低温光胁迫后 SOD 和谷胱甘肽还原酶(GR)活性的变化

1. 水稻 Lemont 2. 水稻桂朝 2 号 3. 黄瓜夏青 3 号

Fig. 3 Changes of SOD and glutathione reductase (GR) activities in cold-hardened and unhardened rice and cucumber seedlings after stress treatment under 4 °C, PFD 250 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ for 2 d

1. Rice Lemont; 2. Rice Guichao No. 2; 3. Cucumber Xiaqing No. 3

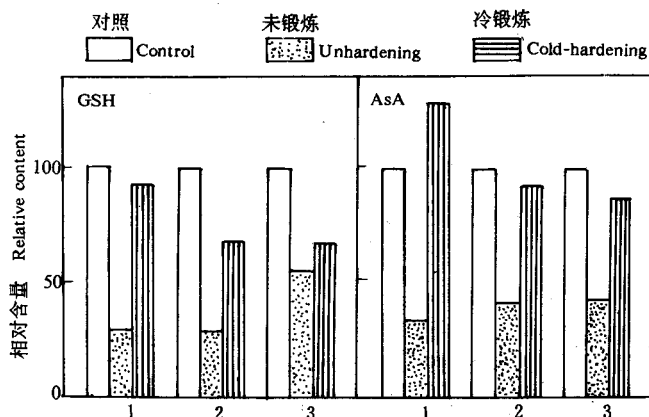


图 4 冷锻炼与未锻炼水稻和黄瓜幼苗在低温光胁迫 2 d 后还原型谷胱甘肽(GSH)和抗坏血酸(AsA)含量变化

1. 水稻 Lemont 2. 水稻桂朝 2 号 3. 黄瓜夏青 3 号

Fig. 4 Changes of reductic glutathione (GSH) and ascorbic acid (AsA) contents in cold-hardening and unhardening rice and cucumber seedlings after stress treatment under 4 °C, PFD 250 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ for 2 d

1. Rice Lemont; 2. Rice Guichao No. 2; 3. Cucumber Xiaqing No. 3

表 1 冷锻炼对水稻和黄瓜幼苗的抗冷性及膜脂过氧化作用的影响

Table 1 Effect of cold-hardening on chilling tolerance and membrane lipid peroxidation of rice and cucumber seedlings

材料 Material	4 °C 下 PFD (250 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) 处理 2 d 后 After stress treatment under 4 °C PFD (250 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) for 2 d			
	幼苗存活率 Survival rate of seedlings (%)		丙二醛含量 MDA content (% of control)	
	CH	NH	CH	NH
水稻 Lemont Rice Lemont	96.5	25.6	127.9	133.5
水稻桂朝 2 号 Rice Guichao No. 2	88.7	17.6	145.1	176.4
黄瓜夏青 3 号 Cucumber Xiaqing No. 3	80.7	7.4	148.9	198.6

CH. 冷锻炼苗; NH. 未锻炼苗。CH. Cold-hardened seedling; NH. Unhardened seedlings; MDA. Malonyl dialdehyde

3 讨 论

低温下可促使细胞内自由基形成,引起植物细胞膜脂质过氧化作用的加强,破坏膜的结构与功能,造成植物的伤害与死亡^[6]。De KoK 和 Oosterhuis^[4], Guy 和 Carter^[12,13]用菠菜进行冷锻炼时发现,菠菜叶子中伴随有 GR 活性的提高和谷胱甘肽含量的增加,且这种 GR 对低温有较大的稳定性,对基质有高的亲和性。Schoner 和 Krause^[5]亦发现,菠菜在 1 °C 260~300 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 光强下锻炼可降低叶子对低温光胁迫的敏感性,其抗冻性的发展与 AsA 含量及叶绿体中 SOD、抗坏血酸过氧化物酶活性等的提高有关,光合色素中特别增加了叶黄素、玉米黄质和紫黄质含量,由此认为冷驯化的植物中增加了对 O_2^- 和 H_2O_2 清除系统的能力,加之色素组分的变化,从而增强了光合器官在低温光胁迫下对抗活性氧毒害的保护作用。本实验结果亦证实了冷锻炼能提高水稻、黄瓜幼苗叶片中的 SOD、GR 活性和 GSH、AsA 的含量,减轻脂质过氧化作用,增强了幼苗的耐冷力。本试验中亦可看出:冷锻炼对冷敏感的黄瓜比水稻的作用要小,两个品种的水稻相比较,冷锻炼对较耐冷的品种“Lemont”比冷敏感的“桂朝 2 号”作用更大。植物在正常条件下借助于体内活性氧清除系统来清除不断产生的有害的活性氧,保护光合器官,AsA 与 GSH 一起参加了清除自由基,排除过氧化物,猝灭 $^1\text{O}_2$ 和保护 SH 基^[6]。AsA 还可作为还原剂参与叶黄素循环,该循环中大量形成的玉米黄质是抵抗低温光胁迫的一个重要因素^[14]。由此认为,低温配合适当光照进行驯化能提高膜保护系统的功能,增强在低温光胁迫条件下细胞膜的稳定性是冷驯化提高植物抗冷作用的一个重要方面。

参 考 文 献

- 1 何若韞,王光洁. 植物冷驯化的机理. 北京植物生理学会编辑, 植物生理生化进展. 1987. (5): 17~19
- 2 沈征言, 低温锻炼对黄瓜幼苗几种酶活性的影响. 植物学报. 1991. 33: 627~632
- 3 龚明. 低温和干旱锻炼对杂交粳稻无性系抗寒性的生理效应. 南京农业大学学报. 1989. 12: 22~27
- 4 De KoK L J. Oosterhuis F J. Effect of frost hardening and salinity on glutathione and sulfhydryl levels and on glutathione reductase activity in spinach leaves. *Physiol Plant*. 1983. 58: 47~51
- 5 Schoner S. Krause G H. Protective systems against active oxygen species in spinach: Response to cold acclimation in excess light. *Planta*. 1990. 180: 483~489
- 6 刘鸿先, 王以柔, 郭俊彦. 低温对植物细胞膜系统伤害机理的研究. 中国科学院华南植物研究所集刊. 1989. 第 5 集: 31~38
- 7 Takahama U. Nishimura M. Formation of singlet molecular oxygen in illuminated chloroplast. Effects on photo-inactivation and lipid peroxidation. *Plant Cell Physiol*. 1975. 16: 737~748
- 8 Arno S. Kunert K J. Lipid peroxidation in higher plants: The role of glutathione reductase. *Plant Physiol*. 1986. 82: 700~702
- 9 Giannopolitis C N. Ries S K. Superoxide dismutase. Purification and quantitative relationship with water-soluble protein in seedlings. *Plant Physiol*. 1977. 59: 315~318
- 10 曾韶西, 王以柔, 刘鸿先. 低温胁迫对水稻幼苗抗坏血酸含量的影响. 植物生理学报. 1987. 13: 365~370
- 11 王以柔, 刘鸿先, 李平等. 低温对水稻幼苗中谷胱甘肽含量及谷胱甘肽还原酶活性的影响. 中国科学院华南植物研究所集刊. 1989. 第 4 集: 153~160
- 12 Guy C L. Carter J V. Characterization of partially purified glutathione reductase from cold-hardened and nonhardened spinach leaf tissue. *Cryobiology*. 1984. 21: 454~464
- 13 Guy C L. Carter J V. Changes in GSH content during cold acclimation in *Cornus sericea* and *Citrus sinensis*. *Cryobiology*. 1984. 21: 443~453
- 14 Demmig-Adams B. Winter K. Kruger A et al. Zeaxanthin synthesis, energy dissipation and photoprotection of photosystem I at chilling temperatures. *Plant Physiol*. 1989. 90: 894~898