

# 低温胁迫对草莓叶片 SOD 和 AsA – GSH 循环酶系统的影响

罗 娅, 汤浩茹\*, 张 勇

(四川农业大学林学院园艺学院, 四川雅安 625014)

**摘 要:** 以草莓试管苗为试材, 研究低温胁迫对草莓离体叶片抗坏血酸、脱氢抗坏血酸含量和 SOD 以及抗坏血酸—谷胱甘肽 (AsA – GSH) 循环中 4 种酶活性的影响。结果表明, 低温胁迫导致超氧化物歧化酶、抗坏血酸过氧化物酶和单脱氢抗坏血酸还原酶活性上升, 脱氢抗坏血酸还原酶和谷胱甘肽还原酶活性下降; 同时使还原态抗坏血酸含量下降而脱氢抗坏血酸含量上升。随着低温处理时间延长, 过多活性氧不能被防御体系有效清除, 植物受到伤害。试验结果还表明, 抗坏血酸过氧化物酶具有较强的氧化还原抗坏血酸的能力, 单脱氢抗坏血酸还原酶是 AsA – GSH 循环再生抗坏血酸的主要酶。

**关键词:** 草莓; 低温胁迫; 抗坏血酸; 超氧化物歧化酶; 抗坏血酸—谷胱甘肽循环

**中图分类号:** S 668.4   **文献标识码:** A   **文章编号:** 0513-353X (2007) 06-1405-06

## Effect of Low Temperature Stress on Activities of SOD and Enzymes of Ascorbate – Glutathione Cycle

LUO Ya, TANG Hao-ru\*, and ZHANG Yong

(Forestry and Horticultural College, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan 625014, China)

**Abstract:** To investigate the effect of low temperature stress on ascorbate content, activities of its relative oxidative enzymes and superoxide dismutase (SOD), the ascorbate and dehydroascorbate content and activities of SOD and four enzymes involved in the ascorbate-glutathione cycle (AsA – GSH cycle) in strawberry were studied. The results showed that under low temperature stress the activities of SOD, ascorbate peroxidase (APX) and monodehydroascorbate reductase (MDAR) increased, while the activities of dehydroascorbate reductase (DHAR) and glutathione reductase (GR) decreased. Meanwhile, low temperature stress induced decrease in ascorbate (AsA) content and increase in dehydroascorbate (DHA) content. When low temperature stress continued, more reactive oxygen species (ROS) were produced and could not be removed efficiently by defense system. The results also indicated that APX had a strong ability to oxidize AsA and MDAR was a main enzyme to regenerate AsA in AsA – GSH cycle.

**Key words:** Strawberry; Low temperature stress; Ascorbate; SOD; Ascorbate – glutathione cycle

低温逆境会导致植物体内过多活性氧 ( $O_2^{\cdot -}$ 、 $H_2O_2$ 、 $\cdot OH$  和  $^1O_2$ ) 的产生与积累 (Yong et al., 2003), 从而引发或加剧细胞膜脂过氧化, 蛋白质变性以及核苷酸损伤等, 严重时导致细胞死亡。植物通过调节自身的防御体系对低温胁迫作出适应性反应, 以保护细胞免受活性氧的伤害, 维持膜系统的稳定。超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 和抗坏血酸—谷胱甘肽 (ascorbate – glutathione, AsA – GSH) 循环在清除活性氧过程中发挥着极其重要的作用 (Manisha et al., 1999)。SOD 是

收稿日期: 2007-03-27; 修回日期: 2007-09-05

基金项目: 教育部“新世纪优秀人才支持计划”项目 (NCET-04-0905); 国家自然科学基金项目 (30671454); 高等学校全国百篇优秀博士学位论文作者专项 (200253)

\* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: htang@sicau.edu.cn)

植物防御体系中的第一道防线,能催化超氧阴离子( $O_2^{\cdot-}$ )歧化生成 $O_2$ 和 $H_2O_2$ , $H_2O_2$ 通过AsA-GSH循环脱毒生成 $H_2O$ 。在AsA-GSH循环中,抗坏血酸过氧化物酶(ascorbate peroxidase, APX)利用AsA将 $H_2O_2$ 还原成 $H_2O$ ,同时形成单脱氢抗坏血酸(monodehydroascorbate, MDHA),MDHA很不稳定,一部分被单脱氢抗坏血酸还原酶(monodehydroascorbate reductase, MDAR)还原为AsA,另一部分进一步氧化生成脱氢抗坏血酸(dehydroascorbate, DHA)。DHA以还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)为底物,在脱氢抗坏血酸还原酶(dehydroascorbate reductase, DHAR)的作用下生成AsA。此反应产生的氧化型谷胱甘肽(oxidized glutathione, GSSG)又可在谷胱甘肽还原酶(glutathione reductase, GR)的催化下被还原成GSH。

抗坏血酸在植物体内直接参与 $O_2^{\cdot-}$ 的清除,维生素E的再生以及叶黄素循环中紫黄质的还原反应(Foyer, 1993),与SOD以及AsA-GSH循环中的相关酶一起在清除活性氧的过程中发挥着极其重要的作用。目前,不同物种在不同低温胁迫下抗氧化酶活性变化已有相关报道(李晶等, 2000; 陈禅友等, 2005; 孙学成等, 2006),但对抗坏血酸的氧化还原态以及AsA-GSH循环中APX、MDAR、DHAR和GR在低温胁迫下的动态变化研究较少。

草莓是目前果树保护地生产中种植面积最大的一个树种,由于南方冬季温度较高,草莓的越冬保护措施不严格,草莓在栽培过程中往往会受到偶发性的短时(1~2 d)低温伤害,从而给草莓生产带来巨大损失。据报道,由于受西北干冷气流影响,2005年四川盆地92%的草莓花果受冻,减产20%~30%(四川农业厅经作处, 2005)。因此,研究草莓抗寒机理在生产上具有重要意义。田间材料本身以及环境条件的差异,常导致试验结果不明显,而采用试管苗具有取材方便,个体差异小的优点,在研究植物体内细微变化方面更具有优势(张建霞等, 2005)。

作者以南方主栽草莓品种‘章姬’试管苗为材料,探讨低温胁迫下叶片活性氧代谢以及SOD、抗坏血酸含量和AsA-GSH循环中相关酶在同一短期低温胁迫中的动态变化,以期揭示植物在低温胁迫下的响应机制提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

选用培养室继代培养4周左右的草莓栽培品种‘章姬’(*Fragaria ananassa* ‘Zoji’)试管苗叶片为试材。继代培养基是MS+0.5 mg·L<sup>-1</sup> BA+0.1 mg·L<sup>-1</sup> IBA,其中蔗糖20.0 g·L<sup>-1</sup>,琼脂粉6.0 g·L<sup>-1</sup>,培养温度(25±1)℃,光强4 800 lx,光照时间16 h·d<sup>-1</sup>。

### 1.2 方法

将试管苗放入0℃的人工气候箱中进行低温处理,分别剪取低温处理2、4、6、8、12、24、48和72 h后的草莓叶片进行各项生理指标的测定,以没有进行低温处理的试管苗叶片为对照。

质膜透性以相对电导率表示,采用电导法测定并计算(朱广廉等, 1990)。

$O_2^{\cdot-}$ 、 $H_2O_2$ 、丙二醛(MDA)含量和SOD活性分别使用南京建成生物工程研究所提供的 $O_2^{\cdot-}$ 和 $H_2O_2$ 试剂盒、MDA试剂盒、SOD试剂盒测定。酶活性采用比活力表示。可溶性蛋白采用考马斯亮蓝G-250法进行测定(熊庆娥, 2003)。

APX、DHAR、MDAR活性测定分别参考Nakano和Asada(1981),Hossain和Asada(1984),Krivosheeva等(1996)的方法,GR活性使用GR测定试剂盒(南京建成生物工程研究所)测定。

抗坏血酸和脱氢抗坏血酸含量按Foyer和Halliwell(1976)的方法测定。

试验数据使用DPS7.05数据包,按单因素方差分析的方法在 $P\leq 0.05$ 的水平上进行显著性检验。试验重复3次,每次3个重复。

## 2 结果与分析

### 2.1 低温处理下叶片相对电导率的变化

本试验结果表明, 0℃ 低温处理期间 (2 ~ 72 h), 草莓叶片相对电导率均有升高, 且与未经低温处理的对照呈显著差异 (图 1), 其中低温处理前期 (0 ~ 4 h) 较对照明显增大, 中期 (4 ~ 12 h) 增加有所减缓, 后期 (24 ~ 72 h) 增加趋势越加明显, 72 h 时相对电导率较对照增加了 101%。

上述结果说明草莓在低温胁迫下细胞膜受到了伤害, 且随着低温时间的延长, 受害程度越严重。

### 2.2 低温处理下 $O_2^{\cdot -}$ 产生速率和 MDA 含量的变化

$O_2^{\cdot -}$  是形成其它活性氧的主要分子, 它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 (吕庆和郑荣梁, 1996)。0℃ 低温处理初期 (0 ~ 4 h), 草莓叶片中  $O_2^{\cdot -}$  的产生保持在一个较低的水平, 随着处理时间的延长,  $O_2^{\cdot -}$  显著增加, 8 h 时达到最大值, 较对照增加了 49% (图 2, A)。随后  $O_2^{\cdot -}$  产生有所下降, 但都显著高于对照。

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 (陈少裕, 1991)。草莓叶片受到 0℃ 低温胁迫后, MDA 含量迅速提高, 并在低温处理 4 h 时达到最大值, 之后随着处理时间的延长, MDA 含量有所下降, 但仍显著高于对照 (图 2, B)。

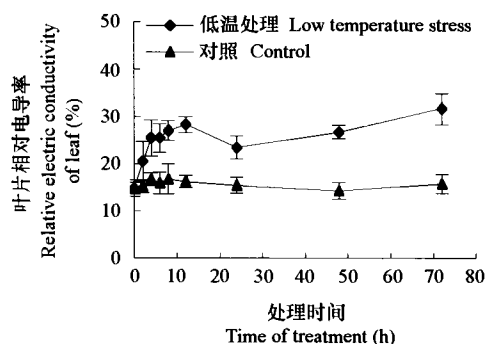


图 1 低温处理对草莓叶片相对电导率的影响

Fig. 1 Effect of low temperature stress on the relative electric conductivity in leaves of strawberry 'Zoji'

Values are means  $\pm$  SD of three replicates.

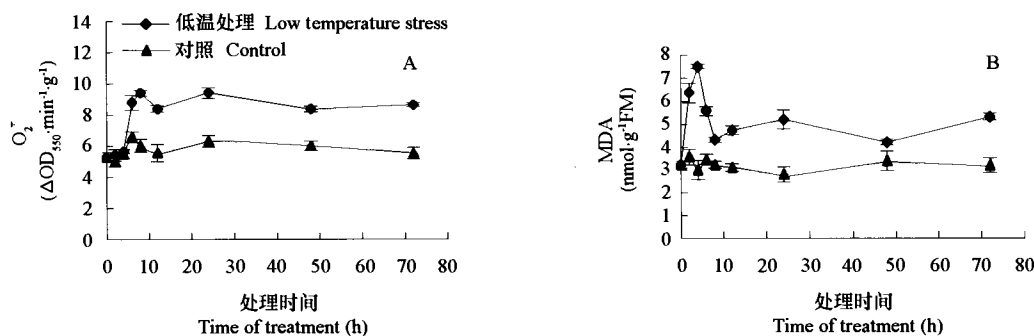


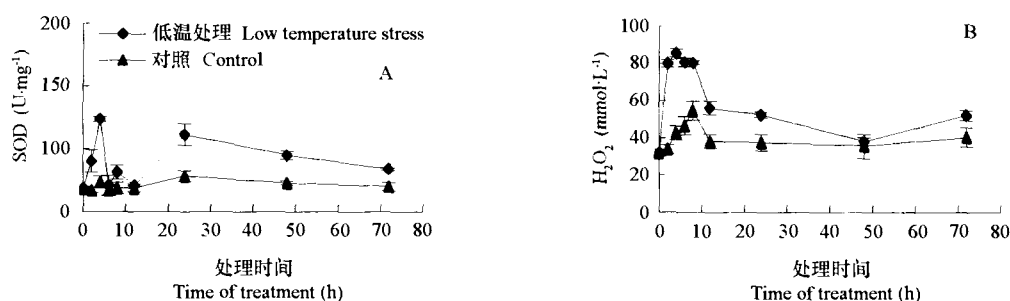
图 2 低温处理对草莓叶片  $O_2^{\cdot -}$  产生速率和 MDA 含量的影响

Fig. 2 Effect of low temperature stress on the  $O_2^{\cdot -}$  production rates and the content of MDA in leaves of strawberry 'Zoji'

Values are means  $\pm$  SD of three replicates.

### 2.3 低温处理下 SOD 活性和 $H_2O_2$ 含量的变化

SOD 是植物体内清除活性氧自由基的重要酶之一。低温处理前期 (0 ~ 4 h), 草莓 SOD 活性迅速上升 (图 3, A), 将产生的  $O_2^{\cdot -}$  快速歧化成  $H_2O_2$ , 致使  $H_2O_2$  含量也迅速增加 (图 3, B)。随着处理时间的延长 (4 ~ 72 h), 低温可能抑制了 SOD 活性, 导致 SOD 活性较低温处理前期有所减弱, 同时由于 AsA - GSH 清除  $H_2O_2$  系统的启动,  $H_2O_2$  含量下降 (图 3, B)。

图3 低温处理对草莓叶片 SOD 活性和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量的影响Fig. 3 Effect of low temperature stress on the activity of SOD and the content of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in leaves of strawberry 'Zoji'Values are means  $\pm$  SD of three replicates.

## 2.4 低温处理下 AsA - GSH 循环中 APX、MDAR、DHAR 和 GR 酶活性的变化

0℃低温处理后, APX 活性逐渐增加, 12 h 时达到最大值, 较对照提高了 129%; 之后有所下降, 但仍维持在一个较高的水平 (图 4, A)。MDAR 和 DHAR 的活性在低温处理后逐渐提高, 分别在 6 h 和 8 h 时达到最大值, 随之呈波动式变化, 这可能与植株体内 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的产生含量有关。在处理过程中 MDAR 活性一直高于 DHAR, 说明 MDAR 再生 AsA 的能力比 DHAR 强 (图 4, B、C)。GR 活性在低温处理 2 h 后较对照迅速提高了 70%, 随后呈波浪性变化, 在 72 h 时较对照降低了 8% (图 4, D)。

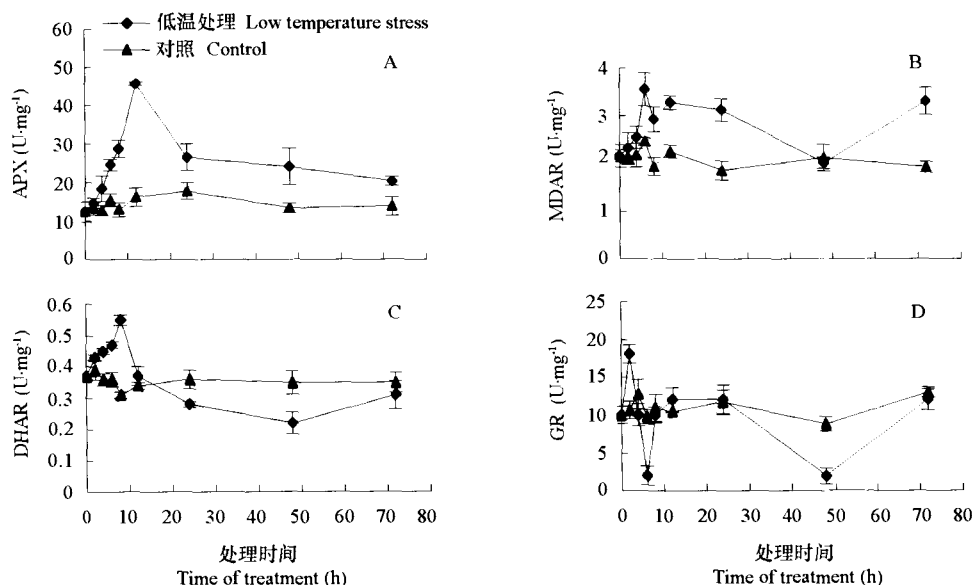


图4 低温处理对草莓叶片 APX、MDAR、DHAR 和 GR 活性的影响

Fig. 4 Effect of low temperature stress on the activities of APX, MDAR, DHAR and GR in leaves of strawberry 'Zoji'

Values are means  $\pm$  SD of three replicates.

## 2.5 低温处理下 AsA 和 DHA 含量的变化

在 0℃的低温处理过程中, 除处理 6~8 h 外, 草莓叶片中 AsA 的含量呈下降趋势, 且显著低于对照, 而 DHA 的含量逐渐升高, 并在处理 48 h 时达到最大值, 虽然其后 DHA 含量有所降低, 但仍显著高于对照 (图 5)。

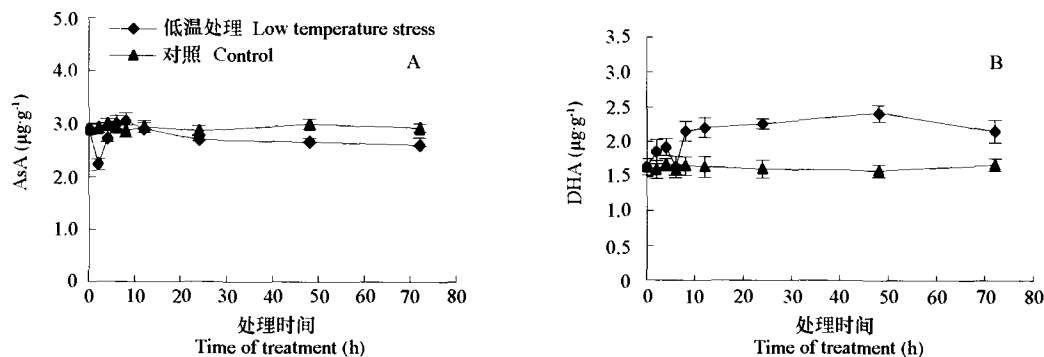


图 5 低温处理对草莓叶片 AsA 和 DHA 含量影响

Fig. 5 Effect of low temperature stress on the contents of AsA and DHA in leaves of strawberry 'Zoji'

Values are means  $\pm$  SD of three replicates.

### 3 讨论

各种逆境对细胞的伤害始于质膜 (朱素琴, 2002)。本试验结果表明, 低温使草莓叶片电解质渗漏率加大和 MDA 含量增加, 这可能是由于草莓在低温条件下, 抗氧化系统不能有效清除过多活性氧的产生,  $O_2^-$  和  $H_2O_2$  等活性氧含量持续增加, 从而诱发膜质过氧化程度加剧和细胞膜透性加大所致。

低温逆境条件不仅会提高细胞活性氧水平, 同时也可诱发植物防御体系的建立, 从而避免或减轻活性氧对植物的伤害。本试验研究表明, 草莓遭受低温胁迫后, 叶片活性氧含量迅速积累, 各种抗氧化酶活性随之迅速提高。在低温处理 72 h 时, 除了 DHAR 和 GR 活性较对照有轻微下降外, SOD、APX 以及 MDAR 活性分别比对照提高了 20%、47% 和 71%。同时低温处理后, 随着 APX 活性增加, 更多的 AsA 被消耗, 产物 DHA 含量不断增加。由此说明, 草莓在受到低温胁迫时, 抗氧化酶与抗氧化剂将共同协调作用, 以减轻不良环境造成的伤害。在本次试验中, 虽然 SOD、APX 和 MDAR 3 种抗氧化酶活性在低温处理后都有一定程度的提高, 但是叶片活性氧和膜脂化水平在低温处理 72 h 后分别比对照提高了 62%、56% 和 67%。说明在低温处理初期, 各种抗氧化酶活性的提高是植物对外界环境的一种应激和自我保护反应, 并通过调节抗氧化酶与抗氧化剂的水平去适应逆境并再次建立活性氧产生与清除之间的平衡关系。然而, 随着胁迫时间的延长, 草莓体内活性氧水平持续增加, 一方面抑制了酶活性, 降低了植物对自身的保护能力, 另一方面又攻击细胞膜系统, 诱发膜脂过氧化水平加剧, 最终导致植物受伤。

APX 被认为是植物细胞中有效分解  $H_2O_2$  的重要酶之一。APX 活性增加有助于植物抗性的提高 (Allen et al., 1997)。本试验研究表明, APX 对低温非常敏感, APX 活性伴随着  $H_2O_2$  的升降而升降, 说明 APX 在清除  $H_2O_2$  的过程中发挥着重要的作用。从试验中还可看出, APX 活性一直高于 MDAR 和 DHAR, 说明 APX 氧化 AsA 的活性比 MDAR 与 DHAR 再生 AsA 的活性强, 这与 Jin 等 (2003) 的研究结果相一致。MDAR 和 DHAR 是 AsA - GSH 循环中再生 AsA 的两个重要酶, Valentina 等 (2000) 通过比较番茄叶与根中叶绿体/质体, 线粒体和过氧化物酶体等细胞器中 DHAR 与 MDAR 酶活性大小得出, MDAR 活性明显高于 DHAR, AsA 再生主要是通过 MDAR 还原 MDHA 而来。本研究表明, MDAR 活性远高于 DHAR, 说明在草莓叶片中 MDAR 是再生 AsA 的主要酶。

植物在逆境条件下是否受到伤害与植物种类、逆境强度和持续时间有关。在逆境初期, 植物有一个应激保护反应, SOD、APX、MDAR、DHAR、GR 活性和 DHA 含量增加, AsA 含量减少。植物的自我保护能力有限, 随着胁迫时间的延长, 过多的活性氧不能被有效清除, 最终植物受到逆境伤害。在抗坏血酸氧化酶体系中 APX 对环境变化非常敏感, 具有较强的氧化 AsA 的能力, 是清除  $H_2O_2$  的重要酶。MDAR 还原 MDHAR 是 AsA - GSH 循环中再生 AsA 的主要途径。

## References

- Agricultural Bureau of Sichuan Province. 2005. Serious freeze injury and loosing of loquat and strawberry in Longquan Mountain. Science and Technology of Sichuan Agriculture, (2): 41. (in Chinese)
- 四川农业厅经作处. 2005. 龙泉山脉枇杷、草莓受冻损失严重. 四川农业科技, (2): 41.
- Allen R D, Webb R P, Schake S A. 1997. Use of transgenic plants to study antioxidant defences. Free Radical Biology and Medicine, 23: 473–479.
- Chen Chan-you, Wang Hui-dong, Ding Yi. 2005. Changes of soluble protein content and activities of cell protective enzymes under chilling stress in asparagus bean seedlings. Acta Horticulture Sinica, 32 (5): 911–913. (in Chinese)
- 陈禅友, 汪汇东, 丁毅. 2005. 低温胁迫下长豇豆幼苗可溶性蛋白质和细胞保护酶活性的变化. 园艺学报, 32 (5): 911–913.
- Chen Shao-yu. 1991. Injury of membrane lipid peroxidation to plant cell. Plant Physiology Communications, 27 (2): 84–90. (in Chinese)
- 陈少裕. 1991. 膜脂过氧化对植物细胞的伤害. 植物生理学通讯, 27 (2): 84–90.
- Foyer C H. 1993. Ascorbic acid. In: Alscher R G, Hess J L eds. Antioxidants in higher plants. Boca Raton: CRC Press: 31–58.
- Foyer C H, Halliwell B. 1976. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts; a proposed role in ascorbic acid metabolism. Planta, 133: 21–25.
- Hossain M A, Asada K. 1984. Purification of dehydroascorbate reductase from spinach and its characterization as a thiol enzyme. Plant Cell Physiology, 25: 85–92.
- Jin Y H, Tao D L, Hao Z Q, Ye J, Du Y J, Liu H L, Zhou Y B. 2003. Environmental stresses and redox status of ascorbate. Acta Botanica Sinica, 45 (7): 795–801.
- Krivosheeva A, Tao D L, Ottander C, Wingsle G, Dube S L, Oquis G. 1996. Cold acclimation and photoinhibition of photosynthesis in Scots pine. Planta, 200: 296–305.
- Li Jing, Yan Xiu-feng, Zu Yuan-gang. 2000. Generation of activated oxygen and change of cell defense enzyme activity in leaves of Korean pine seeding under low temperature. Acta Botanica Sinica, 42 (2): 148–152. (in Chinese)
- 李晶, 阎秀峰, 祖元刚. 2000. 低温下红松幼苗活性氧的产生及保护酶的变化. 植物学报, 42 (2): 148–152.
- Lü Qing, Zheng Rong-liang. 1996. Membrane lipid peroxidation and deesterification of wheat induced by drought and active oxygen. Science in China Series C, 26 (1): 26–30. (in Chinese)
- 吕庆, 郑荣梁. 1996. 干旱及活性氧引起小麦膜脂过氧化与脱脂化. 中国科学 C 辑, 26 (1): 26–30.
- Manisha G, Ann C, Jacob V, Herman C. 1999. Copper affects the enzymes of ascorbate–glutathione cycle and its related metabolites in the roots of *Phaseolus vulgaris*. Physiologia Plantarum, 106 (3): 262–267.
- Nakano Y, Asada K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplast. Plant Cell Physiology, 22 (5): 867–880.
- Sun Xue-cheng, Yang Ling, Hu Cheng-xiao, Gan Qiao-qiao, Yi Chang-cheng. 2006. Effects of molybdenum on antioxidative enzymes in winter wheat under low temperature stress. Scientia Agricultura Sinica, 39 (5): 952–959. (in Chinese)
- 孙学成, 杨玲, 胡承孝, 甘巧巧, 易长城. 2006. 低温胁迫下钼对冬小麦抗氧化酶活性的影响. 中国农业科学, 39 (5): 952–959.
- Valentina M, Micha V, Micha G, Moshe T. 2000. Activities of SOD and the ascorbate–glutathione cycle enzymes in subcellular compartments in leaves and roots of cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii*. Physiologia Plantarum, 110 (1): 42–50.
- Xiong Qing-e. 2003. Experimental textbook of plant physiology. Chengdu: Sichuan Publishing House of Science and Technology: 55–56. (in Chinese)
- 熊庆娥. 2003. 植物生理学实验教程. 成都: 四川科学技术出版社: 55–56.
- Yong I K, Ji S S, Nilda R B, Tay E H, Oksoo H, Baik H G, Sunjo J, Ja O G. 2003. Antioxidative enzymes offer protection from chilling damage in rice plants. Crop Science, 43: 2109–2117.
- Zhang Jian-xia, Li Xin-guo, Sun Zhong-hai. 2005. Effect of calcium on the growth of lemon tissue culture seedlings and some physiological and biochemical index related to cold-resistance. Journal of Fruit Science, 22 (6): 667–672. (in Chinese)
- 张建霞, 李新国, 孙中海. 2005. 钙对柠檬试管苗生长和一些与抗寒性相关指标的影响. 果树学报, 22 (6): 667–672.
- Zhu Guang-lian, Zhong Hai-wen, Zhang Ai-qin. 1990. Plant physiology experiment. Beijing: Peking University Press: 51–54. (in Chinese)
- 朱广廉, 钟海文, 张爱琴. 1990. 植物生理实验. 北京: 北京大学出版社: 51–54.
- Zhu Su-qin. 2002. Advances in research of the relationships between membrane lipids and plant's cold-resistance. Journal of Xiangtan Normal University (Natural Science Edition), 12 (4): 49–54. (in Chinese)
- 朱素琴. 2002. 膜脂与植物抗寒性关系研究进展. 湘潭师范学院学报 (自然科学版), 12 (4): 49–54.