

# 伤害胁迫对合作杨叶片膜质过氧化及抗氧化酶活性的影响

安 钰<sup>1</sup>, 沈应柏<sup>2</sup>, 张志翔<sup>2</sup>

(1. 宁夏农林科学院 荒漠化治理研究所, 银川 750002; 2. 北京林业大学 生物科学与技术学院, 北京 100083)

**摘 要:** 本研究初步探讨了合作杨抗虫性与过氧化氢( $H_2O_2$ )含量、丙二醛(MDA)含量及超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和过氧化物酶(POD)活性变化的关系。发现昆虫取食和机械损伤均可以引起叶片中 $H_2O_2$ 和MDA含量的积累及相应的抗氧化酶SOD、CAT、POD活性提高。两种不同处理方法中,昆虫取食诱导的膜质过氧化和抗氧化酶活性变化(除了CAT活性)与机械损伤诱导结果表现出明显差异。这些结果表明,昆虫取食和机械损伤可以诱导叶片中 $H_2O_2$ 和MDA积累,且其代谢受到抗氧化酶活性变化的共同影响,通过提高抗氧化酶活性可以减轻膜质过氧化程度,有效地诱导伤害防御反应的产生。同时,两种处理之间的差异表明 $H_2O_2$ 、SOD、CAT和POD与合作杨抗虫性之间存在一定的关联。

**关键词:** 伤害胁迫; 活性氧; 抗氧化酶; 抗虫性; 合作杨

中图分类号: Q946

文献标识码: A

文章编号: 1005-3409(2010)05-0241-04

## Effects of Damage Stress on Membrane Lipid Peroxidation and Antioxidant Enzymes in Poplar Leaves

AN Yu<sup>1</sup>, SHEN Ying-bai<sup>2</sup>, ZHANG Zhi-xiang<sup>2</sup>

(1. Institute of Desertification Control, Ningxia Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Yinchuan 750002, China; 2. College of Biological Science and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

**Abstract:** The concentration of hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) and malondialdehyde (MDA) and the activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and peroxidase (POD) were measured in poplar leaves damaged by mechanical damage and herbivore wounding. The results showed that the concentration of  $H_2O_2$  and MDA and the activities of SOD, CAT and POD were enhanced; the change of membrane lipid peroxidation and antioxidant enzymes was significantly higher in the herbivore wounding treatment (except CAT). The results suggest that the concentration of  $H_2O_2$  and MDA were closely related to the change in antioxidant enzymes activities. A high level of antioxidant enzymes could decrease membrane lipid peroxidation levels and effectively induce plant defense responses. Meanwhile, the difference between mechanical damage and herbivore wounding suggest that  $H_2O_2$ , SOD, CAT and POD are associated with insect resistance in poplar.

**Key words:** damage stress; reactive oxygen species; antioxidant enzymes; insect resistance; poplar

当植物受到机械损伤、昆虫取食等非生物和生物胁迫时,会产生一系列防御反应,这些防御反应一方面有助于受损部位愈合,另一方面诱导全身反应进一步阻止伤害的发生<sup>[1-2]</sup>。近年来关于伤害诱导植物体内生理生化变化方面的研究报道有很多,在伤害胁迫研究领域人们日益关注活性氧(ROS)的产生和细胞抗氧化防御系统的关系<sup>[3-5]</sup>。正常情况下,植物依赖

其体内存在的ROS清除系统包括超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)、抗坏血酸等维持自由基生成与消除的动态平衡。但另一方面,ROS积累可导致膜质过氧化和膜透性丧失,从而引起植物体内发生一系列的生理生化变化、代谢紊乱,使植物受到伤害。同时,研究发现不同损伤形式诱导植物体内产生的防御反应也存在差异。

收稿日期: 2010-06-19

资助项目: 国家“十一五”科技支撑计划课题(2006BAD01A15; 2006BAD24B04)

作者简介: 安钰(1982-),女,宁夏固原人,博士,助理研究员,主要从事植物生理生态学研究。E-mail: anyu02@163.com

通信作者: 沈应柏(1959-),男,云南宣威人,博士,教授,博士生导师,主要从事植物生理生态学研究。E-mail: ybshen@bjfu.edu.cn

©1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Maffei 等<sup>[6]</sup>研究表明, 经棉贪夜蛾(*Spodoptera littoralis*) 取食和机械损伤的利马豆(*Phaseolus lunatus*) 叶片中, 钙离子和活性氧的积累, 及抗氧化酶活性和基因表达都表现出明显差异。但也有研究表明, 连续的机械损伤能够诱导利马豆释放出与棉贪夜蛾取食非常相似的挥发物, 机械损伤完全能够模拟昆虫取食<sup>[7]</sup>。因此, 机械损伤和昆虫取食能否诱导相同的防御反应, 机械损伤能否完全替代昆虫取食, 还存在争议。

合作杨(*Populus simonii* × *P. pyramidalis* cv. ‘Opera 8277’) 是杂交品种, 具有扦插育苗易生根、易繁殖、造林成活率高、适应性强、生长快等特点, 是我国北方地区特别是黄土高原以及“三北”地区主要的造林树种, 但其极易受到病虫危害, 给林业生产和发展造成重大损失。因此, 本试验以合作杨为材料, 研究了昆虫取食和机械损伤对合作杨叶片膜质过氧化及抗氧化酶活性的影响, 并对抗氧化酶在合作杨抗病虫防御反应中的作用进行了探讨, 以期建立新的无公害病虫害防治方法提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

以 1 年生合作杨(*Populus simonii* × *P. pyramidalis* cv. ‘Opera 8277’) 扦插苗为试验材料。3 月份将插条扦插于直径 25 cm、盛有果园土的塑料盆中, 定期浇水, 缓苗后定期供给 Hoagland 营养液, 以避免产生干旱胁迫或缺乏营养影响实验结果。试验于 7 月份进行, 选取长势较好且一致的幼苗。

实验用虫为杨扇舟蛾(*Clostera anachoreta* Fabricius) 3 龄幼虫, 由通州区小耕垡林场提供, 饲养于温室的指形管中。

### 1.2 处理方法

机械损伤: 用打孔器模拟昆虫取食叶片的方式对合作杨的功能叶片进行损伤, 损伤大约 30% 的叶面积;

昆虫取食: 实验前一天晚上终止杨扇舟蛾进食, 使其处于饥饿状态, 第二天取 8~10 条健康的杨扇舟蛾幼虫放到合作杨叶片上取食 30 min 后开始计时;

在各种处理 0.5, 1, 2, 4, 8 h 后分别取伤害叶片和邻近的上、下位健康叶片, 立即投入液氮中冷冻, -80℃ 保存备用。以相同条件下未损伤的合作杨植株上相同部位叶片为对照, 每种处理均设 3 个重复。

### 1.3 测定项目及方法

1.3.1 过氧化氢( $H_2O_2$ ) 含量测定 参照刘俊等<sup>[8]</sup>的方法, 用丙酮提取叶片中的  $H_2O_2$ , 萃取脱色,  $Ti(IV)$ -PAR 比色法。按照同样程序制备  $H_2O_2$  标

准曲线, 通过标准曲线计算  $H_2O_2$  的含量, 结果以  $nmol/g$  FW 表示。

1.3.2 丙二醛(MDA) 含量测定 参照赵世杰等<sup>[9]</sup>的硫代巴比妥酸(TBA) 法, 最后采用公式  $MDA (\mu mol/L) = 6.45(D_{532} - D_{600}) - 0.56D_{450}$  来计算 MDA 含量, 结果以  $nmol/g$  FW 表示。

1.3.3 酶活性测定 取 0.2 g 合作杨叶片, 液氮研磨, 加入 1.5 ml 预冷的 50 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 7.0), 匀浆在 4℃ 下 10 000 g 离心 20 min, 上清液立即用于酶活性测定。

SOD 用氮蓝四唑(NBT) 光化还原法<sup>[10]</sup>, 以抑制 NBT 光化还原的 50% 为一个酶活性单位, 以  $U/g$  FW 表示。CAT 采用分光光度法测定<sup>[11]</sup>, 以每分钟吸光值的变化来表示酶活性大小, 单位为  $\Delta OD_{240}/min \cdot g$  FW。POD 采用愈创木酚法测定<sup>[11]</sup>, 以每克鲜重每分钟吸光值的变化值来表示酶活性大小, 单位为  $\Delta OD_{470}/min \cdot g$  FW。

### 1.4 数据处理

用 Excel 软件对数据进行整理, 实验结果利用 SAS 软件进行 Duncan 分析, 图中不同的字母表示各处理间的差异显著性( $P < 0.05$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 伤害胁迫对合作杨叶片 MDA 含量的影响

机械损伤和昆虫取食处理后 MDA 含量随时间的增加均有一个上升过程(图 1), 机械损伤处理后 MDA 含量略高于其相应时间的对照, 但无显著差异。昆虫取食 2 h 后, MDA 含量达到最大值, 较对照增加了 93.9%, 随后下降, 到处理后 8 h, 基本恢复至对照水平。机械损伤处理后 MDA 含量变化趋势与昆虫取食一致, 但含量显著低于昆虫取食。

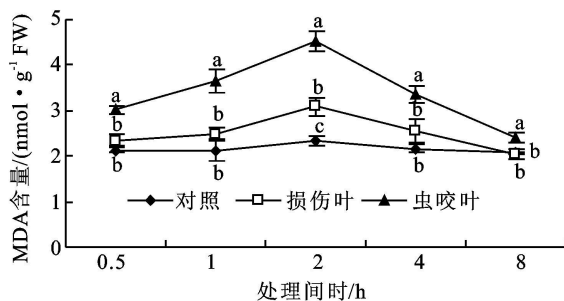


图 1 伤害胁迫对合作杨叶片 MDA 含量的影响

### 2.2 伤害胁迫对合作杨叶片 $H_2O_2$ 含量的影响

机械损伤和昆虫取食均能诱导合作杨处理叶片中  $H_2O_2$  含量的增加, 且处理间存在显著差异(图 2)。昆虫取食叶片后,  $H_2O_2$  含量与对照相比均有显著的增加( $P < 0.05$ ), 且表现出同步性的特点。随着昆虫取食时间延长,  $H_2O_2$  含量有一个升高又恢复的

过程,在取食 1 h 后迅速升高,并在 2 h 时达到最大值,较对照增加了 70.5%,随后迅速下降。机械损伤处理后, $\text{H}_2\text{O}_2$  含量在早期(0.5 h)升高幅度最大,之后持续下降,8 h 后又有所增加。从总的趋势来看,昆虫取食对  $\text{H}_2\text{O}_2$  积累的影响大,表明植物对不同损伤形式具有识别能力。

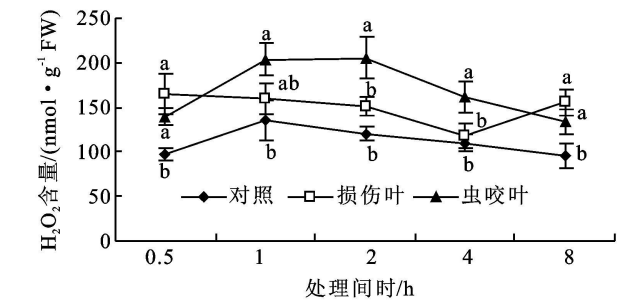


图 2 伤害胁迫对合作杨叶片  $\text{H}_2\text{O}_2$  含量的影响

2.3 合作杨叶片受损伤后抗氧化酶活性的变化

SOD、CAT 和 POD 是植物细胞中清除活性氧的

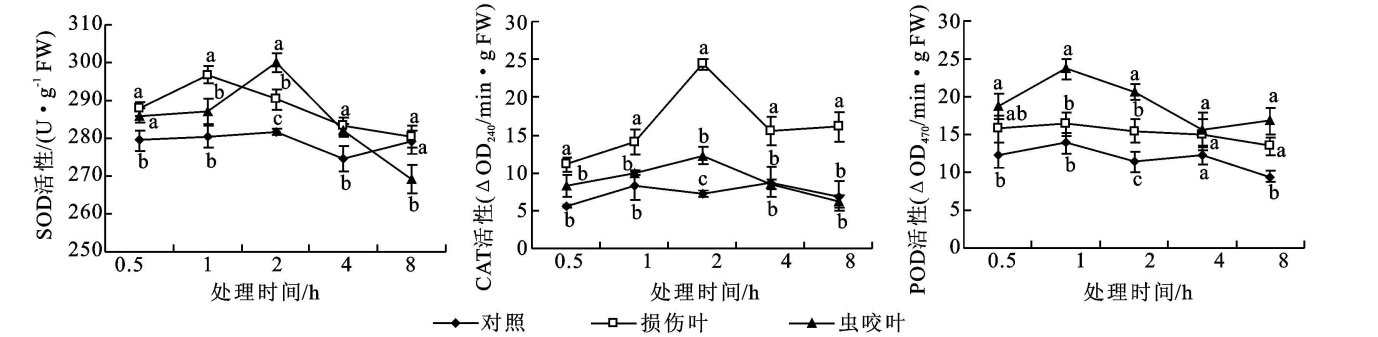


图 3 伤害胁迫对合作杨叶片 SOD、CAT、POD 活性的影响

### 3 讨论

植物在遭受到损伤时,在其受伤部位会发生一系列的早期信号事件,ROS 的产生是早期信号事件之一。当 ROS 积累超过抗氧化系统的清除能力时,ROS 就会大量积累,造成了抗氧化酶活性的降低和膜透性的增加<sup>[12-13]</sup>。MDA 是膜质过氧化的主要产物之一,其积累是自由基毒害作用的表现。因此,MDA 可以代表细胞的脂质过氧化水平和生物膜损伤程度的大小,目前已成为判断膜质过氧化作用的一个重要指标<sup>[14]</sup>。本研究结果表明,昆虫取食后, $\text{H}_2\text{O}_2$  含量与对照相比均有显著的增加,且在取食 1 h 后迅速升高,并在 2 h 时达到最大值,随后迅速下降(图 2);与之相应的,MDA 含量也呈先上升后下降趋势,并在取食 2 h 后达到最大值,随后下降,直至恢复至对照水平(图 1)。机械损伤处理后 MDA 含量变化趋势与昆虫取食一致,但含量显著低于昆虫取食; $\text{H}_2\text{O}_2$  含量在早期(0.5 h)升高幅度最大,之后持续下降,8 h 后又有所增加。表明机械损伤和昆虫取食均在一定程度

主要抗氧化酶类,机械损伤和昆虫取食后,合作杨叶片中 3 种抗氧化酶活性均发生变化,但各有其特点(图 3)。机械损伤处理后,损伤叶中 SOD 活性迅速增加,并在 1 h 时达到最大值,随后开始下降,直至恢复到对照水平。昆虫取食后,SOD 活性在处理初期变化比较平缓,虽有所升高,但增幅不大,到 2 h 时 SOD 活性开始迅速上升并达到最大值,随后迅速下降,在 8 h 时显著低于对照。而叶片中 CAT 活性与对照相比均显著升高,并随时间延长呈先上升再下降的趋势,在处理 2 h 时 CAT 活性达到峰值,随后开始下降。昆虫取食后,叶片中 CAT 活性变化趋势与机械损伤相似,与对照相比 CAT 活性变化不显著;叶片中 POD 活性随时间延长无明显变化,维持在一个相对稳定的水平。昆虫取食后,叶片中 POD 活性在 0.5 h 时迅速升高达到最大值,最大增幅为 70.4%,之后 POD 活性有所下降,但仍高于显著高于对照。

上引起合作杨叶片膜质过氧化。

植物在长期进化过程中自身形成了多种机制可以清除活性氧,其中 SOD、CAT 和 POD 等抗氧化酶类在植物体内协同作用清除过量的活性氧,SOD 可抑制膜质过氧化产物 MDA 的积累,保持和修复细胞膜;POD 可把 SOD 等产生的  $\text{H}_2\text{O}_2$  变成  $\text{H}_2\text{O}$ ,使活性氧维持在较低水平上;CAT 可与 SOD 偶联,彻底清除体内超氧阴离子及  $\text{H}_2\text{O}_2$  等氧自由基。这些抗氧化酶类在维持活性氧的代谢平衡、保护膜结构的稳定性中起重要作用,从而使植物在一定程度上忍耐、减缓或抵御逆境胁迫伤害<sup>[15]</sup>。

在本研究中,伤害胁迫后合作杨叶片内各种保护酶活性均受到不同程度的影响,其变化方式因不同损伤形式而异(图 3)。从总体趋势来看,随着处理时间延长,抗氧化酶活性(SOD、CAT 和 POD)呈先升高后下降的变化规律,表明了它们抗伤害胁迫的协同性,共同组成防御过氧化系统,抵抗不良条件对植物体的破坏。昆虫取食后,SOD 和 POD 活性随时间的增加而增加,分别在 1 h 和 2 h 时达到最大值,随后开始下

降; CAT 活性也表现出相似的趋势,但与对照相比无显著变化。机械损伤处理后,合作杨叶片中的 SOD 和 CAT 活性随着损伤时间的延长呈现先升高再降低的趋势,在处理末期其活性仍然显著高于对照;而 POD 活性随时间延长无明显变化,维持在一个相对稳定的水平。这些酶活性变化与昆虫取食和机械损伤后叶片内 MDA 和  $H_2O_2$  积累表现出一致性,从而有效清除 ROS,维持膜系统稳定。两种不同处理方法中,昆虫取食诱导的膜质过氧化和抗氧化酶活性变化与机械损伤诱导结果表现出明显差异,这是因为昆虫取食除了对合作杨叶片造成机械损伤,同时还有其口腔分泌物的参与。表明合作杨遭到伤害胁迫后体内  $H_2O_2$  短时间内快速积累可能与抗虫性之间存在着一定关联。

综上所述,机械损伤和昆虫取食均能引起合作杨叶片中活性氧迸发,同时又通过诱导抗氧化酶类活性提高,降低膜质过氧化水平,进一步诱导伤害防御反应产生,为探讨合作杨抗虫性机制从生理生化方面奠定了基础。

#### 参考文献:

- [1] Baldwin I T. An ecologically motivated analysis of plant herbivore interactions in native tobacco[J]. *Plant Physiol.*, 2001, 127: 1449-1458.
- [2] León J, Rojo E, Sánchez Serrano J J. Wound signaling in plants[J]. *J. Exp. Bot.*, 2001, 52: 1-9.
- [3] Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt K V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress[J]. *Ann. Bot.*, 2003, 91: 179-194.
- [4] Mur L, Kenton P, Draper J. In planta measurements of oxidative bursts elicited by avirulent and virulent bacterial pathogens suggests that  $H_2O_2$  is insufficient to elicit cell death in tobacco[J]. *Plant Cell Environ.*, 2005, 28:

548-561.

- [5] Slesak I, Slesak H, Libik M, et al. Antioxidant response system in the short term post wounding effect in *Mesembryanthemum crystallinum* leaves[J]. *J. Plant Physiol.*, 2008, 165: 127-137.
- [6] Maffei M E, Mithöfer A, Arimura G, et al. Effects of feeding *Spodoptera littoralis* on lima bean leaves. III: Membrane depolarization and involvement of hydrogen peroxide[J]. *Plant Physiol.*, 2006, 140: 1022-1035.
- [7] Mithöfer A, Wanner G, Boland W. Effects of feeding *Spodoptera littoralis* on lima bean leaves. II. Continuous mechanical wounding resembling insect feeding is sufficient to elicit herbivory-related volatile emission[J]. *Plant Physiol.*, 2005, 137: 1160-1168.
- [8] 刘俊,吕波,徐朗莱.植物叶片中过氧化氢含量测定方法的改进[J].*生物化学与生物物理进展*, 2000, 27(5): 548-551.
- [9] 赵世杰,许长成,邹琦,等.植物组织中丙二醛测定方法的改进[J].*植物生理学通讯*, 1994, 30(3): 207-210.
- [10] 邹琦.植物生理生化试验指导[M].北京:中国农业出版社,1998: 97-99.
- [11] 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,2000: 164-169.
- [12] Fadzilla N M, Finch R P, Burdon R H. Salinity, oxidative stress and antioxidant responses in shoot culture of rice[J]. *J. Exp. Bot.*, 1997, 48: 325-331.
- [13] Bandoeglu E, Eyidogan F, Yucel M, et al. Antioxidant responses of shoots and roots of lentil to NaCl salinity stress[J]. *Plant Growth Regul.*, 2004, 42: 69-77.
- [14] 陈少裕.膜质过氧化对植物细胞的伤害[J].*植物生理学通讯*, 1991, 27(2): 84-90.
- [15] Levine A, Tenhaken R, Dixon R, et al.  $H_2O_2$  from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response[J]. *Cell*, 1994, 79: 583-593.

(上接第 240 页)

#### 参考文献:

- [1] 翟浩辉.紧紧围绕提高农业综合生产能力 努力推进新时期的农村水利工作[N].<http://www.mwr.gov.cn>, 2004-12-24.
- [2] 魏薇.新农村示范地区土地利用变化及生态服务价值变化研究[D].重庆:西南大学,2008.
- [3] 曲环.农业面源污染控制的补偿理论与途径研究[D].北

京:中国农业科学院,2007.

- [4] 胡习英,李海华,陈南祥.城市生态环境评价指标体系与评价模型研究[J].*河南农业大学学报*, 2006, 40(3): 207-210.
- [5] 金晓斌,张鸿辉,周寅康.农用地定级综合评价中权重系数确定方法探讨[J].*南京大学学报:自然科学版*, 2008, 44(4): 447-456.
- [6] 高向军,王志刚.农用地分等定级估价理论与实践[M].北京:地质出版社,2004: 82-88.