

红树叶片衰老过程中活性氧和保护酶活性的变化

张平, 谢潮添, 杨盛昌

(厦门大学 生命科学学院, 福建 厦门 361005)

摘要: 测定了红树植物木榄 (*Bruguiera gymnorhiza*) 和秋茄 (*Kandelia candel*) 幼叶、成熟叶和老叶间活性氧和三种细胞保护酶活性的变化。结果表明, 在叶片衰老过程中, 丙二醛和 H_2O_2 含量显著提高, 超氧化物自由基产生速率加快, 表明红树叶片衰老中膜脂过氧化作用增强, 并且与 H_2O_2 和超氧化物自由基含量的上升相关。在 3 种细胞保护酶中, 超氧化物歧化酶 (SOD) 活性逐渐降低, 过氧化物酶 (POD) 活性显著提高, 过氧化氢酶 (CAT) 活性在叶片成熟过程中增高, 随着衰老而急剧降低, 细胞保护酶酶活的变化直接影响了叶片衰老过程中活性氧代谢的平衡。

关键词: 木榄 (*Bruguiera gymnorhiza*); 秋茄 (*Kandelia candel*); 叶片衰老; 活性氧; 保护酶

中图分类号: Q945; S68 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3096(2004)05-0037-03

叶片是植物光合作用的主要器官, 其功能强弱决定了植物的初级生产量。在叶片的不同发育时期, 细胞结构、物质组成、生理代谢活性及基因的表达等均发生显著变化。作者以分布于海岸潮间带的红树植物木榄和秋茄为材料, 研究了叶片在不同生长时期超氧化物自由基产生速率、 H_2O_2 含量和膜脂过氧化作用以及超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化物酶 (POD) 和过氧化氢酶 (CAT) 等 3 种细胞保护酶活性的变化, 为揭示红树植物叶片衰老机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

木榄 (*Bruguiera gymnorhiza*) 和秋茄 (*Kandelia candel*) 叶片采自福建省龙海市浮宫红树林保护区, 分别为枝条顶端幼叶、顶端以下第 2 或 3 对的成熟叶以及即将脱落的黄叶。采样后立即带回实验室进行各项指标的测定。

1.2 方法

1.2.1 酶液制备

取 4 g 鲜重叶片, 剪碎, 加入 10 mL 62.5 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.8) 于冰浴研磨, 12 000 r/min, 4 ℃ 离心 20 min, 转移上清液用于超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化物酶 (POD) 和过氧化氢酶 (CAT) 酶活及可溶性蛋白质含量、丙二醛 (MDA) 含量、超氧化物自由基产生速率的测定。

1.2.2 膜脂过氧化作用的测定

以膜脂过氧化作用产物丙二醛 (MDA) 的含量反

映膜脂过氧化作用。取上清液 1 mL, 按刘祖祺和张石诚^[1]的方法测定 MDA 含量, 单位为 $\mu\text{mol/g}$ 。

1.2.3 超氧化物自由基产生速率的测定

采用王爱国和罗广华^[2]的方法测定超氧化物自由基产生速率。

1.2.4 细胞保护酶酶活的测定

按 Giannopolitis 和 Ries 的方法测定 SOD 酶活。以每毫克蛋白质每分钟内抑制光还原 50% 的氮蓝四唑 (NBT) 作为一个酶活单位 (U)。采用愈创木酚显色法^[1]测定 POD 酶活, 以每毫克蛋白质每分钟内导致 1 个 A_{470} 的变化值作为一个酶活单位 (U)。以硫代硫酸钠滴定法^[3]测定 CAT 酶活, 以每毫克蛋白质每分钟催化生成 1 mg H_2O_2 作为一个酶活单位 (U)。可溶性蛋白质含量按 Bradford 法^[1]测定。

1.2.5 过氧化氢 (H_2O_2) 含量测定
取 2 g 鲜重叶片, 剪碎, 加入 10 mL 62.5 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.8) 于冰浴研磨, 12 000 r/min, 4 ℃ 离心 20 min, 转移上清液, 采用文献 [4] 的方法测定 H_2O_2 含量。

收稿日期: 2002-11-19; 修回日期: 2003-01-10

基金项目: 教育部优秀青年教师基金项目

作者简介: 张平 (1978-), 女, 硕士, 研究方向: 植物生理,

E-mail: sldbell@hotmail.net; 杨盛昌, 通讯作者

2 结果与分析

2.1 叶片衰老过程中细胞膜脂过氧化作用的变化

不同生长时期红树叶片的MDA含量的变化见图1。很明显,随着叶片的成熟,木榄和秋茄叶片的MDA含量略有增高,但变化不显著,木榄和秋茄成熟叶的MDA含量分别为幼叶的1.06和1.01倍;而在叶片衰老时,木榄和秋茄老叶的MDA含量显著增高,分别为幼叶的1.70和1.38倍。MDA含量的增高意味着2种红树叶片的衰老过程中细胞膜脂过氧化作用的增强。

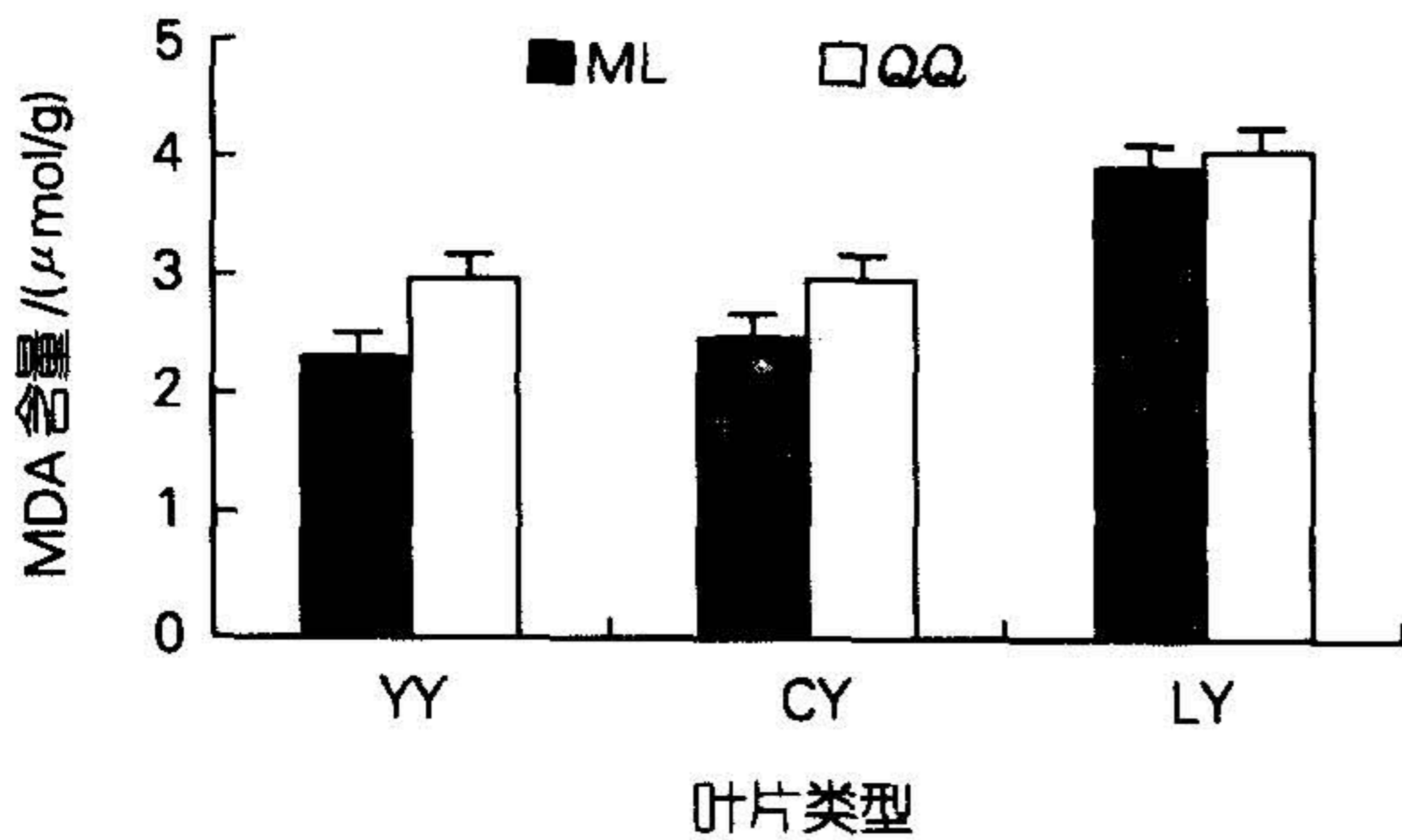


图1 木榄(ML)和秋茄(QQ)叶片衰老过程中丙二醛含量的变化

Fig. 1 Changes of malondialdehyde (MDA) content in *Bruguiera gymnorhiza* (ML) and *Kandelia candel* (QQ) leaves during senescence
YY. 幼叶; CY. 成熟叶; LY. 老叶

2.2 叶片衰老过程中H₂O₂含量和超氧化物自由基产生速率的变化

细胞活性氧包括H₂O₂和超氧化物自由基等组分。不同生长时期红树叶片的H₂O₂含量和超氧化物自由基产生速率的变化见图2。随着叶片的成熟和衰老,木榄和秋茄的H₂O₂含量增高,超氧化物自由基产生速率加快,其中木榄和秋茄成熟叶的H₂O₂含量分别为幼叶的1.15和1.19倍,老叶分别为幼叶的1.78和2.09倍;木榄和秋茄成熟叶的超氧化物自由基产生速率分别为幼叶的1.06和1.26倍,老叶分别为幼叶的1.54和1.40倍。H₂O₂和超氧化物自由基含量的增高与叶片细胞的膜脂过氧化作用增强密切相关。

2.3 叶片衰老过程中3种细胞保护酶活性及可溶性蛋白含量的变化

不同生长时期红树叶片的3种细胞保护酶活性及

可溶性蛋白含量的变化见图3。显然,不同的细胞保护酶呈现不同的变化趋势,其中SOD酶活随着叶片的成熟和衰老逐渐下降,且木榄叶片的变化幅度大于秋茄,木榄老叶的SOD酶活比成熟叶和幼叶下降29%和39%;秋茄老叶的SOD酶活则比成熟叶和幼叶下降21%和25%。CAT酶活在叶片成熟时增高,叶片衰老时则显著降低,呈现抛物线式的变化。POD酶活则随着叶片的成熟和衰老而逐渐增高,木榄老叶的POD酶活分别为成熟叶和幼叶的1.66和2.56倍;秋茄老叶的POD酶活性分别为成熟叶和幼叶的1.62和1.67倍。红树叶片的可溶性蛋白含量呈现与过氧化氢酶相似的抛物线变化趋势,即叶片成熟时可溶性蛋白含量迅速增大,衰老时则迅速减少,表明叶片成熟时可溶性蛋白合成量增多,而衰老时则逐渐降解。

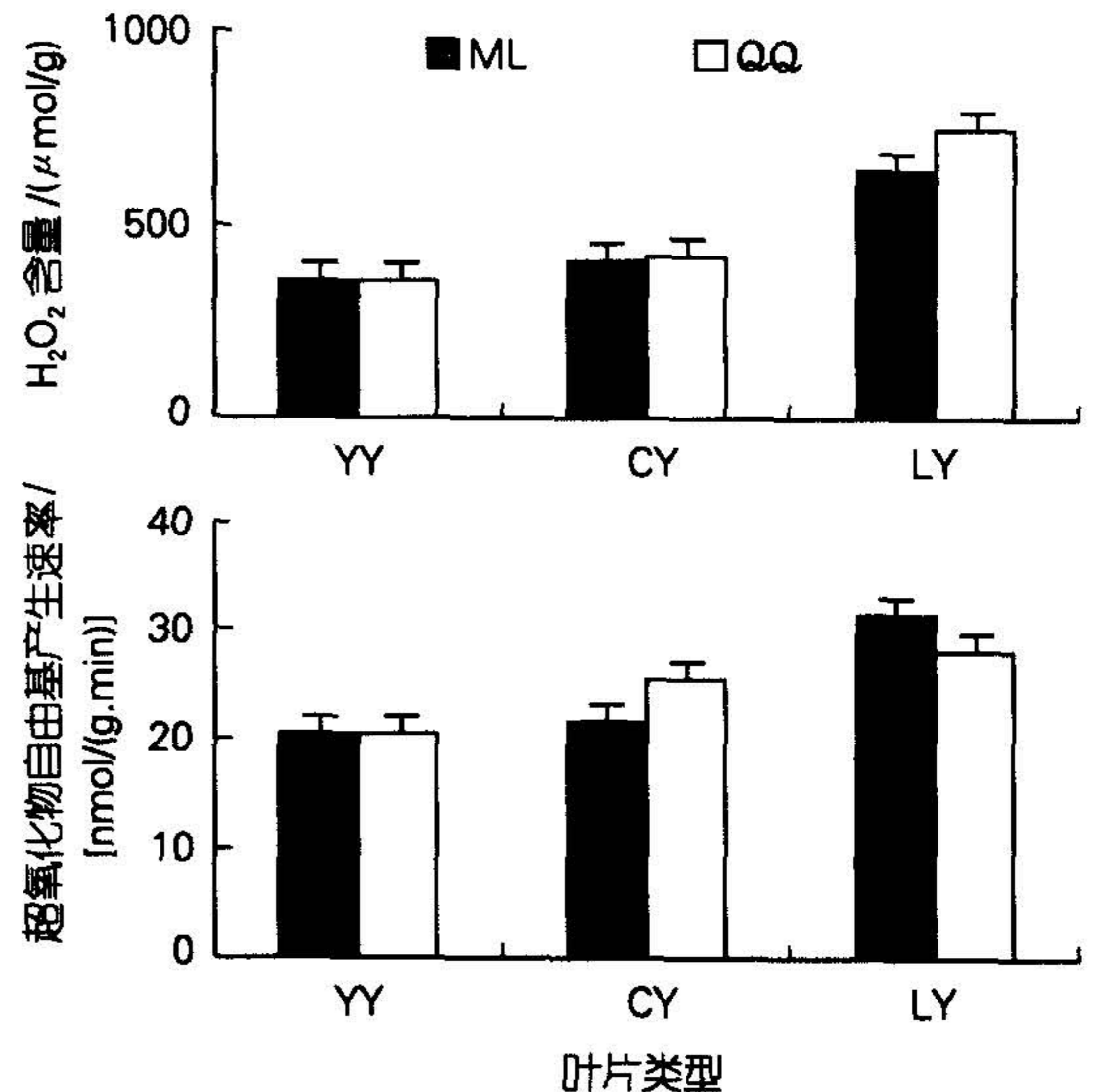


图2 木榄(ML)和秋茄(QQ)叶片衰老过程中H₂O₂含量和超氧化物自由基产生速率的变化

Fig. 2 Changes of H₂O₂ content and superoxide free anion generation rate in *Bruguiera gymnorhiza* (ML) and *Kandelia candel* (QQ) leaves during senescence
YY. 幼叶; CY. 成熟叶; LY. 老叶

3 讨论

活性氧在正常植物细胞中存在一个动态平衡,细胞衰老或逆境胁迫会促进活性氧的产生,高水平的活性氧可能加速膜脂过氧化和膜蛋白间的聚合,从而破坏植物细胞膜的结构功能,而细胞中的SOD、POD和CAT等可以起到清除活性氧的作用,防止活

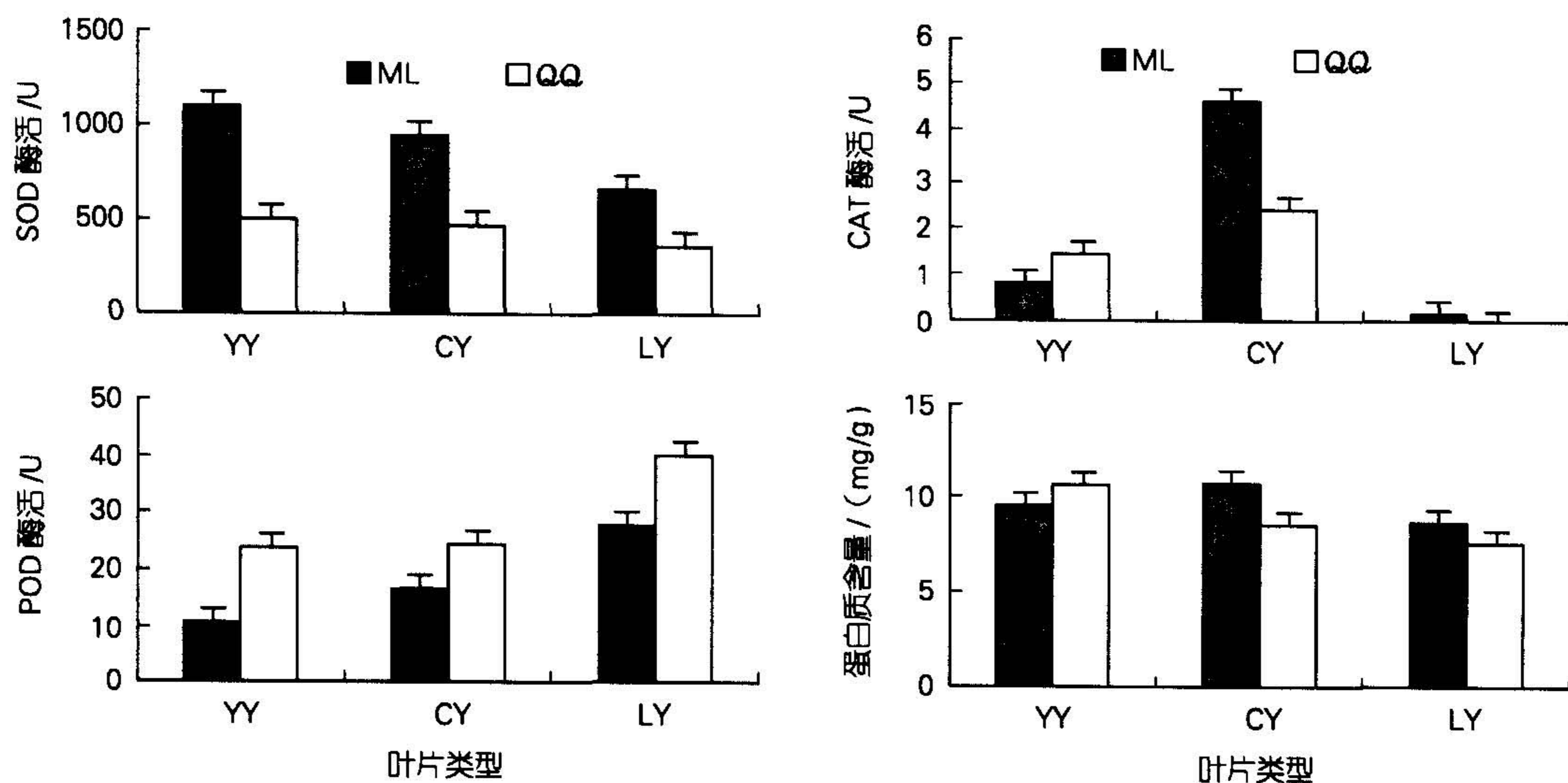


图3 木榄(ML)和秋茄(QQ)叶片衰老过程中 SOD、CAT、POD 酶活及可溶性蛋白含量的变化

Fig. 3 Changes of SOD, CAT, POD activity and soluble protein content in *Bruguiera gymnorrhiza* (ML) and *Kandelia candel* (QQ) leaves during senescence

YY. 幼叶; CY. 成熟叶; LY. 老叶

性氧对细胞膜的毒害,故上述各种酶称为细胞保护酶^[1,5]。木榄和秋茄红树叶片在衰老过程中, H₂O₂ 含量迅速增高,超氧化物自由基产生速率加快,高水平的活性氧导致细胞膜脂过氧化作用增强,这与水稻和玉米等植物叶片的衰老过程一致^[6]。此外,有人认为 H₂O₂ 可能是启动叶片衰老的一个重要因子^[7],因此, H₂O₂ 不仅是活性氧组分,也可能作为一种信号分子参与信号传导过程。

SOD、POD 和 CAT 都是植物对膜脂过氧化的酶促防御系统中重要的保护酶。SOD 在细胞保护酶系统中的作用是清除超氧化物自由基,同时产生歧化产物 H₂O₂,因此 SOD 可以避免超氧化物自由基对膜的过氧化作用。红树叶片衰老过程中 SOD 酶活的下降可能是由于蛋白质降解所致,其结果是导致超氧化物自由基水平的上升,进而加剧了膜脂过氧化作用。

CAT 和 POD 在保护酶系统中主要是起到酶促降解 H₂O₂ 的作用,避免具有强氧化能力的 H₂O₂ 对细胞膜的伤害。红树叶片的衰老过程中 CAT 与 POD 的酶活变化机制相反,即 CAT 酶活下降,而 POD 酶活上升。叶片 CAT 酶活的下降会引起 H₂O₂ 的积累,而 POD 酶活的提高又会促进 H₂O₂ 的降解,因此 CAT 和 POD

酶活的变化决定了红树叶片 H₂O₂ 的动态变化情况,红树衰老叶片中 H₂O₂ 的大量积累可能与 CAT 酶活的降幅大于 POD 酶活的增幅有关,同时也是衰老细胞通过各种代谢途径生成的 H₂O₂ 含量增多的结果。

参考文献:

- [1] 刘祖祺,张石诚. 植物抗性生物学[M]. 北京:中国农业出版社,1990. 370 - 372.
- [2] 王爱国,罗广华. 植物的超氧化物自由基与羟胺反应的定量关系[J]. 植物生理学通讯,1990, 6:55 - 57.
- [3] 山东农学院、西北农学院. 植物植物生理学实验指导[M]. 济南:山东科技出版社,1980. 109 - 114.
- [4] Ferguson I B, Watkins C B, Harman J E. Inhibition by calcium of senescence of detached cucumber cotyledons[J]. *Plant Physiology*, 1983, 71: 182 - 186.
- [5] Elstner E F. Oxygen activation and oxygen toxicity[J]. *Annual Review of Plant Physiology*, 1982, 33:73 - 96.
- [6] 林植芳,林桂珠,李双顺,等. 衰老叶片和叶绿体超氧阴离子和有机自由基浓度的变化[J]. 植物生理学报, 1988, 14:238 - 243.
- [7] Bowler C, Fluhr R. The role of calcium and activated oxygens as signals for controlling cross-tolerance[J]. *Trends in plant sciences*, 2000, 5:241 - 246.

Changes to activated oxygen and protective enzyme activity in mangrove plant leaf during senescence

ZHANG Ping , XIE Chao - tian , YANG Sheng - chang
(The School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Received: Nov., 19, 2002

Key words: *Kandelia candel* ; *Bruguiera gymnorhiza* ; protective enzyme; activated oxygen; leaf senescence.

Abstract: Changes of membrane lipid peroxidation , superoxide free anion generation rate , hydrogen peroxide(H_2O_2) content, and activity of some protective enzymes such as superoxide dismutase (SOD) , peroxidase (POD), catalase(CAT) were measured in mangrove plant *Kandelia candel* and *Bruguiera gymnorhiza* leaf during senescence. When the leaf grew from the tender stage to the senescence stage, malondialdehyde(MDA) and H_2O_2 content increased evidently, superoxide free anion generation rate was also gradually raised, showing that membrane lipid peroxidation was enhanced during the leaf growth course, furthermore that it was related to the raise of H_2O_2 and superoxide free anion in the leaf. Among these three protective enzymes, SOD activity gradually decreased, while POD activity increased remarkably during growth course. CAT activity increased as the leaf matured, dropping sharply during senescence. Protective enzyme activity in the leaf had an immediate influence on the balance of activated oxygen metabolism.

(本文编辑:张培新)