

成铁龙,彭 冶,施季森,等. 低温胁迫对杂交鹅掌楸幼苗活性氧和活性氮代谢的影响[J]. 江苏农业科学,2017,45(24):99-102.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.24.025

低温胁迫对杂交鹅掌楸幼苗活性氧和活性氮代谢的影响

成铁龙^{1,2}, 彭 冶^{1,2}, 施季森^{1,3}, 陈金慧^{1,3}, 杨立明^{1,2}

(1. 南方现代林业协同创新中心, 江苏南京 210037; 2. 南京林业大学生物与环境学院, 江苏南京 210037;

3. 南京林业大学林木遗传与生物技术部共建教育部重点实验室, 江苏南京 210037)

摘要:为了探究低温胁迫处理对鹅掌楸 [*Liriodendron chinense* (Hemsl.) Sarg.] 幼苗叶片内的活性氧和活性氮代谢的影响,以杂交鹅掌楸幼苗为材料,在 4 ℃ 条件下处理 6 d,随后于室温下恢复 2 d,测定不同时间段幼苗叶片内超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、一氧化氮合成酶(NOS)等酶活性的变化,以及超氧阴离子(O_2^-)、过氧化氢(H_2O_2)、一氧化氮(NO)的含量。结果表明,6 d 的低温胁迫处理引起了杂交鹅掌楸幼苗叶片内 SOD、CAT、NOS 活性逐渐升高;室温恢复 2 d 后叶片内 SOD、CAT、NOS 活性又有所降低,但仍高于对照。低温胁迫处理 6 d, O_2^- 和 H_2O_2 含量升高并维持在较高的水平,NO 含量也呈现增加的趋势;室温恢复 2 d 后叶片内 O_2^- 、 H_2O_2 和 NO 含量有所降低,但仍高于对照。低温胁迫导致杂交鹅掌楸幼苗叶片积累了大量的活性氧和活性氮代谢物,引起其氧化还原系统的失衡,进而对植株造成伤害。

关键词:杂交鹅掌楸;低温;活性氧;活性氮

中图分类号: S792.210.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)24-0099-04

鹅掌楸 [*Liriodendron chinense* (Hemsl.) Sarg.], 别称马褂木,是我国南方地区重要的阔叶用材树种,具有速生、材质优良、工业利用价值高等优点,而由中国马褂木和北美鹅掌楸为亲本经过人工杂交育成的种间杂种杂交鹅掌楸具有明显的杂种优势,树干更通直,树叶更秀丽,生长更迅速,目前已成为我国南方地区人工林改造的替代树种^[1]。为了扩大杂交鹅掌楸的推广应用范围,特别是进一步在我国北方大面积推广,开展杂交鹅掌楸应对低温胁迫的生物学研究及其耐低温育种研究具有重要意义。

植物低温耐性是其抵御低温危害的重要决定因素,低温抗性的强弱是植物长期适应与进化的结果,并受遗传因素的控制。但是不断增加的研究结果表明,植物对冷害或冻害的耐受是一系列抗逆性相关基因或蛋白转录活化的结果^[2]。研究发现,植物受到冷胁迫过程中,抗逆相关基因的转录与表达呈现一种网络状态。通过对含有 24 000 个拟南芥基因的芯片分析发现,低温可以诱导其中 655 个基因表达,同时抑制 284 个基因的转录,表明低温胁迫激活了植物体内基因表达的网络系统,进而调控下游蛋白质和代谢物组分的代谢变化,从而表现出对低温胁迫的耐受或敏感性^[3]。

植物应答低温胁迫的早期事件之一是氧化还原系统的变化,特别是活性氧代谢的失调导致的过量积累。过量积累的活性氧能改变植物体内正常的氧化还原状态,进而引发氧化损伤,最后导致生物大分子的破坏以及植物叶片的细胞死亡^[4-7]。植物防御系统能够通过酶和非酶催化的抗氧化系统提供足够的保护以消除正常条件下产生的活性氧损失^[8]。前期的研究发现,抗氧化系统能够被低温诱导,如超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)活性的增加,然而植物体内产生的过量活性氧(ROS)可以破坏防御系统而导致氧化胁迫^[8-10]。类似于 ROS,一氧化氮(NO)也是一种氧化还原信号分子,能够与 ROS 的一些分子发生反应^[11],这些反应的产物被称为活性氮(RNS)。最近研究发现,低温胁迫能诱导 NO 产生,并调控 RNS 相关物质的基因表达和酶活性^[12]。已有报道显示过氧化氢(H_2O_2)和 NO 在应答胁迫时具有协同效应,然而在低温胁迫下植物体内活性氧和活性氮系统的变化特征尚不清楚。

为了探究杂交鹅掌楸在低温胁迫下氧化还原系统的变化,本研究以杂交鹅掌楸幼苗为材料,在 4 ℃ 条件下处理 6 d 并于室温条件下恢复 2 d 后,测定幼苗叶片内 SOD、CAT、NOS 等酶活性的变化,以及 O_2^- 、 H_2O_2 、NO 的含量,探讨低温胁迫下杂交鹅掌楸幼苗叶片内活性氧和活性氮系统的变化特征。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验选用的材料为笔者所在实验室杂交鹅掌楸体细胞胚胎发生体系培养获得的再生植株,基因型为 1×5002。

收稿日期:2017-10-01

基金项目:国家“863”计划(编号:2013AA102705);江苏省高校自然科学基金(编号:13KJA220001);江苏省高校青蓝工程;江苏省高校优势学科建设工程(PAPD)。

作者简介:成铁龙(1975—),男,江西修水人,博士,高级工程师,主要从事林木分子生物学研究。E-mail:chengtl@njfu.edu.cn。

通信作者:杨立明,博士,教授,主要从事林木遗传育种研究。E-mail:yangliming@njfu.edu.cn。

1.2 低温胁迫处理

选取在 3/4 MS 固体培养基中生长良好、高度为 5~6 cm 的杂交鹅掌楸体细胞胚胎再生植株幼苗,置于恒温培养箱中进行 4℃ 低温处理,每 2 d 观察植株表型并取叶片,处理时间分别为 2、4、6 d。低温胁迫 6 d 后于室温恢复 2 d,记为 R₂ 处理。每个处理时间点设 45 株植株。培养条件:温度(4.0±0.5)℃,光—暗周期为 14 h—10 h,光照度 350 μmol/(m²·s),空气湿度 65%~70%。

1.3 生理指标的测定

1.3.1 酶活性测定 称取 1 g 叶片,在液氮中充分碾磨,加入 5 mL 50 mmol/L 磷酸缓冲液[5 g/L PVP-40,0.1% (体积分数) TritonX-100,1 mmol/L EDTA (pH 值为 7.4),蛋白酶抑制剂]于室温下涡旋 20 min,再于 4℃、8 000 g 离心 20 min,取上清液用于酶活性的测定。SOD 活性的测定参考 Beauchamp 等报道的方法^[13],CAT 活性的测定参考 Aebi 报道的方法^[14]。一氧化氮合成酶(NOS)活性测定使用 NOS 活性测试试剂盒(Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA),具体方法参考试剂盒的使用说明。称取 1 g 叶片,在液氮中充分碾磨,加入酶提取试剂[100 mmol/L 4-羟乙基哌嗪乙磺酸(简称 HEPES)-KOH(pH 值为 7.4),1 mmol/L EDTA(pH 值为 7.4),10% 丙三醇(体积分数),5 mmol/L 二硫苏糖醇(DTT),10 μmol/L 苯甲基磺酰氟(PMSF),0.1% Triton X-100(体积分数),10 g/L PVP-40,20 μmol/L 黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)],于室温下涡旋 20 min,再于 4℃、8 000 g 离心 20 min,取上清液用于 NOS 活性的测定,具体方法参照

González 等的报道^[15]。

1.3.2 O₂⁻ 含量和 H₂O₂ 含量测定 O₂⁻ 含量的测定参考 Rook 等的方法^[16],取叶片经氯化硝基四氮唑蓝(NBT)染色后,在液氮中碾磨,在 2 mol/L KOH-DMSO(体积比 1:1.16)中温育 4 h,用酶标仪于 630 nm 下测定吸光度。H₂O₂ 含量测定参考 Kotchoni 等的方法^[17],即经二氨基联苯胺法(DAB)染色后的叶片在液氮中碾磨,在 0.2 mol/L HClO₄ 中温育 1 h,用酶标仪于 450 nm 下测定吸光度。

1.3.3 NO 含量测定 切取 12 mm² 大小的叶片置于 96 孔板中,加 10 μm DAF-FM 双乙酸盐[10 mmol/L Tris-HCl(pH 值为 7.5)]暗室温育 10 min,用 10 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 值为 7.5)洗 3 次后,用荧光仪测定相对 NO 荧光强度^[18-19]。

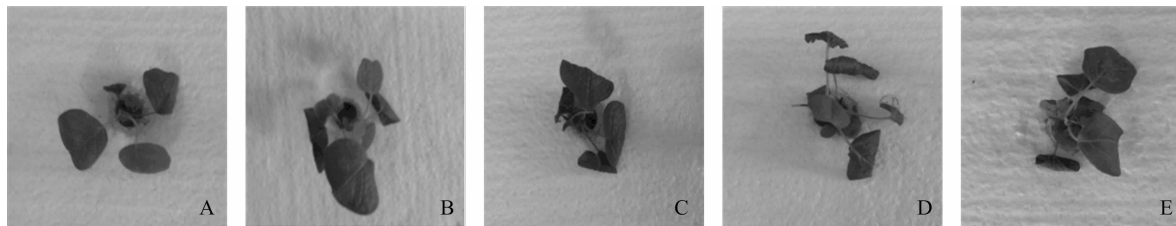
1.4 数据处理

用 SPSS 16.0 软件进行数据统计分析。

2 结果与分析

2.1 低温处理对杂交鹅掌楸幼苗表型的影响

低温胁迫影响了鹅掌楸幼苗的形态。相对于室温条件下,在低温胁迫的 1~2 d 时间段,叶片有轻微的卷曲,随着胁迫时间的延长,叶片卷曲较为明显,特别是在低温胁迫后 6 d,叶片呈现出较为明显的卷曲,甚至部分植株幼苗出现了萎蔫。但低温胁迫 6 d 后,解除低温胁迫 2 d,幼苗叶片基本恢复到与室温类似的形态(图 1)。



A、B、C、D、E 分别为杂交鹅掌楸幼苗植株在低温处理的 0、2、4、6 d 及低温胁迫 6 d 后恢复 2 d 的形态

图1 杂交鹅掌楸幼苗叶片在低温胁迫下的表型

2.2 低温胁迫对鹅掌楸幼苗叶片活性氧和活性氮含量的影响

2.2.1 鹅掌楸幼苗叶片应答低温过程中活性氧含量变化

超氧阴离子和过氧化氢是活性氧物质的 2 个重要成员,环境胁迫会诱导植物产生过量的活性氧物质的积累。研究发现,低温胁迫引起鹅掌楸幼苗叶片超氧阴离子含量先缓慢升高后急剧升高。在低温胁迫 2 d 时,鹅掌楸幼苗叶片超氧阴离子含量仅仅为对照植株的 1.3 倍;但当低温胁迫处理 4 d 和 6 d 时,超氧阴离子含量分别增加到对照植株的 4.8 倍和 6.6 倍。低温胁迫 6 d 后解除 2 d,超氧阴离子含量有所降低,但仍处于较高的水平(图 2)。

同样,低温胁迫也导致鹅掌楸幼苗叶片内过氧化氢含量的增加,但与超氧阴离子含量增加趋势有所不同。低温胁迫 2 d 引起鹅掌楸幼苗叶片过氧化氢含量增加 3.9 倍,低温胁迫处理 4 d 和 6 d 引起过氧化氢含量分别增加到对照植株的 5.1 倍和 7.3 倍。低温胁迫 6 d 后解除 2 d,过氧化氢含量仍为对照植物的 3.7 倍(图 3)。

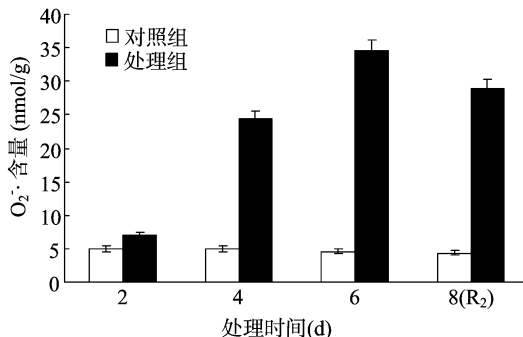


图2 低温胁迫过程中杂交鹅掌楸幼苗叶片超氧阴离子含量变化

2.2.2 鹅掌楸幼苗叶片应答低温过程中一氧化氮含量变化

低温胁迫引起了鹅掌楸幼苗叶片一氧化氮含量升高。在低温胁迫 2 d 时,鹅掌楸幼苗叶片一氧化氮含量达到对照植株的 2.2 倍;但当低温胁迫处理 4 d 和 6 d 时,一氧化氮含量分别增加到对照植株的 3.7 倍和 4.8 倍;低温胁迫 6 d 后解除 2 d,一氧化氮含量略有降低,但仍是对照植株的 3.4 倍(图 4)。

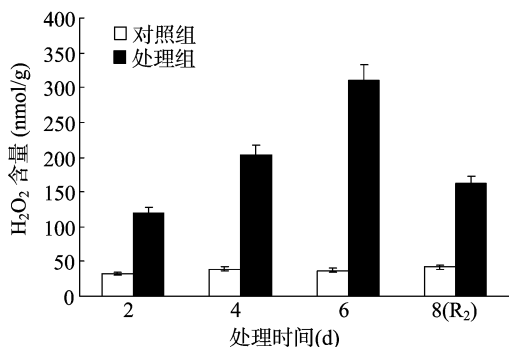


图3 低温胁迫过程中杂交鹅掌楸幼苗叶片过氧化氢含量变化

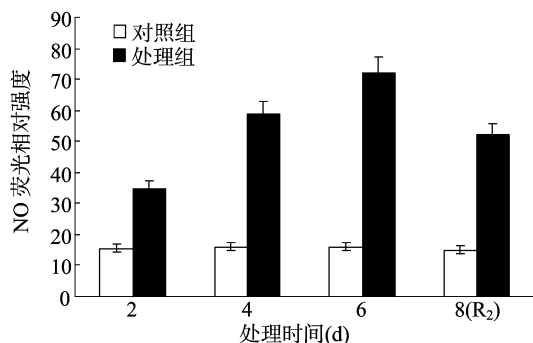


图4 低温胁迫过程中杂交鹅掌楸幼苗叶片 NO 含量变化

2.3 低温胁迫对鹅掌楸幼苗叶片活性氧和活性氮相关酶活性的影响

2.3.1 鹅掌楸幼苗叶片应答低温过程中活性氧清除酶系的活性变化 通过测定植物体内 2 个关键的清除活性氧的酶 SOD 和 CAT 活性,可以了解二者在低温胁迫过程中的防御作用。SOD 是体内清除超氧阴离子的酶,可以将体内过量的超氧阴离子催化生成过氧化氢,进而分解成水,从而解除超氧阴离子过量积累造成的伤害。低温处理鹅掌楸幼苗植株,引起叶片内 SOD 活性的增加,且随着胁迫处理时间的延长酶活性逐渐升高(图 5)。与室温条件相比,低温胁迫处理 2 d 诱导 SOD 活性增加了 1.6 倍;胁迫处理 4 d 和 6 d 时 SOD 活性增加了 2~3 倍;当胁迫 6 d 后解除胁迫条件恢复到室温 2 d 后, SOD 活性降低到低温胁迫处理 4 d 时的水平(图 5)。

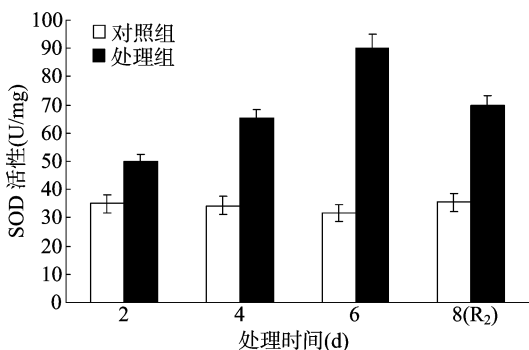


图5 低温胁迫条件下 SOD 活性在杂交鹅掌楸幼苗叶片中的变化

CAT 可以有效地将植物体内过氧化氢分解,维持机体内过氧化氢的动态水平。鹅掌楸幼苗植株在低温胁迫下,CAT 活性急剧升高,在低温胁迫的 2 d,CAT 活性增加了 2.8 倍,随着胁迫时间的延长,CAT 活性缓慢升高。在胁迫 6 d 后恢复到室温 2 d 后 CAT 活性又降低到低温胁迫 2 d 时的水平(图 6)。

从上述结果可见,鹅掌楸幼苗叶片活性氧清除酶系 SOD 和 CAT 活性在应答低温胁迫期间逐渐增强;相较于室温生长条件下的对照植株,尽管解除低温胁迫降低了 SOD 和 CAT 的活性,但它们在低温胁迫后的植株内仍保持较高的水平。

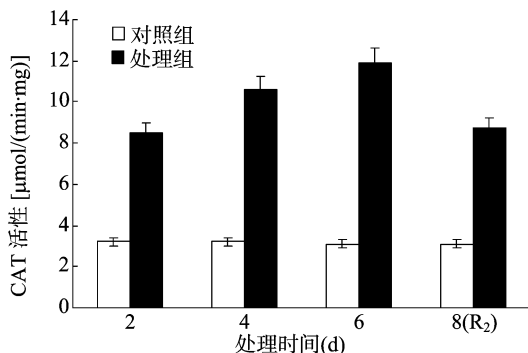


图6 低温胁迫条件下 CAT 活性在杂交鹅掌楸幼苗叶片中的变化

2.3.2 鹅掌楸幼苗叶片应答低温过程中一氧化氮合成酶的活性变化 NOS 是催化一氧化氮合成的重要的酶。上述研究观察到在鹅掌楸幼苗叶片中低温诱导 NO 的快速增加,为了调查 NOS 对这一过程的作用,研究发现低温胁迫诱导了 NOS 活性的增加。在胁迫处理的 2、4、6 d,NOS 活性分别增加了约 40%、80%、110%,胁迫恢复后,NOS 活性降低到对照植株 NOS 活性的 1.6 倍(图 7)。

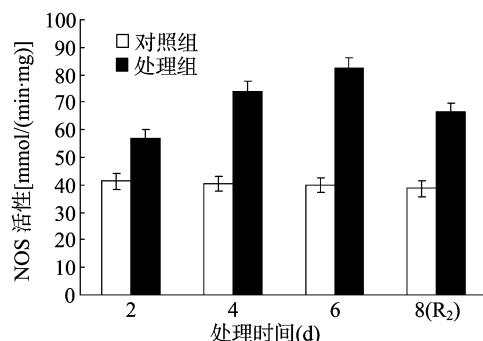


图7 低温胁迫条件下 NOS 活性在杂交鹅掌楸幼苗叶片中的变化

3 结论与讨论

在植物应答胁迫的早期阶段活性氧能够被诱导,并且被认为是植物体内传递胁迫信号的第二信使。但是当胁迫处理到一定程度时植物体内会产生过量的活性氧,并损伤植物体^[20]。因此,调查胁迫状态与活性氧积累的特征变化谱有助于了解植物应答胁迫的生理生化机制。研究发现,低温胁迫下杂交鹅掌楸幼苗叶片内超氧阴离子自由基、过氧化氢等活性氧物质含量显著增加,特别是随着胁迫处理时间的延长,活性氧积累得更多。这可能是由于低温胁迫打破了植株体内氧化还原系统的平衡状态,使活性氧产生的速度超过了活性氧清除的速度,引起了活性氧含量的增加。为了避免植物体内由于活性氧积累造成的氧化伤害,植物拥有复杂的抗氧化系统来清除活性氧,其中 SOD 和 CAT 是 2 个主要的催化分解超氧阴离子自由基和过氧化氢的抗氧化酶,可以防止活性氧的过量积累。本研究中,低温胁迫诱导了杂交鹅掌楸幼苗叶片内 SOD、CAT 活性的增强,SOD、CAT 活性在低温胁迫过程中增强可能是为了降低过量积累的活性氧对植物体的伤害。

低温胁迫与活性氮代谢也密切相关^[21]。研究发现,低温胁迫也引起了杂交鹅掌楸幼苗叶片内一氧化氮含量的增加,该结果显示一氧化氮参与到植物应答低温胁迫的机制中;一氧化氮含量的应答变化趋势与一氧化氮合成酶活性的增加呈正相关,由此暗示 NOS 活性也许被上调以便产生更多的一氧化氮来应答低温胁迫。

已知活性氧和活性氮代谢是紧密相连且交叉反应的系统,活性氧和一氧化氮能直接相互作用生成过氧亚硝基阴离子等活性氮物质^[22]。本研究中,低温胁迫扰乱了活性氧和活性氮的平衡状态,引起了活性氧和活性氮含量增加,而其自身防御系统调动了活性氧清除酶的活性以降低活性氧含量,以减缓其对植物体的氧化伤害(图 8)。

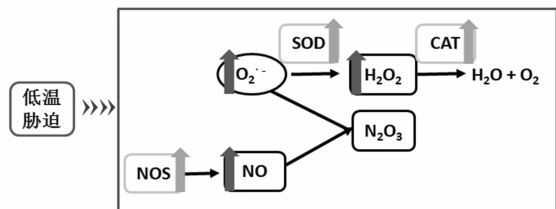


图8 低温诱导鹅掌楸幼苗叶片活性氧和活性氮代谢的途径

参考文献:

- [1] 陈金慧. 杂交鹅掌楸体细胞胚胎发生研究[D]. 南京:南京林业大学,2003.
- [2] Li W, Wang R, Li M, et al. Differential degradation of extraplastidic and plastidic lipids during freezing and post-freezing recovery in *Arabidopsis thaliana* [J]. Journal of Biology Chemistry, 2008, 283 (1): 461-468.
- [3] Zhu J, Dong C H, Zhu J K. Interplay between cold-responsive gene regulation, metabolism and RNA processing during plant cold acclimation[J]. Current Opinion Plant Biology, 2007, 10(3): 290-295.
- [4] Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, et al. Reactive oxygen gene network of plants[J]. Trends in Plant Science, 2004, 9: 490-498.
- [5] Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance[J]. Trends in Plant Science, 2002, 7: 405-410.
- [6] Kerchev P, Mühlenbock P, Denecker J, et al. Activation of auxin signalling counteracts photorespiratory H_2O_2 -dependent cell death[J]. Plant Cell Environment, 2015, 38: 253-265.
- [7] Wang Y, Lin A, Loake G J, et al. H_2O_2 -induced leaf cell death and the crosstalk of reactive nitric/oxygen species [J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2013, 55: 202-208.
- [8] Hasanuzzaman M, Hossain M A, Silva J A T, et al. Plant response and tolerance to abiotic oxidative stress: antioxidant defense is a key factor [M]//Venkateswarlu B, Shanker A K, Shanker C, et al. Crop stress and its management: perspectives and strategies. Netherlands: Springer, 2012: 261-315.
- [9] 刘零怡, 赵丹莹, 郑 杨, 等. 植物在低温胁迫下的过氧化氢代谢及信号转导[J]. 园艺学报, 2009, 36(11): 1701-1708.
- [10] You J, Chan Z L. ROS regulation during abiotic stress responses in crop plants[J]. Frontiers in Plant Science, 2015, 6: 1092.
- [11] Hill B G, Dranka B P, Bailey S M, et al. What part of NO don't you understand? Some answers to the cardinal questions in nitric oxide biology [J]. Journal of Biology Chemistry, 2010, 285: 19699-19704.
- [12] Airaki M, Leterrier M, Mateos R M, et al. Metabolism of reactive oxygen species and reactive nitrogen species in pepper (*Capsicum annuum* L.) plants under low temperature stress[J]. Plant Cell Environment, 2012, 35: 281-295.
- [13] Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels [J]. Analytical Biochemistry, 1971, 44: 276-287.
- [14] Aebi H. Catalase *in vitro* [J]. Method of Enzymology, 1984, 105: 121-126.
- [15] González A, Cabrera M de los Á, Henríquez M J, et al. Cross talk among calcium, hydrogen peroxide, and nitric oxide and activation of gene expression involving calmodulins and calcium-dependent protein kinases in *Ulva compressa* exposed to copper excess[J]. Plant Physiology, 2012, 158: 1451-1462.
- [16] Rook G A, Steele J, Umar S, et al. A simple method for the solubilization of reduced NBT, and its use as a colorimetric assay for activation of human macrophages by gamma-interferon[J]. Journal of Immunology Methods, 1985, 82: 161-167.
- [17] Kotchoni S O, Kuhns C, Ditzler A, et al. Overexpression of different aldehyde dehydrogenase genes in *Arabidopsis thaliana* confers tolerance to abiotic stress and protects plants against lipid peroxidation and oxidative stress[J]. Plant Cell Environment, 2006, 29: 1033-1048.
- [18] Mur L A, Mandon J, Cristescu S M, et al. Methods of nitric oxide detection in plants: a commentary[J]. Plant Science, 2011, 181: 509-519.
- [19] Zielonka J, Zielonka M, Sikora A, et al. Global profiling of reactive oxygen and nitrogen species in biological systems: high-throughput real-time analyses[J]. Journal of Biology Chemistry, 2012, 287: 2984-2995.
- [20] Cruz de Carvalho M H. Drought stress and reactive oxygen species: Production, scavenging and signaling[J]. Plant Signal Behavior, 2008, 3: 156-165.
- [21] Puyaubert J, Baudouin E. New clues for a cold case: nitric oxide response to low temperature[J]. Plant Cell Environment, 2014, 37: 2623-2630.
- [22] Lindermayr C, Durner J. Interplay of reactive oxygen species and nitric oxide: nitric oxide coordinates reactive oxygen species homeostasis[J]. Plant Physiology, 2015, 167: 1209-1210.