

余甜,张萍,陈韦多.干旱胁迫下3种类型新疆野核桃保护酶和丙二醛含量的变化[J].江苏农业科学,2018,46(16):119-121.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.16.030

# 干旱胁迫下3种类型新疆野核桃保护酶和丙二醛含量的变化

余甜,张萍,陈韦多

(新疆农业大学林学与园艺学院/新疆教育厅干旱区林业生态与产业技术重点实验室,新疆乌鲁木齐 830052)

**摘要:**以卵圆形、尖嘴形、心形3种类型1年生新疆野核桃盆栽实生幼苗为材料,研究干旱胁迫下新疆野核桃叶片超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)活性及丙二醛(MDA)含量的变化。结果表明,尖嘴形新疆野核桃调节自身抗氧化的能力居中,心形新疆野核桃过氧化过程较慢,抗旱性较强,而卵圆形野核桃参与渗透调节能力消耗相对较大,调节自身抗氧化能力相对较弱;3种类型新疆野核桃耐旱性强弱依次为心形>尖嘴形>卵圆形。

**关键词:**新疆野核桃;干旱胁迫;保护酶;丙二醛;卵圆形;尖嘴形;心形

**中图分类号:** S664.101 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)16-0119-03

世界上有1/3以上的土地处于干旱、半干旱地区,而非干旱地区在植物生长季节也常发生不同程度的干旱<sup>[1]</sup>,干旱已成为世界范围内影响农业生产的主要现象之一。目前,对植物耐旱机制的研究日益受到重视,且多集中在干旱胁迫时植物的生理生化反应及相应的适应性机制<sup>[2-3]</sup>。在长期进化过程中,植物形成保护系统以清除活性氧,减轻或避免活性氧对细胞造成的伤害,而抗氧化酶系的表达和渗透调节物质的积累提高了植物的抗逆性,最终体现为植物对干旱胁迫的抗性<sup>[4-5]</sup>。

新疆野核桃(*Juglans regia*)属胡桃科、胡桃属植物,既是珍稀野生林木资源,又是世界上稀有的野生核桃资源,中国仅在新疆维吾尔自治区伊犁巩留县野核桃沟有成片分布,并经考证认为是栽培核桃的直系祖先<sup>[6-7]</sup>,按种子特征主要划分为14个类型<sup>[8]</sup>。有研究发现,影响新疆野核桃生长繁衍的限制因素主要是生境温度和湿度<sup>[9-10]</sup>。本试验以卵圆形、尖嘴形、心形3种类型新疆野核桃为研究对象,测定干旱胁迫下新疆野核桃苗期叶片超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)活性及丙二醛(MDA)含量,初步比较3种新疆野核桃在干旱胁迫下的生理反应差异,确定其适生水分范围,为新疆野核桃的进一步保护性开发研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验处理

采集种子表型特征差异明显,在新疆野核桃沟存活株数

较多,且在各生长区域有一定数量分布的卵圆形、尖嘴形、心形3种类型新疆野核桃种子,单株取样,按不同类型混合;当年11月播种于花盆内,并在位于新疆乌鲁木齐县水西沟的阳光温室内培养;次年7月,每个类型随机选取50株盆栽1年生新疆野核桃实生幼苗,在新疆农业大学林木遗传育种实验室内进行持续自然干旱处理,处理前浇足量水,使每株幼苗土壤水分达到相对饱和状态,后直到试验结束不再浇水;每隔5d,即分别在试验后0(刚灌完水,CK)、5、10、15、20、25d及复水10d,于08:00随机选取新疆野核桃实生幼苗中上部的成熟叶片,测定叶片的超氧化物歧化酶、过氧化物酶、过氧化氢酶活性及丙二醛含量等指标。

### 1.2 各指标的测定方法

**1.2.1 CAT活性** 参照邹琦的方法<sup>[11]</sup>进行:新疆野核桃幼苗叶片提取酶液0.05mL,加入1.5mL磷酸缓冲液,再加1mL蒸馏水;逐管加入0.1mol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.45mL,迅速倒入石英杯中,测定波长为240nm处的吸光度,每隔1min读数1次,共读数5次;计算CAT活性,公式为:

$$\text{CAT 活性} = (D_{240\text{ nm}} \times V_T) / (0.1 \times V_1 \times t \times m)。$$

式中: $D_{240\text{ nm}}$ 为波长240nm的吸光度; $V_T$ 为提取酶粗液的总体积,mL; $V_1$ 为测定时用的酶体积,mL; $t$ 为开始加H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>到最后1次的读数时间,min; $m$ 为叶片鲜质量,g。

**1.2.2 POD活性** 参照李合生等的方法<sup>[12]</sup>进行:试管中依次加入磷酸缓冲液2mL、2% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.2mL、愈创木酚0.5mL,最后加入新疆野核桃幼苗叶片提取酶液0.1mL,水浴锅中34℃保温1min;取出,测定波长为470nm处的吸光度,每隔0.5min读数1次,共读数5次;计算POD活性,公式为:

$$\text{POD 活性} = (\Delta D_{470\text{ nm}} \times V_T) / (0.01 \times V_s \times t \times m)。$$

式中: $\Delta D_{470\text{ nm}}$ 为反应时间内吸光度的变化; $V_T$ 为总提取液体积,mL; $m$ 为叶片鲜质量,g; $V_s$ 为测定时使用的酶液体积,mL; $t$ 为反应时间,min。

**1.2.3 SOD活性** 参照李合生等的方法<sup>[12]</sup>进行:试管中依

收稿日期:2017-07-31

基金项目:国家自然科学基金(编号:31260187)。

作者简介:余甜(1992—),女,江西乐平人,硕士研究生,从事植物生理研究。E-mail: BCC2701@163.com。

通信作者:张萍,博士,副教授,从事林木育种研究。E-mail: zhang20032153@126.com。

次加入磷酸缓冲液 1.5 mL、甲硫氨酸 (Met) 0.3 mL、氮蓝四唑 (NBT) 0.3 mL、乙二胺四乙酸钠 (EDTA - Na<sub>2</sub>) 0.3 mL、0.25 mL 蒸馏水、稀释 5 倍的核黄素 0.3 mL,最后加入新疆野核桃幼苗叶片提取酶液 0.05 mL,置于 4 000 lx 日光下反应 6 min,以暗处理的样品为空白对照,测定波长为 560 nm 处的吸光度,计算 SOD 活性,公式为:

$$\text{SOD 活性} = (D_0 - D_s) \times V_T / (0.5 \times D_0 \times V_1 \times t \times m)。$$
式中: $D_0$  为空白对照的吸光度; $D_s$  为样品管的吸光度值; $V_T$  为样品液的总体积,mL; $m$  为样品鲜质量,g; $V_1$  为测定时提取液用量,mL; $t$  为反应时间,min。

1.2.4 MDA 含量 称取样品 2 g,加入 10% 三氯乙酸 2 mL,研磨至匀浆,再加入 10% 三氯乙酸 8 mL 进一步研磨,匀浆 4 000 r/min 离心 10 min;吸取上清液 2 mL,加入 0.6% 硫代巴比妥酸溶液 2 mL,以加入 2 mL 蒸馏水为对照,混匀,沸水浴反应 15 min;迅速冷却,离心,取上清液,分别测定波长为 532、600、450 nm 处的吸光度,计算 MDA 含量,公式为:

$$\text{MDA 含量} = [6.45 \times (D_{532\text{ nm}} - D_{600\text{ nm}}) - 0.56 \times D_{450\text{ nm}}] \times V/m。$$
式中: $D_{532\text{ nm}}$ 、 $D_{600\text{ nm}}$ 、 $D_{450\text{ nm}}$  分别为波长 532、600、450 nm 处的吸光度; $V$  为样品液的总体积,mL; $m$  为样品鲜质量,g。

1.3 统计分析

采用 Excel 2010、SPSS 19.0 软件对数据进行分析处理。

2 结果与分析

2.1 干旱胁迫下新疆野核桃叶片 CAT 活性的变化

由表 1 可知,干旱胁迫处理 0~10 d,3 种类型新疆野核桃叶片 CAT 活性增长较为缓慢;胁迫处理 10~20 d,3 种类型新疆野核桃叶片 CAT 活性增长较为迅速;胁迫处理 20 d 时,卵圆形、尖嘴形、心形野核桃的 CAT 活性分别为 235.33、151.66、131.00 U/(g·min),其中卵圆形野核桃的 CAT 活性显著高于其他 2 个类型野核桃( $P<0.05$ )。卵圆形、尖嘴形野核桃叶片的 CAT 活性在胁迫处理 20 d 时达到最大值,胁迫处理 25 d 时急剧下降,而心形野核桃在胁迫处理 25 d 时达到最大值,为 170.66 U/(g·min),心形野核桃的 CAT 反应受干旱胁迫时间相比前两者较长;复水 10 d,尖嘴形、卵圆形野核桃叶片的 CAT 活性分别为 52.00、34.66 U/(g·min)。

表 1 干旱胁迫下 3 种类型新疆野核桃叶片的 CAT 活性			
胁迫时间 (d)	CAT 活性[U/(g·min)]		
	卵圆形	尖嘴形	心形
0	28.00 ± 17.55ab	28.33 ± 13.16ab	12.33 ± 2.90a
5	57.66 ± 38.19ab	46.33 ± 25.70ab	52.00 ± 13.65ab
10	53.66 ± 11.60ab	50.00 ± 30.00ab	56.00 ± 24.87ab
15	95.00 ± 13.45bc	67.00 ± 19.21ab	96.00 ± 15.69bc
20	235.33 ± 30.90e	151.66 ± 24.36cd	131.00 ± 25.10cd
25	61.00 ± 6.42ab	34.66 ± 20.69ab	170.66 ± 0.33d
复水 10 d	34.66 ± 11.56ab	52.00 ± 14.73ab	62.00 ± 4.58ab

注:数据后不同小写字母表示处理间差异显著( $P<0.05$ )。下表同。

2.2 干旱胁迫下新疆野核桃叶片 POD 活性的变化

由表 2 可知,干旱胁迫处理 0~5 d,3 种类型新疆野核桃叶片的 POD 活性变化不大,在 50 U/(g·min) 左右,呈缓慢上升趋势;胁迫处理 5~20 d,3 种类型野核桃叶片的 POD 活

性急剧上升,其中心形野核桃叶片 POD 活性增长幅度相对最大,其次是卵圆形,尖嘴形野核桃叶片 POD 活性增长相对最慢;胁迫处理 20 d 时,3 种类型野核桃叶片 POD 活性相互间有显著性差异( $P<0.05$ )。胁迫处理 20~25 d,心形野核桃叶片 POD 活性依然呈增长趋势,且在胁迫处理 25 d 时达到峰值,为 222.80 U/(g·min),而卵圆形和尖嘴形野核桃叶片 POD 活性均呈下降趋势;胁迫处理 25 d 时,卵圆形野核桃叶片的 POD 活性降到 2.00 U/(g·min);心形野核桃叶片 POD 活性在复水 10 d 时相对最低,为 7.40 U/(g·min)。

表 2 干旱胁迫下 3 种类型新疆野核桃叶片的 POD 活性			
胁迫时间 (d)	POD 活性[U/(g·min)]		
	卵圆形	尖嘴形	心形
0	37.80 ± 2.36bc	44.60 ± 5.12bcd	38.86 ± 5.76bc
5	42.86 ± 2.62bcd	51.00 ± 4.01cd	49.66 ± 7.67bcd
10	62.93 ± 2.85de	90.13 ± 6.15fg	120.20 ± 2.19h
15	107.60 ± 19.52gh	119.73 ± 9.83h	143.46 ± 3.65i
20	148.00 ± 3.70i	111.06 ± 6.61h	192.20 ± 7.90j
25	2.00 ± 0.11a	80.73 ± 1.57ef	222.80 ± 18.63k
复水 10 d	43.93 ± 0.86bcd	28.00 ± 0.11b	7.40 ± 0.57a

2.3 干旱胁迫下新疆野核桃叶片 SOD 活性的变化

SOD 是一种重要的活性氧清除酶,当外来胁迫导致活性氧大量产生时,SOD 能及时有效清除自由基,保护细胞免受活性氧胁迫的伤害<sup>[13]</sup>。由表 3 可知,干旱胁迫处理 0~10 d,尖嘴形、心形野核桃叶片的 SOD 活性增加速度相对较慢,而卵圆形野核桃叶片的 SOD 活性增长速度相对较快;胁迫处理 5 d 时,卵圆形野核桃叶片 SOD 活性显著低于其他 2 种类型( $P<0.05$ )。胁迫处理 10~20 d,卵圆形和尖嘴形野核桃叶片的 SOD 活性增长非常接近,有几乎相同的变化趋势,而心形野核桃叶片的 SOD 活性增长速度稍为缓慢;卵圆形野核桃叶片的 SOD 活性在胁迫处理 20 d 时达到峰值,而其他 2 种类型野核桃在胁迫处理 25 d 时达到峰值;复水 10 d,卵圆形、尖嘴形野核桃叶片的 SOD 活性有明显的下降。

表 3 干旱胁迫下 3 种类型新疆野核桃叶片的 SOD 活性			
胁迫时间 (d)	SOD 活性[U/(g·min)]		
	卵圆形	尖嘴形	心形
0	30.66 ± 5.17a	54.66 ± 0.88bc	42.00 ± 6.65ab
5	39.00 ± 3.05a	63.00 ± 3.84cde	59.00 ± 3.21cd
10	64.66 ± 5.78cde	64.33 ± 6.88cde	59.00 ± 12.49cd
15	71.66 ± 2.02cdef	71.00 ± 2.30cdef	65.00 ± 0.57cde
20	80.66 ± 1.76ef	80.33 ± 1.45ef	75.66 ± 0.33def
25	79.66 ± 6.69ef	82.33 ± 5.54f	78.66 ± 4.91ef
复水 10 d	56.66 ± 7.35bc	58.66 ± 2.33cd	67.33 ± 5.78cdef

2.4 干旱胁迫下新疆野核桃叶片丙二醛含量的变化

植物体内的膜脂过氧化产物积累与植物受逆境伤害程度呈正比关系,植物受伤害程度越小,则丙二醛积累量越小;反之,则丙二醛含量越大<sup>[14]</sup>。由表 4 可知,随胁迫天数的增加,卵圆形、尖嘴形野核桃叶片的丙二醛含量呈先上升后下降趋势,而心形野核桃叶片丙二醛含量呈持续上升趋势;干旱胁迫处理 15~20 d,卵圆形、尖嘴形野核桃叶片的丙二醛含量明显上升趋势,且在胁迫处理 20 d 时达到峰值;心形野核桃叶片丙二醛含量在胁迫处理 25 d 时达到峰值,为

26.66  $\mu\text{mol/g}$ , 与其他 2 个类型野核桃叶片丙二醛含量相比有显著性差异 ( $P < 0.05$ ); 复水 10 d, 3 种类型野核桃叶片的丙二醛含量都有不同程度的下降。

表 4 干旱胁迫下 3 种类型新疆野核桃叶片的 MDA 含量

胁迫时间 (d)	MDA 含量 ( $\mu\text{mol/g}$ )		
	卵圆形	尖嘴形	心形
0	16.33 $\pm$ 0.33abc	15.66 $\pm$ 0.88ab	16.33 $\pm$ 1.76abc
5	16.33 $\pm$ 0.33bc	15.66 $\pm$ 0.88ab	16.33 $\pm$ 1.76abc
10	17.00 $\pm$ 0.57abc	16.33 $\pm$ 0.33abc	20.66 $\pm$ 0.33cdef
15	17.00 $\pm$ 0.57abc	17.66 $\pm$ 0.33abcd	21.66 $\pm$ 0.33def
20	22.33 $\pm$ 0.88ef	24.33 $\pm$ 0.88fg	21.33 $\pm$ 4.48def
25	14.00 $\pm$ 0.57a	17.00 $\pm$ 0.00abc	26.66 $\pm$ 0.88g
复水 10 d	13.66 $\pm$ 0.33a	15.66 $\pm$ 0.76ab	19.00 $\pm$ 1.00bcde

### 3 结论与讨论

野生植物资源是重要的遗传资源, 是未来人类能够利用的资源<sup>[8]</sup>。新疆野核桃在我国主要分布于新疆维吾尔自治区伊犁巩留野核桃沟内, 是极为珍稀的野生资源, 对育种和栽培核桃的起源、演化研究具有重要的价值。王肇延研究表明, 新疆野核桃对生存的环境要求较高, 而新疆气候干燥、降水量少的特点时刻威胁着新疆各类野生果树的生存<sup>[10]</sup>。因此, 研究新疆野核桃在干旱环境下的生理适应性反应, 对新疆野核桃未来的研究利用有着重大意义。

植物保护酶系统主要包括超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)等, 相互间可协同作用, 使氧自由基维持在一个较低的水平上, 从而防止氧自由基对生物体造成伤害, 目前已广泛用于植物对逆境的反应机制研究<sup>[15]</sup>。过氧化氢酶普遍存在于植物的所有组织中, 是生物防御体系的关键酶之一, 其活性与植物的代谢强度及抗寒、抗病能力有一定关系; 过氧化物酶是植物体中活性较高的一种酶, 与呼吸作用、光合作用及生长素的氧化等都有关系, 可作为组织老化的一种生理指标。超氧化物歧化酶是一种能够催化超氧化物通过歧化反应转化为氧气和过氧化氢的酶<sup>[16]</sup>, 是生物体内一种很重要的抗氧化酶类, 有很好的科研意义和应用价值<sup>[17]</sup>。试验结果表明, 卵圆形、尖嘴形 2 种类型的新疆野核桃叶片 CAT 活性在干旱胁迫处理 20 d 时达到最大值, 后开始下降, 心形新疆野核桃叶片 CAT 活性在干旱胁迫处理 25 d 时达到最大值, 说明心形野核桃抗旱能力较强; 3 种类型新疆野核桃叶片 POD 活性在胁迫初期呈缓慢增长趋势, 说明植物对于干旱胁迫有一个适应调节的过程, 而其变化幅度大小说明植物调节能力的强弱; 胁迫处理 25 d 至复水 10 d, 卵圆形野核桃叶片的 POD 活性继续上升, 说明干旱胁迫程度已达到饱和, POD 活性不再发挥作用; 干旱胁迫初期, 卵圆形野核桃叶片的 SOD 活性增加速度相对较快, 其余两者增长速度较慢, 植株通过体内 SOD 活性上升来抵御逆境, 使植物不受或受到较小伤害; 干旱胁迫期间, 尖嘴形、心形新疆野核桃叶片 SOD 活性呈持续上升状态, 表明这 2 种新疆野核桃有较强的抗旱性。

丙二醛是机体内脂质过氧化的最终产物之一, 其含量高可一定程度上反映植物受氧化伤害的程度<sup>[18-19]</sup>。本试验结果表明, 干旱胁迫过程中, 心形野核桃叶片的丙二醛含量呈

上升趋势, 直至复水 10 d 下降, 而卵圆形、尖嘴形野核桃叶片的丙二醛含量呈先上升后下降趋势, 胁迫处理 20 d 时达到峰值, 说明心形野核桃的抗逆性较尖嘴形、卵圆形抗逆性强。

从整体来看, 心形野核桃过氧化过程相对较慢, 细胞膜稳定性较高, 抗旱性较强, 尖嘴形野核桃调节自身抗氧化酶活性的能力居中, 而卵圆形野核桃参与渗透调节能力消耗相对较大, 调节自身抗氧化能力相对较弱; 3 种野核桃抗旱性强弱依次为心形 > 尖嘴形 > 卵圆形。

### 参考文献:

- [1] 山 仑. 旱地农业技术发展趋向[J]. 中国农业科学, 2002, 35(7): 848-855.
- [2] Smirnoff N. The role of oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation[J]. New Phytologist, 1993, 125(1): 27-58.
- [3] 陈善福, 舒庆尧. 植物耐干旱胁迫的生物学机理及其基因工程研究进展[J]. 植物学通报, 1999, 16(5): 555-560.
- [4] Chaves M M, Oliveira M M. Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture[J]. Journal of Experimental Botany, 2004, 55(47): 2365-2384.
- [5] 童德龙, 徐雅丽, 焦培培. 土壤水分胁迫对胡杨、灰叶胡杨渗透调节物质和保护酶活性的影响[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(1): 169-173.
- [6] 曾 斌. 新疆野生核桃资源的现状与发展[J]. 北方果树, 2005(4): 1-3.
- [7] 黎祐琛, 邱治军. 树木抗旱性及抗旱造林技术研究综述[J]. 世界林业研究, 2003, 16(4): 17-22.
- [8] 王 磊, 崔乃然, 张汉斐. 新疆野核桃的研究[J]. 干旱区研究, 1997(1): 17-27.
- [9] 董玉芝, 朱小虎, 陈 虹, 等. 新疆巩留野核桃林调查及其分析[J]. 植物遗传资源学报, 2012, 13(3): 386-392.
- [10] 王肇延. 新疆野核桃资源及遗传多样性的分析[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2011.
- [11] 邹 琦. 植物生理生化实验指导[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995.
- [12] 李合生, 孙 群, 赵世杰, 等. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.
- [13] 白志英, 李存东, 吴同燕, 等. 干旱胁迫条件下小麦旗叶酶活性和丙二醛含量的染色体定位[J]. 植物遗传资源学报, 2009, 10(2): 255-261.
- [14] 蒋明义, 郭绍川. 水分亏缺诱导的氧化胁迫和植物的抗氧化作用[J]. 植物生理学通讯, 1996, 32(2): 144-150.
- [15] 许凯扬, 叶万辉, 段学武, 等. PEG 诱导水分胁迫下喜旱莲子草的生理适应性[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2004, 30(3): 37-43.
- [16] 董 亮, 何永志, 王远亮, 等. 超氧化物歧化酶(SOD)的应用研究进展[J]. 中国农业科技导报, 2013(5): 53-58.
- [17] 窦俊辉, 喻树迅, 范术丽, 等. SOD 与植物胁迫抗性[J]. 分子植物育种, 2010, 8(2): 359-364.
- [18] 马书燕, 李吉跃, 彭彰登. 人工老化过程中柔枝松种子丙二醛(MDA)含量变化研究[J]. 种子, 2011, 30(7): 1-3.
- [19] 梁娜娜, 胡其靖, 曹 磊, 等. 蚜虫侵染对黄瓜叶片中丙二醛含量及保护酶活性的影响[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(2): 278-284.