

自身他感作用物对木麻黄苗木活性氧代谢影响

林武星

(福建省林业科学研究院, 福建 福州 350012)

摘 要: 以 15 年实生木麻黄根系水浸液作为他感作用物, 采用水培方法研究木麻黄自身他感作用物对木麻黄苗木活性氧代谢的影响。结果表明, 在木麻黄自身他感作用下, 木麻黄苗木叶片活性氧代谢失衡, 活性氧大量积累。具体表现在: 细胞膜透性增强, 膜的结构和功能受到破坏, 电解质增强, 内溶物外渗增加; 丙二醛 (MDA) 含量增加, 膜质过氧化程度加剧; 叶细胞中超氧阴离子自由基 O_2^- 产生的速率和 H_2O_2 含量增加, 活性氧产生和清除平衡被打破, 细胞内活性氧大量累积; 活性氧酶促消除系统失衡, 超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT)、谷胱甘肽还原酶 (GR) 和过氧化物酶 (POD) 活性下降, 细胞清除 O_2^- 和 H_2O_2 的能力减弱。

关键词: 木麻黄; 自身他感作用; 活性氧代谢

中图分类号: S 718. 43

文献标识码: A

Effect of self allelopathy on AOS of *Casuarina equisetifolia* forst Seedling

LIN Wur xing

(Fujian Academy of Forest Sciences, Fuzhou, Fujian 350012, China)

Abstract: Effect of self allelopathy on AOS of *Casuarina equisetifolia* Forst seedling was studied using a nutritional cultivation method. The water extract of the roots from 15-year *C. equisetifolia* Forst was used for the self allelopathy. The results indicated that the AOS lost its original balance, and that the AOS greatly accumulated in *C. equisetifolia* Forst under self allelopathy. The permeability of plasma membrane increased, while the membrane structure and function were damaged; the MDA content and the membrane lipid peroxidation increased; the O_2^- generation rate and H_2O_2 in leaf cells increased; the AOS became imbalanced; AOS accumulated greatly in leaf cells; the AOS defense system was damaged; the activities of SOD, CAT, GR and POD decreased; and, the ability of cells in clearing O_2^- and H_2O_2 was diminishing.

Key words: *Casuarina equisetifolia* Forst; self allelopathy; AOS

植物体内活性氧的产生和消除在正常情况下处于平衡状态, 植物细胞不会受到伤害。国内外研究表明, 在一些他感物质作用下, 植物体内活性氧的平衡会遭到破坏而有利于活性氧的产生和积累, 引发和加剧细胞膜脂过氧化, 细胞中的活性氧清除能力下降, 从而对细胞膜造成伤害, 最终抑制植物生长^[1- 5]。木麻黄是我国东南沿海地区主要的防护林树种, 已有的研究表明, 木麻黄可产生他感物质引起自身生长量下降, 从而导致更新衰退^[6- 8]。目前对于木麻黄所产生的他感物质对其活性氧代谢影响的研究尚处于空白, 为此, 笔者开展了这方面的研究, 以阐明木麻黄在自身他感物质作用下的生理生化反应机制。

1 材料与方法

1. 1 采样地基本情况

采样地设在福建省惠安赤湖林场, 属于亚热带海洋性季风气候, 年平均气温 19. 8℃, 最高气温 35. 0℃, 最低气温 1. 0℃, 无霜期 320 d, 年降水量 1 029 mm, 适宜木麻黄生长。该场从 20 世纪 60 年代开始引种木麻黄。采样点位于该场赤湖工区 15 年生由实生苗造林的木麻黄 (*Casuarina equisetifolia* Forst.) 林分中, 林地距离潮水线 500 m, 土壤为风积沙土, 土层厚, 肥力较低。采样林分现保留密度 2 750 株·hm^{- 2}, 平均树高 9. 6 m, 平均胸径 8. 9 cm。

收稿日期: 2009- 08- 04 初稿; 2009- 10- 14 修改稿
作者简介: 林武星 (1970-), 男, 博士, 教授级高级工程师, 从事沿海防护林研究
基金项目: 福建省农办项目; 国家林业局南方山地用材林培育重点项目

1.2 试验材料

供体: 从上述木麻黄林分中采集木根部平均离地面 30 cm 范围的细根, 带回室内放在阴凉处自然干燥至恒重, 待用。

受体: 由福清三山苗圃提供的 5 个月生的木麻黄实生裸根苗, 苗木平均高 30.2 cm, 平均地径 2.95 mm。

1.3 方法

1.3.1 根浸液制备 将木麻黄根系剪碎, 然后用相当于根系 5 倍重的蒸馏水浸泡 48 h, 浸提液浓度定为 1: 5, 然后用滤纸过滤, 滤液装在塑料桶中并放入冰箱低温保存。

1.3.2 苗木培养和处理 将长势尽可能一致的 5 个月生的木麻黄实生苗转入 Heiwi 营养液中恢复培养 1 个月, 然后在营养液中加入浸提液, 各培养液中浸提液浓度设为 1: 5、1: 10、1: 20、1: 40, 以不加浸提液为对照 (CK), 采取随机设计, 3 次重复。试验用的容器为外壁漆黑的小塑料桶, 每桶 3 株, 每桶装培养液 4 L, 每 15 d 更换 1 次培养液, 每次更换等量的 Hewitt 营养成分, 每天通气 1 h。

1.3.3 测定样品的采集 浸提液处理苗木 2 个月 后采样, 采样在早晨 8: 00 左右进行, 叶样取小苗 中上部叶片, 根样取须根 2~ 4 cm。

1.3.4 测定方法

1.3.4.1 细胞膜透性 取供试苗木的叶片测定细胞膜透性, 测定方法按照《植物生理学实验指导》步骤进行, 用 DDS-11A 电导仪测定, 以相对电导率表示, 相对电导率 (%) = (处理电导率/煮沸电导率) × 100%^[9]。

1.3.4.2 酶液提取 称取叶样 1.0 g, 分次加入 pH 为 7.8 的 62.5 mmol · L⁻¹ PBS (含 1% PVP) 5.0 mL, 于冰浴上匀浆, 在 15 000 g、4 °C 下离心 20 min, 上清液用于酶活性及 MDA 含量的测定。酶液中蛋白质含量用 Bradford 方法测定^[10], 以牛血清蛋白质作标准曲线。

1.3.4.3 MDA 含量测定 参照刘祖祺等^[11]的方法进行。取酶液 2.0 mL, 加入 2.0 mL 10% TCA (含 0.5% TBA) 混匀, 沸水浴 15 min 后快速冷却, 4 000 rpm 离心 20 min, 以 10% TCA 为参比, 上清液在 532 nm 和 600 nm 处测定 OD 值。

1.3.4.4 H₂O₂ 含量的测定 参照 Patterson 等^[12]的方法。叶片加入冷丙酮提取, 取 1 mL 提取液加 0.1 mL 20% TiCl₄ 的浓盐酸溶液、0.2 mL 浓氨水。生成的过氧化氢-Ti 复合物用 3 000 rpm 离心 10

min, 沉淀再用丙酮悬浮液洗涤 5 次, 以减少色素干扰, 最后将沉淀溶于 3 mL 1 mmol · L⁻¹ 硫酸中, 410 nm 波长下测定光吸收, 根据 H₂O₂ 标准曲线, 计算 H₂O₂ 含量 (μmol · g⁻¹ FW)。

1.3.4.5 O₂⁻ 含量的测定 参照王爱国^[13]的方法。取 0.5 g 叶片, 加 4 mL 62.5 mmol · L⁻¹ PBS (含 1% PVP, pH 7.8) 于冰浴上匀浆, 4 000 g 离心 20 min, 取 1 mL 上清液进行羟胺氧化反应, 最后加等体积 (约 3 mL) 乙醚分层, 取粉红色水相测 OD₅₃₀, 以 NaNO₂ 作标准曲线。由 NO₂⁻ × 2 得到 (O₂⁻), 根据样品和羟胺反应的时间和样品中蛋白质含量, 计算出 O₂⁻ 产生的速率, 以 μmol · mg⁻¹ protein · min⁻¹。

1.3.4.6 细胞保护酶活性的测定 ①SOD 活性的测定按 Giannoplitis^[14] 等方法进行。3 mL 反应液中含 1.5 μmol · L⁻¹ 核黄素, 13 mmol · L⁻¹ 蛋氨酸, 63 μmol · L⁻¹ NTB (氮蓝四唑), 50 mmol · L⁻¹ pH 7.8 PBS, 加入适量酶液后, 在 4 000 lx 下光照 30 min, 560 nm 下测定光吸收, 以抑制 NTB 光化还原 50% 的酶量作为 1 个酶单位。

②CAT 活性的测定参照 Klapheck 等^[15] 的方法。测定系统含 50 mmol · L⁻¹ PBS (pH 7.0)、15 mmol · L⁻¹ H₂O₂ 及 0.05 mL 酶液, 总反应体积 3 mL, 加入 H₂O₂ 开始反应, 在 240 nm 处测定 OD₂₄₀ 值。

③GR 活性的测定参照 Dhindsa^[16] 的方法。3 mL 反应液中含 0.1 mmol · L⁻¹ PBS (pH 7.0)、1 mmol · L⁻¹ GSSG (氧化型谷胱甘肽)、1 mmol · L⁻¹ EDTA、0.1 mmol · L⁻¹ NADPH 及 0.025~0.050 mL 酶液, 加入酶液开始反应, 在 340 nm 处测定 OD₃₄₀ 值。

④POD 活性的测定参照刘祖祺^[11] 的方法进行。取适量酶液 (用 PBS 代替酶作空白) 加 3 mL 反应混合液 (100 mmol · L⁻¹ pH 为 7.0 的 PBS、20 mmol · L⁻¹ 愈创木酚), 混匀, 25 °C 温育 5 min, 加 20 μL H₂O₂ 启动反应, 于 470 nm 波长处扫描, 扫描曲线斜率为酶反应速率, 以每分钟 OD₄₇₀ 增加 0.01 为 1 个酶活单位 (n), 酶活性以 n · mg⁻¹ protein · min⁻¹ 表示。

2 结果与分析

2.1 自身他感作用物对木麻黄苗木叶片细胞膜透性的影响

细胞质膜是植物活细胞与外界环境之间隔离的屏障, 也是植物细胞和外界环境进行物质交换和能

量传递的界面，各种不良环境因素对细胞的影响往往首先作用于这层主要由磷脂和蛋白质所构成的生物膜。磷脂中不饱和脂肪酸的含量极高，易被活性氧抽提而发生均裂。膜脂过氧化是细胞膜磷脂中不饱和脂肪酸中所发生的一系列活性氧反应，其产物丙二醛（MDA）含量是反映脂质过氧化强弱的重要指标。脂质过氧化加剧将导致细胞质膜结构和功能受损，电解质外渗增强。从图 1 可知，自身他感作用下，木麻黄叶细胞质膜透性增大，而且随他感作用物质浓度升高，质膜透性增强的幅度提高。根浸液浓度在 1：40~ 1：20 之间时，相对电导率与对照相比增加了 25.7%~ 62.0%，而当根浸液浓度在 1：10~ 1：5 时，相对电导率进一步增大，与对照相比增加了 127.6%~ 178.0%。可见，在他感物质作用下，木麻黄叶细胞质膜的结构和稳定性遭受破坏，质膜对物质的选择功能降低，细胞内外电解质失去平衡，内溶物外渗增加。

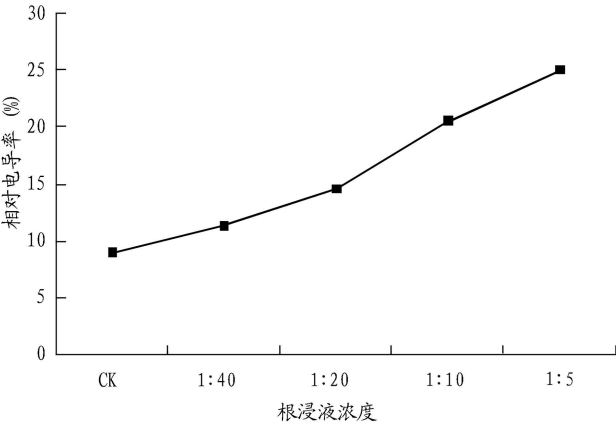


图 1 自身他感作用物对木麻黄叶片细胞膜透性的影响
Fig 1 Effect of self allelochemicals on permeability of plasma Membrane in casuarinas leaves

2.2 自身他感作用物对木麻黄苗木叶片丙二醛 (MDA) 含量的影响

植物叶片中丙二醛（MDA）含量是表征细胞膜脂过氧化程度的重要指标，丙二醛含量增加说明膜脂过氧化作用增强，质膜透性增大。从图 2 看出，随木麻黄根浸液浓度增大，木麻黄苗木中 MDA 含量增加，与对照相比，叶中 MDA 含量增加了 67.8%~ 248.1%。可见，木麻黄根系浸提液导致木麻黄苗木细胞膜脂过氧化强度加大，加速了蛋白酶对叶片中蛋白质的降解，提高了质膜透性。

2.3 自身他感作用物对木麻黄苗木叶中 O₂⁻ 产生速率和 H₂O₂ 含量的影响

植物体内活性氧系指含氧且性质活泼，氧化能

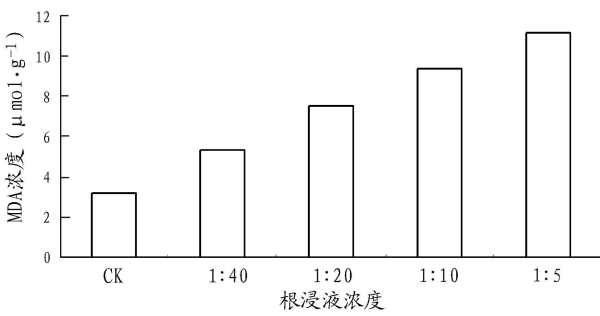


图 2 自身他感作用物对木麻黄叶 MDA 含量的影响
Fig 2 Effect of self allelochemicals on content of MDA in casuarinas leaves

力很强的物质，主要有超氧阳离子自由基（O₂⁻）、过氧化氢（H₂O₂）、单线态氧（O₂^{*}）和羟自由基（OH^{*}）等。O₂⁻ 是分子氧在树木细胞内进行单电子还原的结果，可以直接启动膜脂过氧化，测定他感作用下 O₂⁻ 产生的速率可反映植物细胞内活性氧的累积状况。从图 3 看出，他感作用下，木麻黄叶片中 O₂⁻ 产生的速率加快，与对照相比增加了 68.1%~ 508.8%，可见，他感作用物导致木麻黄叶片的 O₂⁻ 迅速增加，引起膜脂过氧化加剧。过氧化氢（H₂O₂）是 O₂⁻ 通过反应衍生而来的，可以间接地启动膜脂过氧化，从图 4 可知，随他感作用物浓度增加，H₂O₂ 含量增加。与对照相比，木麻黄叶中 H₂O₂ 含量增加了 36.8%~ 219.4%。他感作用下木麻黄苗木叶中 H₂O₂ 含量增加幅度小于 O₂⁻ 产生速率的幅度，由此也说明他感作用物质引起膜脂过氧化的主要原因是 O₂⁻ 迅速增加。

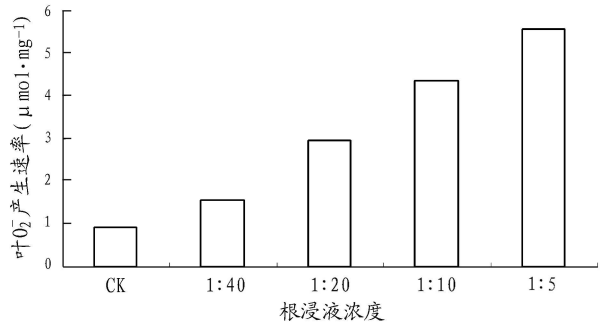


图 3 自身他感作用物对木麻黄叶 O₂⁻ 产生速率的影响
Fig 3 Effect of self allelochemicals on net rate of O₂⁻ in casuarinas leaves

2.4 自身他感作用物对木麻黄苗木叶片活性氧酶促消除系统中的保护酶活性的影响

植物体在长期的生长进化过程中，为抵制膜脂过氧化对细胞膜造成伤害，在体内会形成一套自我防御体系，主要由超氧化物歧化酶（SOD）、过氧

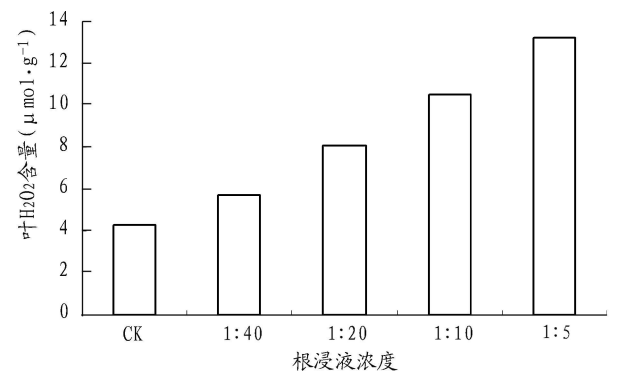


图 4 自身他感作用物对木麻黄叶 H₂O₂ 含量的影响
Fig 4 Effect of self allelochemicals on H₂O₂ content in casuarinas leaves

化氢酶 (CAT)、谷胱甘肽还原酶 (GR) 和过氧化物酶 (POD) 等组成, 起着消除细胞内活性氧和维持活性氧的动态平衡等重要作用。在自身他感作用下, 木麻黄叶中活性氧酶促消除系统中的保护酶活性发生变化。

2.4.1 自身他感物质对木麻黄叶片 SOD 活性的影响 SOD 对消除树木叶片细胞中 O₂⁻ 自由基, 抵御细胞膜脂过氧化起重要作用。从图 5 看出, 在自身他感作用下, 木麻黄叶片 SOD 活性下降, 而且随他感作用物浓度升高, SOD 下降幅度增大。当根浸液浓度为 1:40~1:20 时, SOD 与对照相比下降了 7.2%~14.4%, 下降幅度较小; 当根浸液浓度为 1:10~1:5 时, SOD 活性下降了 38.9%~64.6%, 下降幅度迅速增加。可见, 自身他感作用物质抑制了木麻黄 SOD 活性, 阻碍了 SOD 合成, 随着他感作用物质浓度升高, 木麻黄叶中 O₂⁻ 自由基清除能力不断减弱, 细胞膜脂过氧化程度加剧。

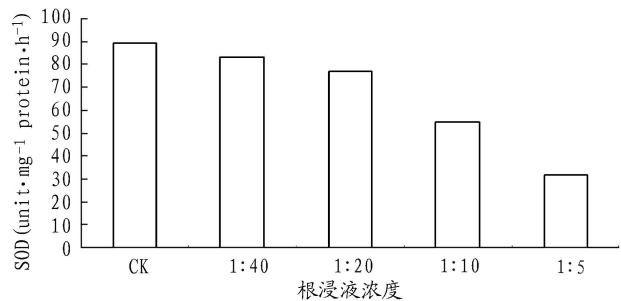


图 5 自身他感作用物对木麻黄叶 SOD 活性的影响
Fig 5 Effect of self allelochemicals on SOD activity in casuarinas leaves

2.4.2 自身他感作用物质对 CAT 活性的影响 植物体中 CAT 起着分解 H₂O₂ 的功能, CAT 活性下降将引起 H₂O₂ 大量积累, 从而加剧细胞膜脂过

氧化程度。从图 6 看出, 自身他感作用下, 木麻黄叶中 CAT 活性降低, 并且随他感作用物浓度增加, CAT 活性下降幅度增大。根浸液浓度在 1:40~1:20 时, CAT 活性降低了 17.6%~28.3%, 当根浸液浓度为 1:10~1:5 时, CAT 活性降低了 48.5%~66.8%, 下降幅度大大增加。可见, 自身他感物质引起木麻黄 CAT 活性迅速下降, 导致 H₂O₂ 消除能力和对细胞膜的修复能力减弱。

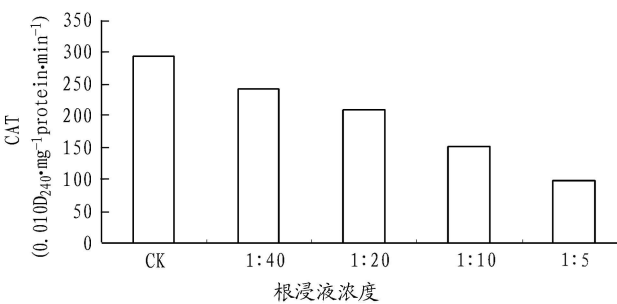


图 6 自身他感作用物对木麻黄叶 CAT 活性的影响
Fig 6 Effect of self allelochemicals on CAT activity in casuarinas leaves

2.4.3 自身他感物质对 POD 及 GR 活性的影响 POD 和 GR 是植物体内消除 H₂O₂ 的主要酶类。从图 7 和图 8 看出, 在自身他感作用下, 木麻黄中 POD 和 GR 活性下降, 并且随他感作用物质增加, POD 和 GR 活性下降幅度增大。根浸液浓度在 1:40~1:5 范围, 木麻黄中 POD 活性与对照相比下降了 9.2%~35.6%, GR 活性下降了 18.3%~42.0%。可见, 木麻黄在自身他感作用下, POD 和 GR 活性不断降低, 导致其消除 H₂O₂ 能力减弱, 引起 H₂O₂ 在木麻黄中大量累积, 膜脂过氧化程度加剧。因此, 木麻黄在自身他感作用下细胞膜受到严重伤害。

3 结论和讨论

自身他感作用下, 木麻黄叶细胞膜透性增强, 膜的稳定性降低。各试验处理木麻黄苗木叶细胞膜相对电导率与对照相比增加了 25.7%~178.0%, 他感作用物浓度越高, 质膜透性越大。说明木麻黄在自身他感作用下叶细胞膜结构受到破坏, 质膜对物质的选择功能降低, 细胞内外电解质失衡, 内溶物外渗。

丙二醛 (MDA) 为膜脂过氧化产物, 是表征细胞膜脂过氧化程度的重要指标。木麻黄叶在自身他感作用下 MDA 含量增加, 而且他感物质浓度越高, MDA 含量增加幅度越大, 与对照相比, 木麻

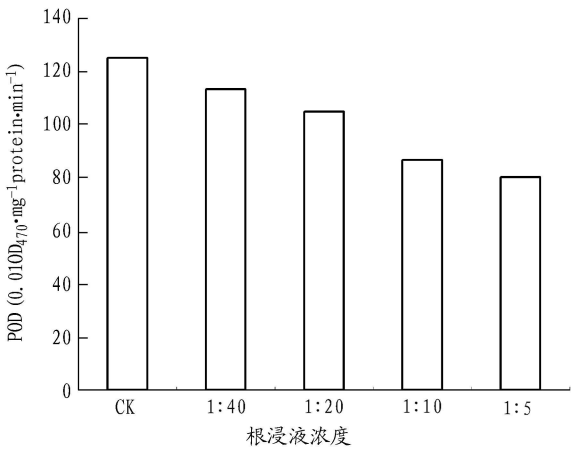


图 7 自身他感作用物对木麻黄叶 POD 活性的影响
Fig 7 Effect of self allelochemicals on POD activity in casuarinas leaves

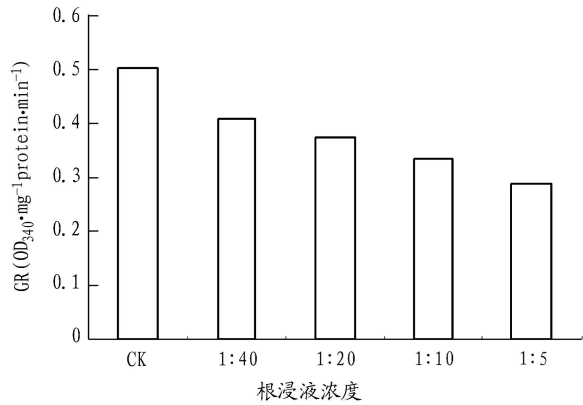


图 8 自身他感作用物对木麻黄叶 GR 活性的影响
Fig 8 Effect of self allelochemicals on GR activity in casuarinas leaves

黄叶中 MDA 含量增加了 67.8%~248.1%。说明木麻黄自身他感作用促进细胞膜脂过氧化, 而且他感作用物浓度越高, 膜脂过氧化程度越严重。膜脂过氧化引起膜系统结构和功能的破坏, 膜透性增强。

木麻黄自身他感作用下膜脂过氧化是由超氧阴离子自由基 O_2^- 、过氧化氢 (H_2O_2) 等活性氧在叶细胞内大量积累引起。木麻黄在自身他感作用下 O_2^- 产生速率与对照相比增加了 68.1%~508.8%, H_2O_2 含量增加了 36.8%~219.4%。可见, 木麻黄在自身他感作用下活性氧的产生和清除平衡被打破, 细胞内活性氧大量累积。这些活性氧可直接抽提细胞膜主要构成成分磷脂中不饱和脂肪酸, 从而导致膜脂过氧化, 增强细胞膜的透性。

引起木麻黄苗木叶中 O_2^- 和 H_2O_2 活性氧积累和膜脂过氧化加剧的另一个原因是他感作用物质破

坏了细胞保护酶和抗氧化物质系统的协调性, 使活性氧防御系统失衡, 从而导致活性氧的累积和细胞膜的伤害。植物体在生长过程中, 为抵制膜脂过氧化对细胞膜造成伤害, 在体内会形成一套自我防御体系, 主要由超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT)、谷胱甘肽还原酶 (GR) 和过氧化物酶 (POD) 等组成的细胞酶促防御系统, 起着消除细胞内活性氧和维持活性氧的动态平衡等重要作用。SOD 具有清除植物叶片细胞中 O_2^- 自由基, 抵制膜脂过氧化, 保护质膜不受伤害的功能。木麻黄在自身他感作用下 SOD 活性下降, 与对照相比 SOD 活性下降了 7.2%~64.6%。可见, 木麻黄他感作用下 O_2^- 消除能力减弱。CAT、POD 和 GR 均为植物体内起消除 H_2O_2 的酶类, 负责把 H_2O_2 变为 H_2O , 使活性氧保持在低水平上。木麻黄自身他感作用下 CAT、POD 和 GR 活性均下降, 与对照相比, CAT、POD 和 GR 活性分别下降了 17.6%~66.8%、9.2%~35.6% 和 19.3%~42.0%, 说明木麻黄在自身他感作用下对 H_2O_2 消除能力减弱, 引起 H_2O_2 大量积累, 膜质过氧化程度加剧, 细胞膜受到严重伤害。

参考文献:

[1] 杜英君, 靳月华. 连作大豆植株化感作用的模拟研究 [J]. 应用生态学报, 1999, 10 (2): 209-212.
[2] 宋君. 植物间的他感作用 [J]. 生态学杂志, 1990 (6): 43-47.
[3] YU J Q, YOSHIHISA M. Effects of root exudates of cucumber (*Cucumis sativus* L.) and allelochemical on ion uptake by cucumber seedlings [J]. Chem. Ecol, 1997, 23 (3): 817-827.
[4] POLITYCKA B. Phenolics and the activities of phenylalanine ammonia-lyase, phenol- β -glucosyltransferase and β -glucosidase in cucumber roots as affected by phenolic allelochemicals [J]. Acta Physiol Plantarum, 1998, 20 (4): 405-410.
[5] BAZIRAMAKENGA R, LEROUX G D, SIMARD R R. Effects of benzoic and cinnamic acid on growth, mineral composition and chlorophyll content of soybean [J]. Chem. Ecol, 1995, 20: 2821-2833.
[6] 邓兰桂. 木麻黄小枝提取物的分离鉴定及其对幼苗的化感作用 [J]. 应用生态学报, 1996 (2): 145-149.
[7] 林武星, 洪伟, 叶功富. 木麻黄水浸液对其苗木生长的影响 [J]. 江西农业大学学报, 2005, 27 (1): 46-51.
[8] 林武星, 洪伟, 叶功富. 木麻黄根浸液对其苗木营养吸收和生长的影响 [J]. 浙江林学院学报, 2005, 22 (2): 170-175.
[9] 华东师范大学生物系生理教研组. 植物生理学实验指导 [M]. 上海: 人民教育出版社, 1980: 68-72.
[10] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quar

tititation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein- dye binding [J]. Anal Biochem, 1976, 72: 248-254

[11] 刘祖祺. 冷驯化和 ABA 对柑桔膜稳定性的影响及膜特异蛋白质的诱导 [J]. 南京农业大学学报, 1994, 17 (1): 1- 5.

[12] PATTERSON B D, MACKAE E A, FERGUSEN I B. Estir- mation of hydrogen peroxide in plant extracts using Titaium (IV) [J]. Anal Biochem, 1984, 139: 487- 492.

[13] 王爱国. 活性氧对大豆下胚轴线粒体结构和功能的损伤 [J]. 植物生理学报, 1990, 16 (1): 13- 18.

[14] GIANNOPLITIC C N. superoxied dismutase I. Purification

and quantitative relationship with water solube protein in see- ding [J]. Pplant Pphysicl, 1977, 59: 315- 318.

[15] K LAPHECK S, INA ZIMMER, HEINZ COSSE. Scaver- ging of hydrogen peroxide in the endosperm of Ricinus commur- nisbg ascorbate peroxidase [J]. Plant Cell Physiol, 1990, 11: 1005- 1013.

[16] DHINDSA R S. Drought stress, enzymes of glutathione me- tabolism, ox idation injury, and protein synthesis in Tortula rur- ralis [J]. Plant Physiol, 1991, 95: 648- 651.

(责任编辑: 刘新永)