

水分胁迫下自由基清除剂对番木瓜的生理保护效应

黄建昌 肖艳 刘伟坚

(仲恺农业技术学院园艺系, 广东广州 510225)

摘要: 用维生素 C (V_C)、维生素 E (V_E) 和苯甲酸钠等作为外源自由基清除剂在水分胁迫前 1 d 预处理番木瓜幼苗, 研究其对番木瓜的生理保护效应。结果表明, 3 种外源自由基清除剂预处理有效地降低了水分胁迫下番木瓜叶片细胞膜透性、POD 活性、MDA 和 H₂O₂ 含量的上升程度, 并能延缓叶片叶绿素和可溶性蛋白质含量和 SOD 活性的降低。外源自由基清除剂通过有效清除 H₂O₂ 降低膜脂过氧化程度, 从而减轻水分胁迫对番木瓜引起的自由基伤害和提高番木瓜的抗旱能力。不同自由基清除剂预处理对番木瓜的抗旱保护效果存在差异, 其中以 V_C 预处理的保护效果最好。

关键词: 番木瓜; 自由基清除剂; 水分胁迫; 膜脂过氧化; H₂O₂

中图分类号: Q945.78

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2003)03-0245-04

Physiological Protective Effect of Free Radical Scavenger on Papaya under Water Stress

HUANG Jian-chang XIAO Yan LIU Wei-jian

(Department of Horticulture, Zhongkai Agrotechnical College, Guangzhou 510225, China)

Abstract: The leaves of *Carica papaya* seedlings cultured in pots were sprayed on both surfaces with free radical scavengers, i.e. vitamins C (10 mmol/L), E (6 mmol/L) and sodium benzoate (5 mmol/L), respectively one day before water stress treatment. Soil in pots was dried naturally to 12%–14% of moisture content, whereas for control at 60%–65%. The results showed that the pretreatment with free radical scavengers could effectively decrease the increment level of plasma membrane permeability, POD activity, MDA and H₂O₂ contents, retard the decrease of chlorophyll and soluble protein contents and the SOD activity in papaya under water stress. Among the free radical scavengers, the protective effect of vitamin C was best.

Key words: Papaya; Water stress; Free radical scavenger; Membrane lipid peroxidation; H₂O₂

番木瓜 (*Carica papaya* L.) 为一种叶面积大、根系分布浅的热带亚热带果树, 在华南地区广泛栽培, 但在生产中易发生干旱而影响植株的生长、产量和品质。水分胁迫对植物的伤害机理已有大量研究^[1-4]。许多研究结果表明, 干旱对植物造成伤害的重要原因之一是植物体内活性氧自由基的积累^[6], 作物的抗旱性与其清除自由基的能力相关^[1,3,6], 外源自由基清除剂对提高作物抗旱能力具有一定的促进作用^[7,8], 但番木瓜还未见有相关报道。本文以栽培广泛的番木瓜品种穗中红为试验材料, 应用维生素 C (V_C)、维生素 E (V_E) 和苯甲酸钠 3 种自由基清除剂, 研究外源自由基清除剂在水分胁迫下番木

瓜抗旱性的相关机理, 以探讨外源自由基清除剂在番木瓜抗旱性栽培中应用的可能性。

1 材料和方法

试验材料及干旱处理 以番木瓜 (*Carica papaya* L.) 穗中红品种 5 叶期幼苗为试验材料, 栽植于培养盆中, 采用自然干旱方式处理, 土壤含水量在干旱处理时为 12%–14%, 对照处理始终保持土壤湿润 (土壤水分含量为 60%–65%)。每个处理植株 30 株, 3 次重复。

自由基清除剂的配制 先用少量无水乙醇溶解, 然后用 Tween-20 乳化剂乳化, 再用蒸馏水稀

释至所需浓度。各自由基清除剂的使用浓度为: 苯甲酸钠 5 mmol/L、 V_E 6 mmol/L、 V_C 10 mmol/L, 以含相同浓度的 Tween-20 乳化剂的蒸馏水处理为对照, 各试剂于施用前配制。

在干旱处理前 1 d, 用清除剂分别对整株番木瓜叶片的正反两面喷施, 以喷湿而不滴水为度, 在植株出现严重缺水症状时取样分析。

测定项目及方法 叶片水势参照王万里的压力室法^[9], 用 ZLZ-4 型植物水分状况测定仪测定。细胞质膜透性用肖艳等^[7]方法测定。丙二醛 (MDA) 含量用曾韶西等^[10]方法测定。叶片叶绿素含量用 Arnon 法^[11]测定。过氧化物酶 (POD) 活性测定用愈创木酚法^[12]进行。超氧歧化酶 (SOD) 活性用王爱国等^[13]方法进行。蛋白质含量用 Bradford^[14]方法测定。 H_2O_2 用 Patterson 等^[15]方法测定。

2 结果和分析

2.1 细胞质膜透性、MDA 和 H_2O_2 含量

细胞质膜透性是反映细胞膜损伤的主要指标之一。由表 1 可知, 水分胁迫处理使番木瓜叶片的细胞质膜透性升高了 10.7 倍, 经 3 种自由基清除剂分别预处理后, 番木瓜叶片细胞质膜透性上升幅度

均显著低于未经预处理的, 其中以 V_C 预处理效果最为明显, 细胞质膜透性仅升高 4.0 倍。自由基清除剂预处理明显地降低因水分胁迫引起的番木瓜叶片 MDA 含量的增加幅度, 其中也以 V_C 预处理作用最为明显, MDA 含量的增加幅度为 130.8%, 显著低于水分胁迫处理的 308.5%。各自由基清除剂处理下番木瓜叶片 MDA 含量与细胞质膜透性的变化趋势相一致, 表现出显著直线正相关 ($r=0.992^{**}$), 说明自由基清除剂预处理引起的膜透性与膜脂过氧化水平的降低关系密切。

水分胁迫使番木瓜叶片 H_2O_2 含量上升了 153.5%。统计分析表明, H_2O_2 含量与 MDA 含量、细胞膜透性呈显著正相关 (相关系数分别为 $r=0.924^{**}$, $r=0.937^{**}$), 表明水分胁迫引起的细胞膜脂过氧化的加剧与体内 H_2O_2 的增加有关。经 3 种自由基清除剂分别预处理后, H_2O_2 含量的上升均显著减缓, 说明这 3 种外源自由基清除剂可以有效促进番木瓜体内 H_2O_2 的清除。但不同自由基清除剂预处理的清除效果有所差异, V_C 预处理的清除效果最为明显, H_2O_2 含量仅上升 47.5%, V_E 次之, 为 76.4%, 苯甲酸钠预处理的效果较差, 达 103.4%, 表明这 3 种自由基清除剂对番木瓜体内 H_2O_2 的清除能力不同。

表 1 水分胁迫下自由基清除剂处理对番木瓜叶片细胞质膜透性、丙二醛 (MDA) 和 H_2O_2 含量变化的影响
Table 1 Effects of pretreatment with free radical scavengers on the changes in relative permeability of cell membrane, MDA content and H_2O_2 in papaya leaves under water stress

	H_2O_2 (μ mol g^{-1} DW)	细胞质膜透性 Relative permeability (%)	MDA (nmol mg^{-1} protein)
对照 Control	93.24eE	4.21 dD	1.17 cC
水分胁迫 Under water stress	236.37aA	49.35 aA	4.78 aA
苯甲酸钠 Sodium benzoate 5 mmol/L*	189.62bB	28.62 bB	3.32 bAB
V_E 6 mmol/L*	164.48cC	24.74 bcB	3.11 bB
V_C 10 mmol/L*	137.52dD	21.02 cB	2.70 bB

表中每列标有相同字母都为 LSD 测验不显著, 小写字母表示 $LSD_{0.05}$ 水平显著, 大写字母表示 $LSD_{0.01}$ 水平显著。Means within columns followed by the same capital letter or small letter do not differ significantly at 0.01 or 0.05 level, respectively, according to LSD-test.

* 为经自由基清除剂预处理 1 d 后再进行水分胁迫处理 Means pretreatment with free radical scavengers one day before water stress. 以下各表同 The same for Tables 2 and 3.

2.2 水势、可溶性蛋白和叶绿素含量

叶片水势是反映植物叶片持水量的重要指标。从表 2 中可知, 干旱处理导致番木瓜叶片水势显著降低, 说明此时番木瓜叶片水分含量显著减少。3 种自由基清除剂预处理对水分胁迫下番木瓜叶片水势的影响不明显, 说明这几种自由基清除剂并不是通过提高番木瓜叶片的保水能力来实现其保护作用。

试验结果 (表 2) 表明, 水分胁迫下番木瓜叶片可溶性蛋白质含量显著降低。经自由基清除剂预处理后番木瓜叶片可溶性蛋白质含量降低程度显著减缓, 但各种清除剂对蛋白质含量的影响程度不一, V_C 效果最为明显, V_E 次之, 苯甲酸钠处理对可溶性蛋白含量降低程度影响最小。由表 2 中也可看出, 3 种自由基清除剂处理都显著地延缓了由水分胁迫引起的叶绿素含量的下降。其中苯甲酸钠预处

理对叶绿素的保护效应最差, V_C 预处理的最好, 说明在水分胁迫下 V_C 对叶绿素的保护最为有效。

2.3 保护酶系统

POD 和 SOD 等植物保护酶系统在逆境中对植物均起着重要的保护作用, 且反应敏感, 常作为植

物对水分胁迫反应敏感性的重要指标。从表 3 中可以看出, 水分胁迫下番木瓜叶片 POD 活性提高, 而 SOD 活性则显著降低。经 3 种自由基清除剂预处理的番木瓜叶片 POD 活性有所降低, 但仍比对照高, SOD 活性则有所提高, 但低于对照。 V_C 预处理对 SOD 和 POD 活性影响最大。

表 2 自由基清除剂预处理对水分胁迫下番木瓜叶片叶绿素和可溶性蛋白质含量及水势的影响
Table 2 Effects of pretreatment with free radical scavengers on the changes in chlorophyll, protein content and water potential in papaya leaves under water stress

	叶绿素 Chlorophyll (mg g ⁻¹ DW)	可溶性蛋白质 Soluble protein (mg g ⁻¹ DW)	水势(-MPa) Water potential
对照 Control	1.531 aA	6.87 aA	0.14bB
水分胁迫 Under water stress	0.763cC	2.39 cC	1.54 aA
苯甲酸钠 Sodium benzoate 5 mmol/L*	1.133 cB	4.51 b B	1.56 aA
V_E 6 mmol/L*	1.341 bcAB	5.52 bAB	1.46 aA
V_C 10 mmol/L*	1.411 abA	6.25 abA	1.52 aA

表 3 自由基清除剂预处理对番木瓜水分胁迫下叶片 POD 和 SOD 活性的影响

Table 3 Effects of pretreatment with free radical scavengers on the changes in POD and SOD activities in papaya leaves under water stress

	POD ($\Delta A_{405} \text{ U min}^{-1} \text{ g}^{-1}$)	SOD (U mg ⁻¹ protein)
对照 Control	5.39cC	1.47aA
水分胁迫 Under water stress	9.25 aA	0.59cC
苯甲酸钠 Sodium benzoate 5 mmol/L*	8.17 bAB	0.88bB
V_E 6 mmol/L*	6.74 cB	0.92 bB
V_C 10 mmol/L*	6.21 cBC	0.97 bB

剂处理在减轻或抵御番木瓜因干旱引起的自由基伤害, 进而提高番木瓜的抗旱能力方面具有相当明显的作用, 这与有关试验结果相似^[7,8]。相关分析结果表明, 外源自由基清除剂的使用与 H_2O_2 含量的降低密切相关, 因此, 可以认为外源自由基清除剂是通过有效清除 H_2O_2 来降低膜脂过氧化程度, 从而减轻水分胁迫对番木瓜引起的自由基伤害和提高番木瓜的抗旱能力。 V_C 是重要的氢供体, 是植物体内非酶促防御系统中的重要抗氧化物^[9], 对有关酶系统具保护作用。 V_E 不溶于水, 通过自身的氧化而保护生物膜中的不饱和脂肪酸不被氧化, 是有效的抗氧化剂。这些自由基清除剂可能是通过有效地补充番木瓜体内抗氧化剂的不足, 达到清除水分胁迫所产生的自由基以达到保护目的。本试验所测试的 3 种外源自由基清除剂对叶绿素具有良好的保护作用, 能有效保护细胞质膜的稳定性, 提高番木瓜抗旱能力的效果较为明显, 其中以 V_C 的效果最好, 而且成本也较低, 因此在生产实践上应该有一定的利用前景。

3 讨论

在水分胁迫下, 植物细胞产生大量的 O_2^- 、 H_2O_2 、 $\cdot OH$ 等活性氧自由基, 使自由基产生和清除的平衡受到破坏而出现自由基积累, 并由此引发或加剧细胞的膜脂过氧化, 并进一步导致细胞膜结构和功能的损伤, 严重时导致细胞死亡^[1-6]。本试验结果表明, 水分胁迫下番木瓜叶片 H_2O_2 含量大幅增加, 而且与细胞质膜透性和 MDA 含量呈显著正相关, 这意味着水分胁迫引起的膜伤害可能是一个活性氧机制^[3,6], 此时产生的过量活性氧 (H_2O_2) 超过防御系统的清除能力^[9]。可见, 水分胁迫引起自由基积累及其膜脂过氧化是导致番木瓜受旱害的重要原因。外源自由基清除剂预处理能有效降低水分胁迫下番木瓜叶片活性氧 (H_2O_2) 含量、细胞膜脂过氧化水平和膜透性增加的程度, 并能有效地延缓番木瓜叶片可溶性蛋白和叶绿素含量的下降, 证明自由基清除

参考文献

- [1] Jiang M Y (蒋明义), Guo S C (郭绍川). Oxidative stress and antioxidation induced by waterdeficiency in plants [J]. Plant Physiol Comm (植物生理学通讯), 1996, 32(2):144-150. (in Chinese)
- [2] Jiang M Y (蒋明义), Jing J H (荆家海), Wang S T (王韶唐). Effects of osmotic stress on membrane-lipid peroxidation and endogenous protective systems in rice seedlings [J]. Acta Phytophysiol Sin (植物生理学报), 1991, 17(1):80-84. (in Chinese)
- [3] Xu C C (许长成), Zou Q (邹琦), Cheng B S (程炳嵩). Changes of hydrogen peroxide metabolism in drought stressed soybean leaves

- and its relation to drought resistance [J]. *Acta Phytophysiol Sin* (植物生理学报), 1993, 19(2):216-220. (in Chinese)
- [4] Chowdhury R S, Choudhuri M A. Hydrogen peroxide metabolism as an index of water stress tolerance in jute [J]. *Physiol Plant*, 1985, 65:476-480.
- [5] Jiang M Y (蒋明义), Yang W Y (杨文英), Xu J (徐江), et al. Osmotic stress-induced oxidative injury of rice seedlings [J]. *Acta Agron Sin* (作物学报), 1994, 20(6):733-738. (in Chinese)
- [6] Chen L S (陈立松), Liu X H (刘星辉). Effects of water stress on active oxygen metabolism in litchi leaves [J]. *Acta Horticult Sin* (园艺学报), 1998, 25(3):241-246. (in Chinese)
- [7] Xiao Y (肖艳), Huang J C (黄建昌). Protective effect of free radical scavengers in strawberry plant under drought stress [J]. *J Zhongkai Agrotechn Coll* (仲恺农业技术学院学报), 1995, 8(2): 63-67. (in Chinese)
- [8] Chen S Y (陈少裕), Chen R K (陈如凯), Chen Q F (陈启锋), et al. Protective effect of free radical scavengers and drought resistance in sugarcane [J]. *Acta Agron Sin* (作物学报), 1994, 20(2):149-155. (in Chinese)
- [9] Wang W L (王万里). *Plant Physiology Experimental Instruction* [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technical Press, 1985. 357-369. (in Chinese)
- [10] Zheng S X (曾韶西), Wang Y R (王以柔). Low temperature injury and peroxidation of membranes lipids in rice seedlings [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 1987, 29(5):506-512. (in Chinese)
- [11] Yuan X H (袁晓华), Yang Z H (杨中汉). *Plant Physiology and Biochemical Experimental Instruction* [M]. Beijing: Higher Education Press, 1983. 177. (in Chinese)
- [12] Zhang Z L (张志良). *Plant Physiology Experimental Instruction* [M]. Beijing: Higher Education Press, 1990. 143-144, 151-157. (in Chinese)
- [13] Wang A G (王爱国), Luo G H (罗广华), Shao C B (邵从本), et al. A study on the superoxide dismutase of soybean seeds [J]. *Acta Phytophysiol Sin* (植物生理学报), 1983, 9(1):77-84. (in Chinese)
- [14] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Anal Biochem*, 1976, 72:248-254.
- [15] Patterson B D, Macke E A, Ferguson I B. Estimation of hydrogen peroxide in plant extracts using titanium (IV) [J]. *Annal Biochem*, 1984, 139:487-492.
- [16] Huang J C (黄建昌), Xiao Y (肖艳), Zhao C X (赵春香). Protective effect of free radical scavengers in banana plant under drought stress [J]. *Fujian Fruits* (福建果树), 1999, 4:1-3. (in Chinese)
- [17] Guo Y P (郭延平), Li J R (李嘉瑞). Changes of fatty acid composition of membrane lipid ethylene and lipoxygenase activity in leaves of apricot under drought [J]. *J Zhejiang Univ (Agri & Life Sci)* (浙江大学学报(农业与生命科学版)), 2002, 28(5):513-517. (in Chinese)
- [18] Yu Z R (于自然), Huang X T (黄熙泰). *Modern Biochemistry* [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2001. 156-159. (in Chinese)