

DOI: 10.3969/j.issn.1000-3142.2014.05.019

于飞,陈银萍,杨宗娟,等. 低温胁迫对两种圆柏属植物亚细胞抗氧化酶活性的影响[J]. 广西植物, 2014, 34(5):686—693

Yu F, Chen YP, Yang ZJ, et al. Effects of low temperature stress on antioxidant enzymes activities in the subcellular of two *Sabina* species[J]. *Guihaia*, 2014, 34(5):686—693

低温胁迫对两种圆柏属植物亚细胞 抗氧化酶活性的影响

于 飞, 陈银萍*, 杨宗娟, 王盼盼, 李冬花, 张 静

(兰州交通大学 环境与市政工程学院, 兰州 730070)

摘 要: 以祁连圆柏和圆柏幼苗为材料, 研究不同处理时间下低温胁迫对圆柏属植物叶片亚细胞抗氧化酶活性的影响, 探讨其在圆柏属植物叶片中的亚细胞定位。结果表明: 低温胁迫下, 丙二醛(MDA)含量和抗氧化酶活性随时间变化均呈先升后降趋势, 祁连圆柏中抗氧化酶的种类比圆柏的多且活性强, 而MDA含量低于圆柏, 表明祁连圆柏在低温胁迫下具有更广泛的适应性。此外, 两种圆柏植物叶片超氧化物歧化酶(SOD)和抗坏血酸过氧化物酶(APX)定位为叶绿体>细胞溶质>线粒体, 过氧化氢酶(CAT)定位为线粒体>叶绿体>细胞溶质, 谷胱甘肽还原酶(GR)定位为线粒体>细胞溶质>叶绿体, 祁连圆柏过氧化物酶(POD)定位为细胞溶质>叶绿体>线粒体, 圆柏POD定位为细胞溶质>线粒体>叶绿体, 且抗氧化酶SOD、APX和GR在亚细胞中分布差异达到极显著, 这说明抗氧化酶在其中一种亚细胞中发挥主要作用, 为克隆亚细胞组分中的抗氧化酶基因提供了理论依据。

关键词: 圆柏属; 亚细胞定位; 抗氧化酶; 低温胁迫

中图分类号: Q945.78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2014)05-0686-08

Effects of low temperature stress on antioxidant enzymes activities in the subcellular of two *Sabina* species

YU Fei, CHEN Yin-Ping*, YANG Zong-Juan, WANG Pan-Pan,
LI Dong-Hua, ZHANG Jing

(School of Environmental and Municipal Engineering, Lanzhou Jiaotong University, Lanzhou 730070, China)

Abstract: Seedlings of *Sabina przewalskii* and *S. chinensis* were used to study the effects of low temperature stress on antioxidant enzymes activities and subcellular distribution in the leaves of *Sabina*. The results showed that: under low temperature stress, the contents of malonaldehyde (MDA) and antioxidant enzymes activities increased firstly and then decreased, and compared with *Sabina chinensis*, the more species and higher activities of antioxidant enzymes were found in *S. przewalskii*, but MDA contents of *S. przewalskii* were lower than *S. chinensis*, it suggested that *S. przewalskii* showed a prevailing strategy than *S. chinensis* in order to develop the tolerance to freezing. Moreover, the localization of superoxide dismutase(SOD) and ascorbate peroxidase(APX) in the leaves of two *Sabina* species was chloroplast>cytosol>mitochondria, the localization of catalase(CAT) was mitochondria>chloroplast>cytosol, the localization of glutathione reductase(GR) was mitochondria>cytosol>chloroplast, the localization of peroxidase(POD) in *S. przewalskii* was cytosol>chloroplast>mitochondria, the localization of POD in *S. chinensis*

收稿日期: 2013-10-24 修回日期: 2013-12-12

基金项目: 国家自然科学基金(31060060, 31260089); 兰州交通大学“青蓝”人才工程基金(QL-08-14A)。

作者简介: 于飞(1987-), 男(蒙古族), 内蒙古人, 硕士研究生, 主要研究方向为环境生态学, (E-mail)267266036@qq.com。

*通讯作者: 陈银萍, 博士, 教授, 主要研究方向为环境生态学, (E-mail)yinpch@mail.lzjtu.cn。

was cytosol>mitochondria>chloroplast, moreover subcellular distribution of antioxidant enzymes (SOD, APX, GR) in organelles were different significantly, this showed that antioxidant enzymes played a major role in one of organelles, which provided theoretical basis for cloning of antioxidant enzymes gene in subcellular fractions.

Key words: *Sabina*; subcellular localization; antioxidant enzymes; low temperature stress

低温是限制植物地理分布的重要因素,也是植物生长中常遇到的灾害之一,它不仅会导致植物产量降低,严重时还会影响农业生产和生态环境。植物抗冻性的形成与环境低温的诱导有关(赵琳娜等, 2008)。圆柏属常绿木本植物主要分布在中国西北地区。祁连圆柏(*Sabina przewalskii*)是中国特有树种,分布在年均温 0.5 °C、海拔 2 600~3 500 m 的高山地带,具有耐严寒、干旱、瘠薄、抗盐碱的特性,是研究植物抗冷冻性的理想材料。圆柏(*S. chinensis*)是常绿乔木或灌木,分布在年均温 8.5 °C、海拔 500~1 900 m 的低山地带(冯自成, 1994)。

植物在低温胁迫下,产生具有活性氧清除功能的抗氧化酶,能减轻或消除逆境对植物造成的伤害,清除自由基并防止自由基毒害,它们活性的变化可作为植物的抗冻指标(崔国文, 2009)。由于低温胁迫使植物亚细胞组分遭受不同程度的氧化而产生不同的抗氧化酶作保护剂,氧化胁迫程度不同导致抗氧化酶在亚细胞分布的差异,因此探索抗氧化酶的亚细胞定位有其必要性(杜秀敏等, 2003)。近年来,逆境胁迫对植物抗氧化酶活性的亚细胞定位研究越来越多(李建坤等, 1992; 陈一舞等 1997; 刘鸿先等 1985)。这些结果表明,不同植物抗氧化酶活性在各亚细胞中分布各不相同,且植物各亚细胞中抗氧化酶活性的强弱对降低其受氧化伤害的程度非常重要,并具有协调抗氧化防护的能力。目前圆柏属植物在逆境胁迫下抗氧化酶的变化已有报道(Chen *et al.*, 2006; 陈晓莉等, 2009),但在亚细胞水平分布的研究尚不多见。本研究以祁连圆柏和圆柏幼苗为材料,通过分析低温胁迫下圆柏属植物亚细胞中膜质过氧化及抗氧化酶活性的变化,探讨其在亚细胞组分中的分布差异,有助于理解常绿木本植物的抗冻适应机理,为亚细胞组分中具活性氧清除功能的抗氧化酶基因进行全长克隆提供理论支撑。

1 材料与方 法

1.1 试验设计

供试材料为 3 年生祁连圆柏和圆柏幼苗,将幼苗盆栽于人工气候箱内。实验设计方案:实验处理

温度分为 4 组,即培养温度为 20、4、0 和 -6 °C;处理时间为 4、8、12、16 和 20 d,每组 3 个重复。

1.2 研究方法

1.2.1 亚细胞提取 参考陈立松等(1998)的方法并作改进,取 10 g 祁连圆柏和圆柏叶片,加入 30 mL 预冷的提取缓冲液(0.05 mol · L⁻¹ Tris-HCl, 0.35 mmol · L⁻¹ 山梨醇, 2 mmol · L⁻¹ EDTA 和 2.5 mmol · L⁻¹ DTT, pH 7.5)和少许石英砂于冰浴中研磨,经 4 层纱布过滤,滤液用冷冻离心机 500 × g 离心 5 min,弃去沉淀,上清液于 2 000 × g 下离心 10 min,沉淀为叶绿体部分,上清液部分再在 12 000 × g 下离心 20 min,所得沉淀为线粒体部分,上清液为细胞溶质部分。所得叶绿体和线粒体部分分别用提取缓冲液洗涤 1 次,分别在 2 000 × g 和 12 000 × g 下重复离心,取沉淀用 5 mL 提取缓冲液悬浮。

1.2.2 丙二醛(MDA)含量测定 按照李合生等(2000)的硫代巴比妥酸法测定。

1.2.3 抗氧化酶活性测定 SOD 活性按李玲等(2009)的方法测定;POD 活性按李合生等(2000)的愈创木酚法测定;CAT 活性按邹琦(2000)的方法测定;APX 活性按 Nakano *et al.*(1981)的方法测定;GR 活性按 Knorz *et al.*(1996)的方法测定。

1.3 数据分析

采用 Microsoft Excel 2003 软件和 SPSS 17.0 软件分析数据,用单因素方差分析对不同低温胁迫各处理时间下亚细胞中的指标进行差异显著性分析和多重比较。

2 结果与分析

2.1 低温胁迫下圆柏属植物各亚细胞中 MDA 含量变化及亚细胞定位

两种圆柏属植物亚细胞中 MDA 含量随时间变化各有不同(图 1)。从图 1 可看出,不同低温(4 °C、0 °C 和 -6 °C)处理 4 d 时,亚细胞中 MDA 含量与 20 °C 处理相比无明显变化,而处理 8 d 和 12 d 时,各亚细胞中 MDA 含量均比 20 °C 处理持续增加,且圆柏比祁连圆柏的 MDA 含量增幅更高,处理 16 d 和 20 d 时,各亚细胞 MDA 含量呈先降低后升高的趋势,

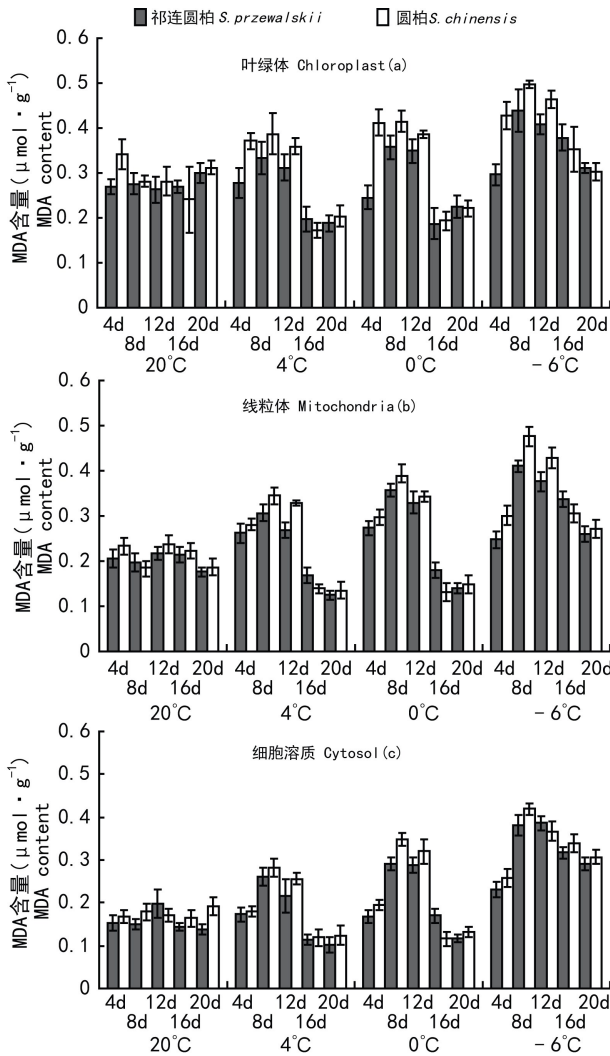


图1 低温胁迫下两种圆柏属植物各亚细胞组分中MDA含量变化

Fig. 1 Changes of MDA content in subcellular fraction of two *Sabina* species under the low temperature stress

且在4℃达最低值。说明同一低温处理下,随着处理时间延长,圆柏属植物亚细胞中MDA含量的变化趋势为先升高后降低并趋于平稳。两树种相比,祁连圆柏各亚细胞中MDA含量均比圆柏的低,且圆柏属植物叶绿体中MDA含量极显著地高于细胞溶质中的($P < 0.01$)(表1)。

2.2 低温胁迫下圆柏属植物各亚细胞中SOD活性变化及亚细胞定位

两种圆柏属植物亚细胞中SOD活性随时间变化趋于一致(图2)。从图2看出,不同低温(4℃、0℃和-6℃)处理时,叶绿体亚细胞中SOD活性大多呈先升高后降低的趋势,且大多基本在4℃达最高值。概而言之,同一低温处理下,随着处理时间的变

表1 低温胁迫下两种圆柏属植物各亚细胞组分中MDA含量差异性分析

Table 1 Differences of MDA content in subcellular fraction of two *Sabina* species under the low temperature stress

亚细胞组分 Subcellular fractions ($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$)	祁连圆柏 <i>S. przewalskii</i>	占总活性的百分比 Percent of total activity (%)	圆柏 <i>S. chinensis</i>	占总活性的百分比 Percent of total activity (%)
叶绿体 Chloroplast	0.294±0.070aA	38.58	0.331±0.093aA	39.78
线粒体 Mitochondria	0.253±0.081abAB	33.20	0.269±0.099bAB	32.33
细胞溶质 Cytosol	0.215±0.087bB	28.22	0.232±0.093bB	27.89

注: 同列中不同大、小写字母分别表示差异极显著($P < 0.01$)和显著($P < 0.05$)。下同。

Note: Different capital and small letters in the same column meant significant differences at 0.01 and 0.05 levels, respectively. The same below.

化,圆柏属植物各亚细胞中SOD活性呈先升高后降低趋势。两树种相比,祁连圆柏各亚细胞中SOD活性均比圆柏的高,且圆柏属植物叶绿体中SOD活性极显著地高于线粒体和细胞溶质中的($P < 0.01$),即圆柏属植物叶片细胞中SOD活性主要存在于叶绿体中,占总活性的43.85%~47.99%,细胞溶质次之,占28.01%~29.92%,线粒体部分活性最低,占24.00%~26.23%(表2)。

2.3 低温胁迫下圆柏属植物各亚细胞中POD活性变化及亚细胞定位

两种圆柏属植物亚细胞中POD活性随时间变化较剧烈(图3)。由图3可知,不同低温(4℃、0℃和-6℃)处理4d时,圆柏细胞溶质亚细胞中POD活性大多呈先升高后降低的趋势,且在4℃达最高值。此外,8d时,两种圆柏的线粒体中,12d时,两种圆柏的叶绿体中,16d和20d时,两种圆柏的各亚细胞中,POD活性均与上述变化趋势一致。处理其余天数时,圆柏属植物各亚细胞中POD活性与20℃处理相比无明显变化。同一低温处理下,随着处理时间延长,圆柏属植物各亚细胞中POD活性与其余抗氧化酶不同,其变化趋势为在低温胁迫后期明显升高。两树种相比,祁连圆柏各亚细胞中POD活性均比圆柏的低,且圆柏属植物各亚细胞中POD活性有所不同,但差异均不显著($P > 0.05$),两树种亚细胞分布略有不同,即祁连圆柏叶片细胞中POD活性主要存在于细胞溶质中,占总活性的37.33%,叶绿体次之,占35.08%,线粒体部分活性最低,占27.59%;圆柏叶片细胞中POD活性主要

表 2 低温胁迫下两种圆柏属植物各亚细胞组分中抗氧化酶活性差异性分析
Table 2 Differences of antioxidant enzymes activities in subcellular fraction of two *Sabina* species under the low temperature stress

抗氧化酶 Antioxidant enzymes	亚细胞组分 Subcellular fractions	祁连圆柏 <i>S. przewalskii</i>		圆柏 <i>S. chinensis</i>	
		酶活性	占总活性的百分比	酶活性	占总活性的百分比
		Activities of enzymes ($U \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$)	Percent of total activity (%)	Activities of enzymes ($U \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$)	Percent of total activity (%)
SOD	叶绿体 Chloroplast	2.415±0.890aA	43.85	2.061±0.731aA	47.99
	线粒体 Mitochondria	1.445±0.523bB	26.23	1.031±0.481bB	24.00
	细胞溶质 Cytosol	1.647±0.960bB	29.92	1.203±0.768bB	28.01
POD	叶绿体 Chloroplast	1.246±1.095aA	35.08	1.463±1.443aA	32.54
	线粒体 Mitochondria	0.980±0.709aA	27.59	1.497±1.259aA	33.30
	细胞溶质 Cytosol	1.326±1.120aA	37.33	1.536±1.356aA	34.16
CAT	叶绿体 Chloroplast	0.044±0.035aA	34.65	0.056±0.035aA	32.37
	线粒体 Mitochondria	0.051±0.043aA	40.15	0.070±0.040aA	40.46
	细胞溶质 Cytosol	0.032±0.030aA	25.20	0.047±0.038aA	27.17
APX	叶绿体 Chloroplast	0.287±0.107aA	44.98	0.232±0.094aA	41.80
	线粒体 Mitochondria	0.152±0.063bB	23.82	0.144±0.060bB	25.95
	细胞溶质 Cytosol	0.199±0.076bB	31.20	0.179±0.072bAB	32.25
GR	叶绿体 Chloroplast	0.047±0.024aA	27.33	0.040±0.016aA	27.21
	线粒体 Mitochondria	0.068±0.021bB	39.53	0.057±0.020bB	38.78
	细胞溶质 Cytosol	0.057±0.025abAB	33.14	0.050±0.023abAB	34.01

存在于细胞溶质中,占 34.16%,线粒体次之,占 33.30%,叶绿体部分活性最低,占 32.54%(表 2)。

2.4 低温胁迫下圆柏属植物各亚细胞中 CAT 活性变化及亚细胞定位

两种圆柏属植物亚细胞中 CAT 活性随时间变化各有不同(图 4)。不同低温(4 °C、0 °C 和-6 °C)处理 8 d 时,祁连圆柏细胞溶质中和圆柏各亚细胞中 CAT 活性呈先升高后降低的趋势,且大多在 4 °C 达最高值。此外,12 d 时,祁连圆柏的叶绿体中,16 d 时,两种圆柏的线粒体中,CAT 活性均与上述变化趋势一致(图 4)。处理其余天数时,圆柏属植物各亚细胞中 CAT 活性与 20 °C 处理相比是降低的($P > 0.05$)。同一低温处理下,随着处理时间的延长,圆柏属植物各亚细胞中 CAT 活性呈先升后降趋势。两树种相比,祁连圆柏各亚细胞中 CAT 活性均较圆柏的低,且圆柏属植物各亚细胞中 CAT 活性有所不同,但差异均不显著($P > 0.05$),即圆柏属植物叶片细胞中 CAT 活性主要存在于线粒体中,占总活性的 40.15%~40.46%,叶绿体次之,占 32.37%~34.65%,细胞溶质活性最低,占 25.20%~27.17%(表 2)。

2.5 低温胁迫下圆柏属植物各亚细胞中 APX 活性变化及亚细胞定位

两种圆柏属植物亚细胞中 APX 活性随时间变化趋于一致(图 5)。不同低温(4 °C、0 °C 和-6 °C)处理 8 d 时,各亚细胞中 APX 活性大多呈现先升高后

降低的趋势,且在 4 °C 达到最高值。此外,12 d 时,两种圆柏的各亚细胞中,16 d 时,祁连圆柏的线粒体中和圆柏的细胞溶质中,20 d 时,两种圆柏的叶绿体、细胞溶质中,APX 活性均与上述变化趋势一致(图 5)。然而处理其余天数时,圆柏属植物各亚细胞中 APX 活性与 20 °C 处理相比无明显变化。概括而言,同一低温处理下,随着处理时间的延长,圆柏属植物各亚细胞中 APX 活性呈先升高后降低的趋势。两树种相比,祁连圆柏各亚细胞中 APX 活性均较圆柏的高,且祁连圆柏叶绿体中 APX 活性极显著地高于线粒体和细胞溶质中的($P < 0.01$),圆柏叶绿体中 APX 活性极显著地高于线粒体中的($P < 0.01$),和显著地高于细胞溶质中的($P < 0.05$),即圆柏属植物叶片细胞中 APX 活性主要存在于叶绿体中,占总活性的 41.80%~44.98%,细胞溶质次之,占 31.20%~32.25%,线粒体部分活性最低,占 23.82%~25.95%(表 2)。

2.6 低温胁迫下圆柏属植物各亚细胞中 GR 活性变化及亚细胞定位

与 APX 活性相似,两种圆柏属植物亚细胞中 GR 活性随时间变化趋于一致(图 6)。不同低温(4 °C、0 °C 和-6 °C)处理 4 d 时,叶绿体和线粒体亚细胞中 GR 活性大多呈先升高后降低的趋势,且大多基本在 4 °C 达最高值。此外,8 d 时,祁连圆柏的线粒体、细胞溶质中和圆柏的细胞溶质中,12 d 时,两种圆柏的各亚细胞中,16 d 时,祁连圆柏的叶绿体、

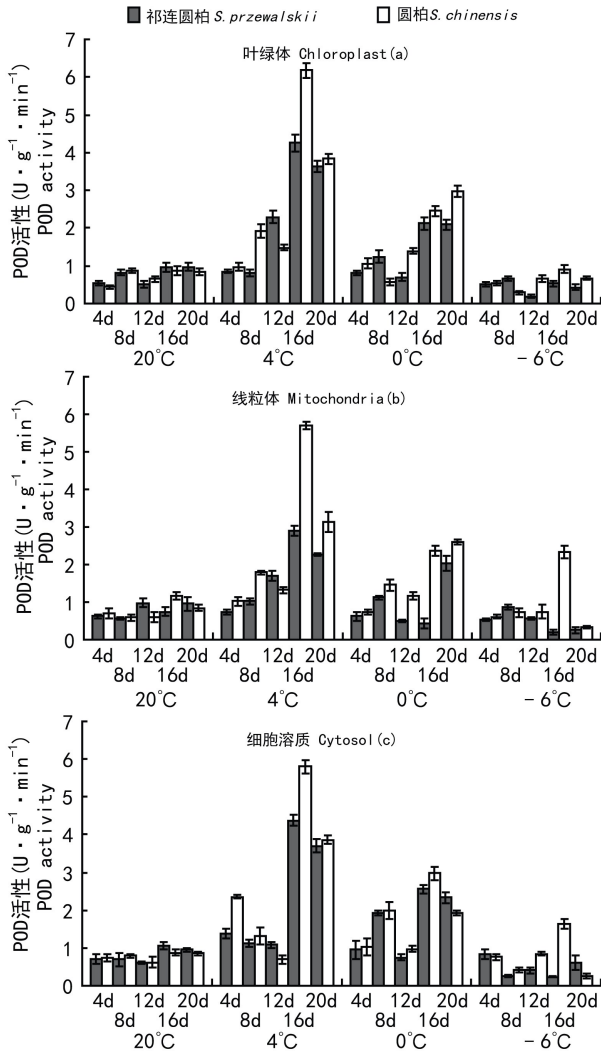


图 2 低温胁迫下两种圆柏属植物各亚细胞组分中 SOD 活性变化

Fig. 2 Changes of SOD activities in subcellular fraction of two *Sabina* species under the low temperature stress

线粒体中和圆柏的叶绿体中, 20 d 时, 两种圆柏的叶绿体中, GR 活性均与上述变化趋势一致(图 6)。处理其余天数时, 圆柏属植物各亚细胞中 GR 活性与 20 °C 处理相比无明显变化。

概而言之, 同一低温处理下, 随着处理时间的变化, 圆柏属植物各亚细胞中 GR 活性呈先升高后降低趋势。两树种相比, 祁连圆柏各亚细胞中 GR 活性均较圆柏的高, 且圆柏属植物线粒体中 GR 活性极显著地高于叶绿体中的 ($P < 0.01$), 即圆柏属植物叶片细胞中 GR 活性主要存在于线粒体中, 占总活性的 38.78%~39.53%, 细胞溶质次之, 占 33.14%~34.01%, 叶绿体部分活性最低, 占 27.21%~27.33%(表 2)。

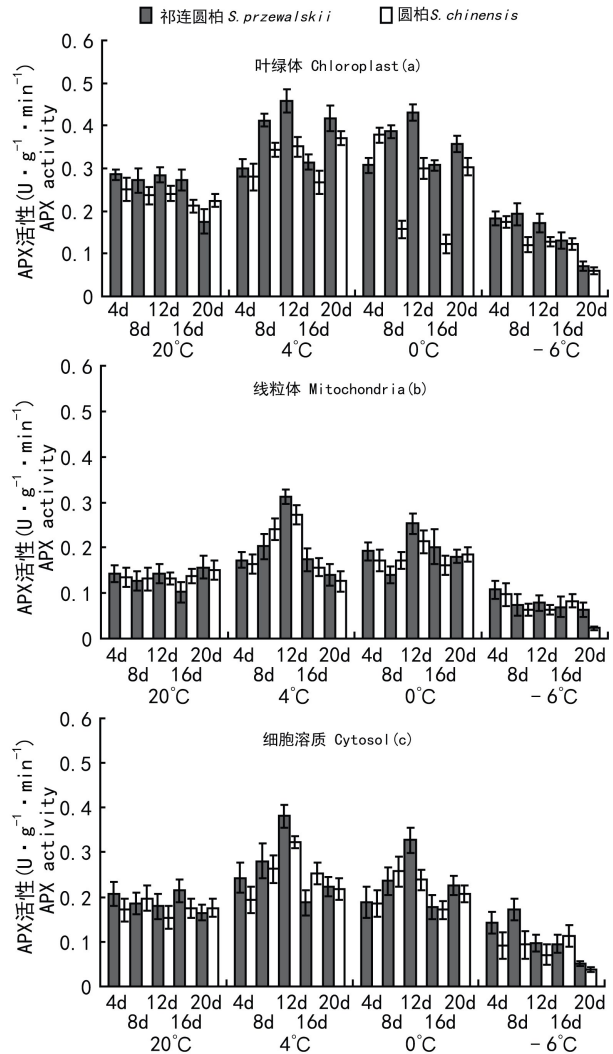


图 3 低温胁迫下两种圆柏属植物各亚细胞组分中 POD 活性变化

Fig. 3 Changes of POD activities in subcellular fraction of two *Sabina* species under the low temperature stress

3 讨论

植物在逆境条件下, 活性氧累积, 导致膜系统氧化伤害产生膜脂过氧化的产物 MDA, 常以 MDA 作为判断膜脂过氧化作用的一种主要指标(康华靖等, 2008)。本研究发现, 在低温胁迫初期, 圆柏属植物 MDA 含量升高, 这与植物受到低温胁迫产生活性氧, 导致膜脂过氧化, 膜系统受损有关, 且圆柏 MDA 含量较祁连圆柏的增幅高; 低温胁迫后期, 圆柏属植物 MDA 含量先降后升, 这可能是抗氧化酶系统及时清除了活性氧, 减缓了植物伤害, 而 -6 °C 的低温处理引起了植物的低温冷冻伤害, 抗氧化酶

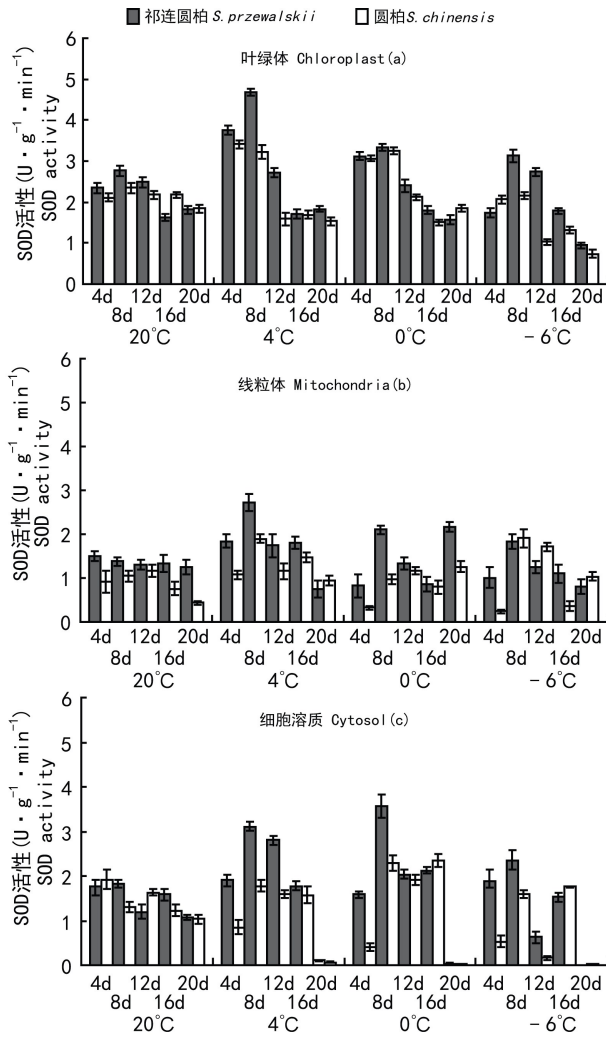


图 4 低温胁迫下两种圆柏属植物各亚细胞组分中 SOD 活性变化

Fig. 4 Changes of SOD activities in subcellular fraction of two *Sabina* species under the low temperature stress

系统活性低,清除活性氧能力差。因此,圆柏属植物 MDA 含量呈现出先降低后升高的趋势。

植物体活性氧的清除涉及一系列细胞代谢和酶促反应过程,植物体中 SOD、POD、CAT、APX 和 GR 是主要的活性氧清除酶(Rao *et al.*, 1996),能使细胞内活性氧维持在较低水平,确保植物正常生长和代谢(马旭俊等,2003)。本研究中,4 °C、0 °C 和 -6 °C 下经历相同处理时间的圆柏属植物与 20 °C 的相比,在同一处理时间下,随着处理温度的降低,4 °C 和 0 °C 处理的叶片抗氧化酶(SOD、POD、APX 和 GR)活性较 20 °C 显著增强,而 -6 °C 处理的则降低;然而 CAT 活性无显著增强,可能是由于 CAT 对低温胁迫不敏感,不是主要的活性氧清除酶。在同一

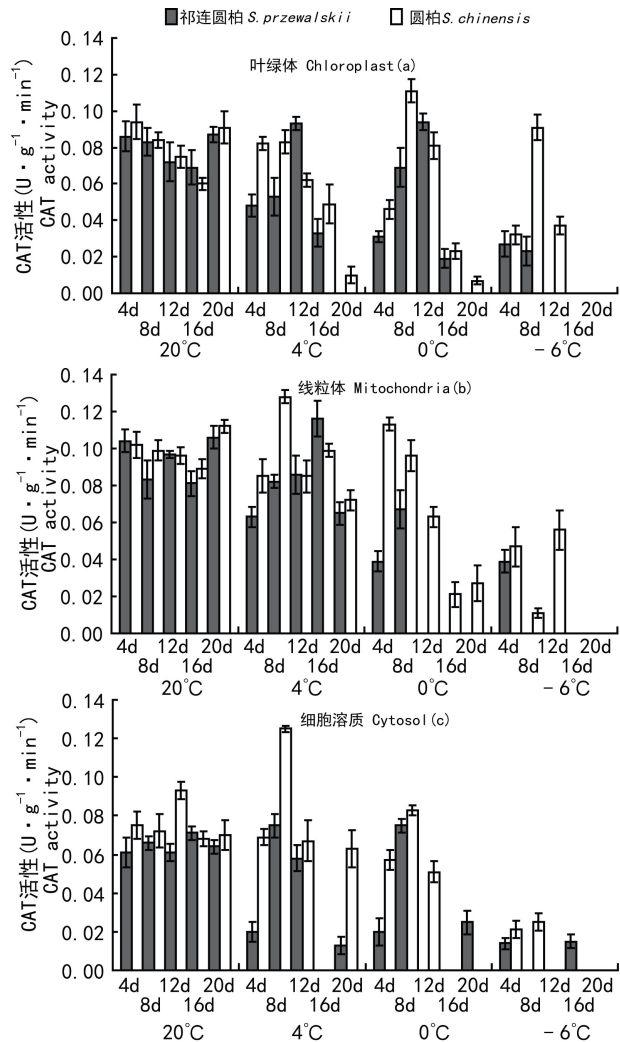


图 5 低温胁迫下两种圆柏属植物各亚细胞组分中 APX 活性变化

Fig. 5 Changes of APX activities in subcellular fraction of two *Sabina* species under the low temperature stress

低温处理下,随着处理时间的延长,在同一低温处理下,随处理时间从 4 d 延长至 20 d,圆柏属植物叶片抗氧化酶(SOD、CAT、APX 和 GR)活性也呈现出先升高后降低的趋势,这符合一般植物的应急性规律,即胁迫温度降低,叶片中抗氧化酶的活性升高,表明低温胁迫对抗氧化酶有一定的诱导作用,但随处理时间延长,叶片中抗氧化酶的活性随之降低(刘璐璐等,2008)。说明在低温胁迫初期,植物体中抗氧化酶活性明显增加,以清除活性氧,在低温胁迫后期,随着活性氧的消除,抗氧化酶活性降低,表明植物对低温胁迫已产生了适应性。在同一处理时间下,随着处理温度的降低,圆柏属植物叶片 CAT 活性无显著地增强,可能是由于 CAT 在圆柏属植物

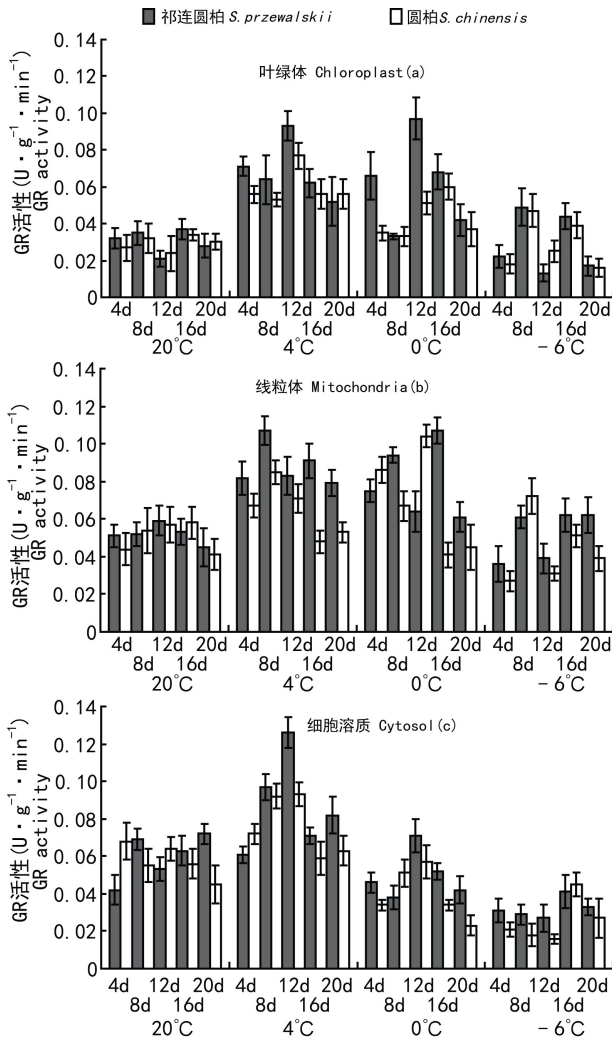


图6 低温胁迫下两种圆柏属植物各亚细胞组分中GR活性变化

Fig. 6 Changes of GR activities in subcellular fraction of two *Sabina* species under the low temperature stress

适应低温胁迫的过程中,对低温胁迫不敏感,并不是主要的活性氧清除酶。在同一低温处理下,随着处理时间的延长,圆柏属植物叶片然而,POD在低温胁迫后期明显升高,表明在低温胁迫初期,植物叶片POD酶活性变化趋势平缓,比其他抗氧化酶响应缓慢。两树种相比,在同一低温胁迫和处理时间下,祁连圆柏的SOD、APX和GR活性较圆柏抗氧化酶活性的高,而祁连圆柏的POD和CAT活性较圆柏抗氧化酶活性的低,说明祁连圆柏和圆柏清除活性氧的主要抗氧化酶不同,祁连圆柏中清除活性氧的抗氧化酶的种类比圆柏的多且活性强,表明祁连圆柏在低温胁迫下具有更广泛的适应性策略,比圆柏表现出较强的低温适应性,这一结果与陈银萍等

(2008)、李玉强等(2010)的研究结果相似。

正常条件下,植物依靠叶绿体、线粒体等细胞器内部存在的自由基清除系统,能使细胞内的自由基保持较低水平,维持正常的生理代谢。低温胁迫下,活性氧的增加可诱导抗氧化酶活性的升高而降低氧化伤害。与吴志华等(2004)和史庆华等(2006)的研究结果相似。本研究中,圆柏属植物叶绿体中SOD活性极显著高于细胞溶质和线粒体,即叶绿体>细胞溶质>线粒体,说明圆柏属植物叶片叶绿体中SOD酶在低温胁迫响应中发挥主要作用;圆柏属植物叶绿体中APX活性极显著高于细胞溶质和线粒体,即叶绿体>细胞溶质>线粒体,说明圆柏属植物叶片叶绿体中APX酶在低温胁迫响应中发挥主要作用;圆柏属植物线粒体中GR活性极显著高于叶绿体,即线粒体>细胞溶质>叶绿体,说明圆柏属植物叶片线粒体中GR酶在低温胁迫响应中发挥主要作用;圆柏属植物各亚细胞组分中CAT差异不显著,由CAT活性高低排序,即线粒体>叶绿体>细胞溶质;圆柏属植物各亚细胞组分中POD差异不显著,且祁连圆柏和圆柏的亚细胞分布不同,由POD活性高低排序,即祁连圆柏:细胞溶质>叶绿体>线粒体,圆柏:细胞溶质>线粒体>叶绿体。

综上所述,在低温胁迫下,圆柏属植物叶片各亚细胞中的抗氧化酶活性大多表现为先升高后降低,这表明植物各亚细胞组分能够协调抗氧化防护的能力。在圆柏属植物的抗氧化酶进行亚细胞定位时,发现各种抗氧化酶活性在叶绿体、线粒体和细胞溶质的分布各不相同,有些抗氧化酶(SOD、APX、GR)活性分布差异甚至达到极显著,说明抗氧化酶在其中一种亚细胞中发挥着主要作用,这为亚细胞组分中的抗氧化酶基因进行全长克隆提供了理论依据。但两种圆柏属植物的抗氧化酶活性存在种间差异,祁连圆柏中清除活性氧的抗氧化酶的种类比圆柏的多而且活性要强,而MDA含量低于圆柏,表明祁连圆柏在低温胁迫下具有更广泛的低温适应性,比圆柏表现出较强的抗冻性,这与其自然生存环境条件相一致。

参考文献:

- Chen LS(陈立松), Liu XH(刘星辉), Hu YL(胡又厘), *et al.* 1998. Effect of water stress on relative permeability of plasma membrane and Na^+ - K^+ ATPase activities in various organelles of Lihchi young seedling leaves(水分胁迫对抗旱性不同的荔枝实生幼苗叶片质膜透性和各细胞器中 Na^+ - K^+

- ATPase 活性的影响[J]. *Chin J Trop Crop* (热带作物学报), **19**(1): 58—63
- Chen XL(陈晓莉), Zhang P(张鹏), Zhang T(张涛), *et al.* 2009. Study on antioxidase activities of *Picea crassifolia* and *Sabina przewalskii* at different altitude gradients(不同海拔青海云杉与祁连圆柏叶片抗氧化酶活性的研究)[J]. *J Gansu Agric Univ*(甘肃农业大学学报), **44**(1): 118—122
- Chen YP(陈银萍), Chen T(陈拓), Zhang MX(张满效), *et al.* 2008. The relation of seasonal changes in water and organic osmotica to freezing tolerance in the leaves of *Sabina* (圆柏属常绿木本植物叶片水分、渗透调节物质的季节变化与抗冷冻性的关系)[J]. *Bull Bot Res* (植物研究), **28**(3): 336—341
- Chen YP, Zhang MX, Chen T, *et al.* 2006. The relationship between seasonal changes in anti-oxidative system and freezing tolerance in the leaves of evergreen woody plants of *Sabina* [J]. *S Afr J Bot*, **72**: 272—279
- Chen YW(陈一舞), Shao GH(邵桂花), Chang RZ(常汝镇). 1997. The effect of salt stress on superoxide dismutase in various organelles from cotyledon of Soybean seedling(盐胁迫对大豆幼苗子叶各细胞器超氧化物歧化酶(SOD)的影响)[J]. *Acta Agron Sin* (作物学报), **23**(2): 214—219
- Cui GW(崔国文). 2009. The physiological responses of cold resistance in *Alfalfa* during overwintering period in the field(紫花苜蓿田间越冬抗寒生理研究)[J]. *Acta Agr Sin* (草地学报), **17**(2): 145—150
- Du XM(杜秀敏), Yin WX(殷文璇), Zhang H(张慧), *et al.* 2003. The researching progress of superoxide dismutase(超氧化物歧化酶(SOD)研究进展)[J]. *J Chin Biotechnol* (中国生物工程杂志), **23**(1): 48—50
- Foyer CH, Descourvires P, Kunert KJ. 1994. Protection against oxygen radicals: An important defence mechanism studied in transgenic plants[J]. *Plant Cell Environ*, **17**: 507—523
- Ji MJ(祭奠菊), An LZ(安黎哲), Chen T(陈拓), *et al.* 2001. Isolation and identification of the antifreeze proteins in *Polygonum viviparum* of altifrigetic subnival plants in the Tianshan Mountains(天山寒区冰缘植物珠芽蓼叶片抗冻蛋白的发现)[J]. *J Glaciol Geocryol* (冰川冻土), **23**(4): 342—345
- Jiang MY(蒋明义), Guo SC(郭绍川). 1996. Oxidative stress and antioxidation induced by water deficiency in plants(水分亏缺诱导的氧化胁迫和植物的抗氧化作用)[J]. *Plant Physiol Commun* (植物生理学通讯), **32**(2): 144—150
- Kang HJ(康华靖), Liu P(刘鹏), Xu GD(徐根娣), *et al.* 2008. Ecophysiological response of *Emmenopteryx henryi* to the habitats in different altitudes in China's Dapan Mountain natural reserve(大盘山自然保护区香果树对不同海拔生境的生理生态响应)[J]. *J Plant Ecol* (植物生态学报), **32**(4): 865—872
- Knorz OC, Durner J, Boger P. 1996. Alterations in the antioxidative system of suspension-cultured soybean cells (*Glycine max*) induced by oxidative stress [J]. *Physiol Plantarum*, **97**: 388—396
- Li HS(李合生), Sun Q(孙群), Zhao SJ(赵世杰), *et al.* 2000. Experiments Theory and Technology of Plant Biochemistry(植物生理生化实验原理和技术)[M]. Beijing(北京): Higher Education Press(高等教育出版社): 164—261
- Liu HX(刘鸿先), Zeng SX(曾韶西), Wang YR(王以柔), *et al.* 1985. The effect of low temperature on superoxide dismutase in various organelles of *Cucumber* seedling cotyledon with different cold tolerance(低温对不同耐寒力的黄瓜幼苗子叶各细胞器中超氧化物歧化酶(SOD)的影响)[J]. *Acta Phytophysiol Sin* (植物生理学学报), **11**(1): 48—57
- Li JK(李建坤), Wang ZL(汪宗立). 1992. Superoxide dismutase activity in leaf-cell organelles and protective role of 6-BA against damage in Corn under waterlogging stress (涝渍逆境下玉米叶片各细胞器超氧化物歧化酶活性的变化及 6-BA 的保护作用)[J]. *Jiangsu J Agric Sci* (江苏农业学报), **8**(3): 20—24
- Li L(李玲), Li NH(李娘辉), Jiang SM(蒋素梅), *et al.* 2009. The Guidance of Plant Physiology Module Experiments(植物生理学模块实验指导)[M]. Beijing(北京): Science Press(科学出版社): 98—100
- Liu LL(刘璐璐), Chai ML(柴明良), Xu XW(徐晓薇), *et al.* 2008. Effect of ^{60}Co γ -rays irradiation on growth and antioxidant enzyme activities of rhizomes in *Cymbidium goeringii*(γ 射线辐照对春兰根状茎生长及抗氧化酶活性的影响)[J]. *J Nucl Agric Sci* (核农学报), **22**(1): 23—27
- Li YQ(李玉强), Chen YP(陈银萍), Zhang MX(张满效), *et al.* 2010. The relation of seasonal changes in the $\delta^{13}\text{C}$ values to freezing tolerance in the needles of *Sabina* (圆柏属常绿木本植物 $\delta^{13}\text{C}$ 值的季节变化与抗冷冻性的关系)[J]. *Ecol Environ Sci* (生态环境学报), **19**(2): 350—354
- Ma XJ(马旭俊), Zhu DH(朱大海). 2003. Functional roles of the plant superoxide dismutase(植物超氧化物歧化酶(SOD)的研究进展)[J]. *Hereditas* (遗传), **25**(2): 225—231
- Nakano Y, Asada K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbatespecific peroxidase in *Spinach chloroplasts* [J]. *Plant Cell Physiol*, **22**: 867—880
- Rao MV, Paliyath G, Ormrod DP. 1996. Ultraviolet-B and ozone induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Physiol*, **110**: 125—136
- Shi QH(史庆华), Zhu ZJ(朱祝军), Wang YC(王永传), *et al.* 2006. Effects of high concentration manganese on active oxygen production and antioxidant enzyme activities in *Cucumber* leaves under different irradiations(不同辐照度下高浓度锰对黄瓜叶片活性氧产生和抗氧化酶活性的影响)[J]. *J Plant Physiol Mol Biol* (植物生理与分子生物学学报), **32**(3): 325—329
- Thomashow MF. 1998. Role of cold responsive gene in plant freezing tolerance[J]. *Plant Physiol*, **118**: 1—7
- Wu ZH(吴志华), Zeng FH(曾富华), Ma SJ(马生健), *et al.* 2004. A review of advances in active oxygen metabolism in plants under water stress(水分胁迫下植物活性氧代谢研究进展)[J]. *Subtrop Plant Sci* (亚热带植物科学), **33**(2): 77—80
- Zhao LN(赵琳娜), Ma QY(马清云), Yang GM(杨贵名), *et al.* 2008. Disasters and its impact of a severe snow storm and freezing rain over Southern China in January 2008 (2008年初我国低温雨雪冰冻对重点行业的影响及致灾成因分析)[J]. *Climatic & Environ Res* (气候与环境研究), **13**(4): 556—566
- Zou Q(邹琦). 2000. The Guidance of Plant Physiology Experiments(植物生理学实验指导)[M]. Beijing(北京): China Agriculture Press(中国农业出版社): 168—170