

文章编号: 1000-5471(2007)03-0074-06

低温胁迫对烟草保护性酶类及氮和碳化合物的影响^①

晋 艳¹, 杨宇虹¹, 华水金², 段玉琪¹, 程新宇³

1. 云南省烟草科学研究所, 云南 玉溪 653100; 2. 浙江大学, 杭州 310029;

3. 云南烟草曲靖市公司, 云南 曲靖 655000

摘要: 在 6 °C 和 10 °C 低温胁迫下, 研究了 2 个烟草品种的膜透性、保护性酶类活性和 N, C 化合物含量的变化。结果表明: 2 个烟草品种幼苗的膜透性都随着胁迫温度的降低和胁迫时间的增加而增加; 酶活性的变化趋势为: CAT 和 SOD 随着胁迫温度的降低和胁迫时间的增加而降低, POD 的变化则有相反的趋势; 蛋白质含量在低温胁迫下下降, 脯氨酸含量则增加, 并且脯氨酸在叶片中的变化较为剧烈; 可溶性总糖和蔗糖含量低温胁迫下在叶片中有所积累, 而叶绿素 a、叶绿素 b 和叶绿素总量则可能因叶绿体受损而下降。

关键词: 低温胁迫; 烟草; 保护性酶; N、C 化合物

中图分类号: S572

文献标识码: A

烟草是一种喜温作物, 低于 10 °C~13 °C 时生长停止, 1 °C~2 °C 时烟株即死亡。云南省是烟草种植大省, 在苗期阶段容易遭到低温危害, 一旦遇到低温胁迫, 烟草的产质量将会受到很大的影响。冷害引起生理的变化主要集中在激素水平的改变, 可溶性糖、氨基酸、有机酸的增加和膜脂化合物的变化^[1~3]。目前, 在水稻^[4]、黄瓜^[5]、辣椒^[6]等作物中已经有了较为深入的研究。但大多数研究主要集中在酶类活性的变化, 对于许多化学物质间发生改变的因果关系还不是很明确。此外, 有关烟草在低温胁迫下生理和分子机制报道还不多。因此本实验主要研究在不同程度的低温和相同处理但不同时间长度胁迫下, 烟草幼苗叶片中过氧化物酶(POD), 过氧化氢酶(CAT)和超氧化物歧化酶(SOD)等保护酶系的活性及游离蛋白质、脯氨酸、可溶性总糖、蔗糖和叶绿素的含量的变化与抗寒性之间的关系, 以明确烟草低温胁迫下的生理本质, 为选育烟草抗寒品种和制定防寒栽培措施提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

供试材料为烤烟(*Nicotiana tabacum* L.)品种云烟 85 和 K 326。云烟 85、K 326 由云南省烟草种子公司提供。

1.2 材料培养及处理方法

2 个烟草品种采用漂浮育苗法^[7]育苗。4 片真叶期时将幼苗分成 2 组, 分别置于 6 °C 和 10 °C 的光照培养箱内, 低温胁迫 0.5, 1, 1.5 h; 处理前均匀浇水; 处理后于常温下培养。本试验分 8 个处理, 分别为 6 °C 处理 0.5, 1, 1.5 h; 10 °C 处理 0.5, 1, 1.5 h; 常温对照。每处理每个品种 50 株, 重复 3 次。处理结束

① 收稿日期: 2006-09-21

作者简介: 晋艳(1968-), 女, 云南呈贡人, 副研究员, 从事烟草栽培方面的科学研究。

后以生长基本一致烟苗的第3片真叶为取样材料,测定有关生理生化指标.

1.3 测定方法

细胞质膜透性的测定:采用电导法测定^[8];保护性酶类活性的测定:SOD活性采用氮蓝四唑(NBT)法测定^[9];CAT活性采用高锰酸钾滴定法^[9];POD方法采用愈创木酚法^[9];可溶性蛋白采用考马斯亮蓝法测定^[8];游离脯氨酸含量采用磺基水杨酸提取比色法测定^[8];可溶性总糖和蔗糖采用蒽酮比色法^[9];叶绿素含量采用丙酮提取比色法^[8].

1.4 数据统计

数据均为3次重复的平均值,采用SPSS统计软件处理数据.

2 结果与讨论

2.1 低温处理下不同烟草品种电解质率的变化及抗寒性比较

烟草2个品种在低温胁迫下,从电解质外渗的情况可以看出细胞质膜的透性发生了明显的变化(表1).品种间比较,云烟85和K326的电解质率在低温处理下,随着胁迫时间的增加而逐渐增加,但是云烟85的电解质率在相同处理下比K326小,说明在低温胁迫下,云烟85细胞质膜损伤较小.处理间比较,处理0.5h,云烟85和K326在6℃处理下比10℃处理的电解质率分别增加了18.05%,28.57%,云烟85处理间未达显著水平,而K326处理达到了显著水平;但处理1h和1.5h后,云烟85在6℃处理和10℃处理下都达到了显著水平,而K326都未达显著水平.

表1 2个烟草品种在低温处理下细胞膜透性和抗寒性的比较

品 种 温度/℃	云烟 85			K 326		
	0.5 h	1 h	1.5 h	0.5 h	1 h	1.5 h
6	19.23 aA ¹	21.18 aA	22.51 aA	22.50 aA	23.69 aA	24.89 aA
10	16.29 abA	17.53 bA	17.76 bA	17.50 bA	20.84 aA	24.28 aA
常 温	15.68 bA	15.68 bA	15.68 bA	14.82 bA	14.82 bA	14.82 bB

注:1 数字后小写字母表示5%显著水平,大写字母表示1%显著水平,下同.

冷害对植物的伤害大致分为2个步骤:第一步是膜相改变,第二步是由于膜损坏而引起代谢紊乱.膜脂相变会导致原生质停止流动,膜结合酶活性降低,膜透性增大,电解质及某些小分子有机物大量渗漏^[11].本试验中,2个烟草品种(云烟85和K326)在低温胁迫下,随着胁迫温度的降低和胁迫时间的增加,电解质率也随之增高,此结果与张燕等(2002)^[12]的研究结果相类似.然而,烟草在低温胁迫下,有关原生质膜的具体变化、包括膜的动态变化、膜上蛋白以及膜上脂肪酸含量和种类的改变还需进一步研究.

2.2 烟草低温处理下保护性酶类活性的变化

CAT,POD和SOD是植物体内受到外界环境胁迫时重要的保护酶类.烟叶幼苗中的CAT是清除H₂O₂一种关键酶.在低温处理下,2个品种的CAT酶活性都有所降低;同时随着胁迫时间的增加,活性也随之下降.云烟85在10℃处理1.5h时,CAT酶活性比相同处理下K326的酶活性高近一倍.这可能是云烟85有较高抗寒性原因之一.随着处理温度的降低,POD活性明显增加.云烟85在低温胁迫0.5h,1h和1.5h下,6℃的POD活性比10℃的酶活性分别增加了0.52%,1.83%和15.41%,K326在相同条件下的增幅分别是12.06%,9.31%和6.00%,但是处理间都未达显著水平;而与常温下烟草幼苗中的POD活性都达极显著水平.二者的增幅变化趋势并不完全相同,这暗示着云烟85和K326防御冷害的机制可能并不完全相同.

SOD是清除植物体内超氧化物最关键的酶类之一.云烟85的SOD活性在低温处理下要比K326略

高. SOD 活性的变化趋势与 CAT 相似, 而与 POD 则相反.

表 2 烟草不同品种在低温胁迫下主要保护性酶类的变化

品 种		云烟 85			K 326		
酶 类	温度/°C	0.5 h	1 h	1.5 h	0.5 h	1 h	1.5 h
CAT	6	36.22 bB	35.90 bB	31.28 bB	29.86 bB	21.30 bB	12.92 bB
$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	10	39.02 bB	38.86 bB	37.90 bB	31.08 bB	23.94 bB	19.90 bB
$\text{mg} \cdot \text{min}^{-1}$	常 温	56.20 aA	56.20 aA	56.20 aA	43.14 aA	43.14 aA	43.14 aA
POD	6	300.82 aA	320.83 aA	380.74 aA	280.67 aA	319.02 aA	329.11 aA
$\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$	10	299.26 aA	315.07 aA	329.89 aA	250.45 aA	291.85 aA	310.49 aA
$\text{U} \cdot \text{min}^{-1}$	常 温	169.47 bB	169.47 bB	169.47 bB	191.01 bB	191.01 bB	191.01 bB
SOD	6	38.60 aA	34.27 aA	23.91 bB	36.08 aA	31.27 aA	23.32 bB
$\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$	10	39.41 aA	37.82 aA	35.15 aA	37.49 aA	34.74 aA	29.91 abAB
$\text{U} \cdot \text{min}^{-1}$	常 温	42.50 aA	42.50 aA	42.50 aA	38.61 aA	38.61 aA	38.61 aA

植物在低温胁迫下, 会产生一些超氧化物, 这些化合物对植物细胞膜和细胞器膜有强烈的破坏作用. 因此, CAT, POD 和 SOD 在作为它们的清除剂时具有十分重要的作用. 大量研究表明, 不同的作物酶的活性变化趋势并不相同. 马德华等(2001)^[13], 在黄瓜的抗寒性时认为, 经低温胁迫后, CAT 和 POD 活性均显著下降, 耐寒性强的品系 SOD 活性上升, 耐寒性弱的品系 SOD 活性则降低. Gabriela P 等(2000)^[14], 研究玉米叶片中的维管束鞘和叶肉细胞在低温胁迫下 H_2O_2 的分布时发现, SOD 的活性却明显增加. 而张燕等(2002)^[12], 在研究钙对低温胁迫的烟草幼苗某些酶活性的影响时认为, 随着胁迫时间的增加, 烟草幼苗内的 CAT 和 SOD 活性降低, 而 POD 活性增加, 与本文的结果一致.

2.3 烟草低温胁迫下一些含 N 化合物的变化

低温胁迫下, 烟草幼苗体内的含 N 化合物发生了明显的变化(表 3). 云烟 85 和 K 326 的可溶性蛋白质含量随着胁迫时间的增加和胁迫温度的降低而降低. 与常温相比, 云烟 85 胁迫 0.5 h 的幼苗在 10 °C 下降低的可溶性蛋白质含量不明显, 但在 6 °C 处理下, 二者的含量达到了显著水平; 胁迫 1 h, 1.5 h 以及 K 326 在胁迫 0.5 h, 1 h, 1.5 h 下可溶性蛋白质含量与常温下叶片中蛋白质的含量相比都达到了显著水平.

表 3 烟草低温胁迫对含 N 化合物含量的影响

品 种		云烟 85		K 326	
胁迫时间/h	温度/°C	可溶性蛋白/ $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	脯氨酸/ $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	可溶性蛋白/ $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	脯氨酸/ $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$
0.5	6	0.628 bA	2.002 aA	0.664 bA	0.619 aA
	10	0.855 abA	1.668 aA	0.867 bA	0.614 aA
	常 温	1.023 aA	0.419 bB	0.963 aA	0.504 aA
1	6	0.568 bA	3.477 aA	0.508 bA	2.030 aA
	10	0.616 bA	3.183 aA	0.580 bA	2.019 aA
	常 温	1.023 aA	0.419 bB	0.963 aA	0.504 bB
1.5	6	0.400 bA	9.454 aA	0.316 bA	6.108 aA
	10	0.544 bA	6.366 bB	0.472 bA	5.685 aA
	常 温	1.023 aA	0.419 cC	0.963 aA	0.504 bB

脯氨酸含量的变化更为剧烈. 云烟 85 和 K 326 两个品种幼苗体内的脯氨酸含量都随着低温胁迫时间和温度的降低而大幅度的增加. 在常温下, 2 个品种的烟草幼苗体内的脯氨酸含量都比较低. 6 °C 和 10 °C 处理间比较, 云烟 85 在胁迫 0.5 h, 1 h, 1.5 h 中, 脯氨酸含量的增幅分别为 20.02%, 9.23% 和 48.51%, 而 K 326 的增幅分别为 0.81%, 0.54% 和 7.44%, 但是处理间除了云烟 85 在胁迫 1.5 h 时达到了极显著

水平外, 其余均未达显著水平. 云烟 85 幼苗中脯氨酸的含量要高于 K 326.

植株遭受冷害后, 水解酶类的活性常常高于合成酶类, 致使物质分解增大. 因此, 幼苗处于低温条件下, 蛋白质含量减少, 可溶性含 N 化合物含量增加^[11]. 本研究的结果认为, 在低温胁迫下, 烟草幼苗内的可溶性蛋白含量明显降低, 与上述结果相近.

游离脯氨酸含量与耐寒性的关系已有许多报道. Borman(1980)^[15]指出, 游离脯氨酸含量的增加可提高烟草的抗冷性. 李建设等(2003)^[16]在研究低温对茄子幼苗的影响时认为脯氨酸含量随胁迫温度降低而呈增加趋势. 在本试验的结果认为, 在低温胁迫下, 烟草的 2 个品种云烟 85 和 K 326 幼苗内的游离脯氨酸含量随着胁迫时间的增加而增加. 但是郭确等(1984)^[4]在研究水稻幼苗的抗冷性时指出, 低温对游离脯氨酸含量影响不大.

2.4 烟草低温胁迫下与含 C 化合物变化之间的关系

表 4 表明烟草受到低温胁迫后, 幼苗体内的可溶性糖类物质发生了明显的变化. 云烟 85 和 K 326 可溶性总糖含量在 6 °C 处理下最大, 10 °C 处理次之, 常温最小. 从胁迫时间看, 其含量变化趋势是胁迫 0.5 h 最小, 胁迫 1 h 居中, 胁迫 1.5 h 最大, 说明烟草幼苗中的可溶性总糖含量随着胁迫温度的降低和胁迫时间的增加而增加. 云烟 85 和 K 326 幼苗中蔗糖的含量变化与可溶性总糖含量的变化情况相类似.

叶绿体是植物细胞内重要的细胞器, 是植物进行光合作用的场所. 低温使叶绿素生物合成受阻^[17]. 从表 4 中可以看出, 云烟 85 和 K 326 幼苗中的叶绿素 a、叶绿素 b 和叶绿素总量在低温处理下, 明显降低. 而且在 6 °C 处理下, 幼苗中叶绿素的含量要比 10 °C 处理低. 云烟 85 幼苗中的叶绿素含量要比 K 326 略高.

表 4 低温胁迫对烟草幼苗可溶性总糖和蔗糖以及叶绿素含量的影响

品 种		云烟 85			K 326		
项 目	温度/°C	0.5 h	1 h	1.5 h	0.5 h	1 h	1.5 h
可溶性总糖/%	6	0.143 3 aA	0.272 9 aA	0.661 5 aA	0.186 5 aA	0.301 7 aA	1.294 7 aA
	10	0.128 9 aA	0.215 3 aA	0.359 2 bAB	0.157 7 aA	0.244 1 bA	0.503 1 bAB
	常 温	0.100 2 aA	0.100 2 bA	0.100 2 cB	0.114 6 aA	0.114 6 cA	0.114 6 cB
蔗糖/%	6	0.050 5 aA	0.091 8 aA	0.166 1 aA	0.058 8 aA	0.124 8 aA	0.199 1 aA
	10	0.033 9 aA	0.058 7 bAB	0.149 6 aA	0.042 2 aA	0.091 8 bAB	0.149 6 bA
	常 温	0.017 5 aA	0.017 5 cB	0.017 5 bB	0.025 7 aA	0.025 7 cB	0.025 7 cB
叶绿素 a /(mg · g ⁻¹)	6	0.709 7 bA	0.510 1 bA	0.406 8 bA	0.594 3 bA	0.526 6 bA	0.343 5 bA
	10	0.773 7 bA	0.588 7 bA	0.418 0 bA	0.722 0 aA	0.500 0 bA	0.398 3 bA
	常 温	0.995 9 aA	0.995 9 aA	0.995 9 aA	0.853 5 aA	0.853 5 aA	0.853 5 aA
叶绿素 b /(mg · g ⁻¹)	6	0.256 7 aA	0.216 0 bA	0.139 0 bA	0.169 2 bA	0.161 3 bA	0.156 9 bA
	10	0.268 5 aA	0.239 3 bA	0.174 8 bA	0.255 4 aA	0.190 1 bA	0.173 4 bA
	常 温	0.325 9 aA	0.325 9 aA	0.325 9 aA	0.283 6 aA	0.283 6 aA	0.283 6 aA
叶绿素总量 /(mg · g ⁻¹)	6	0.966 4 aA	0.726 2 bA	0.545 9 bA	0.763 6 aA	0.688 0 bA	0.500 5 bA
	10	1.042 2 aA	0.828 1 bA	0.592 8 bA	0.977 5 aA	0.690 1 bA	0.571 7 bA
	常 温	1.321 9 aA	1.321 9 aA	1.321 9 aA	1.137 1 aA	1.137 1 aA	1.137 1 aA

植物在低温胁迫下, 大多数植物的光合速率明显下降. 引起这一结果的可能原因有以下 3 个方面: 第 1, 低温直接影响植物光合机构的结构和活性. 如叶绿体类囊体膜的组份、透性和流动性等、叶绿体的亚显微结构、叶绿素含量, 光合作用中的光化学反应也会受到影响. 第 2, 低温影响植物体内的其它生理过程从而间接地影响光和作用. 如气孔对 CO₂ 扩散阻力的增加. 第 3, 光合产物运输受阻从而导致光合产物(淀

粉和蔗糖)在叶片中的积累^[18]. 研究表明,云烟 85 和 K 326 幼苗中的可溶性糖在低温胁迫下会有所积累,并且积累量云烟 85 比 K 326 要少. 这可能是云烟 85 较 K 326 有较强的抗冷性的缘故. 就叶片中的叶绿素含量而言,云烟 85 的含量比 K 326 高,说明在低温胁迫下,云烟 85 幼苗中的叶绿体受损较小,此外,2 个烟草品种在低温下蔗糖和可溶性总糖在叶片有一定的积累.

3 结 论

- 3.1 K 326 和云烟 85 在低温胁迫下,细胞质膜的透性发生了明显的变化,但云烟 85 的电解质率在相同处理下比 K 326 小,说明在低温胁迫下,云烟 85 细胞质膜损伤较小.
- 3.2 在低温胁迫下,K 326 和云烟 85 品种烟苗均表现为 POD 活性增加,而 CAT 和 SOD 活性下降. 2 个品种相经,在相同处理条件下,云烟 85 幼苗的 POD,CAT 和 SOD 活性均高于 K 326 幼苗的活性,特别是 CAT 活性,云烟 85 幼苗比 K 326 幼苗高近一倍.
- 3.3 在低温胁迫下,K 326 和云烟 85 品种幼苗体内含 N 化合物的变化表现为蛋白质含量降低,脯氨酸含量增加,云烟 85 幼苗中脯氨酸含量要高于 K 326 幼苗含量.
- 3.4 低温胁迫下,2 个品种幼苗中可溶性总糖含量随胁迫温度的降低和胁迫时间的延长而增加,而叶绿素含量则下降. 云烟 85 品种幼苗中可溶性总糖的积累低于 K 326 品种幼苗,而叶绿素含量则高于 K 326 幼苗.
- 3.5 通过对比云烟 85 和 K 326 两个品种在低温胁迫下的细胞膜透性、保护性酶活性的变化及含 N、含 C 物质的代谢变化,结果表现云烟 85 品种对冷害影响的敏感度要低于 K 326 品种,这也是云烟 85 品种适应性较广的原因之一.

参考文献:

- [1] Hughes M A, Dunn M A. The molecular biology of plant acclimation to low temperature[J]. *J Exp Bot*, 1996, 47: 291 - 305.
- [2] Palva E T. Gene expression under low temperature stress. In: Basra AS eds, *Stress induced gene expression in plants* [M]. Harwood Academic Publishers. New York, 1994: 103 - 130.
- [3] Thomasow M F. Role of cold-responsive genes in plant freezing tolerance[J]. *Plant Physiol*, 1998, 118: 1 - 7.
- [4] Guo Q, Pan R C. Effects of ABA on the resistance of rice seedlings to chilling injury[J]. *Acta Pytophysiological Sinica*, 1984, 10 (4): 295 - 302.
- [5] Liu H X, Zeng S X, Wang Y R, et al. The effect of low temperature on superoxide dimutase in various organells of cucumber seedling cotyledon with different cold tolerance[J]. *Acta Phytophysiological Sinica*, 1985, 11 (1): 48 - 57.
- [6] Ma Y Q, Dai X Z. Effects of low temperature on the stress on the pepper's physiological index related to the resistance coldness[J]. *Journal of Hunan Agricultural university (Nature sciences)*, 2000, 26 (6): 461 - 463.
- [7] Lei Y H, Shi Y C. The technology of flue-cared tobacco floating breeding[M]. In: *Cultural practices for quality flue-cured tobacco*. Yunnan: Yunnan Scienthec Press, 1999: 42 - 54.
- [8] Cai W M, Tang Z C. *Physiology of environment and resistance*[M]. *Guidance of Contemporary Plant Physiology Experiment*, Beijing: Scientific Press, 1999: 294 - 319.
- [9] Li H S. *Technology of plant physiology and biochemical*. In: *Principle and Technology of Plant Physiology and Biochemical*[M]. Beijing: Higher Education Press, 2002: 164 - 169.
- [10] Liang Z S. *Environmental Physiology*. In: Li H S eds, *Contemporary Plant Physiology*[M]. Beijing: Higher Education Press, 2003: 293 - 294.
- [11] Zhang Y, Fang L, Li T F, et al. Effect of Ca^{2+} on activities of some enzymes in tobacco seedling under cold stress[J]. *Chinese Bulletin of botany*, 2002, 19 (3): 342 - 347.
- [12] Ma D H, Sun Q X. Effects of temperature stress on membrane protective system of cucumber seedlings[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2001, 21 (4): 656 - 661.

- [13] Garibela P, Christine H F, Philip M. Low temperature-induced changes in the distribution of H_2O_2 and antioxidants between the bundle sheath and mesophyll cells of maize leaves[J]. *J Exp Bot*, 2000, 50: 107 – 113.
- [14] Borman H C, Janshan E. Nicotiana tabacum callus studies X[J]. ABA increase resistance to cold damage. *Physiol Plant*, 1980, 48: 491 – 493.
- [15] Li J S, Geng G D, Cheng Z H. Effects of chilling stress on chill-resistance physiological and biochemical indexes of egg-plant seedlings[J]. *Journal of Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry (Natural science Edition)*, 2003, 31 (1): 90 – 93.
- [16] Wang D M. Physiological basis of tobacco growth, development and quality tobacco formation[M]. In: Zhou J H eds, *Tobacco Physiology and Biochemical*. Hefei: Sci-Tech University of China Press, 1996: 115 – 119.
- [17] H J, Liu H X, Wang Y R, et al. Low temperature and photosynthesis of plants[J]. *Plant Physiology Communications*, 1986, 2: 1 – 6.

Effects of Low Temperature Stress on the Protective Enzymes and Contents of Nitrogen and Carbon Compounds of Tobacco Seedlings

JIN Yan¹, YANG Yu-hong¹, HUA Shui-jin²,
DUAN Yu-qi¹, CHENG Xin-yu³

1. Yunnan Institute of Tobacco Science, Yuxi Yunnan 653100; 2. Zhejiang University, Hangzhou 310029, China;

3. Tobacco Company of Yunnan Qujin, Qujin Yunan 655000, China

Abstract: Changing of membrane permeability, protective enzyme and content of N, C compound were studied under 6°C and 10°C low temperature stress. The results showed that membrane permeability of two tobacco variety seedling increased as the stress temperature decreased and stress time increased. Changing of enzyme activity was that CAT and SOD activity reduced because of the increase of low temperature stress time and decrease of temperature. However, it was contrary to the POD. As regard to the content of protein and proline, the former decreased while the latter increased by low temperature stress. But the changing of proline in leaf was more greatly. Total content of soluble sugar and sucrose accumulated in leaf and content of chlorophyll, chlorophyll b and total chlorophyll reduced due to the damage of chlorophyll corpuscle under low temperature stress.

Key words: low temperature stress; tobacco; protective enzymes; nitrogen and carbon

责任编辑 夏 娟