

李春雷, 倪德江. 氟对幼龄茶树叶绿素含量及抗氧化酶活性的影响[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(5): 1149-1153.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2015.05.032

氟对幼龄茶树叶绿素含量及抗氧化酶活性的影响

李春雷^{1,2}, 倪德江²

(1. 潍坊科技学院, 山东 寿光 262700; 2. 华中农业大学园艺林学学院/园艺植物生物学教育部重点实验室, 湖北 武汉 430070)

摘要: 为了探讨氟对茶树生理的影响, 本试验以 1 年生福鼎大白茶树为试验材料, 采用水培法, 进行氟处理 ($F=16\text{ mg/L}$), 研究氟对茶树叶片叶绿素、类胡萝卜素含量及保护性酶的影响。结果显示, 随着处理时间的延长, 茶树叶片中氟含量显著升高; 氟处理下叶绿素 a、叶绿素 b 及总叶绿素含量均低于对照, 叶绿素 a/b 显著高于对照, 氟对叶绿素 b 的影响大于叶绿素 a, 氟对类胡萝卜素含量影响不显著。氟处理后, 茶树叶片中超氧化物歧化酶 (*SOD*) 活性显著下降, 氟处理 72 h 时比对照下降 22.8%, 比氟处理 0 h 时下降 24.48%; 氟处理后, 茶树叶片中过氧化物酶 (*POD*) 和过氧化氢酶 (*CAT*) 均是先升高后降低, 均是在氟处理 48 h 达到最大值, 其中 *POD* 活性分别比 0 h 及对照 48 h 时增大 31.47% 和 46.51%, *CAT* 活性分别比氟处理 0 h 及对照 48 h 时增大 36.79% 和 30.17%; MDA 和 H_2O_2 含量随着处理时间的延长变化不大。

关键词: 茶树; 氟; 叶绿素; 类胡萝卜素; 抗氧化酶

中图分类号: S571.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2015)05-1149-05

Chlorophyll content and antioxidation of young tea plant exposed to fluoride

LI Chun-lei^{1,2}, NI De-jiang²

(1. Weifang University of Science & Technology, Shouguang 262700, China; 2. College of Horticulture and Forestry Science, Huazhong Agricultural University/Key Laboratory of Horticultural Plant Biology, Wuhan 430070, China)

Abstract: One-year-old cuttings of *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze cv. Fudingdabai were grown hydroponically in order to study the effects of fluoride ($F=16\text{ mg/L}$) on chlorophyll content, carotenoid content and antioxidative enzymes in tea plant. The results showed that the content of leaf fluoride was significantly increased over time. Under fluoride stress, chlorophyll a, chlorophyll b and total chlorophyll were lower while the ratio of chl. a to chl. b was higher than those in control, indicating that fluoride had a more significant effect on chl. b than on chl. a. The carotenoid contents changed little. Superoxide dismutase (*SOD*) activity was reduced by 22.80% 72 h post treatment compared with control and was reduced by 24.48% after 72-h treatment. Peroxidase (*POD*) and catalase (*CAT*) activities reached their maximum at 48 h and declined afterwards. *CAT* activity was 36.79% and 30.17% higher than that at the beginning of the treatment and that of CK 48 h post treatment. The contents of malondialdehyde (MDA) and hydrogen peroxide (H_2O_2) were kept stable over time. *POD* activity was 31.47% and 46.51% higher than that at the beginning of the treatment and that of CK 48 h posttreatment.

Key words: *Camellia sinensis* (L.); fluoride; chlorophyll content; carotenoid; antioxidative enzyme

收稿日期: 2015-01-22

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31400585); 潍坊市科技发展计划项目 (201301151)

作者简介: 李春雷 (1979-), 男, 博士, 副教授, 主要从事茶树栽培生理与生化方面的研究。 (E-mail) ligreentea@aliyun.com

通讯作者: 倪德江, (E-mail) nidj2009@gmail.com

茶树是一种富氟的植物, 每千克成熟叶片中氟含量可达到上千毫克^[1-2], 但生产中茶树未见明显

的氟中毒症状,并且氟也不被认为是茶树生长的必需元素。茶叶中过高含量的氟不仅危害人体健康,引起氟骨症、氟斑牙^[3]等病,也会影响茶树本身的生理生化指标。近年来多项研究结果表明,茶树体内过量的氟不仅会降低茶叶的滋味及香气等品质^[4-6],而且会影响叶绿素合成及光合作用,破坏细胞膜及叶绿体等细胞结构^[7],影响多种酶的活性^[8-9]。近几年已有一些学者从茶树抗氧化系统方面来研究茶树耐氟的原因,但大多研究不同氟浓度对茶树抗氧化性的影响,鲜有氟处理下茶树抗氧化系统的动态响应方面的研究,本研究以福鼎大白茶为试验材料,采用水培法,研究氟处理下茶树抗氧化系统的动态变化及茶树富集氟的特性,为深入研究茶树中氟的毒害及解毒机理提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

本试验幼龄茶树为福鼎大白 1 年生扦插苗,由湖北省农业科学院果茶研究所提供。

1.2 试验设计

试验在华中农业大学实验基地温室中进行。选择生长健壮、长势较一致的茶苗,栽植前洗净茶苗根部,采用营养液培养,其配方为 1/2 Hoagland + Arnon^[10]。在茶苗处理期间每天用 1 mol/L 的盐酸和氢氧化钠调整营养液 pH 为 5.5 ± 0.1 ,每 3 h 通气 1 h,每 5 d 换 1 次营养液。缓苗 10 d 后,以 $F=0$ mg/L 为对照,设置 $F=16$ mg/L(NH_4F) 进行处理,处理 6 h、12 h、24 h、48 h、72 h 后分别收集第 3 片、第 4 片茶苗鲜叶,经液氮快速冷冻后于 -80°C 超低温冰箱贮存备用。

1.3 测定项目及方法

1.3.1 酶液提取 称取 0.500 0 g 去除主脉的鲜叶置于预冷的研钵,加入 0.500 0 g 石英砂和 10 ml 预冷的 pH 为 7.8、含有 0.1 mmol/L EDTA、5% PVP 的 50.0 mmol/L 磷酸缓冲液,置于冰浴上研磨至匀浆,匀浆液于 16 000 r/min (4°C) 离心 15 min,上清液用于测定 SOD、CAT、POD 活性^[11]。

1.3.2 测定方法 叶绿素、类胡萝卜素含量测定参考 Jiang^[12] 的方法。超氧化物歧化酶(SOD)活性、过氧化氢酶(CAT)活性、过氧化氢(H_2O_2)含量均采用试剂盒(南京建成生物工程技术有限公司生产)测定。过氧化物酶(POD)活性的测定采用愈创木酚法^[7]。

丙二醛(MDA)含量采用硫代巴比妥酸法^[13]测定。

1.4 数据分析

采用 Excel 2003 进行数据计算和作图,采用 SAS 分析软件进行 LSD 显著性检验及相关性分析。

2 结果与分析

2.1 茶树叶片中的氟含量

由图 1 可知,随着处理时间的延长,对照茶树叶片中的氟含量变化趋势平稳,加氟处理下随着处理时间的延长茶树叶片中的氟含量显著升高,在 6 h、12 h、24 h、48 h、72 h 分别比 0 h 升高 3.89%、8.55%、6.41%、11.39%、14.68%。加氟处理茶树叶片中的氟含量比对照显著升高,在 6 h、12 h、24 h、48 h、72 h 分别比对照增加 3.09%、10.17%、8.67%、14.27%、13.76%。

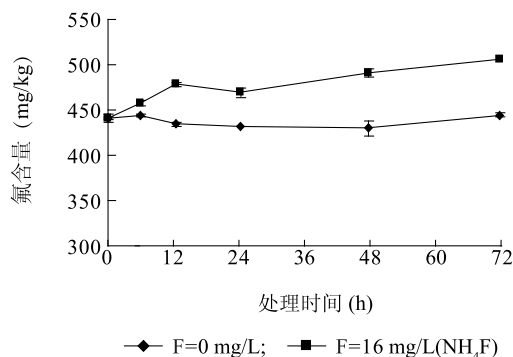


图 1 氟处理下茶树叶片中氟含量变化

Fig. 1 Changes of fluoride content in tea leaves with fluoride treatment

2.2 氟对茶树叶片中叶绿素、类胡萝卜素含量的影响

加氟处理和对照的茶树叶片中叶绿素 a 的含量随着处理时间的延长均呈波浪形变化,在 12 h 和 24 h 时,加氟处理与对照差异显著,其他处理时间,加氟处理与对照差异均不显著(图 2A);叶绿素 b 在加氟处理 6 h 时显著低于加氟处理 0 h,比加氟处理 0 h 时含量降低 16.90%,之后随着时间的延长,叶绿素 b 含量变化趋于平缓,但显著低于对照,加氟处理 6 h、12 h、24 h、48 h、72 h 时分别比对照降低 19.14%、7.01%、22.46%、16.23%、12.66% (图 2B)。这说明在短时间内氟对叶绿素 b 的影响大于对叶绿素 a 的影响。总叶绿素含量的变化趋势与叶绿素 b 的变化趋势相似,在 12 h 时,加氟处理的总

叶绿素含量略高于对照,其他时间均显著低于对照(图2C)。叶绿素 a/b 在加氟处理 6 h 时显著高于加氟处理 0 h,比加氟处理 0 h 时含量高 16.48%,之后随着时间的延长,a/b 变化趋于平缓,但均显著高于对照,加氟处理 6 h、12 h、24 h、48 h、72 h 时分别

比对照增大了 13.88%、11.56%、12.24%、14.43%、14.52%(图2D)。氟对类胡萝卜素含量的影响不显著($P < 0.05$),与对照相比,只是在加氟处理 12 h 时显著高于对照,其他时间均与对照差异不显著(图2E)。

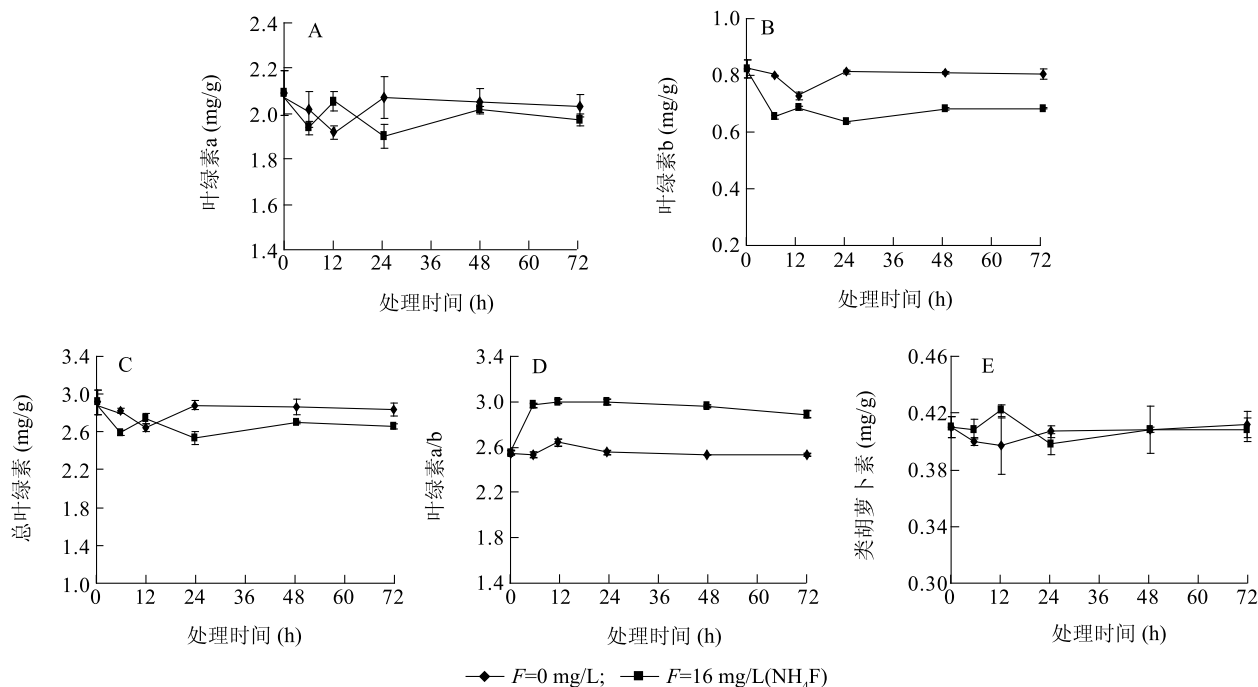


图2 氟处理下茶树叶片中叶绿素及类胡萝卜素含量变化

Fig. 2 Changes of chlorophyll and carotenoid contents in tea leaves with fluoride treatment

2.3 氟对茶树抗氧化酶的影响

超氧化物歧化酶(SOD)是存在于植物细胞中最重要的清除自由基的酶类之一,它的主要功能是清除 O_2^- 的过多积累,缓解逆境对植物体的伤害^[14]。由图3A可知,对照茶树叶片中 SOD 活性随着时间的延长呈波浪形变化,但差异不显著;加氟处理的茶树叶片中 SOD 活性随着时间的延长显著降低,在加氟处理 6 h、12 h、24 h、48 h、72 h 分别比加氟处理 0 h 下降 6.19%、10.44%、12.78%、16.52%、24.48%。加氟处理茶树叶片中 SOD 活性比对照显著下降,在加氟处理 6 h、12 h、24 h、48 h、72 h 茶树叶片中 SOD 活性分别比对照 6 h、12 h、24 h、48 h、72 h 下降 6.8%、14.0%、12.6%、21.2%、22.8%。

图3B和图3C表明,对照茶树叶片中 POD、CAT 活性基本没有变化,加氟处理的茶树叶片中 POD、CAT 活性随着时间的延长均先升高后降低,两者活性均在 48 h 达到最大值。其中加氟处理 48 h 茶树

叶片中 POD 活性分别比加氟处理 0 h 及对照 48 h 高 31.47% 和 46.51%,加氟处理 72 h 时 POD 活性下降,但仍显著高于加氟处理 0 h 的 POD 活性及对照 72 h 时 POD 活性,分别高出 18.3% 和 33.68%;加氟处理 48 h 茶树叶片中 CAT 活性分别比加氟处理 0 h 及对照 48 h 时 CAT 活性增大 36.79% 和 30.17%,加氟处理 72 h 时 CAT 活性下降,但仍显著高于加氟处理 0 h 及对照 72 h 的 CAT 活性,分别高出 29.43% 和 32.35%。

2.4 氟对茶树叶片 MDA、 H_2O_2 含量的影响

MDA 是膜脂过氧化产物,其含量的多少反映细胞膜脂过氧化程度强弱。由图4可以看出,随着时间的延长,加氟处理和对照茶树叶片中的 MDA 含量均呈升高趋势。在 12 h 时,加氟处理的 MDA 含量显著高于对照的 MDA 含量,其他时间加氟处理茶树叶片中的 MDA 含量与对照差异均不显著。说明在短时间内加氟处理的膜脂过氧化反应程度较

弱,未对茶树造成伤害。在加氟处理下, H_2O_2 含量先升后降。在加氟处理 6 h 和 12 h H_2O_2 含量显著

高于对照,加氟处理 24 h 和 72 h H_2O_2 含量与对照无显著差异,这也说明膜质过氧化反应较轻。

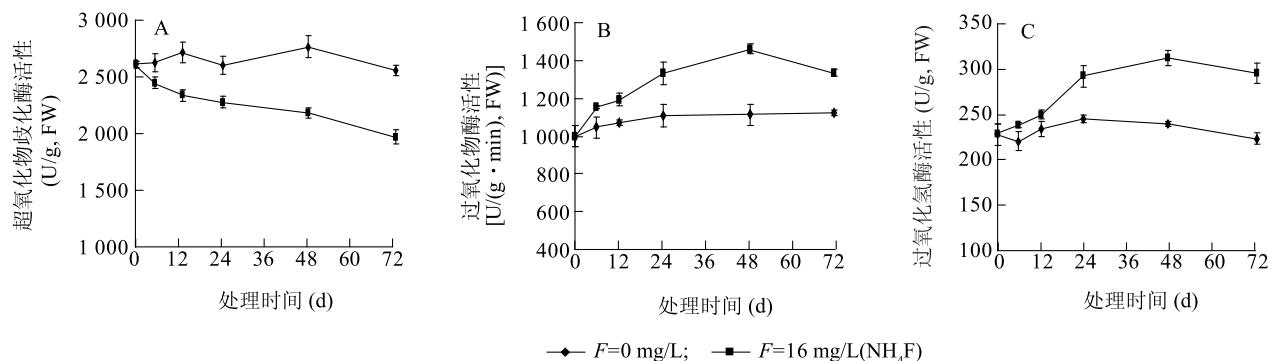


图 3 氟处理下茶树叶片中 *SOD*、*POD*、*CAT* 活性的变化

Fig. 3 Changes of *SOD*, *POD* and *CAT* activities in tea leaves with fluoride treatment

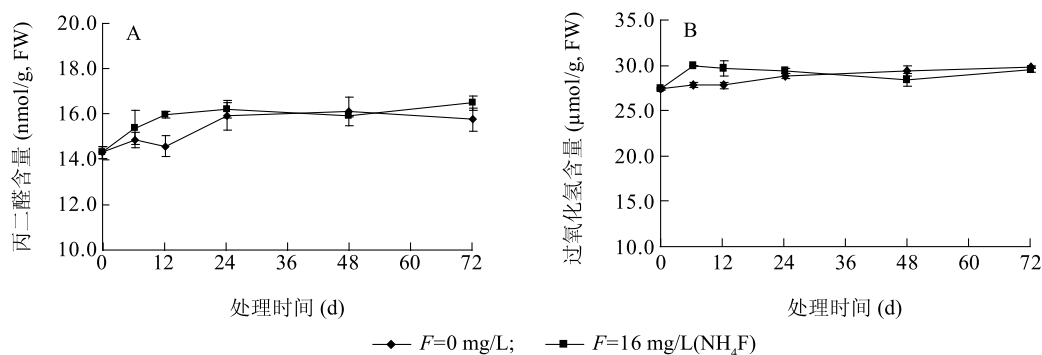


图 4 氟处理下茶树叶片中 *MDA*、 H_2O_2 含量的变化

Fig. 4 Changes of *MDA* and H_2O_2 contents in tea leaves with fluoride treatment

3 讨论

植物抗氧化系统中保护性酶包括 *SOD*、*POD*、*CAT*, 在长期的进化过程中, 这些保护性酶之间相互协调能及时清除植物体内过多的活性氧, 从而使植物免受活性氧的伤害。*SOD* 是植物防御外界伤害的第一道防线, 主要功能是将 O_2^- 歧化为 O_2 和 H_2O_2 [15-16], *POD* 和 *CAT* 将毒害能力更强的 H_2O_2 氧化为无害的 H_2O 。我们前期的研究结果表明, 不同浓度的氟对细胞结构 (叶绿体、线粒体、细胞膜等) 及抗氧化系统产生了较大影响, 在低浓度氟处理下, 抗氧化系统能够通过保护性酶的相互协调清除过量的活性氧, 从而使细胞结构免受其伤害, 在高浓度氟处理下, 活性氧的产生速率超出了保护性酶的清除能力, 致使活性氧积累, 从而造成了细胞结构的破

坏, 这些都说明了抗氧化系统中的保护性酶对氟的积极响应 [7]。在本研究中, 随着处理时间的延长, *SOD* 活性与对照相比显著降低, 说明 *SOD* 活性对氟非常敏感。在不同浓度氟处理茶树的试验中, *SOD* 活性也显示了对氟的敏感性, 我们前期的研究结果显示随着氟浓度的增加 *SOD* 活性显著降低 [7], 李品武等 [17] 的研究结果也表明随着氟浓度的增加名山 131 的 *SOD* 和 *CAT* 活性均逐渐降低, 杜海荣等 [18] 用氟处理玉米发现 *SOD* 活性也随着氟浓度的升高而呈下降趋势。因为 *SOD* 是一种金属酶, 含有 Cu, Zn, Fe, Mn 等金属元素, 氟很可能会与这些金属元素络合而使 *SOD* 失活, 这可能是氟处理下茶树 *SOD* 活性降低的原因之一。*SOD* 活性的降低将导致 O_2^- 清除减慢, 但 O_2^- 还能自动歧化为 H_2O_2 和水, *CAT*、*POD* 将协调清除 H_2O_2 , 将其催化为水。本研究中,

CAT 和 *POD* 均显示了积极作用,随着处理时间的延长两者活性均显著升高,且均比对照显著增加,显示了清除 H_2O_2 的能力,唐茜等^[19]、李品武等^[17]以及我们前期的试验结果^[7]显示,随着氟浓度的增加,*CAT* 活性和 *POD* 活性均先升高后降低。

加氟处理下,叶绿素 a、叶绿素 b 及总叶绿素含量均比对照降低,说明氟影响了叶绿素的合成,本研究的结果显示氟对叶绿素 b 的影响要大于叶绿素 a,而对类胡萝卜素影响不显著。

MDA 含量是衡量膜质过氧化反应程度的重要指标。本研究中 MDA 含量与对照差异不显著,说明氟引起的膜质过氧化反应程度较轻。因此,在短时间(0~72 h)的氟胁迫下,茶树完全能够依靠体内抗氧化系统的保护性酶清除掉多余的活性氧,从而保护茶树不受伤害。

参考文献:

- [1] 陈瑞鸿,梁月荣,陆建良,等. 茶树对氟富集作用的研究[J]. 茶叶,2002,28(4):187-190.
- [2] FUNG K F, ZHANG Z Q, WONG J W C, et al. Fluoride contents in tea and soil from tea plantations and the release of fluoride into tea liquor during infusion[J]. Environ Pollut, 2011, 104: 197-205.
- [3] SOFUOGLU S C, KAVCAR P. An exposure and risk assessment for fluoride and trace metals in black tea[J]. J Hazard Mater, 2008, 158: 392-400.
- [4] LI C L, NI D J. Effect of fluoride on chemical constituents of tea leaves[J]. Fluoride, 2009, 42(3): 237-243.
- [5] LI C L, YANG X, HU J H, et al. Effect of fluoride on aroma of tea leaves[J]. Fluoride, 2013, 46(1): 25-28.
- [6] 王丽霞,汤举红,肖斌,等. 氟对茶树生长、叶片营养元素含量、儿茶素类物质和香气成分的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2014, 20(2): 429-436.
- [7] LI C L, ZHENG Y N, ZHOU J R, et al. Changes of leaf antioxidant system, photosynthesis and ultrastructure in tea plant under the stress of fluoride[J]. Biologia Plantarum, 2011, 55(3): 563-566.
- [8] 王小平,刘鹏,罗虹,等. 铝氟交互处理对茶树生理特性的影响[J]. 园艺学报, 2009, 36(9): 1359-1364.
- [9] 蔡荟梅,董阳阳,陈贵杰,等. 氟胁迫对茶树氟吸收累积特性及生理生化指标的影响[J]. 核农学报, 2014, 28(4): 742-747.
- [10] HOAGLAND D R, ARNON D I. The water culture method for growing plants without soil[J]. Calif Agric Exp Stn Circ, 1950, 347(2): 32.
- [11] 王晶英. 植物生理生化实验技术与原理[M]. 哈尔滨:东北林业大学出版社,2003:82-83.
- [12] JIANG H M, YANG J C, ZHANG J F. Effects of external phosphorus on the cell ultrastructure and the chlorophyll content of maize under cadmium and zinc stress[J]. Environ Pollut, 2007, 147(3): 750-756.
- [13] DHINDSA R S, PLUMB-DHINDSA P, THORPE T A. Leaf senescence: Correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase[J]. J Exp Bot, 1981, 32(1): 93-101.
- [14] BOWLER C, MONTAGU M V, INZE D. Superoxide dismutase and stress tolerance[J]. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1992, 43: 83-116.
- [15] MORAN J F, JAMES E K, RUBIO M C, et al. Functional characterization and expression of a cytosolic iron-superoxide dismutase from cowpea root nodules[J]. Plant Physiol, 2003, 133(2): 773-782.
- [16] LIAU Y J, WEN L, SHAW J F, et al. A highly stable cambialistic-superoxide dismutase from Antrodia camphorata: Expression in yeast and enzyme properties[J]. J Biotechnol, 2007, 31: 84-91.
- [17] 李品武,吴永胜,梁琪惠,等. 氟胁迫对茶树氟积累特性及其生理生化指标的影响[J]. 西南大学学报, 2010, 32(8): 38-42.
- [18] 杜海荣,杨田甜,吕荣芳,等. 氟污染对玉米幼苗生长及生理特性的影响[J]. 农业环境科学学报, 2010, 29(2): 216-222.
- [19] 唐茜,赵先明,杜晓,等. 氟对茶树生长、叶片生理生化指标与茶叶品质的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2011, 17(1): 186-194.

(责任编辑:陈海霞)