

百草枯胁迫对地黄叶片膜脂过氧化相关生理指标的影响

朴仁哲, 赵洪颜, 金玉姬, 林 昊

(延边大学 农学院 吉林 龙井 133400)

摘 要: 研究了百草枯胁迫下对地黄叶片膜脂过氧化相关生理指标影响。结果表明: 在百草枯胁迫下, 地黄叶片相对电导率减小, 丙二醛的含量逐渐降低, 超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)产生的速率逐渐降低, 保护酶(超氧化物歧化酶)SOD 的活性逐渐增加, 抗坏血酸过氧化物酶(APX)活性先增加后降低, 抗氧化剂抗坏血酸(ASA)的含量先降低后增加。从而为百草枯的抗性机理研究提供理论依据。

关键词: 地黄; 百草枯; 膜脂过氧化

中图分类号: S 567.9; S 482.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2008)10-0045-04

活性氧代谢是植物逆境生理活动中重要的代谢过程之一。当植物处于逆境条件下则会加速活性氧的生成, 使其在体内积累, 造成氧化伤害^[1]。百草枯是一种光谱性的除草剂, 它能在绿色植物组织内从光合系统 I 高效接受电子, 产生 $O_2^{\cdot-}$ 。 $O_2^{\cdot-}$ 不但本身对细胞具有毒性, 而且能转化成 $^{\circ}OH$ 与 H_2O_2 等一系列活性氧^[3]。植物对百草枯的抗性与抗氧化自由基清除酶系统的活性有关^[4]。

朴仁哲等^[5] 研究中首次在国内发现地黄对百草枯有较高的抗性。为进一步探讨地黄对百草枯的抗性机理, 以地黄的叶片为试验材料, 研究百草枯胁迫下的膜脂过氧化, 保护酶系(超氧化物歧化酶)SOD、(抗坏血酸过氧化物酶)APX 的活性和抗氧化剂(抗坏血酸)VC 含量的变化及其与地黄叶片对百草枯抗性的关系, 试图为解释百草枯的抗性机理提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

试验于延边大学农学院教学农场和生理生化实验室中进行。供试品种为地黄(85-5), 种子由延边大学农学院中药材研究提供。百草枯 Sigma 公司生产。

1.2 处理方法

利用展开的地黄和稗草叶片, 用打孔器打出直径为 8 mm 的小圆叶后, 准确称取 1 g, 加入到 20 mL 浓度为 0、10、100 $\mu\text{mol/L}$ 的百草枯溶液中且使叶片完全浸入到百草枯溶液中, 3 次重复。将试管放在 25 $^{\circ}\text{C}$, 光照度 125

$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 培养室内。胁迫时间分别是 0、3、6、12、24 h (胁迫时, 首先放置胁迫 24 h 的地黄叶片, 之后分别是 12、6、3、0 h 的地黄叶片), 测定各项生理指标。

1.3 各生理指标的测定方法

丙二醛(MDA)含量的测定参照李合生的方法^[6], 用硫代巴比妥酸(TBA), 以 $\mu\text{mol/g FW}$ 表示 MDA 含量; 超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)产生速率的测定参照王爱国的方法^[7], 根据与羟胺反应时间和蛋白质的含量, 求得产生速率 ($\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ 蛋白); 超氧化物歧化酶(SOD)活性测定^[8], 采用氮蓝四唑光化还原法测定; 抗坏血酸过氧化物酶(APX)活性测定, 参照 NaKano 等方法测定^[8]。抗坏血酸(ASA)含量的测定, 参照 Graham 和 Annette 的方法测定^[9]。蛋白质含量的测定参照 Bradford 的方法^[10]。

2 结果与分析

2.1 对地黄叶片细胞膜透性和丙二醛含量的影响

百草枯胁迫对地黄、稗草细胞膜透性的结果见图 1。百草枯胁迫后随着时间的推移, 地黄和稗草的电导率逐渐提高, 在处理 3~6 h 地黄和稗草的电导率差异不大, 从 6 h 开始稗草的电导率急速增长, 到 48 h 后达到 453 us/cm ; 但地黄只有 273 us/cm , 而且地黄和稗草对照的电导率一直处于同一水平下。表明地黄叶细胞膜破坏的很少, 对百草枯具有很高的抗性。

丙二醛是膜脂发生过氧化反应的产物, 也是细胞膜损伤程度的标志性物质, 同时它的含量与膜脂过氧化程度呈正相关^[11]。地黄叶片 MDA 含量随着百草枯胁迫时间增加逐渐降低, 而且降低幅度特别显著, 虽然在百草枯胁迫 3 h, MDA 的含量瞬间高于对照, 这可能是在百草枯胁迫 3 h, 地黄叶片刚刚启动膜脂的过氧化。由于 MDA 的进一步代谢或与其它成分结合, 或者是与不同组织器官脂质组分的差异有关^[12]。在百草枯胁迫

第一作者简介: 朴仁哲(1964), 男, 吉林延边人, 博士, 副教授, 现主要从事作物栽培与植物逆境生理研究工作。E-mail: prjys@ybu.edu.cn.

基金项目: 延边大学 州校合作资助项目。

收稿日期: 2008-04-23

24 h 后,地黄叶片在 $10 \mu\text{mol/L}$ 的浓度水平下,和对照相比降低 85.89%。这说明地黄叶片的脂质过氧化反应,减轻了活性氧对膜结构和功能的破坏,保护了细胞膜系统的完整性,提高了地黄叶片对百草枯的抗性(见图 2)。

2.2 百草枯胁迫对地黄叶片 O_2^- 产生速率和 SOD 活性的影响

植物组织对百草枯胁迫的抗性均与活性氧清除系统酶的活性尤其是关键 SOD 的活性呈正相关^[13]。 O_2^- 是 O_2 接受一个电子后形成的活性氧产物,可以自发地或在 SOD 的作用下歧化为 H_2O_2 和 O_2 。 O_2^- 的含量变化将会影响膜脂的损伤程度。随着百草枯胁迫时间的延长

地黄叶片超氧阴离子产生的速率明显增加。说明百草枯胁迫后,植物体内细胞产生激发态的电子,从而产生游离的百草枯(paraquat $^{+ \cdot}$),游离基被大气中分子氧氧化产生活性氧。百草枯胁迫 24 h 后,10、100 $\mu\text{mol/L}$ 地黄叶片超氧阴离子产生的速率远远低于对照超氧阴离子产生的速率。以上说明地黄叶片 SOD 的清除能力逐渐增强,所以地黄叶片 SOD 的活性逐渐增加,10、100 $\mu\text{mol/L}$ 地黄叶片的 SOD 的活性分别比对照高 66.8%、63.1%,这与前人研究的结果相一致^[14-15]。表明膜脂过氧化受到抑制,缓解了百草枯胁迫对地黄叶片膜脂的损伤,提高地黄叶片对百草枯的抗性(见图 3、4)。

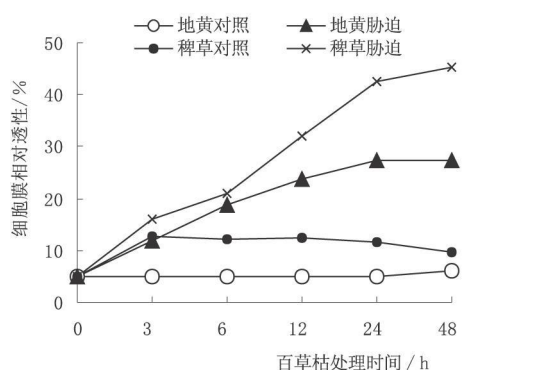


图 1 百草枯胁迫对地黄叶片细胞膜透性的影响

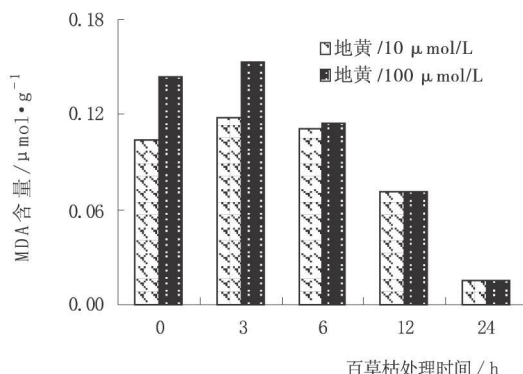


图 2 百草枯胁迫对地黄叶片 MDA 含量的影响

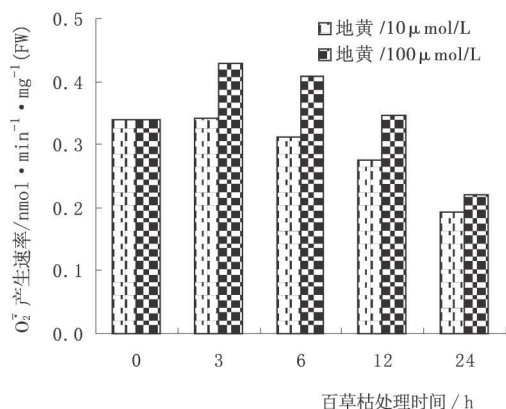


图 3 百草枯胁迫对地黄叶片 O_2^- 产生速率的影响

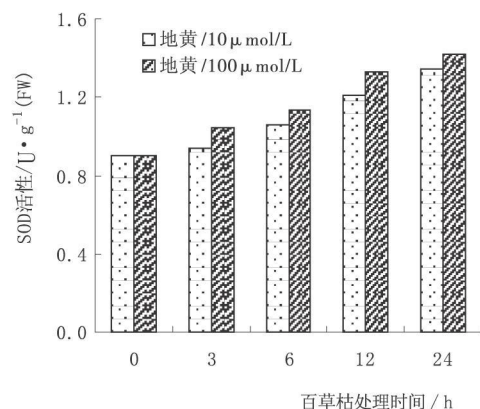


图 4 百草枯胁迫对地黄叶片 SOD 活性的影响

2.3 百草枯胁迫对地黄叶片 ASA 含量和 APX 活性的影响

抗坏血酸在植物体内含量十分丰富,它在植物抗氧化胁迫和调节细胞生长发育中具有重要的作用^[16]。还原型抗坏血酸是植物体内一种重要的小分子抗氧化物质,它可以通过抗坏血酸过氧化物酶的催化作用或者本身直接与 H_2O_2 反应,在被氧化为脱氢抗坏血酸的同时,将 H_2O_2 还原为 H_2O ,从而降低植物细胞的 H_2O_2 的积

累,减轻由此引起的氧化胁迫^[17]。由图 5、6 可知,在 10、100 $\mu\text{mol/L}$ 百草枯胁迫 24 h 后,地黄叶片抗坏血酸的含量均比对照高 9.0%、9.4%。地黄叶片 APX 活性比对照降低 44.3%、38.2%。而在百草枯胁迫 6 h,ASA 的含量达到最低值,APX 的活性最高。表明此时 APX 还原 H_2O_2 ,使大量的 ASA 氧化成 DHASA (氧化型抗坏血酸),减轻了百草枯对地黄叶片的氧化胁迫,提高了地黄叶片的抗性。此结论在前人的研究中得到证实^[14]。

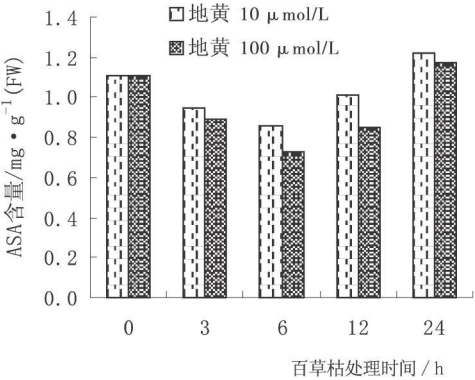


图5 百草枯胁迫对地黄叶片 ASA 含量的影响

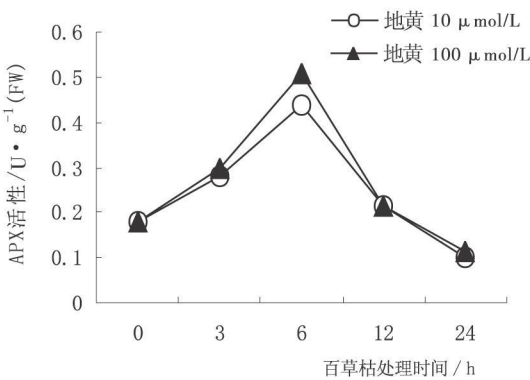


图6 百草枯胁迫对地黄叶片 APX 活性的影响

3 讨论

逆境引起的自由基的累积与膜伤害有密切关系。大量的研究表明,植物在逆境胁迫过程中,会产生过剩的自由基,其毒害之一就是引发或加剧膜脂过氧化作用。膜脂过氧化作用的中间产物自由基和最终产物 MDA 都会严重损伤生物膜。百草枯是光谱除草剂,在叶绿体和线粒体中诱导 O₂⁻ 产生, O₂⁻ 对细胞具毒害作用,还能转化成 H₂O₂ 与 ·OH, ·OH 是极具有破坏力的活性氧,是膜脂过氧化的启动者^[18-19]。指出 O₂⁻ 产生的速率与膜脂过氧化及膜透性呈极显著的关系。研究在不同浓度的百草枯胁迫下能使地黄叶片 O₂⁻ 产生的速率、电导率、MDA 的含量维持在较低水平,说明百草枯胁迫条件下,细胞膜系统受破坏小,地黄对百草枯有很高的抗性。

逆境胁迫可破坏活性氧产生与清除之间的平衡,导致植物体内活性氧的积累。百草枯可诱导氧化胁迫,植物组织对百草枯的抗性与组织所具有的活性氧清除系统的活性密切相关^[20]。已经有报道表明:植物体内 SOD 水平与抗百草枯能力间存在着正相关性。在小球藻中证实 SOD 有拮抗百草枯毒害作用^[21]。SOD 活性强,间接说明了细胞内具有高水平的 O₂⁻。对 O₂⁻ 的直接测定证明了这一点(图3)。该试验的研究结果与前人的结果相一致,这是地黄叶片抗百草枯的主要原因之一。ASA 是植物体内重要的抗氧化剂,在活性氧的清除系统中有重要的地位。它们通过 Halliwell-Asada 途径或直接清除 H₂O₂,并与¹O₂、O₂⁻、·OH 反应清除活性氧的毒害作用。抗坏血酸过氧化物酶(APX)能清除 H₂O₂ 且与 H₂O₂ 有很高的亲和力。从该研究结果来看,地黄叶片 APX 的活性,在百草枯胁迫 6 h 后活性逐渐降低恢复到对照的水平。而地黄叶片 ASA 的含量逐渐增加,在百草枯胁迫 24 h ASA 的含量达到最大值(图5)。表明在百草枯胁迫的前期 APX 的活性起到了显著的作用,后期 ASA 在地黄叶片对百草枯抗性中起到重要的作用。所以推测地黄的叶片中有很强的抗氧化活性的物质有待进一步的

研究。

百草枯的抗性机理十分复杂。Fuerst 和 Vaughn 指出对抗百草枯产生的抗性至少有 5 种不同的机理^[22]。但是,没有一种机理已经是被证明作为唯一的百草枯抗性机理。相反,更多每一种抗性机理可能实施在不同属和种类之内。所以地黄叶片对百草枯抗性机理的其它的原因有待进一步的分析。

参考文献

[1] Elstner E, Osswald F W. Mechanism of oxygen activation during plant stress [J]. Proceedings of Royal Society of Edinburgh, 1994, 10(B): 131-154.

[2] Foyer C H, Lelandais M, Kunert K J. Photooxidative stress in plant [J]. Physiol Plant, 1994, 92: 696-717.

[3] 武宝环, Mitchell E D, Johnson B L, 等. 野生种花生叶片内超氧化物歧化酶及其抗 paraquat 特性[J]. 植物生理与分子生物学学报, 1990, 16 (2): 53-58.

[4] Cakmak J, Marschner H. Magnesium deficiency enhances resistance to paraquat toxicity in bean leaves [J]. Plant cell and Environment, 1992, 15: 955.

[5] 朴仁哲, 吴明根, 崔成姬. 地黄、稗草对百草枯耐性差异的研究[J]. 特产研究, 2002, 24(4): 12-15.

[6] 李合声. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2001, 164-261.

[7] 王爱国, 罗广华. 植物的超氧化物自由基与羟胺反应的定量关系[J]. 植物生理学通讯, 1990, 26(6): 55-57.

[8] Nakano Y, Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts [J]. Plant Cell Physiol, 1981, 22: 867-886.

[9] 中国科学院上海植物生理研究所, 上海市植物生理学会编. 现代植物生理学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 315-316.

[10] Bradford M M. A rapid and sensitive method for quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding [J]. Anal Biochem, 1976, 72: 248-254.

[11] Corbineau F, Gay-Mathieu G, Vinel D. Decrease in sunflower seed viability caused by high temperatures as related to energy metabolism, membrane damage and lipid composition [J]. Physiol Plant, 2002, 116: 489-496.

[12] 蒋明义, 郭绍川. 水分亏缺诱导的氧化胁迫和植物的抗氧化作用[J]. 植物生理学通讯, 1996, 32(2): 144-150.

[13] 许长成, 樊继莲, 邹琦, 等. 水稻对百草枯和一些环境胁迫的交叉抗性[J]. 作物学报, 1996, 22(3): 358-361.

- [14] Pyon J Y, Piao R Z, Roh S W. Occurrence and distribution of *Erigeron Canadensis* L. biotypes resistant to paraquat in Korea[J]. Korea J. Weed Sci. 2001, 21: 27-32.
- [15] Shaaltiel Y, Gressel J. Multienzyme oxygen radical detoxifying system correlated with paraquat resistance in *Conyza bonariensis*[J]. Pestic Biochemistry Physiology, 1986, 26: 22-28.
- [16] 宋凤鸣, 郑勇, 葛秀春. 活性氧及膜脂过氧化在植物病原物互作中的作用[J]. 植物生理学通讯, 1996, 32(5): 377-381.
- [17] Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt K V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review[J]. Ann. Bot., 2003, 91: 179-194.
- [18] Malan C, Greyling M M, Gressel J. Correlation between Cu and Zn superoxide dismutase and glutathione reductase and xenobiotic stress tolerance in maize inbreds[J]. Plant Sci., 1990, 69: 157-166.

- [19] Mishra N P, Mishra P K, Singhal G S. Changes in the activities of antioxidant enzymes during exposure of intact wheat leaves to strong visible light at different temperatures in the presence of protein synthesis inhibitors[J]. Plant Physiol., 1993, 120: 903-911.
- [20] Bowler C, Van Montagu M. Superoxide dismutase and stress tolerance[J]. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1992, 43: 83-116.
- [21] Rabinowitch H D, Clarc D A, Crapo J D, et al. Positive correlation between superoxide dismutase and resistance to paraquat toxicity in the green alga *Chlorella sorokiniana*[J]. Arch. Biochem. Biophys., 1983, 225: 640-648.
- [22] Fuerst E P, Vaughn K C. Mechanism of paraquat resistance[J]. Weed Technology, 1990, 4: 150-156.

Effect of Paraquat Stress on Physiological Indexes Related with Membrane Lipid Peroxidation of *Rehmanniae* Lesves

PIAO Ren-zhe, ZHAO Hong-yan, JIN Yu-ji, LIN Hao

(College of Agronomy, Yanbian University, Longjing, Jilin 133400 China)

Abstract: The effect of Paraquat stress on physiological indexes related with membrane lipid peroxidation of *rehmanniae* Lesves. The result showed that *rehmanniae* leaves of the relative conductivity, the malondialdehyde(MDA) content and the O_2^- production rate decreased, the superoxide dismutase (SOD) activity increased, the ascorbate peroxidase (APX) activity increased first, then declined considerably, the ascorbic acid (ASA) content declined first, then increased considerably after the paraquat stress were treated with different concentrations and hours. And the research result provided the theories basis for *rehmanniae* leaves resistance paraquat.

Key words: *Rehmanniae*; Paraquat; Membrane lipid peroxidation

欢迎订阅《温室园艺》杂志(月刊)

温室设施与园艺栽培相结合的专业期刊

《农业工程技术·温室园艺》是由农业部规划设计研究院、中国农业工程学会主办的科普性期刊,由《农业工程技术》杂志社出版,《温室园艺》编辑部编辑。

主要内容: 温室工程技术, 温室管理与维护技术, 温室栽培与管理(设施花卉、蔬菜、果木), 品种视窗, 基质与肥料, 采后加工技术, 最新政策导向, 设施园艺科研动态, 设施园艺市场动态和技术交流等。

主要读者群体: 花卉种植者、蔬菜种植者、育苗企业、温室及配套设备供应商、政府农业主管部门、科研与教育机构、技术推广组织等。

本刊为月刊, 每月5日出版, 16开本, 彩色印刷。定价每册10元, 全年120元。邮发代号: 82-133, 全国各地邮局(所)及编辑部均可订阅。

敬 请 赐 稿 !

地址: 北京市朝阳区麦子店街41号4层(100125) 信箱: magazine@cngreenhouse.com; sub@cngreenhouse.com
电话: 010-65929445 87006567 87006568 传真: 010-65922393 网址: www.horticulture.cn