

除草剂苯噻草胺胁迫对水稻活性氧清除系统的影响

张承东, 韩朔睽, 张爱茜

(南京大学环境科学系污染控制与资源化国家重点实验室, 江苏 南京 210093)

摘要: 采用室内培养实验方法, 对水稻幼苗的多项生理生化指标进行了测定。结果表明: 随着除草剂苯噻草胺浓度的升高, 水稻株高变矮, 根长缩短; 蛋白质、叶绿素和 GSH 含量应激升高。活性氧·O₂⁻、H₂O₂ 和膜脂过氧化产物 MDA 的含量增加, 组织自氧化速率增大, 表明苯噻草胺对水稻幼苗的毒害作用主要是破坏了体内的活性氧平衡。水稻叶片中的 CAT 酶, 根中的 SOD 和 POD 酶对苯噻草胺的浓度比较敏感。SOD 与 MDA 含量呈显著正相关, 提示了抗氧化酶清除活性氧的作用滞后于活性氧对膜脂过氧化的诱导作用。

关键词: 苯噻草胺; 水稻; 活性氧清除系统

中图分类号: X503. 231 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000 – 0267(2001)06 – 0410 – 03

Effect of Herbicide Mefenacet on Response of Active Oxygen Scavenging System in Rice Plant

ZHANG Cheng-dong, HAN Shuo-kui, ZHANG Ai-qian

(Department of Environment Science, State Key Laboratory of Pollution Control and Reuse, Nanjing University, Nanjing 210093 China)

Abstract: Effects of mefenacet on response of active oxygen scavenging system in rice plant were studied. The results showed that mefenacet could cause shorten of height and root length of the plant. Contents of protein, chlorophyll and GSH were increased with the concentration of mefenacet. The contents of active oxygen, lipid oxidation products MDA and autooxidation rate were also enhanced, revealing that balance of active oxygen in the body of rice plant had been disturbed. The activities of antioxidant enzymes were induced by stress of the herbicide. CAT in leaves was sensitive to change of mefenacet, but SOD and POD in roots were more sensitive. SOD showed good relativity with the contents of MDA, which indicated that the process of scavenging active oxygen dropped behind the process of lipid oxidation induction.

Keywords: mefenacet; paddy rice; scavenging system of active oxygen

随着丁草胺、二氯喹啉酸等除稗剂长期大量的使用, 作物遭受药害的问题已日益显露。苯噻草胺(2 – (1, 3 – 苯并噻唑 – 2 – 氧基) – N – 甲基乙酰替苯胺, mefenacet) 因具有在水层中分散性好, 施药适期长, 对萌芽至三叶期稗草均有效等特点, 作为一个应用前景较好的替代品种目前在我国已投入工业化生产。已有观察表明, 苯噻草胺在农田中如施用不当, 对水稻的毒害很重, 成苗率极差^[1]。

通常植物在逆境胁迫下会产生高度反应性的氧自由基(ROS), ROS 在细胞中引起生物膜的过氧化损伤, 造成叶绿体与线粒体等细胞器的功能损害, 最终

导致细胞凋亡^[2]。相应地, 植物体内也有一套复杂的活性氧清除系统来保护植物细胞免受活性氧的损伤^[3]。活性氧清除系统包括低分子量的抗氧化剂如谷胱甘肽、辅氨酸等, 以及抗氧化酶类如过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)和超氧化物歧化酶(SOD)等。植物体内活性氧的清除能力可能是植物抗逆境的一个关键因子^[4]。

本文在控制条件下, 较系统地研究了苯噻草胺对水稻幼苗的毒害及对水稻体内活性氧清除系统的影响, 为深入研究除草剂在作物体内的代谢、积累过程奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

收稿日期: 2001 – 01 – 13

基金项目: 国家自然科学基金项目(29877012)

作者简介: 张承东(1976—), 女, 南京大学环境科学系硕士研究生。

水稻品种:先优 507。苯噻草胺,纯度 98%。

1.2 方法

1.2.1 选取饱满的种子,用 2% 的 HClO 消毒。浸种后置于垫有纱布的托盘中于 30 ℃ 萌发,每天换水两次,培养长至一叶一心时移入含苯噻草胺浓度为 0、0.5、1.0、2.0、4.0 mg · L⁻¹ 的 Holand 培养液中。每盆种 9 株,每个试验组设 5 个平行样。每 2 d 更换 1 次培养液,水稻幼苗一直保持叶绿生长,7 d 后取样测定,对每个试验组的各种指标测量值取平均。

1.2.2 株高和根长的测定

测量在苯噻草胺不同浓度胁迫下水稻的株高和根长。

1.2.3 叶绿素含量的测定

称取 0.5 g 鲜重叶片加入 4.5 mL 蒸馏水匀浆,再加入 20 mL 丙酮,研磨至组织无绿色,提取液用丙酮湿润的滤纸过滤,定容至 50 mL。参照文献[5]的方法测定叶绿素含量。

1.2.4 蛋白质含量的测定

用考马斯亮蓝 G-250 法^[6]测定叶片蛋白质含量,以牛血清作标准溶液。

1.2.5 超氧负离子 · O₂⁻ 产生速率的测定

称取 0.5 g 鲜重水稻根,加入 3 mL 65 mmol · L⁻¹ 磷酸缓冲液(pH 7.8)研磨匀浆,离心 1 200 r · min⁻¹ × 20 min,取上清液参照文献[7]的方法测定 · O₂⁻ 产生速率。

1.2.6 H₂O₂ 含量的测定

称取 0.5 g 鲜重叶片,加入 5 mL 冷丙酮研磨提取。按照文献[8]的方法测定 H₂O₂ 含量。

1.2.7 膜脂过氧化产物 MDA 和组织自氧化速率的测定

称取 0.5 g 鲜重叶片,加入 pH 7.5 的 50 mmol · L⁻¹ 磷酸缓冲液 6 mL,于冰浴中研磨提取,参照文献[9]测定 MDA 含量及组织自氧化速率。

1.2.8 谷胱甘肽 GSH 含量的测定

称取 0.5 g 鲜重叶片加 3 mL 0.1 mol · L⁻¹ EDTA 溶液,匀浆。然后在匀浆中加入 HClO₄,使其最终浓度为 0.3 mol · L⁻¹,离心 10 000 r · min⁻¹ × 15 min,上清液参照文献[10]测定 GSH 含量。

1.2.9 超氧化物歧化酶 SOD 活性测定

分别称取 1 g 鲜重叶和根,加入 5 mL 62.5 mmol · L⁻¹ (pH 7.8)的磷酸缓冲液(含适量 PVP)于冰浴上研磨,于 4 ℃ 离心 5 000 r · min⁻¹ × 20 min,上清液为酶液。参照文献[11]的方法分别测定水稻叶与根

中 SOD 酶活性。

1.2.10 过氧化物酶 POD 活性的测定

酶液制备同 SOD,测定方法参照文献[12]。

1.2.11 过氧化氢酶 CAT 的活性测定

酶液制备同 SOD,测定方法参照文献[13]。

2 结果与讨论

2.1 水稻株高和根长的变化

苯噻草胺对水稻株高和根长有十分明显的抑制作用,见图 1、图 2。生长在高浓度苯噻草胺培养液中的水稻根部发黑。苯噻草胺作为除草剂主要作用于稗草的根、芽生长点原基,抑制细胞的分裂和伸长,导致茎、叶和根部的生长点异常膨大,最终整株死亡。与此同时也抑制了水稻幼苗的生长。

图 1 苯噻草胺对株高的影响

Figure 1 Effect of mefenacet on height of rice plant

图 2 苯噻草胺对根长的影响

Figure 2 Effect of mefenacet on root length of rice plant

2.2 叶绿素含量的变化

随着苯噻草胺浓度升高水稻叶片变得浓绿,出现滞绿现象^[14]。在试验浓度范围内叶绿素含量增加了 1.0—2.7 倍,表明在苯噻草胺胁迫下叶片衰老过程中,叶绿素的降解与叶片中其它物质的降解途径并非偶联,彼此之间有相对独立性。

2.3 蛋白质含量的变化

叶片中蛋白质含量与苯噻草胺浓度有较好的正相关($r=0.89$)关系。在苯噻草胺 1 mg · L⁻¹ 浓度以下,蛋白质含量平均增加 0.18 倍;2 mg · L⁻¹ 浓度以上平均增加 0.84 倍。蛋白质含量的升高是植物对逆境的应答,是一种非特异性反应。已有研究报道植物

暴露于 H_2O_2 后至少可以诱导 30 种蛋白质的合成^[21]。

2.4 $\cdot\text{O}_2^-$ 产生速率和 H_2O_2 含量的变化

$\cdot\text{O}_2^-$ 伤害植物的机理之一是参与启动膜脂过氧化反应或与膜脂作用。 H_2O_2 虽不是自由基,但其具有强氧化性,也是可以造成氧毒害的活性氧之一。水稻体内 $\cdot\text{O}_2^-$ 产生速率和 H_2O_2 含量均随苯噻草胺浓度 (C) 升高而升高,并具有下列回归关系: $\cdot\text{O}_2^- = 0.54 + 0.98C$, $\text{H}_2\text{O}_2 = 0.81 + 0.58C$, 其相关系数分别为 0.98 和 0.99。试验结果表明,苯噻草胺被水稻吸收后诱导了活性氧的增加,破坏了细胞内活性氧代谢的平衡。这与 Charles F Babbs 等人所研究的除草剂百草枯的杀草机理相类似^[16]。

2.5 MDA 含量与组织自氧化速率变化

MDA 是植物细胞膜脂过氧化作用的最终产物,是膜系统受伤害的重要标志之一。组织自氧化速率越大,MDA 积累越多,膜系统受损程度越高。随苯噻草胺浓度升高,MDA 含量增加了 0.17、1.20、2.25、2.02 倍;组织自氧化速率增加了 0.03、0.84、1.60、2.34 倍。MDA 含量升高,自氧化速率加快说明苯噻草胺引发或加剧膜脂过氧化。

通过回归分析,MDA 还分别与 $\cdot\text{O}_2^-$ 、 H_2O_2 含量呈正相关 ($r = 0.73$, $r = 0.86$),提示在苯噻草胺胁迫下水稻体内产生的活性氧参与了对膜系统的伤害,这种伤害是通过诱导膜脂过氧化来完成的。

2.6 GSH 含量的变化

GSH 是植物体内抗氧化剂之一,GSH 含量的高低反映植物体内抗氧化系统的强弱,与除草剂在植物体内的代谢过程密切相关。试验结果表明,水稻叶中的 GSH 含量随苯噻草胺浓度 (C) 升高而升高,其回归关系为: $\text{GSH} = 1.58 + 0.32C$,相关性非常好 ($r = 0.98$)。根据 I. K. Smith 等人的研究结果^[17],GSH 通过系列反应将 H_2O_2 还原为 H_2O ,降低了 H_2O_2 的含量,从而使植物免受 H_2O_2 的毒害。本试验中 H_2O_2 却与 GSH 有较好的正相关性 ($r = 0.97$),提示可能还存在 H_2O_2 刺激 GSH 含量升高的途径。

2.7 SOD 酶、POD 酶和 CAT 酶活性的变化

SOD、POD 和 CAT 是植物体内活性氧清除系统的抗氧化酶。SOD 酶清除 $\cdot\text{O}_2^-$, 将其歧化为 O_2 和 H_2O_2 ,POD、CAT 则催化 H_2O_2 形成 H_2O 。这 3 种酶均能有效减少 $\cdot\text{O}_2^-$ 和 H_2O_2 的积累,阻止活性氧启动膜脂的过氧化作用。

苯噻草胺进入水稻体内激发了活性氧清除系统,

诱导 SOD、POD、CAT 酶活性升高(因蛋白质含量随苯噻草胺浓度升高而升高,所以酶活性按试样的鲜重计算)。如图 3 所示,水稻叶中 SOD 酶和 POD 酶的活性随着苯噻草胺浓度的升高呈显著上升趋势。但是,苯噻草胺浓度达到 $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,CAT 的活性转而被抑制,CAT 活性变化呈单峰曲线,提示苯噻草胺的胁迫作用超过了水稻自身的应激限度。可能正是在高浓度苯噻草胺作用下 CAT 酶活性的降低,导致了水稻体内大量 H_2O_2 的积累。水稻根中的情况则相反,在 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时苯噻草胺对 SOD 酶和 POD 酶有最大刺激作用,酶活性分别增加了 0.33 倍和 0.18 倍; $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度以上的苯噻草胺对这两种酶活性均有抑制作用。根中 CAT 酶活性随苯噻草胺浓度升高而升高,但只及叶中的 $1/6$ — $1/8$ 。这个现象提示了水稻根和叶中防御系统的解毒过程可能不同,叶中的 CAT 对活性氧胁迫比较敏感,而在根中 SOD 和 POD 酶比较敏感。

图 3 苯噻草胺对酶活性的影响

Figure 3 Effect of mefenacet on enzyme activities

值得提出的是,很多研究认为 SOD 活性与植物体内 MDA 含量呈负相关^[18],但在本试验中 SOD 与 MDA 呈正相关 ($r = 0.94$)。这个结果表明,在苯噻草胺胁迫下抗氧化酶 SOD、POD、CAT 的活性虽然明显升高,但植物体内仍积累了大量活性氧,提示酶清除活性氧自由基的作用滞后于活性氧自由基对膜脂氧化的诱导。

3 结论

(1)就外观指标看,随着苯噻草胺浓度的升高,水稻株高变矮,根长变短,当苯噻草胺浓度高达 $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,植株严重损伤。

(2)蛋白质含量的升高是水稻对苯噻草胺胁迫产生的非特异性应激反应,而叶绿素含量的反常增加则可能发生了滞绿突变。

(3)水稻体内的活性氧 $\cdot\text{O}_2^-$, H_2O_2 , 膜脂过氧化

(下转第 416 页)