

乙酰水杨酸对镍胁迫下水稻幼苗中 O_2^- 水平和膜脂过氧化的影响

王海华¹ , 帕尼古丽² , 蒋明义¹ , 康健¹ , 彭喜旭¹

(1. 湘潭师范学院生物系, 湖南 湘潭 411201; 2. 新疆石河子大学农学院农科系, 新疆 石河子 832003)

摘要: 采用室内培养及生理指标测定方法, 研究了乙酰水杨酸对镍胁迫下水稻幼苗中部分生理指标的影响。结果表明, $10\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $30\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的镍胁迫下, 稻苗叶片中 SOD 活性明显降低, 质外体中的 NADH 氧化酶活性显著上升; 同时, 细胞中总 O_2^- 和质外体中 O_2^- 产生明显加快, 从而导致叶片组织中 MDA 含量和质膜透性亦明显增加。同样胁迫条件下, 加入 0.05% ASA, SOD 活性回升, O_2^- 产生速率回落, MDA 含量和质膜透性增加的程度亦减小, 但乙酰水杨酸 (ASA) 对质外体中 NADH 氧化酶活性无明显影响。这些结果提示 O_2^- 产生与积累导致的膜脂过氧化作用介导了镍对稻苗的毒害; ASA 能降低 O_2^- 产生速率, 减轻膜脂过氧化损伤程度, 因而缓解了镍胁迫对稻苗的毒害。

关键词: 镍胁迫; 水稻; 乙酰水杨酸; O_2^- ; 膜脂过氧化

中图分类号: S131.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000 – 0267(2001)03 – 0148 – 04

Effects of Acetosalicylic Acid on Levels of Superoxide Anion and Peroxidation of Membrane Lipid in Rice Seedlings Under Nickel-Stress

WANG Hai-hua¹ , PANI Gu-li² , JIANG Ming-yi¹ , KANG Jian¹ , PENG Xi-xu¹

(1. Department of Biology, Xiangtan Normal College, Xiangtan Hunan 411201 China;

2. Shihezi University, Xinjiang 832003 China)

Abstract: Two stress concentrations of nickel tested ($10, 30\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) significantly decreased superoxide dismutase (SOD) activity in rice leaves, while enhanced NADH oxidase activity significantly in apoplast. Measurement of O_2^- , malondialdehyde(MDA), relative electric conductivity showed that there was a significantly increase in both total O_2^- generation rate and that of apoplast, as well as in MDA content and the plasma membrane permeability after nickel treatment. Addition of 0.05 % acetylsalicylic (ASA) to the same nickel stress condition decreased the rate of decline in SOD activity, and that of increase in O_2^- generation, MDA content and the plasma permeability observed in rice leaves treated with nickel alone. However, no changes in apoplast NADH oxidase activity were observed. The results suggested that O_2^- accumulation and membrane lipid peroxidation were involved in the toxicity to rice seedlings led by nickel, and the decline in O_2^- level and membrane lipid peroxidation were the reasons by which ASA mitigated the injuries induced by nickel stress in rice seedlings.

Keywords: nickel stress; rice; acetosalicylic acid; O_2^- ; membrane lipid peroxidation

镍是近 20 年来才确定的植物的一种必需微量元素, 适量的镍促进植物胚胎发育、种子萌发、氮素分配与利用^[1]。镍同时也是一种重金属, 过量的镍会对植物造成毒害。目前, 绝大部分工作仍集中在镍作为必需微量元素对植物生长发育有益的生理效应等方面, 而很少注意植物镍毒、毒害的生理机制以及如何减轻毒害。业已证明, 植物的许多(重)金属毒害如镉

毒^[2]、铁毒^[3]、铝毒^[4]与活性氧代谢平衡破坏、自由基积累及膜脂过氧化作用密切相关, 提示从活性氧代谢角度研究镍胁迫下植物的一些生理变化, 可能有利于揭示植物镍毒的生理机制。乙酰水杨酸 (acetosalicylic acid, ASA) 是水杨酸(SA)的衍生物, 研究^[5]表明, 它具有清除 O_2^- 的作用。本文就镍胁迫下水稻幼苗叶片中有关 O_2^- 代谢酶活力、 O_2^- 水平的动态变化以及膜脂过氧化作用和 ASA 对上述生理指标的影响进行探讨, 为揭示植物镍毒的生理机制, 以及如何减轻镍对作物的毒害, 提高作物产量及农业环境保护提供理论依据。

收稿日期: 2000 – 10 – 15

基金项目: 湖南省教委重点课题(97A15)资助

作者简介: 王海华(1969—), 男, 湘潭师范学院生物系讲师, 硕士, 从事植物抗性生理学的教学与科研。

1 材料与方法

1.1 水稻幼苗的培养及处理

湘晚籼 15-1 由湖南农科院水稻所提供。种子经 0.1% HgCl₂ 消毒 15 min, 充分漂洗后, 28 ℃ 下浸种、催芽。播种于 19 cm × 14 cm 的尼龙网架上, 在人工气候室中用木村 B 液培养至 2 叶 1 心期。光强 50 μmol · m⁻² · s⁻¹, 光照 10 h · d⁻¹, 温度 28 ℃ (昼)/20 ℃ (夜), 相对湿度为 80%。分别用含 10 μmol · L⁻¹ Ni(NO₃)₂、30 μmol · L⁻¹ Ni(NO₃)₂、10 μmol · L⁻¹ Ni(NO₃)₂ + 0.05% ASA、30 μmol · L⁻¹ Ni(NO₃)₂ + 0.05% ASA 的木村 B 液处理。取第 2 叶进行各项生理指标测定。重复 3 次。

1.2 生理指标的测定

超氧化物歧化酶 (SOD) 活性按王爱国等^[6]的方法测定。质外体的制备和 6-磷酸葡萄糖脱氢酶 (G6PDH) 抽提、酶活性测定均按 Reimers 等^[7]的方法。计算同一处理中质外体 G6PDH 与细胞总 G6PDH

活性之比, 以判断质外体受细胞质污染的程度。质外体 NADH 氧化酶活性测定按 Charles 等^[8]的方法。以每分钟变化 0.01 个 A₃₄₀ 所需酶量为 1 个活力单位。O₂⁻ 产生速率的检测按王爱国等^[9]介绍羟胺氧化法进行。丙二醛 (MDA) 含量测定按 Dhindsa 等^[10]的方法。叶片质膜透性参照朱诚等^[11]的方法。相对电导率 = 叶片煮沸前电导率 / 煮沸后电导率 × 100%。

2 结果与分析

2.1 ASA 处理对镍胁迫下稻苗叶片中酶活性的影响

培养在含 10 μmol · L⁻¹ 和 30 μmol · L⁻¹ 的镍的营养液中的稻苗, 出现叶尖枯死、叶片发黄、稻心伸长、根生长受抑等镍毒症状 (资料未列出), 说明此时的稻苗已处于镍胁迫下。

从图 1A 可以看出, 对照的 SOD 活性随时间略有上升, 在 4 d 内, 上升了 3.5%。除处理后第 1 d 外, 10 μmol · L⁻¹ 和 30 μmol · L⁻¹ 的镍能明显抑制 SOD 的活性, 统计分析表明, 均与对照有显著差异 (P

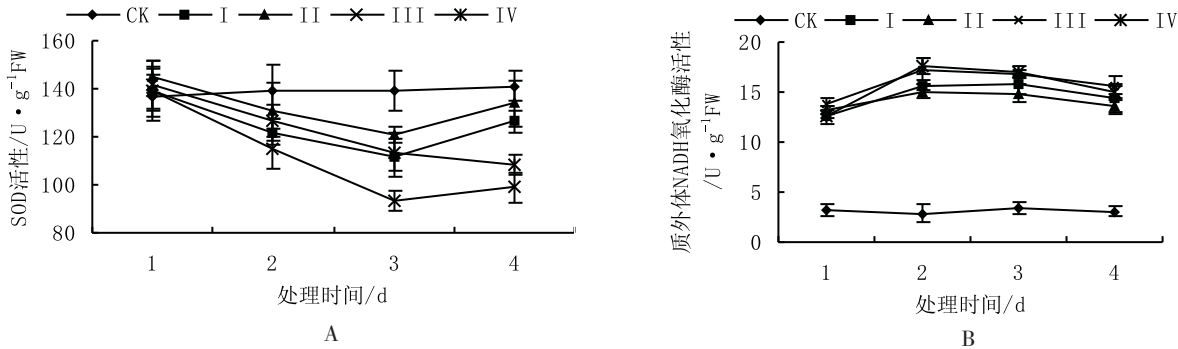


图 1 ASA 对镍胁迫下的 SOD 和质外体 NADH 氧化酶活性的影响

Figure 1 Effects of ASA on activity of SOD and NADH oxidase under nickel - stress

CK: 木村 B 液; I: 10 μmol · L⁻¹ Ni(NO₃)₂ + 木村 B 液; II: 0.05% ASA + 10 μmol · L⁻¹ Ni(NO₃)₂ + 木村 B 液; III: 30 μmol · L⁻¹ Ni(NO₃)₂ + 木村 B 液; IV: 0.05% ASA + 30 μmol · L⁻¹ Ni(NO₃)₂ + 木村 B 液; 下同

<0.05 或 0.01)。在处理第 3 d, 两种浓度的镍使稻苗叶片中 SOD 活性至最大降幅, 分别比对照下降了 20.2% 和 32.8%。推测镍胁迫第 1 d 稻苗叶片中 SOD 活性升高是镍诱发 O₂⁻ 的一种应急反应。0.05% ASA 加入胁迫体系后, SOD 活性下降的趋势有所缓解, 表明 ASA 能提高稻苗叶片中 SOD 的活性。

对照的质外体 NADH 氧化酶活性较低。镍胁迫下, 此酶的活性明显升高, 在各处理时间, 30 μmol · L⁻¹ 的镍对酶活性的促进程度均比 10 μmol · L⁻¹ 的镍大, 两者均在处理后第 2 d 达最大升幅, 提示 NADH 氧化酶较 SOD 对镍胁迫更敏感, 酶活性分别比对照上升了 437.9% 和 496.6%, 与对照有极显著差异 (P

<0.01)。ASA 对镍胁迫下稻苗叶片中的 NADH 氧化酶的活性的作用无明显规律, 且总体上变化不大 (图 1B)。

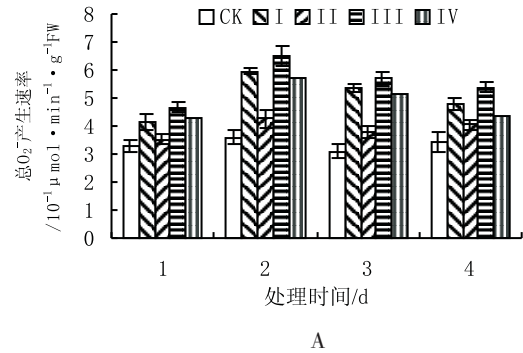
G6PDH 是细胞质中的标志酶, 本实验中检测了所制备的质外体和细胞中总 G6PDH 的活性, 发现各处理下稻苗叶片细胞的质外体中 G6PDH 活性不超过总活性的 2.3% (数据未列出), 说明所制备的质外体受细胞质污染程度较小, 纯度较高。

2.2 ASA 对镍胁迫下 O₂⁻ 产生速率的影响

镍胁迫能显著加快稻苗叶片中 O₂⁻ 产生速率, 胁迫浓度愈高, O₂⁻ 产生速率增大程度愈大, 处理后 1—4 d, 10 μmol · L⁻¹ 和 30 μmol · L⁻¹ 的镍使稻苗叶片

中总O₂⁻产生速率分别提高了 51.4% 和 66.3% (平均而言, 图 2A), 两者处理后 2—3 d, O₂⁻产生速率均维持在较高水平, 到第 4 d 有所缓和, 但仍分别达对照的 140.8% 和 158.1%。0.05% ASA 能缓解镍造成的 O₂⁻产生加快, 较 10 μmol · L⁻¹ 和 30 μmol · L⁻¹ 的镍单独处理来说, O₂⁻产生速率分别下降了为 15.0% — 29.5% 和 8.2%—19.5%。

镍胁迫亦能明显提高稻苗叶片细胞质外体中O₂⁻



产生速率, 提高的幅度与镍处理的浓度成正相关, 均在处理后第 3 d 达最大值, 分别为对照 6.6 倍和 9.0 倍。相同胁迫条件下, 加入 0.05% ASA, 质外体中O₂⁻产生速率均低于镍单独处理(图 2B)。SOD 主要存在于叶绿体、线粒体、胞质中, 质外体很少发现有 SOD 活性^[12], 因此 ASA 降低质外体中O₂⁻水平, 可能仅由于它直接清除O₂⁻的能力^[5]。

2.3 ASA 对镍胁迫下稻苗叶片中 MDA 含量和质膜透

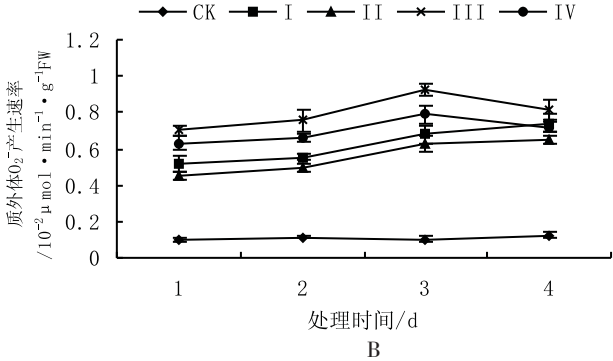


图 2 ASA 对镍胁迫下稻苗叶片中O₂⁻ 产生速率的影响
Figure 2 Effects of ASA on O₂⁻ produced from young rice seedling leaf under nickel - stress

性的影响

镍胁迫条件下稻苗叶片的 MDA 含量比对照明显提高, 且 30 μmol · L⁻¹ 的镍胁迫较 10 μmol · L⁻¹ 增加的幅度大, MDA 的最大积累时间在胁迫的第 3—4 d, 比O₂⁻产生速率达最大的时间推迟了约 1 d, 说明

O₂⁻ 积累可能是 MDA 含量上升的原因, 此时胁迫下的稻苗叶片中 MDA 含量较对照增加了 1—2 倍, 与对照比均达到了 $P < 0.01$ 的极显著差异。相同胁迫条件下加入 0.05% ASA, 幼苗叶片中 MDA 含量均低于镍处理(图 3A)。镍胁迫引起稻苗叶片相对电导率明显

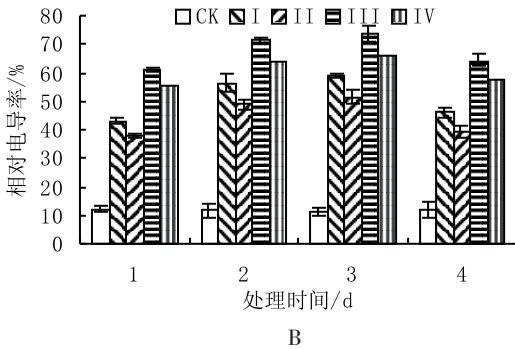
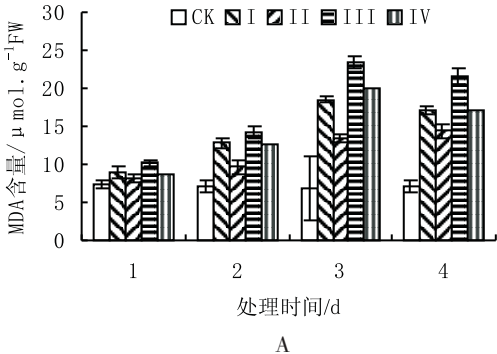


图 3 ASA 对镍胁迫下稻苗叶片中 MDA 含量和质膜透性的影响
Figure 3 Effects of ASA on MDA contents and permeability of lipid membrane in young rice seedling leaf under nickel - stress

增大, 加入 ASA 后, 叶片相对电导率均有不同程度的降低, 变化规律与镍胁迫基本一致(图 3B)。上述结果表明 ASA 能够降低镍胁迫对细胞质膜的伤害, 从而缓解了镍毒害。

3 讨论

植物体内活性氧的水平取决于其产生和降解之

间的动态平衡。当外界条件发生变化, 这种平衡可能会打破, 由此导致的活性氧积累和膜脂过氧化损伤是需氧生物遭受逆境的重要特征, 这已在许多(重)金属胁迫下得到了证实。我们的实验表明, 镍胁迫下稻苗叶片中O₂⁻产生速率明显增大, MDA 含量和质膜透性也明显升高, 说明此时的稻苗已遭受较严重的氧化胁迫, 进一步证实了活性氧积累和膜脂过氧化

作用可能是许多(重)金属毒害植物的机制之一的结论。ASA 是水杨酸的衍生物,在植物体内经过芳香酯酶的催化,水解成水杨酸,具有与水杨酸类似的作用^[13]。研究表明,水杨酸能激活 SOD 活性^[14]。因此可以推测,ASA 激活镍胁迫下稻苗叶片中 SOD 酶活性,可能是最终通过其水解产物——水杨酸而起作用。体外实验证明和通过体内实验间接推断,ASA 具有直接的清除 O_2^- 的作用,同时亦能通过提高水分亏缺下小麦叶片中 SOD 活性,降低 O_2^- 水平,从而避免或减缓水分亏缺对小麦的伤害^[5]。本实验表明,同样胁迫条件下加入 ASA,能明显降低 O_2^- 产生速率和稻苗叶片膜脂过氧化程度,这可能与 SOD 活性升高和 ASA 本身的清除作用有关。

绿色植物中, O_2^- 的产生部位主要是叶绿体中光合电子传递和线粒体呼吸电子传递链^[15,16],另外质膜 ES 面(靠质外体侧)也是 O_2^- 产生的位点之一^[17]。NADH 氧化酶参与了此过程。它是一类过氧化物酶的同工酶,以 NADH 和 H_2O_2 为底物,形成的 $\cdot NAD$ 将电子转移给 O_2 ,产生 O_2^- 。Charles 等^[8]证明质外体中存在此酶活性,其底物之一 NADH 靠跨膜的苹果酸-草酰乙酸穿梭系统提供。我们检测的结果表明,镍能刺激稻苗叶片质外体 NADH 氧化酶的活性,而 ASA 对酶活性无明显影响,提示镍通过提高此酶活性,加速胞外 O_2^- 产生速率(尽管胞外 O_2^- 水平比细胞中总 O_2^- 水平低一个数量级),是细胞中总 O_2^- 含量升高的一方面原因;同时表明 ASA 不能通过调节 NADH 氧化酶活性去影响植物体内 O_2^- 水平。另外, Mn^{2+} 可刺激 NADH 氧化酶催化的反应,那么同属于过渡金属的二价镍离子是否通过相似的机制来促进 NADH 氧化酶活性,值得探讨。

虽然 O_2^- 能否作为膜脂过氧化的直接启动者,尚有不同看法,但它作为膜脂过氧化作用的介导者是肯定的。 O_2^- 和 H_2O_2 通过 Harber-Weiss 反应转化成更攻击性的 $\cdot OH$,直接启动脂质过氧化作用。镍胁迫下,稻苗叶片组织中 H_2O_2 (未发表的资料)和 O_2^- 大量产生,表明此时具有发生 Harber-Weiss 反应的物质条件,在疏水膜区隔附近产生 $\cdot OH$,启动膜脂过氧化,导致质膜透性增大。统计分析表明,不同浓度镍处理下稻苗叶片中 MDA 含量、质膜透性与 O_2^- 产生速率之间有如下回归方程: $y(\text{相对 MDA 含量}) = -59.1708 + 1.8230x(\text{相对 } O_2^- \text{ 产生速率}), r = 0.8315^{**}, df = 14 (* *: p < 0.01); y(\text{相对电导率}) = -30.9605 + 3.4816x(\text{相对 } O_2^- \text{ 产生速率}), r =$

$0.8778^{**}, df = 14$ 。这表明 O_2^- 积累是膜脂过氧化和质膜透性增大的原因, O_2^- 积累和膜脂过氧化介导了镍对稻苗的毒害。ASA 能促进 SOD 的活性,降低 O_2^- 产生速率,因而减轻了膜脂过氧化和质膜损伤程度,缓解了镍胁迫对水稻幼苗的毒害,提示在考虑其它因素的情况下,可通过施用 ASA 减轻镍污染(如工业废水)土壤作物的毒害,达到提高作物产量的目的。

参考文献:

- [1] 扶惠华,王煜,田延亮. 镍在植物生命活动中的作用[J]. 植物生理学通讯,1996,32(1): 45-49.
- [2] 黄玉山,罗广华,关紫文. 镉诱导植物的自由基过氧化损伤[J]. 植物学报,1997,9(6): 522-526.
- [3] 胡彬,吴平,廖春燕,等. 水稻依赖抗坏血酸 H_2O_2 清除系统在抗铁毒中的作用[J]. 植物生理学报,1999,25(1): 43-48.
- [4] 张芬琴. 铝胁迫与小麦叶片的内肽酶活性及活性氧的产生[J]. 农业环境保护,2000,19(2): 79-81.
- [5] 姜晶,张宪政. 水分亏缺下乙酰水杨酸清除小麦幼苗中 O_2^- 的研究[J]. 植物生理学通讯,2000,36(1): 33-35.
- [6] 王爱国,罗广华,邵从本,等. 大豆种子超氧化物歧化酶的研究[J]. 植物生理学报,1983,9(1): 77-83.
- [7] Reimers P J, Guo A, Leach J E. Increased activity of a cation peroxidase associated with an incompatible interaction between *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and rice (*oryza sativa*) [J]. *Plant Physiol*, 1992,99: 1044-1050.
- [8] Charles S B, Ian R, Mansfield J W. Localized changes in peroxidase activity accompany hydrogen peroxide generation during the development of a nonhost hypersensitive reaction in lettuce [J]. *Plant Physiol*, 1998, 117: 1103-1114.
- [9] 王爱国,罗广华. 植物的超氧化自由基与羟胺反应的定量关系[J]. 植物生理学通讯,1990,39(6): 55-57.
- [10] 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: 92-101.
- [11] 朱诚,曾广文,郑新华. 超干花生种子耐藏性与脂质过氧化作用[J]. 作物学报,2000,26(2): 235-238.
- [12] Bowler C, Van Montagu M, Inze D. Superoxide dismutase and stress tolerance [J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1992,43: 83-116.
- [13] Raskin I. Role of salicylic acid in plant [J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1992, 43: 439-463.
- [14] 李德红,潘瑞炽. 水杨酸在植物体内的作用[J]. 植物生理学通讯,1995,31(2): 144-149.
- [15] Asada K. Chloroplasts: formation of active oxygen and its scavenging [J]. *Methods Enzymol*. 1984,10: 422-429.
- [16] Del Rio L A, Sandalio L M, Palma J M et al. Metabolism of oxygen radicals in peroxisomes and cellular implications [J]. *Free Rad Biol Med*, 1992,13: 557-580.
- [17] Rubinstein B, Luster D G. Plasma membrane redox activity: components and role in plant process [J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1993,44: 131-155.