

外源活性氧清除剂对玉米植株涝害的缓解*

晏 斌

戴秋杰

(江苏省农业科学院农业生物遗传生理研究所, 南京 210014)

摘 要 五种活性氧清除剂分别喷施 4 叶期玉米幼苗, 均使受渍玉米叶片的叶绿素含量显著提高, $O_2^{\cdot -}$ 产生速率和 H_2O_2 浓度明显下降, 而谷胱甘肽和抗坏血酸含量增加。这种效应以处理后期(第 5 天)和老叶(第 2 叶)较为明显, 但各清除剂之间的差异较小。表明各种活性氧清除剂单独使用皆能缓解受渍玉米的涝害, 从而增强玉米的抗涝性。试验结果为活性氧参与玉米的涝渍伤害过程提供了证据, 也为应用化学调控手段减轻玉米涝害的可能性提供了理论依据。

关键词: 玉米 涝渍 活性氧 活性氧清除剂

逆境下植物体内活性氧的产生是不可避免的。已相继报道, 诸多逆境伤害与体内活性氧代谢失衡从而导致活性氧毒害有关。因此, 如何降低活性氧对生物体的毒害, 已成为减缓植物逆境伤害和提高抗逆性的一条重要途径。实验表明, 应用外源活性氧清除剂可在一定程度上防护植物因 $SO_2^{[6]}$, $O_3^{[13]}$, 和 $NO_2^{[3]}$ 引起的损伤。李建坤等发现活性氧清除剂可显著降低受渍玉米丙二醛含量, 并提高活性氧保护酶活性。而活性氧是否参与对涝渍玉米的伤害, 目前仍缺乏直接的证据。本文通过外施各种类型的活性氧清除剂, 研究它们对受渍玉米活性氧($O_2^{\cdot -}$ 、 H_2O_2) 含量, 以及非酶促保护系统(抗坏血酸, 谷胱甘肽)的影响, 旨在进一步验证玉米的涝渍伤害与活性氧代谢的关系, 并为应用化学控制手段防护涝害提供理论依据。

1 材料和方法

玉米 (*Zea mays* L.) 品种黄早四种子经灭菌消毒后, 在 30℃ 恒温箱内浸种发芽, 按汪宗立等^[4]所述双套盆钵方法, 在可控光温的生长室内培养。生长条件为: 昼夜温差 30/20℃, 苗顶光强 $0.3 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-2}$, 每日照光 10 h。植株生长至 4 叶期开始淹水和喷施药剂处理。共选用 5 种活性氧清除剂, 其中 8-羟基喹啉 (8-HQ) 为超氧自由基 ($O_2^{\cdot -}$) 的清除剂, 苯甲酸钠 (SB) 为羟基自由基 ($\cdot \text{OH}$) 清除剂, 生育酚 (Vit E) 为单线态氧 ($^1 \text{O}_2$) 的猝灭剂, 抗坏血酸 (AsA) 和还原态谷胱甘肽 (GSH) 则兼具清除 H_2O_2 、 $O_2^{\cdot -}$ 和 $\cdot \text{OH}$ 等多种活性氧的作用。活性氧清除剂的使用浓度、配制和喷施方法均参见李建坤等^[2]的方法, GSH 的浓度为 1000mg/L。取倒数第 2 叶和第 4 叶片测试。

超氧自由基 ($O_2^{\cdot -}$) 产生速率的测定 取 1.0 g 鲜重的叶片用 3 ml 65mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.8) 研磨, 经四层纱布过滤, 滤液在 5000×g 离心 10 min。取 1 ml 上清液按王爱国和罗

广华^[1]方法测定 $O_2^{\cdot-}$ 产生速率。以 NO_2^- 作标准曲线。

H_2O_2 含量的测定 取 1 g 鲜重叶片加入 4 ml 冷丙酮提取, 取 1ml 提取液按 Patterson 等^[12]方法测定 H_2O_2 含量。

AsA 含量的测定 按 Arakawa 等^[7]方法。

GSH 含量的测定 取 0.5g 鲜重的叶片加入 5ml 5% 的三氯乙酸, 在充分研磨后, 16000×g 离心 10 min, 取上清液, 参照 Ellman^[8]方法, 以 5, 5-二硫代双(乙-硝基甲酸)(DTNB)显色, 测定波长 412 nm 下的光密度。用 GSH 作标准曲线。

2 结果

2.1 活性氧清除剂对受渍玉米叶片叶绿素含量的影响

淹水后无论是下部老叶(第 2 叶)还是上部幼叶(第 4 叶), 叶绿素含量均明显下降。老叶的下降幅度大于幼叶, 处理早期(第 3 天)大于后期(第 5 天), 喷施 5 种活性氧清除剂都可减缓这种下降。从图 1 还看到, 喷后 3 天的叶绿素含量不仅高于淹水处理, 而且略大于或相当于对照, 在喷施第 5 天, 各清除剂能够使受渍叶片的叶绿素含量增加 45%~55% (第 2 叶), 并达到极显著水平 ($P < 0.01$), 第 4 叶增加 9%~14%。说明各种活性氧清除剂在单独作用时, 对涝害的缓解效应大体相似。

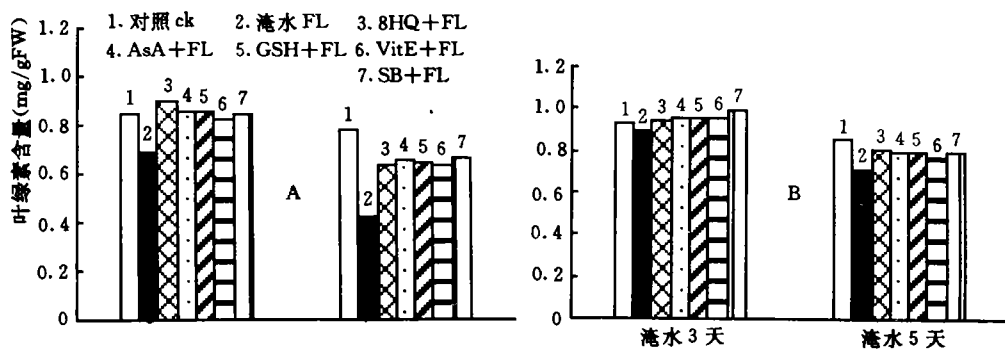


图 1 外源活性氧清除剂对受渍玉米叶片叶绿素含量的影响

A: 第 2 叶; B: 第 4 叶

2.2 活性氧清除剂对受渍玉米叶片 $O_2^{\cdot-}$ 产生速率和 H_2O_2 含量的影响

图 2 表明, 淹水导致玉米第 2 叶 $O_2^{\cdot-}$ 产生速率上升, 处理第 5 天的增幅显著大于处理第 3 天。在喷施活性氧清除剂后, 受渍叶片的 $O_2^{\cdot-}$ 产生速率被降低, 喷施效果随时间的延长而增大。到处理第 5 天, 以 8-HQ 最为明显, $O_2^{\cdot-}$ 产生速率下降 30.5%, 达到显著水平 ($P < 0.05$), 而其它清除剂使 $O_2^{\cdot-}$ 产生速率也下降 13%~20%。

与 $O_2^{\cdot-}$ 产生速率一样, 淹水也引起了玉米第 2 叶 H_2O_2 含量的显著增高, 但增加幅度不及 $O_2^{\cdot-}$ 。喷施活性氧清除剂之后, 受渍叶片 H_2O_2 含量的变化也与 $O_2^{\cdot-}$ 相似, 直到第 5 天才见 H_2O_2 浓度明显降低, 各类清除剂之间效果相差较小 (图 3)。

2.3 活性氧清除剂对受渍叶片 AsA 和 GSH 含量的影响

AsA 和 GSH 为植物体内存在的两种非酶促活性氧清除物质, 淹水可导致玉米第 2 叶这

两种物质含量下降。但喷施活性氧清除剂使受渍叶片的 AsA 含量 (图 4) 和 GSH 含量 (图 5) 均提高, 其中喷施 AsA 和 GSH 之后, 体内的 AsA 和 GSH 含量还高于各自的对照。而其它清除剂之间相差不明显, 与未喷的受渍叶片相比, AsA 上升幅度在 11%~19% 之间, GSH 的上升幅度则为 10%~13%。

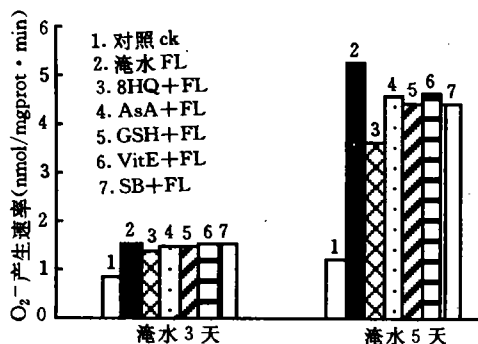


图 2 外源活性氧清除剂对受渍玉米叶片 O_2^- 产生速率影响

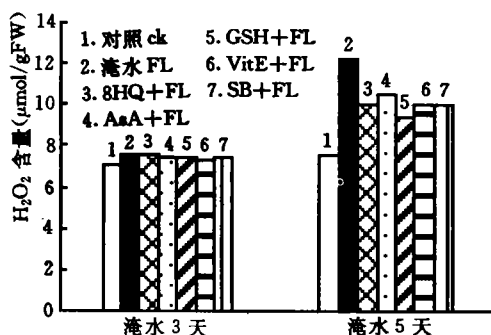


图 3 外源活性氧清除剂对受渍玉米叶片 H_2O_2 含量的影响

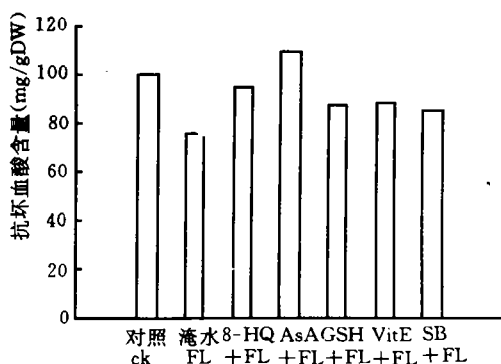


图 4 外源活性氧清除剂对受渍玉米叶片抗坏血酸含量的影响

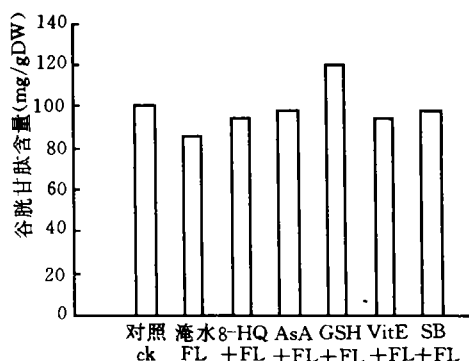


图 5 外源活性氧清除剂对受渍玉米叶片谷胱甘肽含量的影响

3 讨论

植物体内过剩活性氧的毒害之一是引发和加剧膜脂过氧化作用, 从而导致质膜受损, 直到植株死亡^[5,11]。在涝渍逆境下, 玉米叶片叶绿素的降解和膜脂过氧化产物 MDA 的增生平行变化, 并伴随着体内活性氧保护酶 SOD 和 CAT 活性显著下降^[4], 这些均反映出玉米受涝害过程中活性氧毒害的生理生化特征。据报道, 外源活性氧清除剂可显著降低受涝玉米叶片的膜脂过氧化, 提高 SOD 和 CAT 活性^[2]。从本试验结果进一步看到, 各类活性氧清除剂均使受渍玉米叶片叶绿素含量显著增加 (图 1), 并明显减少 O_2^- 产生速率和 H_2O_2 的积累 (图 2, 3), 表明外加活性氧清除剂能够缓解涝渍引起的伤害。但它们的作用随处理时间和叶位而异, 处理后期大于处理初期, 老叶大于幼叶。这可能是由于: 在处理初期或幼叶上, 活性氧浓度增长缓慢, 此时活性氧清除剂的效果较小; 而在处理后期或老叶, 活性氧产生速率剧增, 活性氧清除剂则可以清除体内一部分过剩的活性氧, 也即减缓活性氧的毒害。因此, 这些活性氧

清除剂在植株体内能产生上述持续的效应。

各种活性氧均可导致生物体受损,但活性氧是否参与玉米的涝渍伤害,目前尚缺乏直接的实验证据。汪宗立等^[4]从保护酶活性的变化上间接证明活性氧与玉米涝害有关。本试验表明,淹水后玉米叶片 $O_2^{\cdot -}$ 和 H_2O_2 都显著积累;而降低的活性氧 ($O_2^{\cdot -}$ 和 H_2O_2) 浓度,能减缓玉米叶片的涝害,并提高非酶促活性氧保护物质 AsA 和 GSH 的含量 (图 4, 5)。这些结果一方面为活性氧参与涝渍伤害提供了依据,另一方面说明涝渍伤害过程中的活性氧毒害是复杂的,由于各清除剂单独使用都能增强玉米抗涝性,提示各种类型的活性氧都有可能参与玉米涝渍伤害过程。而各种活性氧的产生或清除又是相互促进和相互制约的^[9,10],其中某一环节被改变将会影响活性氧代谢,导致活性氧产生和清除之间的平衡失调。如果活性氧的清除速率大于产生速率,则体内活性氧毒害将减弱。因此可以认为,应用外源活性氧清除剂是通过直接清除和间接提高活性氧清除能力两个方面的作用来降低植物体内活性氧产生的数量。本试验还证实,通过外源化学调控手段,筛选有效适用的抗氧化剂,可成为克服或缓解玉米涝害的技术途径。

参 考 文 献

- 1 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.植物生理学通讯,1990 (6): 55~57
- 2 李建坤,汪宗立,王志霞.活性氧清除剂对受渍玉米叶片保护酶活性的影响.江苏农业学报,1991, 7 (3): 23~28
- 3 李犁,余叔文. NO_2 对菠菜的伤害机理的研究.植物生理学报,1988, 14 (3): 263~286
- 4 汪宗立,刘晓忠,李建坤等.玉米的涝渍伤害与膜脂过氧化作用和保护酶活性的关系.江苏农业学报, 1988, 4 (3): 1~8
- 5 陈少裕.膜脂过氧化对植物细胞的伤害.植物生理学通讯,1991, 27 (2): 84~90
- 6 谭常,刘愚,李振国等.植物对二氧化硫的反应和抗性研究. VII 自由基清除剂对 SO_2 伤害的保护作用.环境科学报,1981, 1 (3): 197~206
- 7 Arakawa Net al. A rapid and sensitive method for the determination of ascorbic acid using 4, 7-diphenyl, 10-phenanthroline. Agri Biol Chem, 1981, 45 (2): 1289~1290
- 8 Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. Arch Biochem Biophys, 1959, 82: 70~77
- 9 Elstner EF. Oxygen activation and oxygen toxicity. Ann Rev Plant Physiol, 1982, 33: 73~96
- 10 Fridovich I. The biology of oxygen radicals. Science, 1970, 201: 875~880
- 11 Kellogg EW and Fridovich EF. Superoxide, hydrogen peroxide, and singlet oxygen in lipid peroxidation by a xanthine oxidase system. J Biol Chem, 1975, 250: 8812 ~8817
- 12 Patterson BD, MacCrae EA, Ferguson IB. Estimation of hydrogen peroxide in plant extracts using titanium (IV). Anal Biochem, 1984, 139: 487~492
- 13 Sakaki T et al. Breakdown of photosynthetic pigments and lipids in pinach leaves with ozone fumigation: Roles of active oxygen. Physiol Plant, 1983, 59: 28~14

Ameliorative Effects of Exogenous Active Oxygen Scavengers on Waterlogging Injury of Corn Leaves

Yan Bin

Dai Qiujie

(Institute of Agrobiological Genetics and Physiology, Jiangsu Academy
of Agricultural Sciences, Nanjing 210014)

Abstract Waterlogging is one of the major stress factors limiting summer corn (*Zea mays* L.) production. This study was conducted to determine whether exogenous active oxygen scavengers ameliorated the detrimental effects of waterlogging on H_2O_2 , chlorophyll, ascorbic acid (AsA), glutathione (GSH) contents, and $O_2^{\cdot-}$ production rate of corn plants grown in the greenhouse. Five scavengers, i. e. 8-hydroxyquinoline (8-HQ), AsA, GSH, α -tocopherol (VitE) and sodium benzoate (SB), were sprayed on the leaves at the beginning of waterlogging treatment. The parameters mentioned above were measured at the 3rd and 5th day after the treatment. These scavengers obviously decreased $O_2^{\cdot-}$ production rate and H_2O_2 content, significantly increased chlorophyll content and non-enzymatic antioxidants (AsA, GSH) concentrations. The profound effects of scavengers were found in the old leaf (2nd leaf) and at the later stage (5th day) of the treatment. The results suggested that scavengers can lessen corn waterlogging injury probably caused by oxyradicals. Ameliorative effects of exogenous active oxygen scavengers provided an evidence for alleviating waterlogging damage to corn plants through chemical application.

Key words: Corn; Waterlogging; Active oxygen; Active oxygen scavengers