水杨酸对铜胁迫下水稻幼苗膜脂过氧化作用的影响

丁佳红,薛正莲,杨超英

(安徽工程大学,安徽 芜湖 241000)

摘要:为了探讨水杨酸在缓解重金属胁迫中的作用,以水稻为材料,通过水培试验,研究了在重金属铜处理下水杨酸对水稻幼苗膜脂过氧化作用的影响。结果表明:随着铜浓度的提高,水稻幼苗叶片的膜完整性被破坏,电导率增加,最大为对照组的 2.62 倍,同时 MDA 含量显著提高,表明膜脂过氧化作用加剧。而对铜处理的水稻幼苗滴加水杨酸时,水稻叶片的电导率、MDA 均比单独铜处理有所下降,说明水杨酸在一定程度上保护了膜系统的完整性,降低了水稻幼苗的膜脂过氧化作用。同时水杨酸还提高了铜处理水稻幼苗的 POD、CAT 和 SOD 的活性,强化了植物体内保护酶的功能,增强了水稻幼苗对抗重金属毒害的能力。

关键词:水稻;水杨酸;铜胁迫;膜脂过氧化

中图分类号:X503.23 文献标识码:A 文章编号:1002-2767(2013)01-0014-05

农田生态环境污染是全球性环境污染中人类最为关注的问题之一。在我国,农田生态环境污染虽然得到一定的遏制,但仍有日益加重的趋势,土壤一旦受到污染将会给农业生产带来严重的损失,我国每年因重金属污染导致的粮食减产达1000多万t,另外被重金属污染的粮食也达1200万t,合计经济损失200亿元。同时,重金属对农田的污染会导致其在农作物的根、茎、叶和籽粒中大量积累,不仅影响作物的生长发育,造成产量的下降,而且严重影响生态环境和农产品的安全,并

收稿日期:2012-09-07

基金项目:安徽省高校省级自然科学研究资助项目(KJ 2010B286);省级自然科学研究资助项目(KJ 2009B089Z);安徽工程大学校青年基金资助项目(2005yq018)

第一作者简介: 丁佳红(1977-), 女, 安徽省宿州市人, 硕士, 讲师, 从事环境污染生态学方面的研究。 E-mail: djiahong@ 163. com。 最终威胁人类的生存。

水杨酸(Salicylic acid,SA)是植物体内普遍存在的一种酚类化合物,是细胞内的信号传递分子,对植物的生长发育具有多种生理调节效应,不仅能增强植物抵抗真菌、细菌和病毒等生物胁迫的能力,而且还影响着植物对重金属、臭氧、紫外辐射、低温、热激、水分亏缺和盐害等非生物胁迫的抗性[1-2]。重金属胁迫会对植物造成一系列的伤害,如抑制种子的萌发和幼苗的生长[3],影响细胞膜的透性[4],引起活性氧代谢失调而造成氧化胁迫[5],影响光合作用和呼吸作用[6],甚至细胞和整个植株的生长也受到强烈抑制而使生物产量下降。

外源水杨酸能在一定程度上缓解重金属对植物造成的伤害。Pál等^[7]、李彩霞等^[8]和 Krantev等^[9]相继研究了水杨酸对镉胁迫下玉米幼苗生长的影响,结果表明,镉胁迫下,水杨酸处理或预处理都能促进植物的生长,降低质膜透性,减少丙二醛(Malondialdehyde,MDA)的积累,提高玉米幼

Effect of Different Factors on Rice Callus Formation

WANG Yu-yang, JIANG Liu-qing, DONG Xue-mei, SUN Dong-mei

(Life Science and Technology College of Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing, Heilongjiang 163319)

Abstract: Taking Kenjiandao No. 10 as the experimental materials, using 75% alcohol, 0. 1% mercuric chloride and 5% sodium hypochlorite as disinfectants, the effects of different disinfectants and treatment time on the induction of rice mature embryo callus were studied. Meanwhile using the best screening sterilization conditions, the best induced callus matrix were also studied for the selected medium of MS, B_5 , N_6 and the NMB. The results showed that; the best disinfection treatment combination was: 75% alcohol 1 min \pm 0. 1% mercuric chloride 10 min \pm 10% sodium hypochlorite 4 min; after analysis of variance, B_5 medium was better than other matrix on the callus induction of Kenjiangdao No. 10, callus per dish on B_5 medium was higher than other substrates, and the induced callus were large and fresh.

Key words: rice; callus; factors

苗叶中的脯氨酸和可溶性糖的含量,激活抗氧化反应。Guo等[10]、Drazic 和 Mihailovic[11] 也研究发现镉胁迫下,水稻根系的生长受到显著抑制,大豆幼苗叶片严重失水,而同时施用水杨酸这种抑制作用则不出现。为了探讨铜尾矿的开采以及废弃物的堆放对周围农作物生长的影响,同时探明水杨酸在重金属铜毒害过程中所发挥的作用,该文以水稻作为试验材料,采用室内模拟试验,研究铜胁迫下水稻幼苗叶片的膜脂过氧化作用以及水杨酸对这种作用的缓解情况。

1 材料与方法

1.1 材料

供试水稻品种为金优 63,供试试剂为五水硫酸铜($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)。

1.2 方法

1.2.1 试验设计 精选粒大饱满的水稻籽粒,用 0.1% $HgCl_2$ 表面消毒 6 min,于蒸馏水浸泡 48 h,然后将种子放在盖有湿润纱布的白瓷盘中,于 28℃恒温培养箱中催芽,保持纱布湿润。3 d 后水稻长出芽及根,转移到改良的 Hangland 培养液中培养 7 d 后备用,每天更换 1 次培养液,试验在 28℃光照培养箱中进行,光周期为 10 h:14 h(光:暗)。水稻在培养液中生长 7 d 后,把所有水稻幼苗分为两组,其中一组采用水杨酸 1.0 mmol·L¹+ Cu^{2+} (0、50、100、150 和200 mg·L¹)处理, Cu^{2+} 浓度为 0 的处理为对照;而另一组采用单独铜处理,铜处理浓度分别为 0 (对照)、50、100、150 和200 mg·L¹,每个处理浓度设 10 个重复,处理 7 d 后,开始测定所有指标。

1.2.2 指标的测定方法 (1)质膜透性的测定。取新鲜的植物叶片,剪成 1 cm 的小段,放入装有 20 mL双蒸水的三角烧瓶中,在电动振荡仪上以 400 次•min⁻¹的速度震荡 1 h 后用 DDS-307 电导仪 测定电导率。采用外渗电导率法,以相对电导率表示大小[12]。(2) 丙二醛 (MDA) 含量的测定。按 Heath 等的硫代巴比妥酸 (TBA) 显色法[13]。(3) 过氧化氢酶 (CAT) 活性的测定。称取植物材料 0.2 g,加入 5 mL 预冷的 50 mmol•L⁻¹ pH7.8 的磷酸缓冲液于冰浴中研磨成匀浆,在冷冻高速离心机中于 4℃下 15 000 g 离心 20 min,取上清液用于测定 CAT 活性,CAT 活性测定用高锰酸钾滴定法,酶活性大小以每克鲜重质量每分钟分解的 H_2O_2 的量来表示[14]。(4)过氧化物酶(POD)活性的测定。采用 Proinoke X H 的方法,酶活力单

位用1g植物材料氧化愈创木酚的微克数表示^[15]。(5)超氧物歧化酶(SOD)活性的测定。按邵从本的NBT光化还原法^[16]测定。

1.2.3 数据分析 采用 SPSS13.0 软件进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 水杨酸对铜胁迫下水稻幼苗叶片电导率的影响

细胞膜是植物细胞和外界环境进行物质交换的中介,植物细胞膜起着调节、控制细胞内外物质交换的作用,其稳定性是细胞正常生理功能的基础。在重金属胁迫下,植物细胞膜会发生过氧化作用,使细胞膜透性增加,从而破坏了细胞膜的完整性,导致膜上结合酶和细胞内酶的平衡失调,大量物质外渗,有毒物质能自由进入细胞,致使细胞生理生化过程发生紊乱,严重时还会导致植株死亡。

细胞膜透性是评价植物对污染物反应的指标之一,表征细胞膜透性的电导率与污染物浓度呈正相关^[17]。细胞膜透性的增大是由膜损伤引起的,而细胞膜的损伤是由细胞膜脂质过氧化作用造成的,各种逆境都是通过膜脂质过氧化作用而伤害植物^[18]。

由图 1 可以看出,在不进行铜处理时,有无水杨酸对水稻幼苗的电导率影响不大,分别为15.59 和 15.50 μ S·cm⁻¹,单独采用不同浓度 Cu²⁺处理时,水稻幼苗电导率随着 Cu²⁺浓度的升高而逐渐升高,表明 Cu²⁺胁迫时,水稻幼苗叶片膜系统的完整性被破坏,而且 Cu²⁺浓度越大膜被破坏得越严重,电导率最大时为对照组的 2.62 倍。而当水稻幼苗分别在相应浓度 Cu²⁺ +1.0 mmol·L⁻¹水杨酸(SA)的条件下进行培养时,电导率较其加对应浓度 Cu²⁺而不加 SA 处理均有所降低,电导率

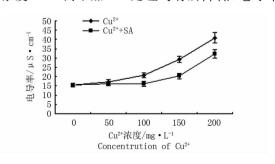


图 1 水杨酸对铜胁迫下水稻幼苗叶片电导率的影响 Fig. 1 The effect of salicylic acid on electric conductivity in rice seedling leaf under copper stress

最大时为对照组的 2.07 倍,统计学分析表明单独 Cu^{2+} 处理组和 Cu^{2+} + SA 处理组均与电导率呈 现显 著 正 相 关 性,相 关 系 数 分 别 为 0.946、0.958(P<0.05),说明水杨酸对水稻幼苗叶片的 膜系统具有一定的保护作用。

2.2 水杨酸对铜胁迫下水稻幼苗叶片丙二醛(MDA)含量的影响

逆境条件下植物体内的超氧自由基(O₂)、氢氧自由基(OH•)、单线态氧(O₂)和过氧化氢自由基(H₂O₂)等有毒物质会大量积累,导致膜脂过氧化或脱脂作用,产生大量的活性氧,引起植物一系列的生理生化变化,使植物体内的物质、能量代谢紊乱。丙二醛(MDA)则是细胞内膜脂过氧化或脱脂的产物,它会严重损伤细胞的生物膜,降低膜中不饱和脂肪酸的含量,使膜的流动性降低。同时,膜脂过氧化还会影响植物的光合作用和呼吸作用,改变光合作用和呼吸作用中的电子传递,从而导致大量活性氧自由基的产生,进一步引起膜脂过氧化。因此,MDA浓度的高低可以用来表示脂质过氧化强度和膜系统伤害程度,是一种重要的逆境生理指标。

从图 2 可以看出,对照组中,水杨酸的添加对MDA 含量的影响不大,而单独采用不同浓度Cu²+处理时,水稻幼苗 MDA 含量随着 Cu²+增加而显著升高,表明 Cu²+胁迫时,水稻幼苗叶片的膜脂过氧化作用加剧, MDA 含量最大时为对照组的 1.71 倍。而当水稻幼苗分别在相应浓度Cu²++1.0 mmol·L¹ SA 的条件下进行培养时,MDA 含量较仅加对应浓度 Cu²+而不加 SA 处理均有所降低, MDA 含量最大时为对照的 1.32倍,统计学分析表明单独 Cu²+处理组和 Cu²++1.0 mmol·L¹ SA 处理组均与 MDA 的含量呈现显著正相关性,相关系数为 0.982 和 0.921(P<

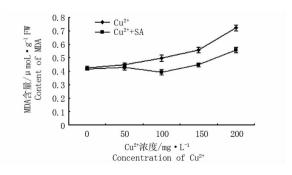


图 2 水杨酸对铜胁迫下水稻幼苗叶片 MDA 含量的影响 Fig. 2 The effect of salicylic acid on MDA content in rice seedling leaf under copper stress

0.05),说明 Cu²+处理加剧了水稻的膜脂过氧化作用,而加入水杨酸后则可以降低水稻幼苗在重金属铜胁迫下的膜脂过氧化作用,一定程度上缓解了重金属铜对植物的毒害作用。这与 Pál 等[7]、李彩霞等[8]和 Krantev等[9]研究结果一致。

2.3 水杨酸对铜胁迫下水稻幼苗叶片过氧化物酶(POD)活性的影响

植物在受到胁迫的情况下,细胞中发生的过氧化作用产生的活性氧就会剧增,从而使细胞不能及时地把过氧化作用产生的 H_2 O_2 等代谢物分解、排除,致使有害物质进一步积累,影响细胞的正常代谢,严重时会导致细胞死亡。过氧化物酶(Peroxidase,POD)以愈创木酚作为受体,能清除各种生物和非生物胁迫过氧化产生的 H_2 O_2 O_2 O_3 O_4 O_4 O_4 O_5 O_5 O_5 O_6 O_6

从图 3 可 Ω ,单独采用不同浓度 Cu^{2+} 处理 时,水稻幼苗的 POD 活性随着 Cu2+浓度的增加 呈现先升高后降低的趋势,表明低浓度 Cu2+胁迫 处理时,水稻幼苗可以通过提高其抗氧化酶 POD 活性来抵御 Cu²⁺ 胁迫引起的毒害,而当 Cu²⁺ 浓 度继续增加时,POD活性开始下降,说明高浓度 的铜超过植物的耐受性限度,破坏了植物体内的 保护酶活性,POD 活性有下降趋势,细胞就不可 避免地受超氧自由基的攻击。而当水稻幼苗分别 在含相应浓度 Cu²⁺ +1.0 mmol·L⁻¹ SA 的条件 下进行培养时,各浓度 Cu²⁺ +1.0 mmol·L⁻¹ SA 培养的水稻幼苗的 POD 活性均较仅加对应浓度 Cu²⁺ 而不加 SA 的处理有所提高,统计学分析表 明单独 Cu²⁺ 处理组、Cu²⁺ +1.0 mmol·L⁻¹ SA 处 理组均与POD含量呈现显著相关性,相关系数分 别为 0.925、0.934(P < 0.05),说明水杨酸可以有

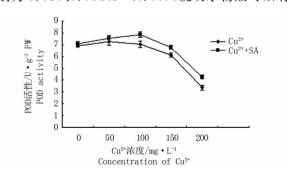


图 3 水杨酸对铜胁迫下水稻幼苗叶片 POD 活性的影响 Fig. 3 The effect of salicylic acid on POD activity in rice seedling leaf under copper stress

效提高重金属铜胁迫下时水稻幼苗 POD 的活性, 启动这种保护作用,从而更好地清除膜脂过氧化 作用产生的自由基,降低对膜系统的损害,从而更 加有效地对抗重金属带来的毒害作用。这与王松 华等[20]、李彩霞等[8]和 Guo 等[10]研究结果一致。

2. 4 水杨酸对铜胁迫下水稻幼苗过氧化氢酶(CAT)活性的影响

过氧化氢酶(CAT)也是一种重要的保护酶,可以清除 H_2O_2 ,主要存在于细胞的过氧化体中。过氧化氢酶(CAT)与超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)共同组成了生物体内活性氧防御系统,在活性氧代谢过程中,CAT可以使 H_2O_2 发生歧化生成水和氧分子。因此,过氧化氢酶活性也就成为衡量细胞过氧化水平的重要标志。

由图 4 可知,在对照组中,水杨酸的添加对 CAT 活性的影响不大,单独采用不同浓度 Cu²⁺ 处 理时,水稻幼苗的 CAT 活性随着 Cu2+浓度的增加 呈现先升高后降低的趋势,说明低浓度 Cu2+ 胁迫 处理时,水稻幼苗可以通过提高过氧化氢酶 CAT 活性来清除活性氧,保护细胞膜的结构,从而抵御 Cu^{2+} 胁迫带来的毒害作用,而当 Cu^{2+} 浓度继续增 加时,CAT 活性开始下降,说明高浓度的铜已经超 过了植物的耐受限度,破坏了植物体内的保护酶系 统,加剧了对植物的毒害作用。当水稻幼苗分别在 含相应浓度 Cu²⁺ +1.0 mmol•L⁻¹ SA 的条件下进 行培养时,各浓度 Cu²⁺ +1.0 mmol•L⁻¹ SA 培养的 水稻幼苗的 CAT 活性加对应浓度 Cu²⁺ 而不加 SA 的得事均有所提高,统计学分析表明单独 Cu2+ 处 理组、Cu²⁺ + 1.0 mmol·L⁻¹ SA 处理组均与 CAT 活性无明显相关性,相关系数相关系数分别为 0.873, 0.865(P > 0.05)

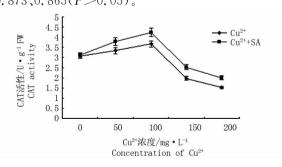


图 4 水杨酸对铜胁迫下水稻幼苗叶片 CAT 活性的影响 Fig. 4 The effect of salicylic acid on CAT activity in rice seedling under copper stress

2.5 水杨酸对铜胁迫下水稻幼苗超氧化物歧化 酶(SOD)活性的影响

SOD 是一种抗性酶,它在高等植物的氧伤

害、器官衰老及抗逆性中所起的作用已得到证实。 在植物体内有氧代谢过程中产生的氧自由基可使 脂质过氧化并且导致膜伤害,这被认为是组织衰 老和种子变劣的原因。SOD作为超载自由基清 除剂,其活性高低与植物抗性大小有一定的相关 性。当外来胁迫(如重金属)导致活性氧大量产生 时,它能及时有效清除自由基,保护细胞免受氧化 胁迫的伤害。

由图 5 可知,单独采用不同浓度 Cu^{2+} 处理时,水稻幼苗的 SOD 活性呈现低浓度升高,高浓度抑制的现象,说明低浓度 Cu^{2+} 胁迫处理时,水稻幼苗可以通过提高 SOD 活性来清除活性氧,保护细胞膜的结构,从而抵御 Cu^{2+} 胁迫带来的毒害作用,但当活性氧的增加远远超过正常的歧化能力时,细胞内多种功能酶以及膜系统遭到破坏,生理代谢紊乱,SOD 活性反而受到抑制而下降[21]。当水稻幼苗分别在含相应浓度 $Cu^{2+}+1.0$ mmol· L^{-1} SA 的条件下进行培养时,各浓度 $Cu^{2+}+1.0$ mmol· L^{-1} SA 的条件下进行培养时,各浓度 $Cu^{2+}+1.0$ mmol· L^{-1} SA 培养的水稻幼苗的 SOD 活性较仅加对应浓度 Cu^{2+} 而不加 SA 处理均有所提高,统计学分析表明单独 Cu^{2+} 处理组、 $Cu^{2+}+1.0$ mmol· L^{-1} SA 处理组均与 SOD 活性呈现显著相关性,相关系数相关系数分别为 0.875、0.899 (P<0.05)。

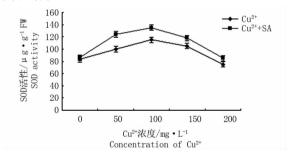


图 5 水杨酸对铜胁迫下水稻幼苗叶片 SOD 活性的影响 Fig. 5 The effect of salicylic acid on SOD activity in rice seedling under copper stress

3 结论

重金属铜胁迫对水稻叶片的膜透性明显增加,电导率最大时为对照组的 2.62 倍,而添加水杨酸后,电导率最大为对照组的 2.07 倍,说明水杨酸对水稻叶片的膜系统具有一定的保护作用。

重金属铜胁迫造成水稻叶片的 MDA 含量显著增加,MDA 含量最大时为对照的 1.71 倍,膜脂过氧化程度加剧,而水杨酸的加入降低了MDA 的含量,MDA 含量最大时为对照的 1.32倍,说明水杨酸在一定程度上降低了水稻叶片的膜脂过氧化程度。

低浓度铜胁迫下,水稻叶片 POD 酶活性、CAT 酶活性和 SOD 活性均有所升高,可以有效保护膜结构的稳定性,并且水杨酸的加入更加显著地提高了3种酶的活性,所以水杨酸可以通过提高水稻叶片保护酶的活性来降低叶片膜脂过氧化程度,从而更好地对抗重金属带来的毒害作用。参考文献:

- [1] Senaratna T, Touchell D, Bunn E, et al. Acetyl salicylic acid (Aspirin) and salicylic acid induce multiple stress tolerance in bean and tomato plants [J]. Plant Growth Regulation, 2000, 30, 157-161.
- [2] Loake G, Grant M. Salicylic acid in plant defence——the players and protagonists[J]. Current opinion in plant biology, 2007, 10:466-472.
- [3] Munzuroglu O, Geckil H. Effects of metals on seed germination, root elongation and coleoptile and hypocotyl growth in *Triticum aestivum* and *Cucumis sativus*[J]. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2002, 43: 203-213.
- [4] 王正秋,江行玉,王长海. 铅、镉和锌污染对芦苇幼苗氧化胁 迫和抗氧化能力的影响[J]. 过程工程学报,2002,2(6): 558-563.
- [5] 林冬,朱诚,孙宗修. 镉敏感水稻突变体在镉胁迫下活性氧代谢的变化[J]. 环境科学,2006,27(3):561-566.
- [6] 张建平,陈娟,胡一鸿,等. 镉胁迫对浮萍叶片光合功能的影响[J]. 农业环境科学学报,2007,26(6):2027-2032.
- [7] Pál M, Szalai G, Horváth E, et al. Effect of salicylic acid during heavy metal stress[J]. Acta Biologica Szegediensis, 2002,46;119-120.
- [8] 李彩霞,李鹏,苏永发,等. 水杨酸对镉胁迫下玉米幼苗质膜透性和保护酶活性的影响[J]. 植物生理学通讯,2006,42(5):882-884.
- [9] Krantev A, Yordanova R, Janda T, et al. Treatment with salicylic acid decreases the effect of cadmium on photosynthesis in maize plants [J]. Journal of Plant Physiology,

- 2008,165:920-931.
- [10] Guo B, Liang Y C, Zhu Y G, et al. Role of salicylic acid in alleviating oxidative damage in rice roots (*Oryza sativa*) subjected to cadmium stress[J]. Environmental Pollution, 2007,147;743-749.
- [11] Drazic G, Mihailovic N. Modification of cadmium toxicity in soybean seedlings by salicylic acid[J]. Plant Science, 2005,168;511-517.
- [12] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京:高等教育出版社,2000;261-263.
- [13] Health R L, Packer L. Photoperoxidation in isolated chloro-plasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1968, 125:189-198.
- [14] 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]. Journal of Experimental Botany, 1981, 32:93-101.
- [15] Proinoke X H. The Methods of Analysis of Biochemistry on Plants[M]. Beijing: Science Press, 1981:197-209.
- [16] 邵从本,罗广华,王爱国,等. 几种检测超氧物歧化酶活性 反应的比较[J]. 植物生理学通讯,1983(5):46-49.
- [17] 马成仓. Hg 对油菜叶细胞膜的损伤及细胞的自身保护作用[J]. 应用生态学报,1998,9(3):323-326.
- [18] Fernandes J C, Henriques F S. Biochemical, physiological, and structural effects of excess copper in plants[J]. The Botanical Review, 1991, 57; 246-273.
- [19] Wang Yousheng, Wang Jin, Yang Zhimin, et al. Salicylic acid modulates aluminum-induced oxidative stress in roots of *Cassia tora* [J]. Acta Botanica Sinica, 2004, 46 (7): 819-828.
- [20] 王松华,储卫红,周正义,等.水杨酸对小麦镉毒害的缓解效应[J].种子,2005,24(10):15-17.
- [21] 姜虎生,石德成. Hg, Cd 复合污染对玉米生理指标的影响[J]. 陕西农业科学,2005(6):7-9.

Effect of Salicylic Acid on Membrane Lipid Peroxidation in Rice Seedlings under Copper Stress

DING Jia-hong, XUE Zheng-lian, YANG Chao-ying

(Anhui Engineering University, Wuhu, Anhui 241000)

Abstract: In order to investigate the effect of SA in relieving heavy metal stress, the effect of salicylic acid on membrane lipid peroxidation in rice seedlings leaf under copper stress were studied by water culture experiment with rice as material. The results showed that with the elevation of Cu²+ concentration, the membrane integrity of rice seedlings leaf was destroyed and the electric conductivity increased, the maximum was 2.62 times of the control group, meanwhile the MDA content was raised significantly, which indicated that the membrane lipid peroxidation was intensified. But when salicylic acid was drop wised during the water culture, the electric conductivity and MDA content were both decreased, which illustrated the salicylic acid could protect the integrity of membrane system in certain degree and release the membrane lipid peroxidation of rice seedlings leaf. At the same time, salicylic acid also increased POD, CAT and SOD activity of rice seedling leaf, enriched protective enzyme in plant and reinforced the ability of rice seedling opposition to heavy metal poison.

Key words: rice; salicylic acid; copper stress; membrane lipid peroxidation