

# 臭氧对水稻叶片膜脂过氧化和抗氧化系统的影响\*

金明红, 冯宗炜, 张福珠(中国科学院生态环境研究中心, 北京 100080, E-mail: jinmh@sina.com)

**摘要:** 采用 OTC-1 型开顶式气室研究臭氧对不同生育时期水稻叶片膜脂过氧化和抗氧化系统的影响。实验结果表明, 随着臭氧浓度增加, 水稻叶片叶绿素含量、叶绿素 a/b 值下降, 膜相对透性和丙二醛(MDA)含量上升, 过氧化物酶(POD)活性逐渐上升, 过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)活性开始被诱导上升, 当浓度达到  $200\text{nI} \cdot \text{L}^{-1}$  时反而下降。叶绿素含量及叶绿素 a/b 值与 MDA 含量呈显著负相关, 膜透性与 MDA 含量呈显著正相关, 叶绿素含量与 POD 活性呈负相关。臭氧造成活性氧的产生和清除之间的失衡, 加剧了膜脂过氧化作用, 对水稻的膜系统产生了危害, 降解叶绿素, 加速叶片的老化。

**关键词:** 臭氧, 膜脂过氧化, 抗氧化系统, 水稻。

中图分类号: X173 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2000)03-0001-05

## Effects of Ozone on Membrane Lipid Peroxidation and Antioxidant System of Rice Leaves\*

Jin Minghong, Feng Zongwei, Zhang Fuzhu (Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China E-mail: jinmh@sina.com)

**Abstract** Rice plants were used to investigate effects of ozone on membrane lipid peroxidation and antioxidant system of rice leaves in varied growth stage. The plants were exposed in open top chambers (OTCs) in field conditions to four levels of  $\text{O}_3$  concentration (charcoal filtered air,  $50\text{nI} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $100\text{nI} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $200\text{nI} \cdot \text{L}^{-1}$ ) from 1999-07-04 to 1999-10-01. With  $\text{O}_3$  concentration increasing, chlorophyll content and chlorophyll a/b in rice leaves were significantly declined; membrane permeability and the level of lipid peroxidation (MDA) content were significantly increased; the activity of CAT, SOD increased first and decreased afterward; the activity of POD gradually increased. Chlorophyll content was negatively correlated with MDA content and membrane permeability was positively correlated with MDA content. Those observations indicated the  $\text{O}_3$  stress induce *in vivo* oxidative injury and affect the activities of antioxidant enzymes. The effects resulted in imbalance of activated oxygen produce and scavenge, accelerated process of lipid peroxidation, imposed on the rice leaves detrimentally.

**Keywords:** ozone, membrane lipid peroxidation, antioxidant system, rice.

臭氧对植物细胞产生氧化伤害, 膜脂过氧化(lipid peroxidation, LP)被认为是测定氧化伤害程度的可靠指标<sup>[1]</sup>。植物体内的抗氧化系统是决定植物细胞对氧化胁迫抗性的关键因素, 它能清除体内的活性氧和膜脂过氧化所产生的有毒产物, 以利于植物在逆境中的生存。超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)是抗氧化系统中酶促子系统的3种重要的保护酶。这些抗氧化酶能清除体内的活性氧, 有利于植物维持体内活性氧产

生和淬灭的动态平衡, 从而阻抑膜脂氧化的进程。但是, 当逆境胁迫超过一定阈值时, 过高的活性氧累积会破坏植物的保护防御系统<sup>[2,3]</sup>。

臭氧对植物特别是农作物的形态、生态、生理生化影响成为国际的研究热点, 在国外有不少报道, 但对植物膜脂过氧化过程中生化响应

\* 国家自然科学基金资助项目(Project Supported by the National Natural Science Foundation of China): 49899270  
作者简介: 金明红(1974~), 男, 博士研究生, 主要研究方向为污染生态学。  
收稿日期: 2000-01-10

机制特别是对内源抗氧化酶的诱导或抑制作用及其机理还不甚清楚,已有的文献表达也不尽一致<sup>[3,4]</sup>,国内尚未见有关报道.本研究以水稻为材料,研究臭氧对水稻叶片膜脂过氧化和抗氧化系统的影响.

## 1 实验材料和方法

### 1.1 实验材料及臭氧处理

材料为我国主要农作物水稻(*Oryza sativa* L.).实验是在中国气象局农业气象试验基地中进行,OTC-1型开顶式气室由过滤器、风机、通风管路、框架与室壁5部分组成,具体结构见文献<sup>[5]</sup>.臭氧由清华大学生产的QHG-1型高频臭氧发生器产生,采用日本堀场(HORIBA)公司的臭氧监测仪对各气室中的臭氧浓度进行监控.

水稻于1999-05-01播种于大田,06-09秧苗移入顶口直径36cm、深26cm的瓦盆,土壤为大田表土,各盆之间土壤质地相同.每盆定株为20(4株×5)株.07-01移入气室适应,07-04开始通气,至10-01水稻成熟,停止通气,共设4个处理,臭氧浓度依次为:处理1:对照,5±3nL·L<sup>-1</sup>(活性碳过滤空气,CFA);处理2:50±4nL·L<sup>-1</sup>;处理3:100±6nL·L<sup>-1</sup>;处理4:200±8nL·L<sup>-1</sup>.气室内臭氧浓度变异系数小于5%.每天通气时间为9:00~16:00,其中11:00~11:15,14:00~14:15停止通气30min,下雨天停止通气.对水稻施肥、浇水以及防病虫害措施各气室保持一致,并使水肥条件不成为限制因子.

### 1.2 测定时间和项目

实验分别于07-14(分蘖期)、08-03(孕穗初期)、08-22(开花末期)、08-31(灌浆普遍期)、09-01(乳熟期)对各处理的水稻叶片进行取样.随机取同一叶位的叶子数片,取叶片中部作实验测定用,每个实验4个重复.

叶绿素用80%丙酮提取,采用Arnon D. I法测定,单位为mg·g<sup>-1</sup>(FW).膜透性用DDS-11型电导率测定叶浸提液的电导率占煮后电导率的百分比表示.MDA含量以硫代巴

比妥酸(TBA)法测定,单位为n·md·g<sup>-1</sup>(FW).POD活性采用愈创木酚法测定,单位为OD<sub>470</sub>·min<sup>-1</sup>·g<sup>-1</sup>(FW).CAT活性采用高锰酸钾滴定法测定,单位为H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>mg·min<sup>-1</sup>·g<sup>-1</sup>(FW).SOD活性以每单位时间内抑制光化还原50%的氮蓝四唑(NBT)为一个活性单位(u)<sup>[6]</sup>.

## 2 结果与分析

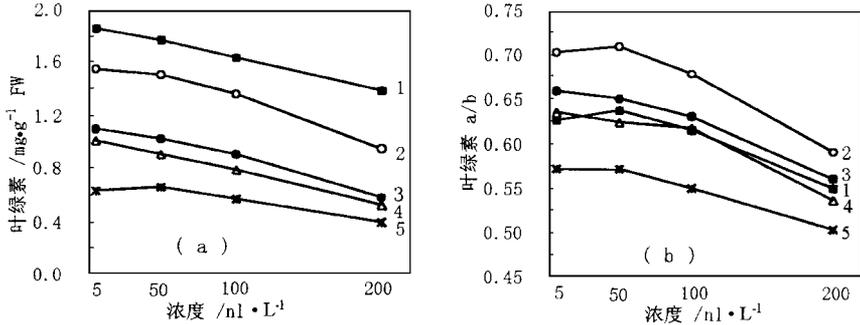
### 2.1 臭氧胁迫对水稻叶片叶绿素含量的影响

实验结果表明(图1,a):叶绿素含量随着生育期进程而减少.各生育期叶片叶绿素含量(叶绿素a+叶绿素b)均随着臭氧处理浓度增加而逐渐下降,二者呈显著负相关关系( $R^2=0.885\sim 0.997$ ).臭氧浓度为100nL·L<sup>-1</sup>和200nL·L<sup>-1</sup>处理与其他处理差异均极显著( $P<0.01$ ),同时从植物外部形态看,这2个处理系列的叶片较对照和50nL·L<sup>-1</sup>处理的叶片褪绿发黄.

在叶片衰老的进程中,叶绿素a比叶绿素b下降速率更快,叶绿素a/b值可作为叶片衰老的指标<sup>[7]</sup>,从图1(b)可看出,随着臭氧浓度增加,叶片叶绿素a/b值逐渐下降,二者在各生育期都呈负相关关系( $R^2=0.842\sim 0.950$ ),50nL·L<sup>-1</sup>处理与对照差异不显著,100nL·L<sup>-1</sup>和200nL·L<sup>-1</sup>的处理与其他处理差异均极显著( $P<0.01$ ).这表明臭氧具有加速水稻叶片衰老进程的作用.同时,由于受到臭氧伤害,叶片老化加速,水稻发育期提前、生育期缩短.田间观察显示,100nL·L<sup>-1</sup>和200nL·L<sup>-1</sup>处理的水稻,开花期、乳熟期、成熟期比对照提前1~4d.在所测定的几个生育期中,叶绿素a/b在孕穗期最大,其变化幅度也大;在乳熟期最小,其变化幅度也最小.

### 2.2 臭氧胁迫对水稻叶片膜透性的影响

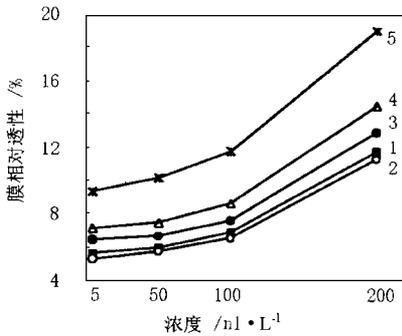
植物细胞原生质膜的选择透性是植物最重要的功能之一,其大小可反映环境胁迫对植物的伤害程度.实验结果表明(图2):膜透性随着生育期进程而增加.各个生育期的叶片膜相对透性均随臭氧浓度增加而上升,开始时上升趋



1. 分蘖期 2. 孕穗初期 3. 开花末期 4. 灌浆普遍期 5. 乳熟期  
 图1 臭氧对水稻不同生育时期叶片叶绿素含量(a)和叶绿素 a/b (b)的影响

Fig.1 The effects of ozone on chlorophyll contents of rice leaves in varied growth stage

势比较平缓,到 200nL·L<sup>-1</sup>处理时急剧上升,二者呈显著正相关关系( $R^2 = 0.895 \sim 0.934$ ). 100nL·L<sup>-1</sup>和 200nL·L<sup>-1</sup>处理与其他处理差异均极显著( $P < 0.01$ ). 说明在臭氧胁迫下,水稻叶片的膜系统受到了伤害.



图例同图 1

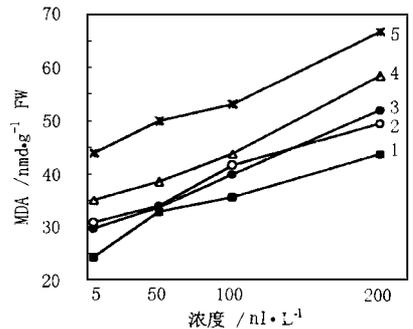
图 2 臭氧对水稻不同生育时期叶片膜透性的影响

Fig.2 The effects of ozone on membrane permeability of rice leaves in varied growth stage

2.3 臭氧胁迫对水稻叶片 MDA 含量的影响

MDA 是膜脂过氧化的产物,是衰老生理的重要指标. 实验结果表明(图 3): 叶片的 MDA 含量随着生育期进程而增加. 各个生育期叶片 MDA 含量均随臭氧浓度增加而上升,二者呈显著正相关关系( $R^2 = 0.950 \sim 0.998$ ). 各浓度处理之间差异均极显著( $P < 0.01$ ). 说明了臭氧加剧水稻叶片的膜脂过氧化作用,加

速了叶片的衰老进程.



图例同图 1

图 3 臭氧对水稻不同生育时期叶片 MDA 的影响

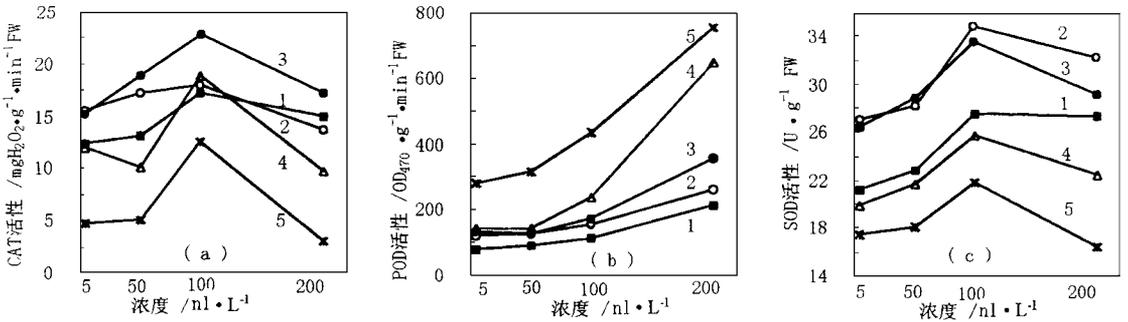
Fig.3 The effects of ozone on MDA contents of rice leaves in varied growth stage

2.4 臭氧胁迫对水稻叶片抗氧化酶活性的影响

随着臭氧浓度增加,抗氧化酶活性发生了明显变化(图 4). 在各生育期中,叶片的 CAT、SOD 活性开始均随臭氧浓度增加而迅速增加,到达一个峰值后而急剧或逐渐下降,甚至可能低于对照水平. 各个生育期叶片的 POD 活性均随臭氧浓度增加而持续上升,开始上升趋势相对比较平缓,到 200nL·L<sup>-1</sup>处理时急剧上升,二者呈显著正相关关系( $R^2 = 0.893 \sim 0.964$ ).

在所测定的几个生育期中, CAT、SOD 活性在孕穗期、开花期较大,在乳熟期较小. 这与植物在不同生育期生理活性、抗逆性强弱有关.

POD 活性随着生育期进程而增加。一些研究也表明, POD 活性与器官幼嫩、老化有关, 它与生长速率呈负相关。这可能是 POD 具有 IAA (生长素) 氧化酶的性质所致<sup>[7]</sup>。



图例同图 1

图 4 臭氧对水稻不同生育时期叶片 CAT(a)、POD(b)、SOD(c) 活性的影响

Fig. 4 The effects of ozone on CAT, POD and SOD activity of rice leaves in varied growth stage

### 3 讨论

考虑到在臭氧等氧化剂胁迫下, 植物叶片的蛋白质含量将有不同程度的增加<sup>[1]</sup>, 所以本文叶绿素、MDA 含量、酶含量均以鲜重为基准, 而不是以蛋白质为基准。氧自由基学说认为: 植物在正常条件下的新陈代谢也产生膜脂过氧化, 但在环境因子, 如光、温、水、缺乏矿质元素、有毒金属、大气污染(O<sub>3</sub>、SO<sub>2</sub>、NO<sub>x</sub> 等) 胁迫下, 植物体内的活性氧(reactive oxygen species, ROS) 如超氧自由基(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)、氢氧自由基(·OH)、单态氧(<sup>1</sup>O<sub>2</sub>)、过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 等产生会显著增加, 进而导致和加剧膜脂过氧化和降解<sup>[8,9]</sup>, 使植物膜系统受到伤害。在本实验中, 随着臭氧浓度的增加, 水稻叶片的 MDA 含量增加, 膜透性上升, 叶绿素含量下降, 叶绿素 a/b 值下降, 膜透性与 MDA 含量二者呈显著正相关( $R = 0.883 \sim 0.984$ ), 叶绿素含量、叶绿素 a/b 值与 MDA 含量呈显著负相关( $R_{\text{叶绿素, MDA}} = -0.937 \sim -0.995$ ,  $R_{a/b, \text{MDA}} = -0.813 \sim -0.981$ )。表明了臭氧胁迫下, 植物产生了大量活性氧, 并由此加剧了膜脂过氧化, 造成了膜系统损害, 叶绿素降解, 叶片老化。

叶绿素降解不仅与叶绿体膜系统的脂质过氧化有关<sup>[10]</sup>, 还与 POD-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 分解系统有密切

的关系<sup>[2,11]</sup>。在本实验中, 在臭氧胁迫下, 叶绿素含量及叶绿素 a/b 值下降, POD 活性上升, 二者呈显著负相关( $R_{\text{叶绿素, POD}} = -0.935 \sim -0.996$ )。当臭氧浓度为 200 nl·L<sup>-1</sup> 时, SOD、CAT 活性下降, 使更多活性氧扩散到叶绿体中参与叶绿素降解, 同时 POD 活性急剧上升也加剧叶绿素降解, 使叶片叶绿素含量迅速下降(图 1)。

膜脂过氧化作用与植物体内活性氧产生以及抗氧化系统的酶促和非酶反应对活性氧清除的动态平衡密切相关。随着臭氧浓度增加, 当植物体内活性氧累积超过正常水平, CAT、POD、SOD 等抗氧化酶由于底物浓度增加而被诱导加速生物合成。SOD 清除 O<sub>2</sub> 形成 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, CAT、POD 催化 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 形成 H<sub>2</sub>O。这些酶活性增加, 机体内抗氧化系统被诱导而加强生理活动, 是对臭氧等逆境的胁迫响应, 加速了活性氧清除, 有效地阻止了它在体内过多地累积, 阻抑了膜脂过氧化, 保护了膜系统。另一方面, 当臭氧浓度为 200 nl·L<sup>-1</sup> 时, 水稻叶片 CAT、SOD 活性下降(图 4), MDA 含量和膜透性急剧上升(图 2, 3), 植物受到严重损害。这表明: 在较强臭氧胁迫下, 当叶细胞中活性氧累积超过一定限度, 对其多种功能膜和酶系统产生了破坏, 致使叶片 CAT、SOD 活性下降。这些能清除活性

氧的抗氧化系统功能下降, 将导致机体内活性氧更迅速累积, 也加速了  $O_2^-$ 、 $^1O_2$ 、 $H_2O_2$  通过 Fenton 和 Haber-Weiss 反应向毒性极强的  $\cdot OH$  转化<sup>[9]</sup>, 从而将大幅度地加剧膜脂过氧化作用, 极大破坏膜系统, 加速叶绿素降解, 导致细胞器官的破坏, 代谢的失调, 加剧叶片衰老进程, 对植物的生物量及产量产生十分不利的影响。

#### 参考文献

- 1 Jita P, Brahma B P. A comparison of biochemical responses to oxidative and metal stress in seedlings of barley, *Hordeum vulgare* L. Environmental Pollution, 1998, **101**: 99~ 105.
- 2 严重玲, 洪业汤, 傅舜珍等. Cd、Pb 胁迫对烟草叶片中活性氧清除系统的影响. 生态学报, 1997, **17**(5): 488~ 492.
- 3 Saxe H. Photosynthesis and stomatal response to pollution air, and the use of physiological and biochemical responses for early detection and diagnostic tool. Adv in Bot. Res., 1991, **18**: 1~ 128.
- 4 Tang Y, Chevone B I, Hess J L. Ozone-responsive protein

- in a tolerant and sensitive clone of white clove(*Trifolium repens*). Environmental Pollution, 1999, **104**: 89~ 98.
- 5 王春乙, 高素华等. OTC-1 型开顶式气室的结构和数据采集系统. 气象, 1993, **19**(4): 15~ 31.
  - 6 张宪政. 作物生理研究法. 北京: 农业出版社, 1992. 207~ 217.
  - 7 Bandurski R S, Nonhebel H M. In wilkins advanced plant physiology. London: Pitman Press, 1984. 1~ 16.
  - 8 Blokhina O B, Fagerstedt K V et al. Relationship between lipid peroxidation and anoxia tolerance in a range of species during post-anoxia reoxygenation. Physiologia plantarum. 1999, **105**: 625~ 632.
  - 9 蒋明义. 水分胁迫下植物体内的  $\cdot OH$  产生与细胞的氧化损害. 植物学报, 1999, **41**(3): 229~ 234.
  - 10 Rajinder S D, Pamela P D et al. Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. Journal experiment botany, 1981, **32**(126): 93~ 101.
  - 11 Yomouchi N, Choudhuri M A. Chlorophyll degradation by peroxidase in parsley leaves. J. Jap. Soc. Hort. Sci., 1985, **54**: 265.

## 《环境科学》征稿简则

(1) 稿件要观点明确, 数据可靠, 层次分明, 结构完整, 文字精练。

(2) 来稿附中英文摘要, 关键词, 英译题目, 作者姓名的汉语拼音、工作单位英文名称和作者简介(包括性别、出生年月、籍贯、学位、职称和主要研究方向)以及 E-mail。

(3) 来稿应达到定稿要求。A<sub>4</sub> 纸激光打印样, 一式 2 份。

(4) 易混淆的外文字母请用铅笔标明文种, 大小写, 正斜体。文中首次出现的生物名称应注明拉丁学名; 首次出现的缩写字母要先给出中文名称, 括号内给出英文全称和缩写。

(5) 插图除在文中相应处附上外, 还需另附一份, 应为激光打印样或绘图纸黑墨精绘样; 照片必须黑白反差大, 清晰; 大小适中(坐标图最好为方形, 长度不超过 60mm)。

(6) 来稿必须使用国务院颁发的《中华人民共和国法定计量单位》(SI 单位)。论文中物理计量单位用符号表示, 如 mg, m, h, d 等。科技名词术语用国内通用写法。作者译的新名词术语, 文中第一次出现时请注明原文。

(7) 未公开发表的资料不列入参考文献, 可以脚注形式标注。文献按文中出现先后次序编排, 书写格式:

期刊: 作者(外文也要姓列名前)。论文名, 期刊名, 年, 卷(期): 页码(起~ 止)。

书籍: 作者. 书名. 版次(第 1 版不标注)。出版地: 出版者, 出版年. 页码(起~ 止)。

文集: 作者. 论文名. 见(In): 编者. 文集名. 出版地: 出版者, 年, 页码(起~ 止)。

专利文献: 作者. 题(篇)名. 专利文献种类, 专利号, 年: 页码。

(8) 来稿文责自负。编辑对来稿可作文字上和编辑技术上修改或删节。切勿一稿两投, 3 个月内未见通知者, 作者可另行处理。对未刊稿件一般不退, 请自留底稿。

(9) 来稿请注明是否为国家自然科学基金项目或省部级基金项目, 国家科技攻关项目, 国际合作项目等。

(10) 请在来稿上注明中图分类号。

(11) 投稿时请附单位业务介绍信及作者详细地址, 电话, 邮政编码。稿件挂号寄至北京 2871 信箱《环境科学》编辑部, 邮政编码: 100085, 电话: 62941102(此为新改电话, 原电话已撤)。电报挂号: 5499。