

硒对除草剂胁迫下水稻幼苗活性氧清除系统响应的作用

张承东, 韩朔睽*, 魏钟波(南京大学环境科学系 污染控制与资源化国家重点实验室, 南京 210093)

摘要: 研究了在除草剂苯噻草胺毒害下硒对水稻幼苗体内活性氧清除系统的影响. 结果表明, 硒缓解了苯噻草胺对水稻幼苗的毒害, 表现为株高、根长变化, 植株体内叶绿素、蛋白质、谷胱甘肽 GSH 含量的提高和抗氧化酶活性的增加, $\cdot O_2$ 、 H_2O_2 等活性氧和膜脂过氧化产物 MDA 含量降低, 自氧化速率减慢. 经 2 个样本个体差均值的配对 t 检验, 验证 Se 处理对水稻具有显著效应.

关键词: 硒; 苯噻草胺; 水稻; 活性氧清除系统

中图分类号: X173 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2002)04-04-0093

Effect of Selenium on the Response of the Active Oxygen Scavenging System in the Leaves of Paddy Rice under the Stress of Herbicide

Zhang Chengdong, Han Shuokui, Wei Zhongbo (State Key Laboratory of Pollution Control and Reuse, Department of Environment Science, Nanjing University, Nanjing 210093)

Abstract: The effects of selenium on the protection system in the leaves of paddy rice were studied under the stress of herbicide mefenacet. The results showed that selenium could cause increase of the height and root length, enhanced the contents of protein, glutathione (GSH) and the activities of antioxidant enzyme, leading to decreased level of activated oxygen and malondialdehyde (MDA), slowing the autoxidation rate. All these could alleviate the harmful effect of mefenacet on paddy rice. The paired t -test results showed that the effect of selenium on the response of the active oxygen scavenging system were significant.

Key words: selenium; mefenacet; paddy rice; scavenging system of activated oxygen

Se 是富有生物活性的微量元素, 随着人们对它认识的提高, Se 在高等植物、动物体内的生理生化作用越来越受到人们的关注. 熊世洲^[1]发现人工硒茶能缓解铅对人体免疫致损伤; Razak^[2]等人发现 Se 能抑制真菌, 与杀菌剂起协同作用; Padmaja^[3]等发现 Se 能调节豆苗中吡啶的生物合成. 本文通过测定水稻的一系列生理生化指标, 研究在除草剂苯噻草胺的毒害下 Se 对水稻幼苗体内活性氧清除系统的影响, 为农业上防治除草剂对水稻的药害提供依据.

1 实验材料和方法

1.1 材料和试剂

水稻品种: 汕优 507. 苯噻草胺, 2-(1, 3-苯并噻唑-2-氧基)-N-甲基乙酰替苯胺 (纯度 98%)、 Na_2SeO_3 (分析纯).

1.2 方法

(1) 试验处理 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 2 次. 培养水稻长至一叶一芯时, 分别移入含 0 mg/L 苯噻草胺, 0 mg/L 苯噻草胺 + 0.3 μg /mL Na_2SeO_3 ^[4], 2 mg/L 苯噻草胺, 2 mg/L 苯噻草胺 + 0.3 μg /mL Na_2SeO_3 的 4 组 Holand 培养液中, 每盆种 9 株, 每个试验处理设 5 个重复. 每 2 天更换 1 次培养液, 水稻幼苗一直保持叶绿生长, 7 天后取样测定, 对每个处理的测量值取平均值.

(2) 株高和根长的测定 测量不同处理的水稻株高和根长.

(3) 叶绿素、蛋白质含量的测定 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, 提取液过滤后定容至 50 mL. 按文献^[5]测定叶绿素含量. 用考

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (29877012)

作者简介: 张承东 (1976~), 女, 江苏武进人, 硕士研究生.

收稿日期: 2001-01-26; 修订日期: 2001-09-11

* 通讯联系人

马斯亮蓝 G-250 法^[6]测定蛋白质含量,以牛血清作标准溶液。

(4) 超氧负离子($\cdot O_2^-$)产生速率、过氧化氢(H_2O_2)含量、膜脂过氧化物(MDA)含量和组织自氧化速率的测定 称取 0.5 g 鲜重水稻根,加入 3 mL 65 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 7.8)研磨匀浆,以 1200 r/min 离心 20 min,取上清液,按文献^[7]测定 $\cdot O_2^-$ 产生速率。

称取 0.5 g 鲜重叶片,加入 5 mL 冷丙酮研磨提取,按文献^[8]测定 H_2O_2 含量。

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

(5) 还原型谷胱甘肽(GSH)含量测定 称取 0.5 g 鲜重叶片加 3 mL 0.1 mol/L EDTA 溶液,匀浆。然后在匀浆中加入 $HClO_4$,使其终浓度为 0.3 mol/L,以 5000 r/min 离心 5 min,取上清液按文献^[10]测定 GSH 含量。

(6) 超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)的活性测定 称取 1 g 鲜重叶片,加入 5 mL 62.5 mmol/L (pH 7.8)的磷酸缓冲液(含适量 PVP)于冰浴上研磨,4℃下以 15000 r/min 离心 20 min,上清液为酶液。分别测定 SOD、POD 和 CAT 的活性^[11-13]。

2 结果与讨论

2.1 水稻株高和根长的变化

根据(2)的测定结果,在无苯噻草胺的情况下虽然 Se 对水稻的株高影响不大,但根明显增长了 11%,显示 Se 对水稻的生长有一定刺激作用。2 mg/L 的苯噻草胺严重抑制了水稻的株高和根长,根部发黑。但在此浓度下 Se 能显著缓解苯噻草胺对水稻幼苗的毒害,根部颜色正常,其株高和根长分别增加了 43%和 40%,如图 1 和图 2 所示。

2.2 叶绿素和可溶性蛋白含量的变化

根据(3)测定结果,Se 和苯噻草胺均能单独增加水稻体内叶绿素含量。Se 使叶绿素含量增加了 2.15 倍,促进了水稻生长,而苯噻草胺使水稻受毒害产生滞绿现象。Se 和苯噻草胺的共

同作用虽然也增加叶绿素含量,其幅度却分别低于 Se 和苯噻草胺的单独作用,说明 Se 对叶绿素的影响与苯噻草胺有拮抗作用,如图 3。

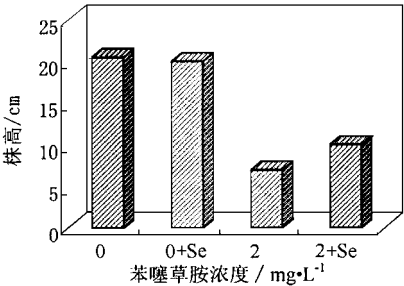


图 1 苯噻草胺胁迫下硒对株高影响

Fig.1 Effect of Se on height under the stress of mefenacet

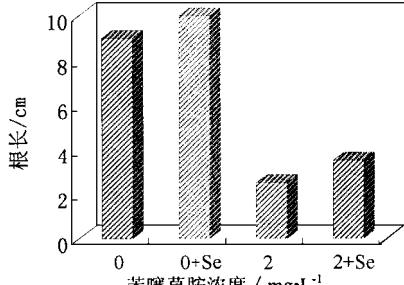


图 2 苯噻草胺胁迫下硒对根长影响

Fig.2 Effect of Se on root length under the stress of mefenacet

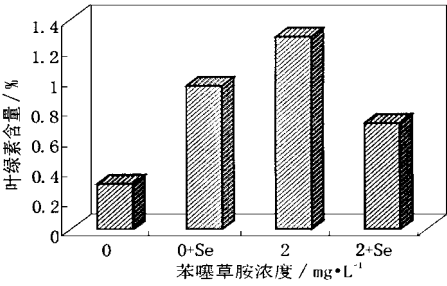


图 3 苯噻草胺胁迫下硒对叶绿素影响

Fig.3 Effect of Se on chlorophyll under the stress of mefenacet

可溶性蛋白含量的变化却相反,见图 4。在无苯噻草胺的情况下,Se 使得水稻体内蛋白质含量略有降低。水稻体内可溶性蛋白质对除草剂逆境胁迫产生了一种非特异性反应,2 mg/L 浓度的苯噻草胺使得蛋白质含量增加了 84%,而 Se 和苯噻草胺的共同作用使得蛋白质含量又提高了 9.7%。因此,在有 Se 存在的情况下,水稻体内以较高的蛋白和叶绿素含量抑制了机体的过氧化

作用,缓解了除草剂对水稻幼苗毒害.

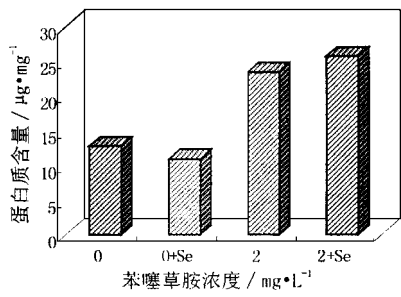


图 4 苯噻草胺胁迫下硒对蛋白质的影响

Fig. 4 Effect of Se on protein under the stress of mefenacet

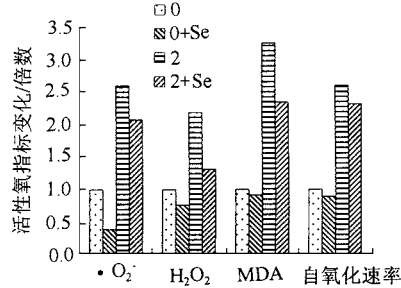


图 5 苯噻草胺胁迫下硒对活性氧和自氧化影响

Fig. 5 Effect of Se on active oxygen and autoxidation under the stress of mefenacet

2.3 $\cdot O_2^-$ 产生速率、 H_2O_2 含量、MDA 含量和自氧化速率的变化

由图 5 可见,无论有无苯噻草胺存在,Se 都会降低水稻幼苗体内的 $\cdot O_2^-$ 产生速率、 H_2O_2 含量、MDA 含量和组织自氧化速率,其变化大小分别降低到相应对照的 80 %、60 %、72 %、89 %,以及 39 %、76 %、92 %、89 %。这个现象说明 Se 在水稻体内清除过量自由基防止过氧化过程中发挥了重要作用,提高了机体抵御逆境伤害的能力。该图还显示,苯噻草胺的存在使 $\cdot O_2^-$ 等 4 项指标均大幅提高。

2.4 GSH 含量的变化

GSH 含量的变化是生物对环境变化产生的一种应激反应,对生物本身有保护作用。由图 6 可知,水稻幼苗对 2 mg/L 苯噻草胺毒害产生的应激反应表现为 GSH 含量升高 59 %。值得注意的是,无论有无苯噻草胺存在,Se 对 GSH 的平均净提高率也达到 24 %。

2.5 SOD、POD 和 CAT 酶活性的变化

Se 对抗氧化酶活性的影响,如图 7 所示。在

无苯噻草胺的情况下,Se 使得水稻体内 SOD 活性提高 2.1 倍,POD 活性降低 23 %、CAT 活性降低 50 %。联系 2.3 中的结果,可以得出由 Se 引起的 SOD 活性升高是导致 $\cdot O_2^-$ 产生速率大幅下降的原因。由于在生理代谢条件下,某一抗氧化系统的改变,有可能影响其他抗氧化系统,故推测水稻幼苗体内 POD、CAT 抗氧化酶活性受到 SOD 酶活性的影响。

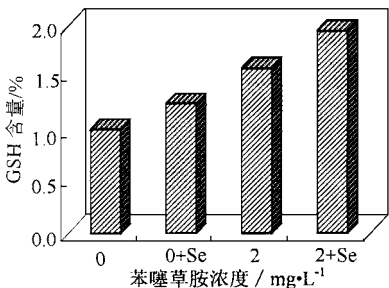


图 6 苯噻草胺胁迫下硒对 GSH 含量影响

Fig. 6 Effect of Se on GSH under the stress of mefenacet

进一步比较在 2 mg/L 苯噻草胺毒害下 Se 存在与否对水稻幼苗抗氧化酶的影响。当 Se 不存在时,水稻体内 SOD、POD 和 CAT 活性分别提高 3.23、0.93 和 0.58 倍,而当 Se 存在时,SOD、POD 和 CAT 活性分别提高了 0.84、2.57 和 2 倍。由此可见在苯噻草胺存在的情况下,Se 能大幅度增加 POD、CAT 活性,而对 SOD 活性增加的幅度较小。这个现象提示了苯噻草胺对 SOD 酶活性的影响受到 Se 的制约,植株表现出对除草剂有抗性。CAT、POD 活性增幅较大可能与植物对除草剂的解毒机制有关。

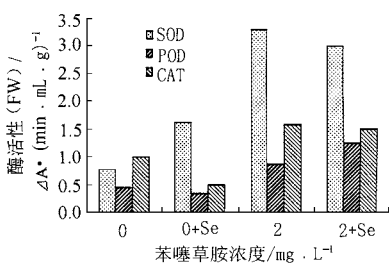


图 7 苯噻草胺胁迫下硒对酶活性的影响

Fig. 7 Effect of Se on activities of enzyme under the stress of mefenace

2.6 Se 对苯噻草胺胁迫下水稻生长影响的显著性检验

上述实验结果虽表明 Se 能缓解除草剂苯噻草胺对水稻幼苗的毒害,但这种影响在统计上是否具有显著性,还须进行检验.本文尝试采用 2 个样本个体差均值的配对 *t* 检验方法,确定 Se 是否对苯噻草胺胁迫下的水稻生长产生显著影响.

由于试验所测指标的量纲不同,分别以苯噻草胺 0 mg/L 样本的 12 个生理生化指标测定值作为参比,对配对比较的各样本对应指标进行标准化.在设定的检验显著水平 $\alpha=0.05$ 上,对样本进行双侧的配对 *t* 检验即:

检验 1,检验苯噻草胺胁迫下 Se 对水稻植株的修复作用是否显著.样本(2 mg/L + Se)产生的效应中包含了苯噻草胺的毒害作用,Se 对水稻植株的刺激作用和苯噻草胺胁迫下 Se 对水稻植株的修复作用.样本(2 mg/L + Se)产生

的效应中扣除样本(0 mg/L + Se)中 Se 产生的刺激效应后,与样本(2 mg/L)的毒性效应作配对比较.

检验 2,检验苯噻草胺胁迫下 Se 的修复作用与 Se 本身对植株的刺激作用之间是否差异显著.样本(2 mg/L + Se)产生的效应中扣除样本(2 mg/L)中苯噻草胺的毒性效应后,与样本(0 mg/L + Se)的刺激效应作配对比较.

检验 3,检验在无苯噻草胺胁迫下 Se 对水稻植株的刺激作用是否显著.将样本(0 mg/L + Se)的各效应与样本(0 mg/L)对应的效应做配对比较.

检验结果列在表 1 中,表明:①Se 对苯塞草胺胁迫下水稻生长有明显的修复作用;②苯噻草胺胁迫下 Se 的修复作用与 Se 本身对植株的刺激作用之间差异显著;③在无苯噻草胺胁迫

表 1 样本的配对 *t* 检验
Table 1 Paired *t* test of samples

检验	2 个样本个体差均值 95 %的置信区间	统计量 <i>t</i>	DF	显著水平	是否拒绝 H_0
检验 1	[- 2.28 , - 0.60]	- 3.78	11	0.003	拒绝
检验 2	[- 2.28 , - 0.60]	- 3.78	11	0.003	拒绝
检验 3	[- 0.32, 0.66]	0.73	11	0.479	不拒绝

下,Se 对植株的刺激作用不显著.

3 结论

(1) 2 mg/L 浓度的苯噻草胺对水稻幼苗的毒害作用表现在体内·O₂⁻、H₂O₂ 活性氧大量增加,MDA 含量升高,组织自氧化速率加快,刺激了叶绿素、蛋白质、GSH 含量和抗氧化酶 SOD、POD 和 CAT 活性的应激升高.植株受损,外在表现为株高和根长明显受到抑制,叶片滞绿,根部发黑.

(2) 在苯噻草胺毒害下,具有高生物活性的微量元素 Se 使得水稻体内一系列生理生化指标发生变化,增强了植株对除草剂的抗性.表现在水稻叶片中叶绿素、蛋白质、GSH 含量的提高,抗氧化酶类活性的有效增加,叶片中·O₂⁻、H₂O₂ 等活性氧含量大大降低,组织自氧化速率减慢,MDA 含量减少,植株长高,根增长.经 2 个样本个体差均值的配对 *t* 检验,表明在苯噻草胺胁迫下施 Se 确实对水稻幼苗产生了显著

影响,提示 Se 对减轻除草剂药害有应用潜力.

参考文献:

1 熊世洲.含硒康绿保健茶系列对铅作业工人危害的保护作用.同济医科大学学报,1995,2(2):152~154.
2 Razak AA et al. Influence of selenium on the efficiency of fungicide action against certain fungi. Biol Trace Elem Res, 1996, 19(1): 22~25.
3 Padmaja K et al. Effect of selenium on chlorophyll II biosynthesis in mung bean seedling. Phytochem, 1989, 28(12): 3321~3324.
4 吴永尧等.硒在水稻中的生理生化作用.中国农业科学,1999,2(1):100~103.
5 朱广廉等.植物生理学实验.北京:北京大学出版社,1990.251~254.
6 张志良等.植物生理学实验指导.北京:高等教育出版社,1990.60~63.
7 王爱国等.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.
8 林植芳等.衰老叶片和叶绿体中 H₂O₂ 累积与膜脂过氧化物的关系.植物生理学报,1988,14(1):16~22.
9 李伯林等.燕麦叶片衰老与活性氧代谢的关系.植物生理学报,1989,15(1):6~12.
10 张承圭等.生物化学仪器分析与技术.北京:高等教育出版社,1994.96~97.
11 邹国林等.一种 SOD 的测活方法.生物化学与生物物理进展,1986,4:71~73.
12 Siberstein L et al. Comparative studies on xantharia parietina, a pollution-resistant lichen and ramalin duriae a sens species evaluation of possible air pollution-protection mechanism. Lichenologist, 1996, 2:367~383.
13 徐镜波等.过氧化氢酶活性及活性抑制的紫外分光光度测定.环境化学,1997,16(1):73~76.