

## 水稻幼苗叶绿体保护系统对干旱的反应

<sup>1</sup>卢少云 <sup>1</sup>郭振飞\* <sup>1</sup>彭新湘 <sup>2</sup>黎用朝 <sup>1</sup>李宝盛 <sup>1</sup>李明启

<sup>1</sup>(华南农业大学生物技术学院, 广州 510642) <sup>2</sup>(湖南省水稻研究所, 长沙 410125)

**摘要** 干旱条件下水稻耐旱品种湘中籼2号比不耐旱品种湘早籼12号具有较低的质膜相对透性、叶绿素含量降低较少, 表明耐旱品种受伤害较轻。两个品种的抗坏血酸-过氧化物酶(AsA-POD)均降低, 但耐旱品种降低较少。耐旱品种的谷胱甘肽还原酶(GR)活性在干旱初期提高, 不耐旱品种的则变化不大。0.01 mmol/L的百草枯和0.1 mmol/L的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>亦能诱导耐旱品种的GR活性, 但对不耐旱品种的GR活性不受影响, 说明可能是干旱诱导的氧化胁迫诱导了GR活性。干旱条件下两品种的抗坏血酸(AsA)和还原型谷胱甘肽(GSH)含量均是先升后降, 但耐旱品种提高幅度较大。结果表明, 耐旱品种的叶绿体保护系统的活性比不耐旱品种的高。

**关键词** 水稻; 抗坏血酸-过氧化物酶; 谷胱甘肽还原酶; 抗坏血酸; 还原型谷胱甘肽; 干旱胁迫  
**中图分类号** S511.01

## RESPONSES OF PROTECTION SYSTEM IN CHLOROPLAST OF RICE SEEDLINGS TO THE DROUGHT

<sup>1</sup>Lu Shaoyun <sup>1</sup>Guo Zhenfei\* <sup>1</sup>Peng Xinxiang <sup>2</sup>Li Yongchao <sup>1</sup>Li Baosheng <sup>1</sup>Li Mingqi

<sup>1</sup>(College of Biotechnology, South China Agricultural University, Guangzhou 510642)

<sup>2</sup>(Hunan Institute of Rice Research, Changsha 410125)

**Abstract** Under drought condition, the drought-tolerant rice cultivar "Xiangzhongxian No. 2" showed lower relative plasmalemma permeability and less reduction in chlorophyll content as compared with drought-sensitive cultivar "Xiangzaoxian No. 12", which indicated that the drought-tolerant cultivar was less damaged by drought stress. Ascorbate-peroxidase (AsA-POD) activity decreased in both cultivars, but less decreased in drought-tolerant one. The glutathione reductase (GR) activity increased at the beginning of drought in drought-tolerant cultivar, but that did not change obviously in drought-sensitive one. The results also showed that GR activity could be induced by paraquat (0.01 mmol/L) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.1 mmol/L) in drought-tolerant cultivar, but they had no effects on drought-sensitive one, which indicated that the increase of GR activity in drought-tolerant cultivar under drought stress might result from the induction by oxidative stress. In addition, the contents of ascorbate (AsA) and reduced glutathione (GSH) showed a tendency of being increased at

广东省自然科学基金和农业部“八五”应用基础研究项目资助课题。

\*通讯联系人 Corresponding author

1997-12-26 收稿; 1998-06-04 修回

first, then decreased in both cultivars, but with greater increase in the drought-tolerant cultivar. The results suggested that drought-tolerant cultivar had better protection system in chloroplasts against drought stress than the drought-sensitive cultivar.

**Key words** Rice; Ascorbate-peroxidase; Glutathione reductase; Ascorbate; Reduced glutathione; Drought stress

近十多年来已证明, 植物在干旱条件下耐旱性强的品种比耐旱性弱的品种往往具有较高的保护酶活性和抗氧化剂含量<sup>[1,2]</sup>, 耐旱性强的品种抗氧化胁迫能力亦强<sup>[3-5]</sup>。由于水稻栽培中需要大量水, 过去对水稻耐旱性机理研究甚少。蒋明义等<sup>[6]</sup>报告了渗透胁迫对水稻幼苗膜脂过氧化及保护系统的影响。我们曾以蛭石培养水稻, 以停止供水模拟土壤干旱, 研究了不同耐旱性品种水稻幼苗的保护酶(SOD、POD、CAT)活性变化及其对氧化胁迫的抗性<sup>[7,8]</sup>。叶绿体是植物细胞对干旱反应最敏感的细胞器, 本文报告不同耐旱性品种水稻幼苗在干旱条件下叶绿体保护系统的变化。

## 1 材料和方法

**材料及培养** 按照前文<sup>[8]</sup>方法进行。选择2个水稻(*Oryza sativa* L.)品种: 湘中籼2号(耐旱性较强, 简称2号)和湘早籼12号(耐旱性较弱, 简称12号), 由湖南省水稻研究所提供。萌发后的种子播种于盛蛭石(30 g DW)、底部穿孔的塑料盆(直径14 cm), 每盆同时种2个品种, 各50粒。10 d时以木村B营养液将蛭石饱和, 以后停止供水。以继续供水作对照。培养温度 $26 \pm 1$  °C, 光强 $80 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , 每天光照14 h, 相对湿度80%。

**质膜相对透性测定** 按李锦树和王洪春<sup>[9]</sup>的方法。

**叶绿素含量测定** 按Arnon<sup>[10]</sup>的方法。

**抗坏血酸-过氧化物酶活性测定** 按Nakano和Asada<sup>[11]</sup>的方法。

**谷胱甘肽还原酶(GR)活性测定** 参照Gamble和Burke的方法<sup>[12]</sup>进行。剪取0.2 g水稻幼苗地上部, 加入3 ml提取液(0.1 mol/L Tricine-NaOH缓冲液, pH7.8, 含2%PVP)研磨, 4 °C下 $15000 \times g$ 离心10 min, 上清液定容至3 ml, 备用。酶活性测定介质总体积1 ml, 含Tricine-NaOH 40 mmol/L(pH 7.8), GSSG 0.5 mmol/L、NADPH 0.1 mmol/L, 加入0.2 ml酶液作启动反应, 记录3 min内340 nm波长下光吸收的变化。以H<sub>2</sub>O代替GSSG作空白对照。

**抗坏血酸(AsA)和还原型谷胱甘肽(GSH)含量测定** 剪取0.2 g水稻幼苗地上部, 加入3 ml 5%三氯乙酸溶液研磨,  $15000 \times g$ 离心10 min, 上清液定容至3 ml, 用于测定AsA和GSH。参照Ellman的方法<sup>[13]</sup>测定GSH含量, 取0.2 ml样品, 加入150 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>溶液(pH7.7)2.6 ml, 混合后再加入DTNB试剂(75.3 mg DTNB溶于30 ml、0.1 mol/L磷酸缓冲液pH6.8), 以加磷酸缓冲液代替DTNB试剂作空白。摇匀, 于30 °C保温5 min后测定412nm波长下的光吸收值。根据用标准GSH溶液所作的标准曲线计算样品GSH含量。

**AsA 含量测定** 参照 Tanaka 等的方法<sup>[4]</sup>。取样品液 0.2 ml, 与 0.4 ml 75 mol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (pH7.4) 混匀后, 再依次加入 10% 三氯乙酸 0.4 ml、44% 磷酸 0.4 ml, 4% 2,2-二联吡啶(溶于 70% 乙醇) 0.4 ml, 和 3%  $\text{FeCl}_3$  0.2 ml, 混匀后于 37 °C 保温 1 h, 测定 525 nm 波长下的光吸收值。根据标准 AsA 溶液所作标准曲线, 计算样品中 AsA 含量。

## 2 实验结果

### 2.1 干旱对质膜相对透性和叶绿素含量的影响

我们曾测定了 2 号和 12 号水稻幼苗在停止供水 0-15 d 的相对含水量 (RWC) 和丙二醛 (MDA) 含量变化, 结果显示, 在 0-6 d 时 RWC 和 MDA 含量与未作干旱处理的相近, RWC 维持在 95% 左右。随着停止供水时间延长, 蛭石越来越干, 第 9 天不耐旱品种 12 号 RWC 降低, MDA 含量升高, 而耐旱性品种 2 号的 RWC 和 MDA 含量仍维持在 6 d 时的水平。9 d 后两品种 RWC 均下降, MDA 含量升高, 但 2 号 RWC 高于 12 号, MDA 含量低于 12 号<sup>[7]</sup>。质膜相对透性也表明植物受伤害的程度, 停止供水 6 d 后, 两个品种质膜相对透性均提高, 但耐旱品种 2 号比不耐旱的 12 号提高幅度小 (图 1)。

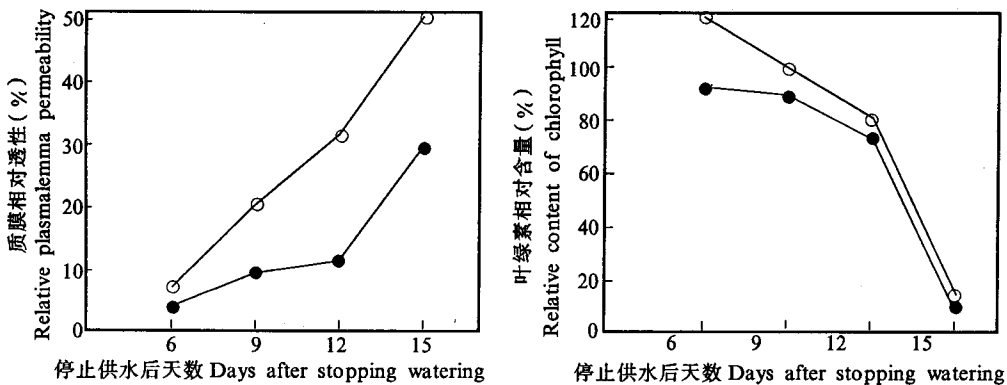


图 1 停止供水后水稻幼苗的质膜相对透性和叶绿素含量的变化

Fig. 1 Changes in relative plasmalemma permeability and chlorophyll content in rice seedlings after stopping watering

● 湘中籼 2 号 Xiangzhongxian 2      ○ 湘早籼 12 号 Xiangzaoxian 12

叶绿素含量变化与 RWC 变化<sup>[7]</sup>相似。停止供水 9 d 时, 2 号叶绿素含量与 6 d 时相近, 但不耐旱的 12 号比 6 d 时降低了 21.4%。此后, 两品种叶绿素含量均降低 (图 1)。

### 2.2 干旱对抗坏血酸 - 过氧化物酶 (AsA-POD) 和 GR 活性的影响

供水条件下, 两个品种的 AsA-POD 活性变化不大; 干旱条件下, 2 号与 12 号品种 AsA-POD 活性均降低, 但 2 号降低幅度较小, 能维持比 12 号高的酶活性 (图 2)。2 号和 12 号的 GR 活性在供水条件下变化不大, 维持相对稳定水平。虽然供水条件下 2 号品种 9 d 时比 6 d 高 20.2%, 但干旱条件下则高 42.7%, 而不耐旱的 12 号干旱条件下未出现升高。以后几天, 干旱条件下两品种 GR 活性均降低 (图 2)。

为探讨干旱条件下不同耐旱性品种 GR 活性变化差异的原因, 测定了正常供水条件下生长 16 d 幼苗喷施百草枯或  $\text{H}_2\text{O}_2$  24 h 后 GR 活性的变化。图 3 表明, 0.01 mmol/L 百草枯和 0.1 mmol/L

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理后, 2号 GR 活性提高, 而 12号品种则不受影响, 表明两个品种的 GR 活性对氧化胁迫反应亦不同。

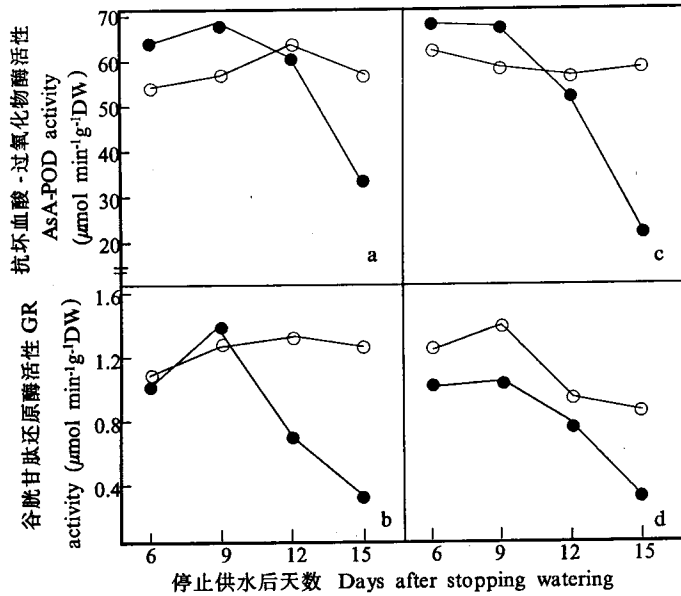


图2 停止供水后水稻幼苗的 AsA-POD 和 GR 活性的变化

Fig. 2 Changes in activities of AsA-POD and GR in rice seedlings after stopping watering

a,b: 湘中籼 2号 Xiangzhongxian 2; c,d: 湘早籼 12号 Xiangzaoxian 12  
○ 供水 Watering ● 停止供水 Stopping watering

### 2.3 干旱对 AsA 和 GSH 含量的影响

AsA 和 GSH 是植物体内存在的抗氧化剂, 是自由基清除系统的重要组成部分。图 4 表明, 正常供水条件下, 2号与 12号的 AsA 含量在 6-9 d 较稳定, 以后升高, 而 GSH 含量一直维持在稳定的水平。干旱条件下, 2号在 9 d 时 AsA 含量比 6 d 时提高 21.7%, 而 12号的 AsA 含量降低 12.4%, 以后两个品种的 AsA 含量均降低; GSH 含量在 6-9 d 均提高, 但 2号提高 20.3%, 12号仅提高 12.1%。

### 3 讨论

叶绿体是植物细胞对干旱反应最敏感的细胞器, 干旱条件下叶绿体内 CO<sub>2</sub> 同化受抑制, 而光合电子传递受影响相对较小<sup>[15]</sup>, 因而更多电子传递到 O<sub>2</sub>, 导致 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 形成, 并产生 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>[16,17]</sup>。SOD 将 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 歧化为 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 叶绿体内 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的清除主要是通过 Halliwell-Asada 途径由 AsA-POD、GR、DHAR 和 AsA、GSH 等共同完

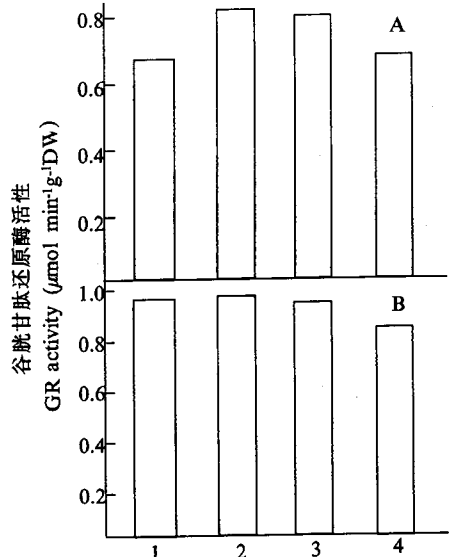


图3 供水条件下百草枯对水稻幼苗 GR 活性的影响

Fig. 3 Effect of paraquat treatment on GR activity in rice seedlings under watering condition

A: 湘中籼 2号 Xiangzhongxian 2; B: 湘早籼 12号 Xiangzaoxian 12; 1. H<sub>2</sub>O; 2. 百草枯 Paraquat 0.01 mmol/L; 3. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.1 mmol/L; 4. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1.0 mmol/L

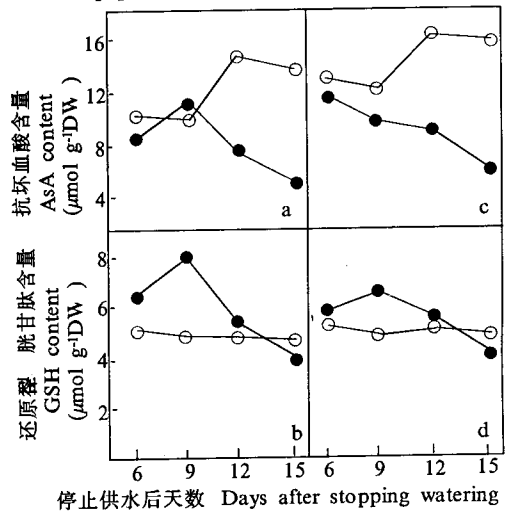


图4 停止供水后水稻幼苗的AsA和 GSH 含量的变化

Fig. 4 Changes in contents of AsA and GSH in rice seedlings after stopping watering

a,b,c,d,○,● 同图 2 a,b,c,d,○,● see Fig. 2

成。AsA 和 GSH 亦可非酶促直接清除  $O_2^-$  和  $H_2O_2$ 。

前文及本文结果表明, 干旱条件下耐旱品种 2 号比不耐旱品种 12 号具有较低的质膜相对透性和 MDA 含量, 具有较高的 RWC 和叶绿素含量<sup>[7]</sup>(图 1), 耐旱品种的  $O_2^-$  产生速率也较低<sup>[8]</sup>。前文报道, 水稻产生耐旱性差异的原因, 是由于耐旱品种在干旱条件下比不耐旱品种能更大幅度提高其保护系统 SOD、POD 和 CAT 活性的能力<sup>[7]</sup>, 这与其它作者对水稻、小麦、玉米的研究结果一致<sup>[6,20,21]</sup>。

本文进一步测定水稻叶绿体保护系统的变化, 与正常供水条件下相比, 2 号与 12 号的 AsA-POD 活性在干旱初期均升高, 而且变化幅度差异不大, 在严重干旱条件下, 两品种的 AsA-POD 活性均降低, 但耐旱品种 2 号的 AsA-POD 活性降幅较小, 维持的酶活性水平比不耐旱品种 12 号的高(图 2)。干旱对 AsA-POD 活性影响因不同植物材料而表现不同, 番茄在水分胁迫下 AsA-POD 活性提高, 另一些植物则不受影响<sup>[18,19]</sup>。GR 活性变化在两品种间表现有差异, 2 号在干旱初期 GR 活性与正常供水条件的相差不大, 干旱 9 d 的活性比 6 d 的高 42.7%, 而 12 号干旱的 GR 活性均比正常供水条件的低, 且干旱 9 d 与 6 d 的活性相比没有升高。AsA 和 GSH 含量亦表现出类似的差异, 在干旱初期, 耐旱品种 2 号的 AsA 和 GSH 分别提高 21.7% 和 20.3%, 而不耐旱 12 号仅提高 12.1%, 同时 AsA 降低(图 4)。这些结果表明, 在干旱初期, 耐旱品种比不耐旱品种能更大幅度提高叶绿体保护系统清除活性氧的能力, 尤其是 GR 活性。

水分胁迫诱导了植物体产生氧化胁迫, 耐旱品种比不耐旱品种具有较强的抗氧化胁迫能力。耐旱品种的玉米叶片在水分胁迫和氧化胁迫(100%  $O_2$ ) 下 GR 和 AsA-POD 活性及巯基含量提高, 而不耐旱品种则降低<sup>[3]</sup>。百草枯和  $H_2O_2$  处理后, 耐旱与不耐旱品系的 GR、AsA-POD 和 SOD 活性均提高, 但耐旱品系比不耐旱品系的高 2-3 倍, GR 活性提高是由于诱导了酶的新合成<sup>[22]</sup>。Baisak 等<sup>[16]</sup> 在小麦上也观察到类似结果。我们曾报告, 水稻耐旱品种 2 号比不耐旱的 12 号对百草枯和  $H_2O_2$  诱导的氧化胁迫抗性强, 百草枯处理后, 诱导 2 号 SOD 活性提高, 因而推测, 水稻幼苗干旱初期(9 d) SOD、POD、CAT 活性的提高, 是由于干旱诱导氧化胁迫, 进一步诱导酶活性提高<sup>[8]</sup>(图 3)。百草枯和  $H_2O_2$  均能诱导水稻耐旱品种 2 号 GR 活性提高, 而不能诱导 12 号。这与干旱初期 2 号 GR 活性提高, 12 号不提高(图 2)的结果一致。这进一步说明, 干旱诱导了氧化胁迫, 导致耐旱品种提高 GR 活性, 以提高叶绿体保护系统清除活性氧能力, 因此其耐旱性强, 而不耐旱品种则不具有这种对干旱灵敏的反应, 因而耐旱性弱。

## 参考文献

- 1 Dhindsa R S, Matowe W. Drought tolerance in two mosses: correlated with enzymatic defence against lipid peroxidation. *J Exp Bot*, 1981, 32:79-91
- 2 Smirnoff N. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytol*, 1993, 125:27-58
- 3 Pastori G M, Trippi V S. Cross resistance between water and oxidative stresses in wheat leaves. *J Agri Sci*, 1993, 120:289-294
- 4 De Longo O T, Gonzalez C A, Pastori G M. Antioxidant defences under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. *Plant Cell Physiol*, 1993, 34:1023-1028

- 5 许长成, 邹琦, 樊继莲等. 抗旱性不同的两个大豆品种对外源  $H_2O_2$  的响应. 植物生理学报, 1996, 22:13-18
- 6 蒋明义, 荆家海, 王韶唐. 渗透胁迫对水稻幼苗膜脂过氧化及体内保护系统的影响. 植物生理学报, 1991, 17(1):80-84
- 7 卢少云, 郭振飞, 彭新湘等. 干旱条件下水稻幼苗的保护酶活性及其与耐旱性关系. 华南农业大学学报, 1997, 18(4):21-25
- 8 郭振飞, 卢少云, 李宝盛等. 不同耐旱性水稻幼苗对氧化胁迫的反应. 植物学报, 1997, 39:748-752
- 9 李锦树, 王洪春. 干旱对玉米叶片细胞透性及膜脂的影响. 植物生理学报, 1983, 9:223-228
- 10 Arnon D. Copper enzymes in isolated chloroplasts: polyphenol-oxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiol, 1949, 24:1-5
- 11 Nakano Y, Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant Cell Physiol, 1981, 22:867-880
- 12 Gamble P E, Burke J J. Effect of water stress on the chloroplast antioxidant system. I. Alteration in glutathione reductase activity. Plant Physiol, 1984, 76:615-621
- 13 Ellman G L. Tissue sulfhydryl groups. Arch Biochem Biophys, 1959, 82:70-77
- 14 Tanaka K, Suda Y, Kondo N et al. Ozone tolerance and the ascorbate-dependent hydrogen peroxide decomposing system in chloroplasts. Plant Cell Physiol, 1985, 26:1425-1431
- 15 Kaiser W M. Effects of water deficit on photosynthetic capacity. Physiol Plant, 1987, 71:142-149
- 16 Baisak R, Rana D, Acharya P B B et al. Alterations in the activities of active oxygen scavenging enzymes of wheat leaves subjected to water stress. Plant Cell Physiol, 1994, 35:489-495
- 17 蒋明义, 郭绍川. 水分亏缺诱导的氧化胁迫和植物的抗氧化作用. 植物生理学通讯, 1996, 32:144-150
- 18 Buchland S M, Price A H, Hendry G A F. The role of ascorbate in drought-treated *Cochlearia atlantica* Pobed. and *Armeria maritima* (Mill.) Willd. New Phytol, 1991, 119:155-160
- 19 Smirnoff N, Colombe S V. Drought influences the activity of enzymes of the chloroplast hydrogen peroxide scavenging system. J Exp Bot, 1988, 39:1097-1108
- 20 王宝山, 赵思齐. 干旱对小麦幼苗膜脂过氧化及保护酶活性的影响. 山东师范大学学报(自然科学版), 1987, 2(11):29-39
- 21 王振镒, 郭嵩光, 罗淑平. 水分胁迫对玉米 SOD 和 POD 活力及同工酶的影响. 西北农业大学学报, 1989, 17(1):45-49
- 22 Pastori G M, Trippi V S. Oxidative stress induces high rate of glutathione reductase synthesis in a drought-resistant maize strain. Plant Cell Physiol, 1992, 33:957-961