

# 超高产杂交稻剑叶衰老过程中的抗氧化性的变化

阳成伟<sup>1,2</sup> 欧志英<sup>1</sup> 林桂珠<sup>1</sup> 彭长连<sup>1\*</sup> 陈贻竹<sup>1</sup>

(1. 中国科学院华南植物研究所, 广东 广州 510650; 2. 中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275)

**摘要:**与对照种汕优 63 相比, 超高产水稻组合培矮 64S/E32 的剑叶在生长后期具有更高的抗氧化酶(抗坏血酸过氧化物酶 APX 和谷胱甘肽还原酶 GR) 活性和小分子抗氧化剂(抗坏血酸 Vc、总 Vc、还原型谷胱甘肽 GSH 和  $\beta$ -胡萝卜素) 含量, 高的清除有机自由基 DPPH $\cdot$  能力, 更低的膜脂过氧化产物丙二醛含量。这表明培矮 64S/E32 剑叶在生长后期有强的抗氧化性, 这种强抗氧化性与超高产水稻在结实后期剑叶中较慢的叶绿素和蛋白质降解速度相一致。  
**关键词:** 超高产水稻; 叶片衰老; 抗氧化系统; 脂质过氧化

中图分类号: S511.01

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395 (2003) 02-0148-05

## Changes in Antioxidant Capacity during Senescence of Flag Leaves in Super High-yielding Hybrid Rice

YANG Cheng-wei<sup>1,2</sup> OU Zhi-ying<sup>1</sup> LIN Gui-zhu<sup>1</sup> PENG Chang-lian<sup>1\*</sup> CHEN Yi-zhu<sup>1</sup>

(1. South China Institute of Botany, the Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China;

2. College of Life Science, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

**Abstract:** Compared to variety Shanyou 63, super high-yielding hybrid rice Pei'ai 64S/E32 had higher activities of ascorbate peroxidase and glutathione reductase, higher antioxidant contents (Vc, total Vc, reduced glutathione, and  $\beta$ -carotene), and higher capacity of scavenging organic free radical, but less content of malondialdehyde (a product of membrane-lipid peroxidation) in flag leaves at late development stage. It was shown that the flag leaves of Pei'ai 64S/E32 at late stages have strong antioxidant capacity, which coincided with the lower degradation of chlorophyll and protein contents in this hybrid at late seed setting stage.

**Key word:** Super high-yielding rice; Leaf senescence; Antioxidant systems; Lipid peroxidation

自从 70 年代在植物衰老研究中引入自由基伤害学说以来, 活性氧自由基与植物衰老的关系的研究正在不断的深入<sup>[1,2]</sup>。氧毒害是氧化逆境下需氧生物受害的主要原因, 光合植物细胞因其本身的有氧状况和类囊体膜上存在许多光敏感部位和不饱和脂肪酸而更易受到活性氧伤害<sup>[3]</sup>。植物消耗氧, 其中 1% 用来产生活性氧, 如超氧阴离子自由基 ( $O_2^-$ )、过氧化氢 ( $H_2O_2$ ) 和单线态氧 ( $^1O_2$ )。为了防止氧化破坏, 植物在进化过程中形成了一个复杂的抗氧化系统包括酶促和非酶促系统, 超氧化物歧化酶 SOD、APX、GR 等是主要清除  $O_2^-$  和  $H_2O_2$  的酶类, 而 Vc、

GSH、 $V_E$  和  $\beta$ -胡萝卜素等是主要的非酶促抗氧化剂<sup>[4]</sup>。正常情况下, 细胞内活性氧自由基的产生和清除处于动态平衡, 但植物在各种逆境情况下(如高光、高温, 干旱, 叶片衰老等), 这种平衡会受到破坏, 导致细胞受到伤害。

水稻产量是由多种因子决定的<sup>[5]</sup>, 其中水稻生长后期叶片早衰是产量的限制因素之一。对水稻叶片衰老过程中活性氧代谢的研究虽有较多的报道<sup>[6,7]</sup>, 但探讨超高产杂交水稻开花结实期间的抗氧化性与早衰的关系仍少见报道。本文以广泛推广的杂交水稻组合汕优 63 作对照, 研究超高产杂交水稻培矮 64S/E32 开花结实期间剑叶衰老与抗氧化系统之间的关系, 为水稻的高光效育种提供理论依据。

收稿日期: 2002-06-20 接受日期: 2002-10-16

基金项目: 国家重点基础研究发展规划项目 (G1998010100)

\* 通讯作者 Corresponding author

## 1 材料和方法

**实验材料** 杂交水稻 (*Oryza sativa* L.) 超高产组合培矮 64S/E32 (简称“培矮”) 和对照组合汕优 63 (简称“汕优”) 种子由湖南杂交水稻研究中心提供。于 2001 年 4 月种植于华南植物研究所的实验田中, 常规管理。选取生长势相近的植株, 在不同时期于早晨 6 时取剑叶进行有关测定。

**抗氧化酶活性的分析** 超氧化物歧化酶 SOD, 抗坏血酸过氧化物酶 APX, 谷胱甘肽还原酶 GR 活性测定参照 Yang 等<sup>[9]</sup>的方法。

**抗氧化剂含量的测定** 抗坏血酸 Vc 和还原型谷胱甘肽 GSH 含量参照 Yang 等<sup>[9]</sup>的方法。

**有机自由基 DPPH·清除能力的测定** 参考彭长连等<sup>[9]</sup>的方法, 稍有修改。利用 DPPH· (1,1-二苯基-2-苦基苯肼, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 溶液的特征紫红色团的吸收峰, 以分光光度法测定加抗氧化剂或植物提取液后  $A_{525}$  光吸收的下降表示其对有机自由基的清除能力 (organic free radical scavenging capacity, ORSC)。反应体积 2 ml, DPPH· (溶于少量甲醇后, 以 50% 乙醇配制) 浓度为  $120 \mu\text{mol/L}$ 。反应时加植物提取液 (50% 的乙醇提取) 0.1 ml 及 1.9 ml DPPH· 溶液。室温静置 20 min 后测吸光度变化。在此条件下保留的 DPPH·% 即  $R = [(A-B)/A_0] \times 100\%$ , 而清除率 (ORSC%) =  $(1-R) \times 100\%$ , 这里  $A_0$  为未加样的 DPPH· (1.9 ml DPPH· + 0.1 ml 50% 乙醇) 溶液的吸光度,  $A$  为样品与 DPPH· 反应后的吸光度,  $B$  为对照 (样品 0.1 ml + 1.9 ml 50% 乙醇) 的吸光度。用公式 (ORSC% × 反应加入的 DPPH·  $\mu\text{g}$  数) / 样品  $\mu\text{g}$  数求得外源抗氧化剂或植物样品对 DPPH· 的清除能

力 ( $\mu\text{g DPPH} \cdot \mu\text{g}^{-1}$  样品)。

**$\beta$ -胡萝卜素的测定** 参照 Gilmore 和 Yamamoto<sup>[10]</sup>的方法。

**叶绿素含量的测定** 参考 Arnon<sup>[11]</sup>的方法。

**可溶性蛋白质含量的测定** 按照 Bradford<sup>[12]</sup>的方法, 以牛血清蛋白作标准。

**MDA 含量的测定** 参照林植芳等<sup>[6]</sup>方法。称取 0.5 g 叶片加入 3 ml 的 0.05 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.0)。加少量石英砂, 于冰浴中研磨。粗提液  $20\,000 \times g$  离心 20 min, 收集上清液定容至 5 ml。从上清液中取 1.5 ml 并加入 2.5 ml 0.5% 硫代巴比妥酸 (20% 三氯乙酸溶液配制) 混合之后在  $100^\circ\text{C}$  水浴中加热 25 min, 然后冰浴冷却,  $2\,000 \times g$  再离心 5 min。取上清液在 532 nm 及 600 nm 下分别测定 OD 值。

## 2 结果和分析

### 2.1 叶片衰老过程中叶绿素和可溶性蛋白质的相对含量

水稻叶中叶绿素和蛋白质含量的下降是衡量水稻叶片衰老的可靠指标<sup>[13]</sup>。从图 1 中可见, 随着剑叶的衰老, 两个组合剑叶中的叶绿素和蛋白质含量逐渐下降, 可溶性蛋白质含量比叶绿素含量下降得更多。移栽后 76 d 之前, “汕优”叶绿素的降解速率和“培矮”差异不明显, 随后则前者明显快于后者。两个组合的可溶性蛋白质含量的变化趋势与叶绿素一样, 只是“汕优”可溶性蛋白质的降解速率在移栽后 66 d 就开始表现出比“培矮”明显加快。由此可见, “汕优”的蛋白质和叶绿素降解速率均比“培矮”快, 即“培矮”叶片衰老速度相对较慢。

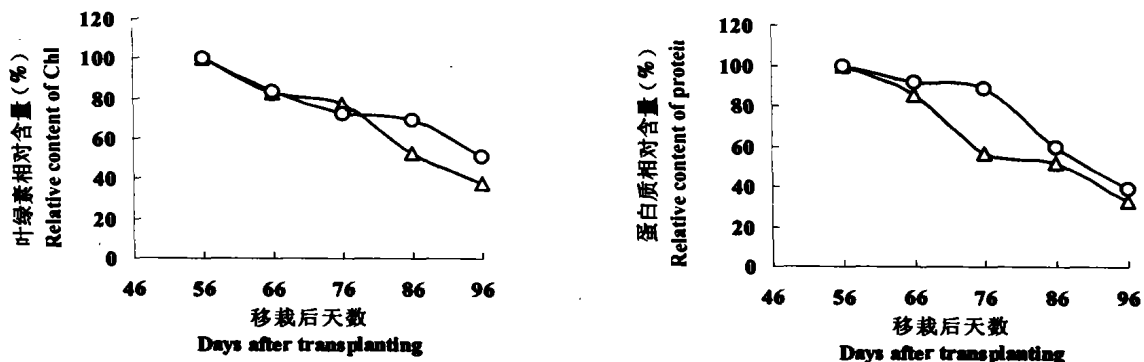


图 1 水稻叶片衰老过程中叶绿素和可溶性蛋白质相对含量的变化

Fig. 1 Changes in relative contents of Chl and soluble protein during the senescence of flag leaves of Shanyou 63 (△) and Peiai 64S/E32 (○)

2.2 叶片衰老过程中抗氧化酶活性

图 2 是两个组合的 Mehler- 抗坏血酸过氧化物酶途径 3 种主要酶 SOD、APX 和 GR 的活性在剑叶衰老过程中的变化。随着叶片的衰老, 3 种酶活性变化不尽相同, APX 和 GR 的活性先上升而后逐渐下降, “培矮”的 GR 活性在移栽 70 d 以后较“汕优”63 有更高的活性优势。两个组合的 SOD 活性变化相对较为平缓, 在生长后期(移栽 76 d 后), “培矮”的 SOD 活性有所增加, 而“汕优”则先升后降。总体上来看, “培矮”的 APX 和 GR 活性在生长后期均高于“汕优”, 但“汕优”的 SOD 活性明显高于“培矮”, 且在整个结实期内保持比较稳定的水平。

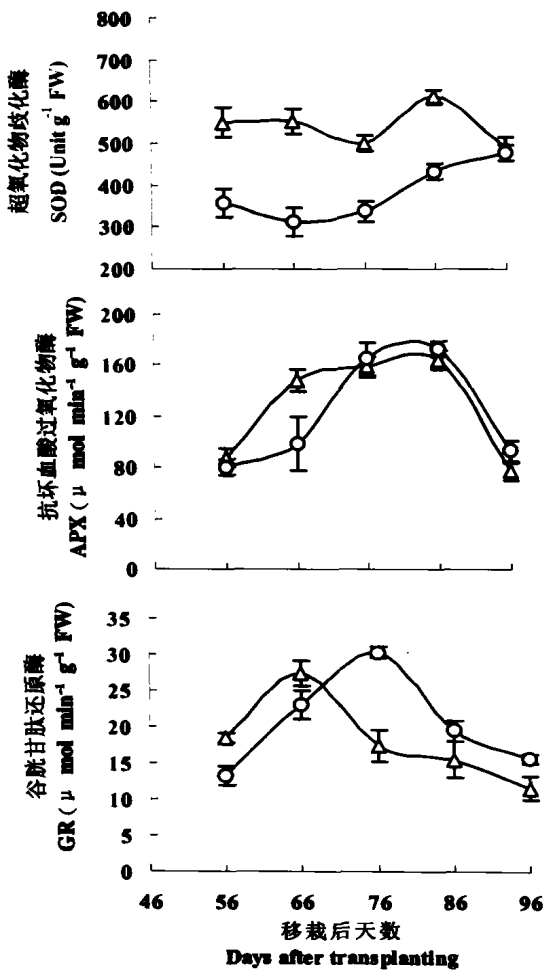


图 2 水稻剑叶衰老过程中 SOD、APX 和 GR 活性的变化  
Fig.2 Changes in activities of superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX) and glutathione reductase (GR) during the senescence of flag leaves of Shanyou 63 ( $\Delta$ ) and Peiai 64S/E32 ( $\circ$ )

2.3 叶片衰老过程中抗氧化小分子的含量

相比之下, 非酶促的抗氧化系统比酶促的有更明显的变化。从图 3 可见, 总 Vc、GSH 和还原型 Vc

的含量在移栽后 66–86 d 明显上升, 尤其是还原型的 Vc, “培矮”是“汕优”的 3 倍左右, 后期(移栽 86 d 以后) 它们的下降并不明显。两个组合剑叶的 GSH 和  $\beta$ -胡萝卜素的含量在生长前后期有十分明显的差异(图 3), 在生长后期“培矮”明显高于“汕优”。

2.4 叶片衰老过程中清除有机自由基 DPPH· 能力

清除有机自由基 DPPH· 法是一种快速、简便和灵敏的评估植物抗氧化能力的可行方法<sup>[9]</sup>。从图 4 看出, 两组合的剑叶在生长前期(移栽后 56–76 d) 清除有机自由基 DPPH· 的能力并无明显差异, 但在后期(移栽后 76–96 d), “培矮”的清除能力明显高于“汕优”。

2.5 叶片衰老过程中 MDA 含量

MDA 是植物膜脂过氧化作用的最终产物, 是膜系统受伤害的重要标志之一。由图 5 可见, “培矮”的剑叶在不同生长期的 MDA 含量均比“汕优”低。

3 讨论

水稻籽粒 2/3 以上的干物质是开花后通过光合作用得到的, 由于水稻叶片衰老导致光合作用下降, 因此水稻在结实期内叶片衰老快慢会直接影响水稻的产量<sup>[13,14]</sup>。水稻生长期较短, 随着叶片的衰老, 光合色素和蛋白质含量下降(图 1), 但以“汕优”的下降速度较快。表明“汕优”剑叶衰老速度快于“培矮”, 易发生早衰现象。

“汕优”剑叶在整个生长期内 MDA 含量均比“培矮”高, 且生长后期增幅加大(图 5)。MDA 是膜脂过氧化作用的最终产物, 又是一种能强烈地与细胞内各种成分发生反应的物质, 其积累为膜结构及功能伤害的表现<sup>[19]</sup>。MDA 含量在整个生长期内持续增加, APX 和 GR 活性与抗氧化剂小分子(还原型 Vc、总 Vc、GSH 和  $\beta$ -胡萝卜素)含量在灌浆期均上升, 随后均呈现不同程度的下降(图 2, 3), 这表明水稻剑叶生长前期 MDA 缓慢增加并不完全是叶片抗氧化能力下降的结果, 而生长后期 MDA 含量上升幅度加大则与叶片的抗氧化能力下降密切相关。

两个组合相比较, 生长后期“培矮”的 APX 和 GR 活性与其底物还原型 Vc、总 Vc 和 GSH 含量明显高于“汕优”, 而 MDA 含量比“汕优”低, 这表明超高产杂交水稻“培矮”在生长后期表现出较强的抗氧化能力, 能够较为及时地清除细胞内的活性氧, 减少了细胞因活性氧的积累而造成的膜脂过氧

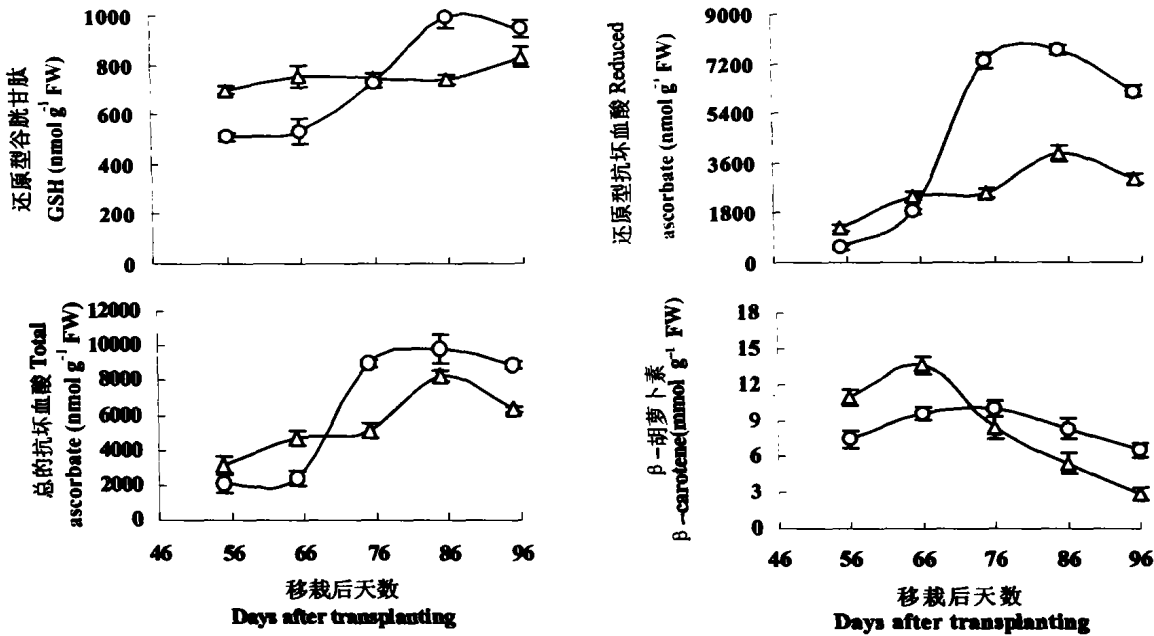


图 3 水稻剑叶衰老过程中 GSH、还原型 Vc、总 Vc 和 β-胡萝卜素含量的变化

Fig.3 Changes in contents of GSH, reduced Vc, total Vc and β-carotene during the senescence of flag leaves of Shanyou 63(△)and Peiai 64S/E32(○)

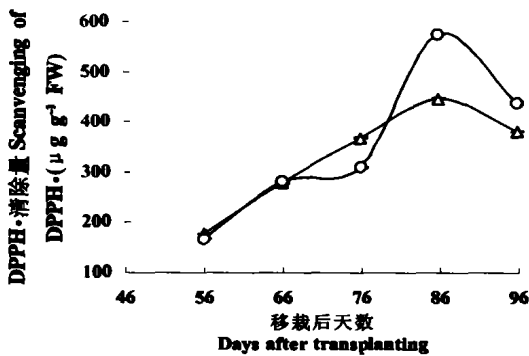


图 4 剑叶衰老过程中清除有机自由基 DPPH· (1,1-二苯基-2-苦基苯肼) 能力的变化

Fig. 4 Change in the capacity of scavenging organic free radical DPPH· (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) during the senescence of flag leaves of Shanyou 63(△)and Peiai 64S/E32(○)

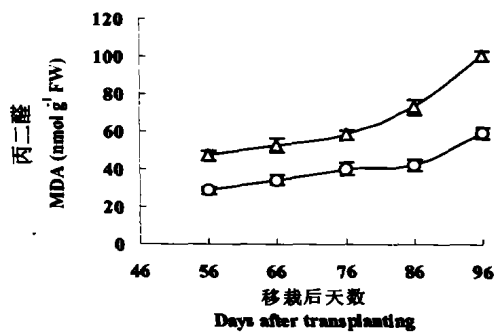


图 5 水稻剑叶衰老过程中丙二醛含量的变化

Fig.5 Change in malondialdehyde (MDA) content during the senescence of flag leaves of Shanyou 63(△)and Peiai 64S/E32(○)

化伤害,这可能是“培矮”不易早衰的原因之一。由于膜脂过氧化作用涉及到多种活性氧及酶促和非酶促抗氧化系统的复杂平衡关系,为了表示机体总的清除自由基的能力,应用彭长连等<sup>[9]</sup>报告中的用清除有机自由基 DPPH· 法来评价植物总的抗氧化能力,结果进一步支持了上述结论。

从以上的分析表明,超高产水稻组合“培矮”在生长后期有较强的抗氧化能力,与它在生长后期剑叶中叶绿素和蛋白质降解较慢是相一致的,其叶片不易早衰。因此,在今后两系法杂交育种研究中,在注重农艺性状育种的同时,还要加强生理性状的育种研究,使水稻优良的外部形态与强的生理机能相结合,实现水稻的高产。

### 参考文献

- [1] Wei D Z(魏道智), Dai X B(戴新宾), Xu X M(许晓明), et al. Several hypotheses on the mechanism of the plant leaf senescence [J]. Guihaia (广西植物), 1998, 18 (1):89-96 (in Chinese)
- [2] Marcela S, Susane P. Oxygen radical generation by isolated microsome from soybean seedling [J]. Plant Physiol, 1992, 100: 1263-1268.
- [3] Halliwell B, Gutteridge J M C. Free radicals in biology and medicine [M]. 2nd. Clarendon, Oxford. 1989. 1-59.
- [4] Foyer C H, Harbison J. Relationship between antioxidant metabolism and carotenoids in the regulation of photosynthesis [A]. In: Frank H A, Young A J, Britton G, et al. The photochemistry of Carotenoids [M]. Dordrecht:Kluwer Academic

- Publishers, 1999. 305-325.
- [5] Lawlor D W. The effects of water deficit on photosynthesis [A]. In: Smirnoff N. Environment Plant Metabolism [M]. Bios Scientific Publishers: Oxford, 1995. 129-156.
- [6] Lin Z F (林植芳), Li S S (李双顺), Lin G Z (林桂珠), et al. Superoxide dismutase activity and lipid peroxidation in relation to senescence of rice leaves [J]. Acta Bot Sin (植物学报), 1984, 26 (6): 605-615. (in Chinese)
- [7] Duan J (段俊), Liang C Y (梁承邺), Huang Y W (黄毓文). Studies on leaf senescence of hybrid rice at flowering and grain formation stage [J]. Acta Phytophysiol Sin (植物生理学报), 1997, 23(2): 139-144. (in Chinese)
- [8] Yang C W, Chen Y Z, Peng C L, et al. Daily changes of components of xanthophyll cycle and antioxidant systems in leaves of rice at different developing stage [J]. Acta Physiol Plant, 2001, 23(4): 361-369.
- [9] Peng C L (彭长连), Chen S W (陈少薇), Lin Z F (林植芳), et al. Detection of antioxidative capacity in plants by scavenging organic free radical DPPH• [J]. Prog Biochem Biophys (生物化学和生物物理进展), 2000, 27(6): 367-370. (in Chinese).
- [10] Gilmore A M, Yamamoto H Y. Resolution of lutein and zeaxanthin using a non-encapped, lightly carbon-loaded C<sub>18</sub> high-performance liquid chromatographic column [J]. J Chromatogr, 1991, 543: 137-145.
- [11] Arnon D I. Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenoloxidase in *Beta vulgaris* [J]. Plant Physiol, 1949, 24: 1-15.
- [12] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Anal Biochem, 1976, 72: 248-254.
- [13] Lu D Z (陆定志), Pan Y C (潘裕才), Ma Y F (马跃芳), et al. Physiological and biochemical studies on leaf senescence at heading and grain formation stage in hybrid rice [J]. Sci Agri Sin (中国农业科学), 1988, 21: 21-24. (in Chinese).
- [14] Murchie E H, Chen Y Z, Hubbart S, et al. Interactions between senescence and leaf orientation determine *in situ* patterns of photosynthesis and photoinhibition in field-grown rice [J]. Plant Physiol, 1999, 119: 553-563.
- [15] Halliwell B. Chloroplasts Metabolism [M]. Clarendon Press: Oxford, 1981. 179.