

## 氧化胁迫对水稻幼苗抗冷力的影响

李美茹 刘鸿先 王以柔

(中国科学院华南植物研究所, 广州 510650)

**摘要** 利用  $H_2O_2$  和甲基紫精(MV)对水稻幼苗作三种不同程度的氧化胁迫预处理。结果表明:轻度氧化胁迫预处理(10  $\mu\text{mol/L}$   $H_2O_2$  或 10  $\mu\text{mol/L}$  MV 处理 4 h)提高了水稻幼苗的抗冷力,严重氧化胁迫预处理(10  $\mu\text{mol/L}$   $H_2O_2$  或 10  $\mu\text{mol/L}$  MV 分别处理 16 h 和 40 h)则削弱水稻幼苗的抗冷力。氧化胁迫预处理刺激了水稻幼苗叶片抗氧化酶(SOD, CAT, POX 和 APX)的活性。经冷胁迫后,不同预处理苗的叶片抗氧化酶活性、膜脂过氧化和膜结构的变化趋势不同:轻度氧化胁迫预处理使幼苗仍保持较高的抗氧化酶活性,减轻了由冷胁迫引起的膜脂过氧化和细胞膜的渗漏程度,而严重氧化胁迫预处理则相反。因此,水稻幼苗对氧化胁迫感知并作出反应的机制(氧化应激机制)在水稻幼苗对低温反应和适应过程中起着很重要的调节作用。

**关键词** 氧化胁迫; 水稻幼苗; 冷适应性; 抗氧化酶

**中图分类号** Q945.78

## EFFECT OF OXIDATIVE STRESS ON COLD TOLERANCE IN RICE SEEDLINGS

Li Meiru Liu Hongxian Wang Yirou

(*South China Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650*)

**Abstract** Effects of different extents of oxidative stress caused by 10  $\mu\text{mol/L}$   $H_2O_2$  or 10  $\mu\text{mol/L}$  methyl viologen (MV) on cold tolerance of rice seedlings were studied. The results showed that mild oxidative stress (10  $\mu\text{mol/L}$   $H_2O_2$  or 10  $\mu\text{mol/L}$  MV for 4 h) could induce cold tolerance, while severe oxidative stress might aggravated chilling injury on rice seedlings. The antioxidatase (POX, SOD, CAT andf APX) activities in leaves from various pretreated seedlings were all increased. After chilling stress, the changes in antioxidatase activities, electrolyte leakage and MDA content among different pretreated seedlings were different. Mild oxidative stress could sustain high level of antioxidatase activities, reduce the increase of membrane lipid peroxidation and cellular electrolyte leakage induced by chilling stress; but contrary effect was observed by severe oxidative pretreatment. It is suggested that the mechanism of rice seedlings responding to oxidative stress (cellular oxidative stress response) might be the important regulatory mechanism for rice seedlings during chilling stress or cold tolerance.

**Key words** Oxidative stress; Rice seedlings; Cold tolerance; Antioxidatase

生物氧自由基代谢及其生理作用的理论知识已被广泛应用于各生命学科领域的研究,活性氧构成氧化胁迫毒害细胞的现象,这几乎是一种共识。活性氧可以充当植物抗氧化能力的诱导者,如当 $O_2^-$ 水平提高时,SOD活性也随之增加<sup>[1]</sup>;  $H_2O_2$ 能刺激SOD、CAT和GR活性<sup>[2]</sup>,这意味着氧化胁迫也有其积极的一面,即可能通过调节抗氧化酶活性达到调节细胞活力的作用。因此,除了认识到氧化胁迫的负作用外,氧化胁迫的正效应也应得到同样的重视。大量研究表明<sup>[3]</sup>,细胞活性氧代谢的失调及活性氧对细胞的损伤是植物在低温逆境下发生伤害的重要原因之一。而提高植物抗冷性的一个重要特征,表现在细胞对活性氧防御能力的提高。因此,细胞内活性氧代谢的变化与植物抗冷力变化密切相关<sup>[4]</sup>。Prasad等<sup>[5]</sup>首次证明无论是冷害还是冷驯化处理都是对玉米幼苗施加一个氧化胁迫的过程,并证明常温下适量的 $H_2O_2$ 处理,可以模拟冷驯化而提高植物的抗冷力。本文探讨不同程度的氧化胁迫对水稻幼苗冷适应性的影响,阐明氧化胁迫与水稻幼苗抗冷力调节的关系。

## 1 材料和方法

**材料的培养** 以水稻(*Oryza sativa* L.)品种特三矮2号为实验材料,材料培养方法同前文<sup>[6]</sup>。

**氧化胁迫处理** A:在冷胁迫处理前的16 h,分别用 $10 \mu\text{mol/L}$   $H_2O_2$ 和 $10 \mu\text{mol/L}$ 甲基紫精(MV)灌根处理幼苗,于黑暗中放置4 h,然后洗去 $H_2O_2$ 和MV,让幼苗在黑暗中恢复生长12 h。B:在冷胁迫处理前的16 h,分别用 $10 \mu\text{mol/L}$   $H_2O_2$ 和 $10 \mu\text{mol/L}$  MV灌根处理幼苗,于黑暗中放置16 h,在冷胁迫前洗去处理的溶液。C:在冷胁迫处理前的16 h,分别用 $10 \mu\text{mol/L}$   $H_2O_2$ 和 $10 \mu\text{mol/L}$  MV灌根处理幼苗,直至冷胁迫后才洗去处理溶液。以水灌根的幼苗为对照,对照苗同样置于暗下生长。将以上所有幼苗置 $1^\circ\text{C}$ 、光照强度为 $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 的培养箱中用冷胁迫处理2 d,取出置培养架上恢复生长,在恢复生长的第3 d统计幼苗的成活率。

**叶片相对电导率的测定** 按刘鸿先等<sup>[7]</sup>的方法。

**叶片丙二醛(MDA)含量的测定** 按Heath和Packer<sup>[8]</sup>的方法。

**叶片抗氧化酶活性的测定** 谷胱甘肽还原酶(GR)活性的测定按Foyer和Halliwell<sup>[9]</sup>的方法,GR活性以 $\Delta\text{OD}_{340 \text{ nm}} \text{mg}^{-1}\text{min}^{-1}$ 表示;超氧化物歧化酶(SOD)活性测定按Giannoplitis和Ries<sup>[10]</sup>的方法,以抑制光还原NBT 50%为一个酶活性单位;过氧化氢酶(CAT)活性测定按Chance和Maehly<sup>[11]</sup>的方法,CAT以每分钟转变 $1 \mu\text{mol}$   $H_2O_2$ 为一个酶活性单位;过氧化物酶(POX)活性的测定按Omran<sup>[12]</sup>的方法,POX活性以 $\Delta\text{OD}_{436 \text{ nm}} \text{mg}^{-1}\text{min}^{-1}$ 表示;抗坏血酸过氧化物酶(APX)活性的测定按Nakano和Asada<sup>[13]</sup>的方法,APX活性以 $\Delta\text{OD}_{290 \text{ nm}} \text{mg}^{-1}\text{min}^{-1}$ 表示。

## 2 结果

### 2.1 不同程度的氧化胁迫对水稻幼苗抗冷力的影响

水稻幼苗经 $1^\circ\text{C}$ 、光强 $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 胁迫处理2 d,其成活率下降为55%。在冷胁迫前,预先分别用 $10 \mu\text{mol/L}$   $H_2O_2$ 和MV泡根4 h,接着在黑暗中恢复生长12 h的幼苗,经冷

胁迫后其成活率分别提高到 82% 和 89%。延长氧化剂预处理时间至 16 h, 在冷胁迫后, 明显降低了幼苗的成活率。而延长氧化剂浸泡时间直至冷胁迫后才洗去处理液, 幼苗完全死亡(表 1)。这说明不同程度的氧化胁迫预处理对幼苗抗冷力的影响不样, 轻度的氧化胁迫预处理可以诱发提高幼苗的抗冷力, 而严重的氧化胁迫预处理则削弱了幼苗的抗冷力。

## 2.2 不同程度的氧化胁迫对水稻幼苗叶片细胞膜透性和膜脂过氧化的影响

植物细胞电解质的大量泄漏, 通常被认为是膜伤害或变性的重要标志。丙二醛(MDA)是细胞膜膜脂过氧化反应的重要产物, 其 MDA 含量常作为发生膜脂过氧化反应的主要指标。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 MV 处理水稻幼苗 4 h 或 16 h 对叶片细胞电解质渗出率没有影响(表 2)。冷胁迫后测定各处理的叶片电解质渗出率, 发现 A 预处理者减轻了冷胁迫诱发的电解质渗出率的增加, 而 B、C 预处理明显加重了冷胁迫对电解质渗出率的影响, 以 C 预处理的最为严重(图 1a)。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、MV 处理水稻幼苗 4 h, 对 MDA 的含量无影响, 处理 16 h 增加 MDA 含量 13%—21% (表 2)。冷胁迫后叶片 MDA 含量的变化趋势与电解质渗出率的变化相似(图 1b)。

## 2.3 不同程度氧化胁迫对水稻幼苗叶片细胞抗氧化酶活性的影响

经 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 或 MV 处理 4 h, 叶片的 CAT 活性明显增加, 延长处理至 16 h 或在 4 h 处理后让其恢复 12 h, CAT 仍可保持高活性。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 MV 处理对 SOD、POX 和 APX 活性的影响与 CAT 的实验结果相似, 但可以看到 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对 CAT、POX 和 APX 的刺激作用较大; 而 MV 对 CAT 和 SOD 的刺激作用较大。GR 活性则不受 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、MV 的影响(表 3)。

表 2 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 MV 处理时间对水稻幼苗叶片电解质渗漏和丙二醛含量的影响  
Table 2 Effects of treated time by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or MV on the electrolyte leakage and MDA content in leaves of rice seedlings

	对照 Control	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		MV	
		4h	16h	4h	16h
电解质渗漏 Electrolyte leakage (%)	9.6±0.4	97.±0.3	9.2±0.4	9.4±0.3	9.5±0.1
MDA 含量 MDA content (μmol g <sup>-1</sup> DW)	15.2±0.5	15.4±0.3	17.2±0.3	16.1±0.4	18.4±0.2

对照: 以水灌根的幼苗为对照苗, 对照苗同样置于暗下生长 16 h。

Control: Seedlings immersed in water in dark at room temperature for 16 h were used as control.

表 1 不同程度的氧化胁迫预处理对水稻幼苗遭受冷胁迫后成活率的影响(%)

Table 1 Effects of different degrees of oxidative stress pretreatment on the survival rate of rice seedlings after chilling stress (%)

预处理 Pretreatment	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (10 μmol/L)	MV (10 μmol/L)
A	55±4	82±3	89±6
B	55±4	20±5	15±7
C	55±4	0	0

冷胁迫条件: 1℃、150 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> FPD, 2 d, A、B、C 见材料和方法, H<sub>2</sub>O: 以水灌根的幼苗为未处理者, 置于暗下生长 16 h, 然后冷胁迫处理。表 2 和图 1, 2 同。

The roots of rice seedlings were immersed in the solution in the dark at room temperature for 4 h (A) and 16 h (B and C) of pretreatment. The pretreated seedlings were then washed with water and incubated in the dark for an additional 12 h, then chilled (A); only washed with water before chilling (B); washed with water after chilling (C). H<sub>2</sub>O: Seedlings immersed in water in the dark for 16 h as unpretreatment. Chilling stress was at 1℃ under 150 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> FPD for 2 days.

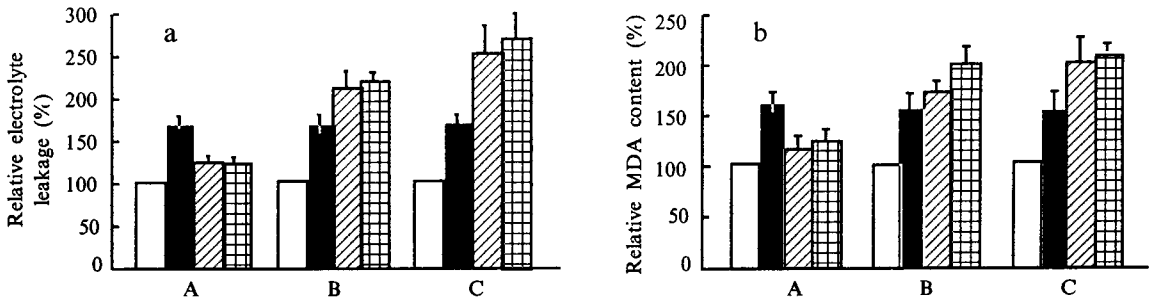


图1 不同程度氧化胁迫预处理对冷胁迫条件下水稻幼苗叶片电解质渗漏和MDA含量的影响

Fig. 1 Effects of different extents of oxidative stress pretreatment on the electrolyte leakage and MDA content in leaves of rice seedlings under chilling stress

A, B, C, H<sub>2</sub>O and Control are as same as in Tables 1 and 2. The values of Control are 8.9% (electrolyte leakage) and 14.7 μmol g<sup>-1</sup>DW (MDA content)

□ Control; ■ H<sub>2</sub>O; ▨ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; ▩ MV

表3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>和MV处理时间对水稻幼苗叶片各种抗氧化酶活性的影响(以对照为100%)

Table 3 Effects of time treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and MV on the activities of antioxidases in leaves of rice seedlings (% of control)

处理 Treatment	CAT (%)	POX (%)	APX (%)	SOD (%)	GR (%)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>					
4 h	138 ± 4	138 ± 3	139 ± 4	103 ± 2	100 ± 3
16 h	144 ± 3	122 ± 2	132 ± 8	110 ± 5	102 ± 3
4 h + 12 hR	144 ± 2	131 ± 2	148 ± 4	120 ± 1	95 ± 3
MV					
4 h	140 ± 5	113 ± 4	119 ± 2	125 ± 7	99 ± 1
16 h	133 ± 2	127 ± 6	117 ± 3	125 ± 4	95 ± 4
4 h + 12 hR	148 ± 3	120 ± 9	121 ± 4	133 ± 3	98 ± 4

4 h和16 h的处理同表2; 4 h+12 hR:用处理液处理4 h, 然后于室温暗下恢复生长12 h;  
Treatment of 4 and 16 h are the same as in Table 2; 4 h+12 hR: Treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or MV for 4 h, then remove H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and MV, the seedlings were recovery at room temperature for additional 12 h. Control values are 39.75 U mg<sup>-1</sup>min<sup>-1</sup> (CAT), 1.43 ΔOD<sub>436 nm</sub> mg<sup>-1</sup>min<sup>-1</sup> (POX), 13.11 U mg<sup>-1</sup>min<sup>-1</sup> (SOD), 3.62 ΔOD<sub>290 nm</sub> mg<sup>-1</sup>min<sup>-1</sup> (APX) and 0.12 ΔOD<sub>340 nm</sub> mg<sup>-1</sup>min<sup>-1</sup> (GR).

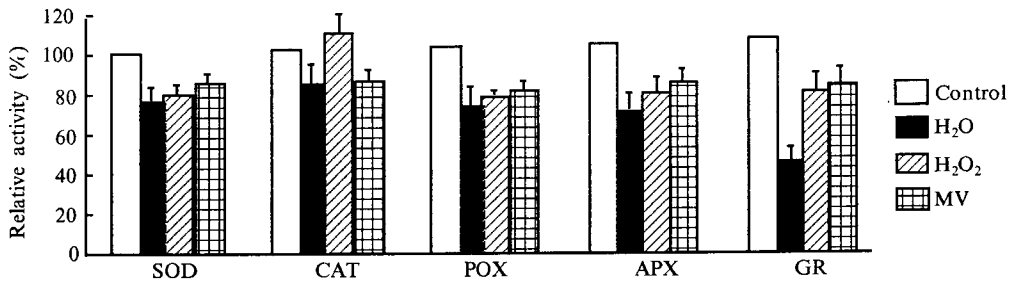


图2 A项预处理对冷胁迫下水稻幼苗叶片各种抗氧化酶活性的影响

Fig. 2 Effect of pretreatment A on the activities of antioxidases in leaves of rice seedlings

H<sub>2</sub>O and pretreatment A see Table 1. Control see Table 2. The values of control are 32.75 U mg<sup>-1</sup>min<sup>-1</sup> (CAT), 1.53 ΔOD<sub>436 nm</sub> mg<sup>-1</sup>min<sup>-1</sup> (POX), 12.11 U mg<sup>-1</sup>min<sup>-1</sup> (SOD), 3.22 ΔOD<sub>290 nm</sub> mg<sup>-1</sup>min<sup>-1</sup> (APX) and 0.10 ΔOD<sub>340 nm</sub> mg<sup>-1</sup>min<sup>-1</sup> (GR).

水稻幼苗经  $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $150\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  光强胁迫处理 2 d 后, 各种抗氧化酶活性均不同程度降低。但各预处理之间表现出很大的差异, A 预处理的各抗氧化酶活性高于未预处理者( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), 特别是对 GR 活性的影响更明显(图 2)。但经 B、C 预处理的, 各抗氧化酶活性与未经预处理的接近(未列出)。

### 3 讨论

玉米冷驯化过程中细胞中  $\text{H}_2\text{O}_2$  首先积累, 然后 CAT 3 和 POX 活性才提高<sup>[5]</sup>。拟南芥菜愈伤组织于  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  处理第 1 天,  $\text{H}_2\text{O}_2$  的含量增加, APX 活性在处理的第 4 天才增加<sup>[4]</sup>。外源施用氧化剂时也能诱导抗氧化酶活性的提高。Paraquat 能诱导玉米叶片 SOD<sup>[1]</sup>、GR<sup>[15]</sup> 的重新合成, 提高豌豆叶片 APX 的活性<sup>[6]</sup>。许长城等<sup>[2]</sup> 的实验表明适当浓度的  $\text{H}_2\text{O}_2$  能刺激大豆叶片 SOD、CAT 与 GR 活性, 这是由于  $\text{H}_2\text{O}_2$  加速了 SOD、CAT 与 GR 的翻译过程, 从而促进这些酶的合成。本实验结果显示  $10\text{ }\mu\text{mol/L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  或 MV 刺激了水稻幼苗叶片 SOD、CAT、POX 和 APX 的活性, 但对 GR 活性影响不大(表 3)。

不同程度的氧化胁迫对水稻幼苗抗冷力的影响是不一样的(表 1), 虽然在冷胁迫前, 不同程度的氧化胁迫预处理对刺激幼苗叶片 SOD、POD、CAT 和抗坏血酸过氧化物酶(AsA-POD) 的活性有一定的作用(表 3), 但在冷胁迫后, 抗氧化酶活性变化不一样。经 A 预处理的各抗氧化酶活性表现为高于未预处理者(图 2); 而经 B、C 预处理的各抗氧化酶活性水平与未预处理者相似。由此可见, 轻度的氧化胁迫处理可能是通过刺激细胞抗氧化酶活性的增加, 从而对随后的冷胁迫诱发的活性氧起清除作用, 减轻或阻止了冷胁迫条件下诱发活性氧对细胞构成的伤害(表 1, 图 1)。对幼苗进行 16 h 的预处理, 刺激了幼苗叶片的膜脂过氧化, 但这时尚未影响膜透性(表 2), 而在冷胁迫后就很明显地加大了冷胁迫引起的膜脂过氧化和膜透性的变化(图 1)。如在冷胁迫过程中继续进行活性氧处理, 则更明显地加大冷胁迫引起的膜脂过氧化和膜透性损伤(图 1a), 因为这时细胞中的活性氧来源既有外加的, 又有因冷胁迫诱发产生的, 且抗氧化酶活性下降, 致使幼苗遭受伤害而死亡(表 1)。

综上所述可见, 不同程度的氧化胁迫对水稻幼苗抗冷力的影响效果是不同的: 轻度氧化胁迫可以诱导幼苗的冷适应性; 深度的氧化胁迫则加重冷胁迫的伤害程度。细胞的这种对氧化胁迫感知并作出反应的机制(氧化应激机制)很可能是植物对低温反应和适应的重要机制, 这很值得进一步的研究。

### 参考文献

- 1 Matters G L, Scandalios JD. Effect of free radical-generation herbicide superoxide dismutase (SOD) genes in maize. *Biochem Biophys Acta*, 1986, 882:29-39
- 2 许长城, 邹琦, 樊继莲等. 抗旱性不同的两个大豆品种对外源  $\text{H}_2\text{O}_2$  的响应. *植物生理学报*, 1996, 22(1):13-18
- 3 刘鸿先, 王以柔, 郭俊彦. 低温对植物细胞膜系统伤害机理的研究. *中国科学院华南植物研究所集刊*, 第 4 集, 北京: 科学出版社, 1989, 1-8
- 4 李美茹, 刘鸿先, 王以柔. 细胞氧化应激机制与植物抗冷性机理的研究. *生命科学*, 1996, 8(4):30-34
- 5 Prasad T K, Anderson M P, Martin B A et al. Evidence for chilling induced oxidative stress in maize seedlings

- and a regulatory role for hydrogen peroxide. *Plant Cell*, 1994, 6:65-74
- 6 李美茹, 刘鸿先, 王以柔等. 钙对水稻幼苗抗冷性的影响. *植物生理学报*, 1996, 22(4):379-384
  - 7 刘鸿先, 曾韶西, 王以柔等. 低温对不同耐寒力的黄瓜 (*Cucumis sativus*) 幼苗子叶各细胞器中超氧化物歧化酶 (SOD) 的影响. *植物生理学报*, 1985, 11:48-57
  - 8 Heath R L, Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts 1. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch Biochem Biophys*, 1968, 125:189-198
  - 9 Foyer C H, Halliwell B. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta*, 1976, 133:21-25
  - 10 Giannopoulou C N, Ries S K. Superoxide dismutase. Purification and quantitative relationship with water-soluble protein in seedlings. *Plant Physiol*, 1977, 59:315-318
  - 11 Chance B, Maehly A C. Assay of catalase and peroxidases. *Methods. Enzymol*, 1955, 2:764-775
  - 12 Omran R G. Peroxide levels and the activities of catalase, peroxidase and indoleacetic acid oxidase during and after chilling cucumber seedlings. *Plant Physiol*, 1980, 65:407-408
  - 13 Nakano Y, Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol*, 1981, 22:867-880
  - 14 O'kane D, Gill V, Boyd P et al. Chilling, oxidative stress and antioxidant response in *Arabidopsis thaliana* callus. *Planta*, 1996, 198:371-377
  - 15 Del Long O T, Gonzalez C A, Pastori G M et al. Antioxidant defences under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity of drought. *Plant Cell Physiol*, 1983, 34: 1023-1032
  - 16 Gillhan D J, Dodge A D. Hydrogen-peroxide scavenging system within pea chloroplasts. *Planta*, 1984, 167:246-254