

臭氧熏气下春小麦叶片 脂质过氧化作用的研究*

安黎哲 王勋陵 李 岚

(兰州大学生物系, 兰州 730000)

摘 要 应用开顶式熏气装置,以低浓度(0.1ppm)的臭氧对春小麦(*Triticum aestivum*)进行了长时间的熏气,观测到:随着熏气时间的延长,叶片内叶绿素含量下降,丙二醛(MDA)积累增多,膜透性增大。在较高浓度(0.2ppm、0.3ppm、0.4ppm)臭氧熏气下,臭氧浓度越高,叶片内叶绿素降解越快,MDA含量越高,膜透性越大。低浓度和短时间的臭氧熏气可使超氧化物歧化酶(SOD)活性升高,而高浓度和长时间的臭氧熏气则导致SOD活性下降。试验结果表明,由臭氧熏气所引起的植物体内代谢紊乱与诸多伤害是由于脂质过氧化作用的结果。

关键词 春小麦;臭氧熏气;脂质过氧化作用

在发达的工业化国家,臭氧已成为主要的污染物,其浓度可达到0.1—0.5ppm,而在市区更高^[12],臭氧对作物的危害越来越受到关注,在探讨伤害机理方面已经做了一些工作,如臭氧引起植物叶片缺绿和坏死,降低叶绿素含量^[10,17]。光合色素的分解是类囊体膜脂受害而致^[14]。有人报道臭氧熏气使叶片内MDA含量上升,膜透性增加,MDA是细胞膜系统的脂质发生了过氧化作用的产物,膜透性增加是脂质过氧化作用的结果^[8,16]。Lee等(1982)将这些结果与自由基伤害机理相联系,认为自由基参与了破坏过程。内源SOD活性对臭氧引起的伤害有一定的防御作用^[11]。已发表的文章中,多数是用高浓度臭氧引起的急性伤害来研究。本试验采用接近自然污染状况的低浓度臭氧与较高浓度的臭氧相结合,并以广泛栽培的春小麦为材料,来研究臭氧对植物的伤害过程和机理,为防护臭氧对植物的伤害提供参考。

1. 材料与方法

供试春小麦(*Triticum aestivum*)为81529-2品种,种子消毒后盆栽。自然光照。白天温度为 $20 \pm 2^\circ\text{C}$;晚上为 $15 \pm 2^\circ\text{C}$ 。相对湿度 $60 \pm 5\%$ 。幼苗长出4片叶后备用。

1.1 臭氧熏气

采用开顶式熏气装置。熏气罩内臭氧浓度控制在 $0.1 \pm 0.02\text{ppm}$, $0.2 \pm 0.02\text{ppm}$, $0.3 \pm 0.02\text{ppm}$ 和 $0.4 \pm 0.02\text{ppm}$ 几种范围内。白天熏气,每天6小时。熏气后第二天进行症状观测与指标测定。SY-1型臭氧发生器发生臭氧。硼酸碘化钾法测定臭氧浓度。

1.2 SOD的提取与活性测定

称取2g小麦叶片(均为第三片叶),洗净剪碎,加入10ml0.05M磷酸缓冲液(pH=7.8)

* 国家自然科学基金资助项目。

本文于1992年4月收到,1992年9月收到修改稿。

和少量石英砂在冰浴中研磨,匀浆在 $19000 \times g$ 冷冻离心 25 分钟,上清液即为酶提取液。按照 SOD 能抑制 NBT 光还原的原理测定 SOD 活性^[1]。

1.3 叶片内脂质过氧化作用的测定

依 MDA 与硫代巴比妥酸的定量反应测定 MDA 量,作为脂质过氧化作用的指标^[4]。

1.4 叶绿素含量的测定

按 Arnon(1949)的方法测定叶绿素含量^[6]。

1.5 叶片膜透性的测定

用电导法测定电解质渗出率,来确定膜透性的变化。

1.6 叶片可见伤害的观测

熏气后第二天目测叶片的可见伤害,以受害面积占叶片总面积的百分数来表示。本试验所得数据均为三次以上的重复。

2. 试验结果

2.1 低浓度臭氧对春小麦叶片的慢性伤害

以 0.1ppm 的臭氧浓度对春小麦连续熏气 14 天,熏气开始后的前 6 天,第三片叶未出现可见伤害,仅表现为叶色较对照浅,叶尖象灼烧变黄。在 8—9 天,叶片有可见伤害,在平行脉间呈现微小褪绿斑点,并伴有少许条纹。随着时间延长,叶片受害加剧。熏气结束后,小面积损伤更加显著,脉间褪绿条纹有多数连成片,可见伤害达到 15% (图 1)。

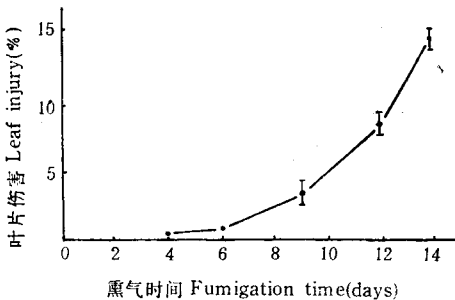


图 1 低浓度(0.1ppm)臭氧对春小麦叶片的伤害
Fig. 1 The leaf injury after fumigated with 0.1ppm ozone

2.2 低浓度臭氧对春小麦叶片内叶绿素含量、MDA 含量、SOD 活性和膜透性的影响

臭氧熏气使春小麦叶片发生了褪绿和坏死现象,因而叶绿素降解被视为植物出现可见伤害的重要指标。熏气过程的前 6 天叶绿素降解较平缓,而后随着时间的延长而加剧,熏气结束后叶绿素含量下降到起始浓度的 61% (图 2)。

叶片中 MDA 的积累说明已发生了脂质过氧化作用。在熏气的前 6 天,MDA 含量处于较低水平,且有缓慢增加的趋势,而后迅速升高。若以对照叶片中 MDA 的含量作基数(100%)来表示处理叶片中 MDA 的相对含量,在熏气的第 14 天和第 18 天分别增至 179% 和 227%。电解质的渗漏与 MDA 的积累有平行关系,呈极显著的正相关($r = 0.958$),只是 MDA 含量的升高先于电解质渗漏的增加,说明可能膜的离子透性增加是脂质过氧化作用的结果。

臭氧熏气对内源 O_2^- 清除剂产生了影响。SOD 活性的升高与下降,决定着细胞内清除氧自由基的能力。在熏气的前 8 天,SOD 活性处于一个较高的水平,处理的第 4 天和第 8 天分别为起始酶活性的 108% 和 94%,而后随熏气时间的延长而降低。在熏气结束时,SOD 活性下降到起始的 65% (图 2)。表明较低臭氧剂量(熏气浓度 \times 熏气时间)对 SOD 活性有刺激作用,一旦臭氧剂量超过一定阈值,SOD 活性受影响而下降。

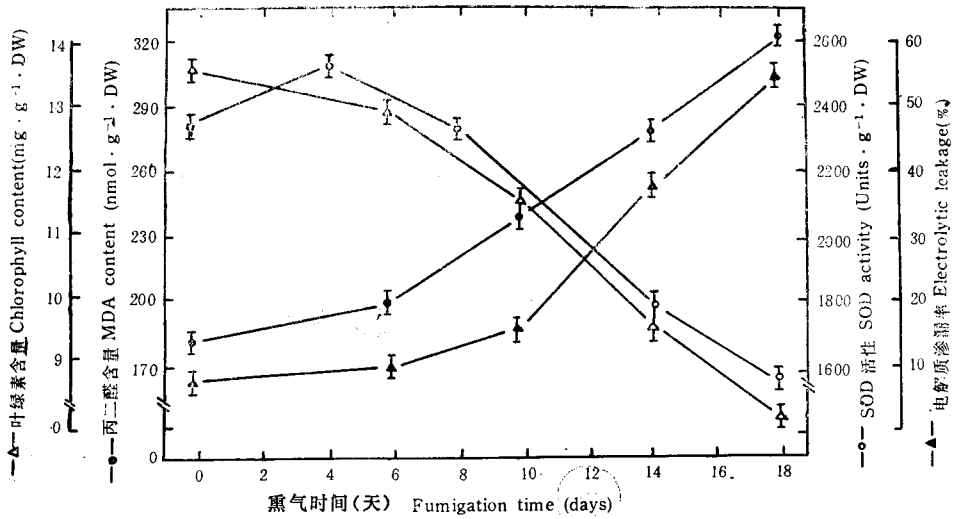


图2 低浓度(0.1ppm)臭氧熏气下叶片内叶绿素含量、MDA含量、SOD活性和膜透性的变化

Fig. 2 Changes in chlorophyll and MDA contents, SOD activity and electrolytic leakage in leaves fumigated with low concentration(0.1ppm) of ozone

2.3 较高臭氧浓度下春小麦叶片内叶绿素和MDA含量、SOD活性及膜透性的变化。

用0.2ppm、0.3ppm和0.4ppm的臭氧对春小麦连续熏气4天,第5天时观察到可见伤害症状,并测定了几项生理指标的变化。熏气结束后,0.2ppm的臭氧浓度引起的可见伤害很小,有少量的褪绿斑点;0.3ppm的臭氧浓度导致叶片出现褪绿条纹,可见伤害达到10%;而0.4ppm的臭氧浓度使叶片伤害更加严重,达到20%。臭氧浓度越高,叶绿素降解越快(图3,A),MDA含量越高[熏气的第三天,MDA含量分别提高到起始的135%、176%和227%(图3,c)],电解质渗漏越严重,并且与MDA的积累成正相关(图3,D)。在熏气的前两天,这些变化不甚明显,而后加快。在0.2ppm臭氧熏气下,起初SOD活性升高,熏气的前两天SOD活性分别为起始的106%和109%,后两天则下降。0.4ppm臭氧熏气仅一天,SOD活性就已低于对照(图3,B)。将熏气第4天所测得的结果绘图(图4),很清楚地反映出本试验所得结果的一致性。

从上述结果可以得出,高浓度和低浓度臭氧对植物的伤害机理相同,只是在相同剂量下,高浓度臭氧所引起的伤害比低浓度臭氧引起的更加严重。

3. 讨论

臭氧熏气条件下,膜上的脂质发生了过氧化作用,其中最主要的产物是MDA。膜脂的损伤可能是叶片受臭氧伤害的主要机理。Paul和Thompson(1980)报道,用臭氧处理分离的微粒体膜,膜的物理性质发生了改变,并伴有MDA的显著增加^[13]。本试验中,在低浓度臭氧熏气下,叶片内MDA含量的升高可以分为两个阶段。第一阶段(熏气开始至第6天)MDA含量上升缓慢。第二阶段(熏气6天以后)MDA含量急剧上升(图2)。与此同时,SOD活性在第一阶段处于较高水平;而在第二阶段SOD活性下降。用较高浓度

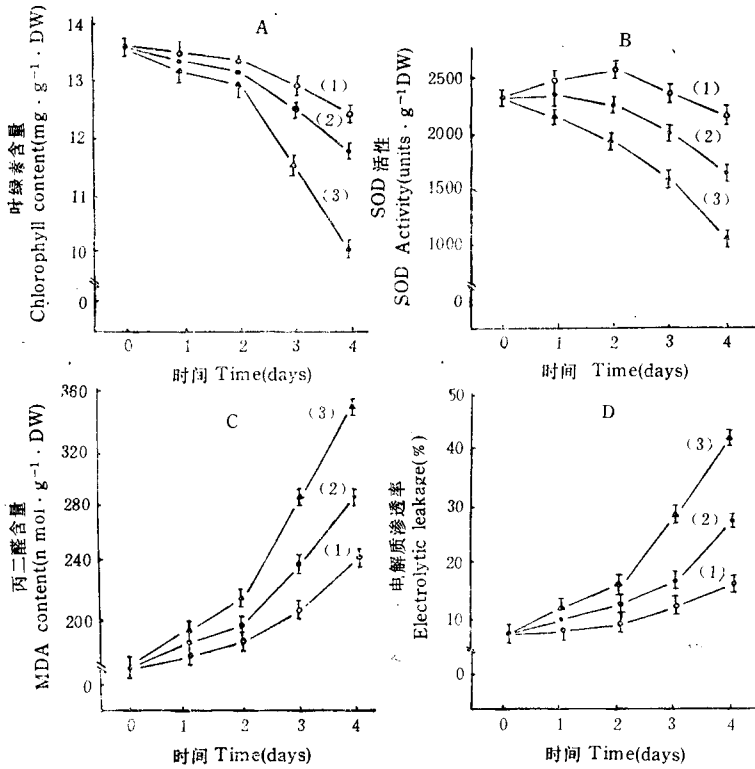


图3 较高臭氧浓度下叶片内叶绿素含量(A)、SOD活性(B)、MDA含量(C)和膜透性(D)的变化

Fig. 3 Changes in chlorophyll content (A), MDA content (B), SOD activity (C) and electrolytic leakage (D) in leaves fumigated with various concentrations of ozone

(1) 0.2ppm (2) 0.3ppm (3) 0.4ppm

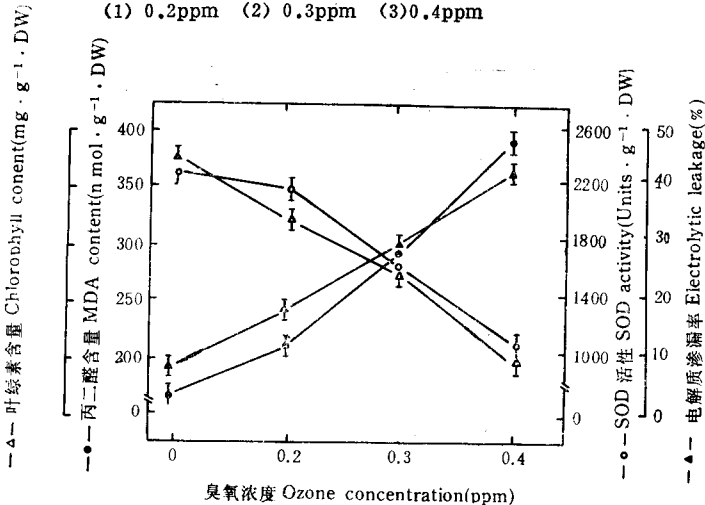


图4 较高臭氧浓度熏气4天对叶片叶绿素含量、MDA含量、SOD活性和膜透性的影响

Fig. 4 Effect of various concentrations of ozone on the chlorophyll and MDA contents, SOD activity and electrolytic leakage in leaves fumigated with different concentrations of ozone for 4 days

的臭氧处理后,MDA 含量的上升也出现了这种趋势。低浓度臭氧熏气下,叶片内 SOD 活性升高,MDA 积累较少;相反,高浓度臭氧使 SOD 活性迅速下降,而 MDA 含量很快上升。因此,SOD 的活性与 MDA 的积累呈负相关关系。高剂量臭氧使植物体内防御活性氧伤害的 SOD 活性下降,致使细胞内形成过多的 O_2^- 不能及时清除。 O_2^- 参与并加剧了脂质过氧化作用^[14],MDA 含量升高。而低剂量的臭氧熏气下,叶片中 SOD 活性处于较高水平甚至还高于对照,这样,过氧化能力得到解除。其它逆境下植物体内产生过多自由基而引发或加剧脂质过氧化作用的结果已得到证实^[2,5,7]。本实验结果还表明,较高的 SOD 活性对臭氧引起的伤害起一定的防御作用。Lee 和 Belleth(1983)给菜豆施用乙烯二脲(EDU)后,SOD 活性增加的同时抗臭氧能力也提高^[11]。

膜透性的增加和 MDA 含量的升高呈极显著的正相关(图 2,图 3,图 4)。MDA 含量增加时,质膜电解质渗漏也增加,只是 MDA 的积累先于膜透性的增加。表明膜上的脂质发生了过氧化作用,其产物 MDA 和氧化过程中产生的自由基有毒害作用使膜选择性透性丧失,电解质和某些小分子有机物大量渗漏,膜功能受损。膜脂过氧化对膜透性的影响有许多报道,在低温、干旱、水渍和盐胁迫下,膜透性的增加与脂质过氧化产物 MDA 含量的增大存在着明显的正相关^[1-3,5]。

MDA 积累的同时,叶绿素受到破坏,MDA 含量越高,叶绿素降解越多(图 2,图 3,图 4)。说明叶绿素的降解与膜严重损伤有关。Heath 等(1968)报道,叶绿素的漂白与 MDA 的产生同时进行^[9]。Shimazaki 等(1980)用 SO_2 处理叶片时发现在 MDA 积累的同时,叶绿素被破坏^[15],Sakaki(1983)认为叶绿素破坏是 O_2^- 使内囊体膜受损,其上的光合色素易进入基质而变得不稳定,进而被氧化分解^[14]。刘鸿先(1985)认为叶绿素的降解是由于叶绿素膜相变性,导致叶绿素分解^[2]。本试验符合上述结果。

由上述结果表明:植物在臭氧胁迫下,由于臭氧的强氧化性,使体内产生了过多的活性氧自由基,并由它引发了脂质过氧化作用,其产物 MDA 和氧化过程中产生的自由基导致了植物体生理代谢的紊乱,膜的伤害和叶绿素的下降,进而出现了不可逆的可见伤害。

参 考 文 献

- [1] 王以柔、刘鸿先等,1986: 在光照和黑暗条件下低温对水稻幼苗光合器官膜脂过氧化作用的影响。植物生理学报,12: 244—251。
- [2] 刘鸿先、曾韶西等,1985: 低温对不同耐寒力的黄瓜子叶各细胞器中超氧化物歧化酶(SOD)的影响。植物生理学报,11: 48—57。
- [3] 汪宗立、刘晓忠等,1988: 玉米的溃渍伤害与膜脂过氧化作用和保护酶活性的关系。江苏农业学报,4: 1—8。
- [4] 林植芳、李双顺等,1988: 衰老叶片和叶绿体中 H_2O_2 的积累与膜脂过氧化的关系。植物生理学报,14: 16—22。
- [5] 龚明、丁念城等,1989: 盐胁迫下大麦和小麦叶片脂质过氧化伤害与超微结构变化的关系。植物学报,31: 841—846。
- [6] Arnon, D. I., 1949: Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.*, 24: 1—4.
- [7] Elstner, E. F., 1982: Oxygen activation and oxygen toxicity. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 33: 73—96.
- [8] Frederich, P. E. and R. L. Heath, 1975: Ozone-induced fatty acid and viability changes in *Chlorella*. *Plant Physiol.*, 55: 15—19.
- [9] Heath, R. L. and L. Packer, 1968: Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch Biochem. Biophys.*, 125: 189—

- 198.
- [10] Kundson, L. L., T. W. Tibbitts and G. E. Edwards, 1977: Measurement of ozone injury by determination of leaf chlorophyll concentration. *Plant Physiol.*, 60: 606—608.
- [11] Lee, E. H. and J. H. Bennett, 1982: Superoxide dismutase: A possible protective enzyme against ozone injury in Snap beans. *Plant Physiol.*, 69: 1444—1449.
- [12] Mudd G. B. and T. T. Kozlowski, 1975: Responses of plants to air pollution. Academic press, New York, pp 19—49.
- [13] Pauls, K. P. and J. E. Thompson, 1980: In vitro simulation of senescence-related membrane damage by ozone-induced lipid peroxidation. *Nature*, 283: 504—506.
- [14] Sakaki, T., N. Kondo and K. Sugahara, 1983: Breakdown of photosynthetic pigments and lipids in spinach leaves with ozone fumigation: Role of active oxygens. *Physiol. Plant*, 59: 28—34.
- [15] Shimazaki, K., T. Sakaki, N. Kondo and K. Sugahara, 1980: Active oxygen participation in chlorophyll destruction and lipid peroxidation in SO₂-fumigated leaves of spinach. *Plant Cell Physiol.* 21: 1193—1204.
- [16] Tomlinson, H. and S. Rich, 1970: Lipid peroxidation. A result of injury in bean leaves exposed to ozone. *Phytopathology*, 60: 1531—1532.
- [17] Wang Xunling and Huang Yunzhu, 1990: Effect of long-time ozone fumigation on growth development and yield of spring wheat in open-top field chamber. *J. Environ. Sci. (China)*, 2: 27—34.

STUDY ON LIPID PEROXIDATION IN SPRING WHEAT LEAVES WITH OZONE FUMIGATION

An Li-zhe Wang Xun-ling Li Lan

(Department of Biology, Lanzhou University, Lanzhou 730000)

Abstract

Spring wheat plants (*Triticum aestivum*) were fumigated with ozone of low concentration (0.1ppm) for a long period of time in open-top chamber. With the increase in fumigation time, the content of chlorophyll in leaves decreased, the formation of malondialdehyde (MDA) and electrolytic leakage increased linearly.

Plants were exposed to ozone of various concentrations (0.2ppm, 0.3ppm and 0.4ppm) for a given time. The higher the ozone concentration became, the more rapidly the content of chlorophyll in leaves declined and the formation of MDA and the electrolytic leakage rose. As fumigated with ozone of low concentration or for a short time, the activity of superoxide dismutase (SOD) in leaves tended to increase; While high ozone concentration or long fumigation time caused a decrease of SOD activity. These results suggested that the metabolic disorder and various injury in leaves induced by ozone were the result of the increase of lipid peroxidation.

Key words Spring wheat; Ozone fumigation; Lipid peroxidation