

NaCl 预处理对盐胁迫下水稻 H₂O₂ 含量和过氧化氢酶活力的影响

高宇^{1,2}, 徐春莹¹, 王丹¹, 周燕¹, 张亚玲¹, 林志伟¹, 张兴², 靳学慧^{1*}

(1. 黑龙江八一农垦大学农学院, 黑龙江大庆 163319; 2. 黑龙江省科学院大庆分院, 黑龙江大庆 163712)

摘要 [目的]通过对水稻苗前期盐处理后,测定盐胁迫条件下生理指标的变化,确定盐害对水稻的影响。[方法]测定了一种盐敏感水稻品种(丽江新团黑谷)经过低浓度盐胁迫预处理后在盐害条件下叶片和根中活性氧 H₂O₂ 的产生和 CAT 活力。[结果] 50 mmol/L 盐胁迫能导致其叶片和根中 H₂O₂ 含量显著上升,而 CAT 活力则显著下降。经过低浓度盐(20 mmol/L)预先处理的水稻在盐胁迫下 H₂O₂ 含量上升幅度则较小,而 CAT 活力较高。此外,盐胁迫预处理的水稻在盐害条件下生长情况更好,其叶片中叶绿素含量更高。[结论] 活性氧 H₂O₂ 及其清除酶 CAT 参与水稻对盐害的应答反应,并且这种预处理能增强水稻抗盐害胁迫能力。

关键词 水稻; 盐害; 过氧化氢; 过氧化氢酶; 预处理

中图分类号 S511 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)36-12814-02

Effects of NaCl Pretreatment on H₂O₂ Content and Catalase Activity of Rice under Salt Stress

GAO Yu^{1,2}, XU Chun-ying¹, WANG Dan¹, JIN Xue-hui^{1*} et al (1. Agricultural College, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing, Heilongjiang 163319; 2. Heilongjiang Daqing Academy of Science, Daqing, Heilongjiang 163712)

Abstract [Objective] In order to study the effects of salt injury to rice, based on early rice seedlings after pretreatment of salt, the changes of physiological indexes under salt stress were determined. [Method] The salt sensitive rice variety of LTH was pretreated by low concentration of salt stress. And H₂O₂ content and catalase activity in the leaves and the roots were studied. [Result] 50 mmol/L salt stress could significantly increase H₂O₂ content in the leaves and the roots, but significantly decrease CAT activity. The rise of H₂O₂ content of rice pretreated by low concentration of salt stress (20 mmol/L) was low, but that of CAT activity was high. Otherwise, the growth of the rice pretreated by salt stress under the condition of salt stress was good, and chlorophyll content in the leaves was higher. [Conclusion] H₂O₂ and CAT were engaged in the response reaction of rice to salt stress. And the pretreatment could improve the salt stress resistance of rice.

Key words Rice; Salt stress; Hydrogen peroxide; Catalase; Pretreatment

在植物生长过程中,其细胞在生理活动中不可避免地产生活性氧分子,如单线态氧、超氧阴离子、过氧化氢以及羟自由基等。这些活性氧会对植物的生物大分子造成伤害,但植物在亿万年进化过程中会产生活性氧自由基防卫系统如抗氧化酶(如清除 H₂O₂ 的过氧化氢酶)和大分子抗氧化物质(如抗坏血酸等),从而将活性氧自由基的危害降低到最低程度。各种环境胁迫因子如干旱、盐害、强光等都能导致植物细胞中活性氧的过度产生^[1]。我国有大量盐碱地,对农作物生长有明显的危害作用,如抑制植物生长,作物产量下降。水稻是一种盐敏感植物,也是我国主要的农作物之一。前人发现,离体水稻叶片在盐害作用下 H₂O₂ 没有显著上升。此外,对于水稻植物在盐害条件下 H₂O₂ 是否会上升有不同的结论,如盐敏感水稻 H₂O₂ 会显著上升,而盐抗性水稻 H₂O₂ 上升并不明显。然而,在自然界中很少有抗盐水稻品种。这里,笔者对一种盐敏感水稻品种(丽江新团黑谷)用低浓度 NaCl 预处理后,试图导致其抗盐能力增强,同时研究了后天盐害预处理的水稻在盐害条件下,其活性氧如 H₂O₂ 产量及其主要清除酶过氧化氢酶(CAT)活性。该研究会促进人们对水稻在盐害条件下活性氧代谢产生新的认识。

1 材料与与方法

1.1 植物材料培养及处理 将水稻品种丽江新团黑谷先用浓度 0.5% 次氯酸钠消毒液处理 10 min,然后置于清水中 24 h 让其发芽。接着,转入营养土中使其生长,光照条件为 12

h/12 h,75% 湿度下生长。待长到 2 片叶后,将一部分水稻幼苗用 20 mmol/L NaCl 预处理 24 h,对照为清水处理。然后,将水稻苗重新转入营养土中培养生长 48 h。挑选健康和大小一致的 2 种处理后水稻苗(盐预处理和对照处理的)进行盐害(50 mmol/L NaCl)处理 24 h,对照为清水处理。最后,将处理后的水稻苗挑选出来,用自来水轻轻冲洗干净,用于 H₂O₂ 含量和 CAT 活力测定。

1.2 试验方法

1.2.1 叶绿素含量测定。 叶绿素含量测定采用丙酮提取,分光光度法测定^[2]。

1.2.2 H₂O₂ 含量测定及染色。 利用 FOX 法测定 H₂O₂ 的含量。其原理是在酸性环境下,氢过氧化物(包括 H₂O₂)能将 Fe²⁺ 氧化成 Fe³⁺,后者与二甲酚橙反应生成一种紫蓝色的复合物。该复合物在 560 nm 处有最大吸光值。该方法操作简单,重复性强,灵敏度高^[3]。

DAB 即二氨基联苯胺,能与 H₂O₂ 在过氧化物酶催化下生成一种红棕色物质。具体染色步骤为:将叶片浸泡在 1 mg/ml DAB 溶液中(pH 7.0,DAB 事先须溶解在 pH 3.8 的缓冲液中,低 pH 环境有利于 DAB 完全溶解)。然后,置于有光照的温室中 8 h。将叶片置于浓度 95% 的沸腾乙醇中脱色 5~10 min,可直接看到红棕色斑点。这就是 H₂O₂ 与 DAB 反应的产物^[4]。

1.2.3 CAT 酶抽提及测定。 将植物待测叶片在液氮中研成粉末,用 10 倍体积的抽提缓冲液抽提。缓冲液配方如下: 0.1 mol/L PBS 缓冲液(pH 7.5),内含浓度 1% PVP(聚乙烯吡咯烷酮)、1 mmol/L EDTA、10 mmol/L KCl、10 mmol/L MgCl₂。在 10 000 g 条件下离心 20 min,上清液在 -20 °C 冰

作者简介 高宇(1981-),女,黑龙江大庆人,助理研究员,硕士,从事植物病理学和作物生理方面的研究。* 通讯作者,教授,博士,从事植物病理学方面的研究。

收稿日期 2014-11-12

箱中保存,待测。在 1 ml 反应液(10 mmol/L PBS 缓冲液,pH 7.0,10 mmol/L H₂O₂)中加入适量上述酶抽提液,迅速混匀,在 240 nm 波长处测定吸光值^[5]。蛋白浓度测定采用考马斯亮蓝染色法^[6]。

2 结果与分析

2.1 盐胁迫对水稻叶片叶绿素含量的影响

经过水浸根处理和 30 mmol/L NaCl 浸根处理^[7],分别设不加 100 mmol/L NaCl 和加 100 mmol/L NaCl 处理。由图 1 可知,盐胁迫处理后,经过水浸根处理,分别加 100 mmol/L NaCl 叶片(C1)与不加 100 mmol/L NaCl(C0)叶片比较,叶片中叶绿素含量明显呈下降趋势。而经过水浸根处理与盐 30 mmol/L NaCl 浸根处理不加 100 mmol/L NaCl 处理的叶片(S0)比较,叶片中叶绿素含量依旧呈下降趋势,但是随着盐胁迫的加强以及时间的延长,叶片(S1)中叶绿素含量反而呈上升趋势,甚至超过 C0 处理叶片叶绿素含量水平。这说明盐胁迫对该品种水稻叶绿素含量有较大的影响。

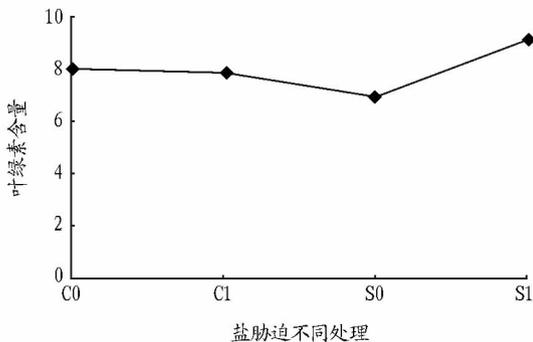


图 1 盐胁迫处理后叶片叶绿素含量的变化

2.2 盐胁迫对水稻叶片中 H₂O₂ 含量的影响

研究表明,H₂O₂ 含量随着 NaCl 胁迫的加大而增加,但是增加趋势缓慢,30 mmol/L NaCl 浸根处理取得的叶片 H₂O₂ 含量会稍低于水浸根处理加 100 mmol/L NaCl 叶片,30 mmol/L NaCl 浸根处理加 100 mmol/L NaCl 处理的叶片 H₂O₂ 含量会稍有增加,但是幅度不大。针对该试验方案测试结果,发现盐胁迫对该品种水稻叶片 H₂O₂ 含量的影响很小^[8]。

2.3 盐胁迫对水稻叶片 CAT 活性的影响

该试验设水浸根处理和 30 mmol/L NaCl 浸根处理,分别设不加 100 mmol/L NaCl 和加 100 mmol/L NaCl 处理,共进行 4 个处理。由图 2 可知,CAT 活性大小顺序为 CS0(水浸根处理不加盐处理) < CS1(水浸根处理加盐处理) < SS0(30 mmol/L NaCl 浸根处理不加盐处理) < SS1(30 mmol/L NaCl 浸根处理加盐处理)。由此可知,盐胁迫对水稻 CAT 活性有较大的影响,而当在盐胁迫环境下“锻炼”后,CAT 活性受影响不大,说明水稻有一定的耐盐性^[9]。

3 结论与讨论

盐胁迫能干扰植物细胞中活性氧(ROS)产生与清除之间的平衡,导致植物细胞遭受氧化胁迫伤害。在正常条件下,植物细胞中产生的 ROS 与其清除系统保持这一动态平衡,而当植物受到环境胁迫而使得产生的 ROS 量超出其清除能力时,就会引起 ROS 累积产生氧化伤害,导致生物膜脂

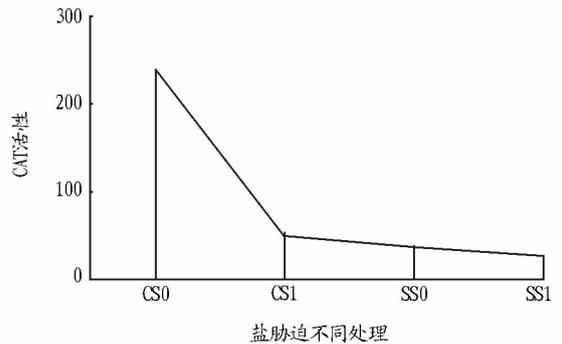


图 2 不同盐处理 CAT 活性的变化

过氧化、蛋白质变性、DNA 链断裂及光合受阻等多种有害现象的出现,使得细胞功能紊乱,机体出现各种氧化损伤毒害。水稻对盐害胁迫相当敏感^[10-13]。前人研究显示,抗性水稻品种在盐害作用下叶片组织中 H₂O₂ 含量并没有显著的改变。然而,盐敏感水稻品种在盐害胁迫下 H₂O₂ 含量会显著上升^[14-16]。此外,离体水稻叶片在盐胁迫下 H₂O₂ 含量也不会显著上升^[17]。研究中,丽江新团黑谷是盐敏感品种,盐害导致其 H₂O₂ 含量稍有上升。而 CAT 作为水稻一种关键的 H₂O₂ 清除酶,研究中盐害导致其酶活力显著下降^[18]。考虑到多数水稻品种是盐敏感品种,而我国又有很大面积的盐碱地,通过非转基因手段获得抗盐能力的水稻研究显得很重要。研究中,通过盐预处理该敏感水稻品种,发现其抗盐能力获得显著增强。这可从生长状态和叶绿素水平获得验证。此外,H₂O₂ 产生量相对于对照也稍有上升,而其原因之一可能与其 CAT 酶活力获得“锻炼”,在盐胁迫条件下能保持较高活力有关。

综上所述,对盐敏感的丽江新团黑谷利用低浓度盐预处理后,该水稻品种在较高盐害条件下其抗性获得显著上升。由盐胁迫诱导的 H₂O₂ 产生量明显降低,而且能保持较高的 CAT 酶活力。该研究可为通过体外施加化学试剂增强水稻抗盐能力提供部分理论依据。

参考文献

- [1] BRADFORD 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.
- [2] HEATH R L, PACKER L. Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation[J]. *Arch Biochem Biophys*, 1968, 125:180-198.
- [3] GAY C, COLLINS J, GEBICKI J. Hydroperoxide assay with the ferricyanide-orange complex[J]. *Anal Biochem*, 1999, 273:149-155.
- [4] THORDALCHRISTENSEN H, ZHANG Z, WEI Y, et al. Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barleypowdery mildew interaction[J]. *Plant J*, 1997, 11:1187-1194.
- [5] ZHANG J, KIRKHAM M. Droughtstress-induced changes in activities of superoxide dismutase, catalase, and peroxidase in wheat species[J]. *Plant Cell Physiol*, 1994, 35:785-791.
- [6] ZAKA R, VANDECASTEELE C, MISSET M. Effects of low chronic doses of ionizing radiation on antioxidant enzymes and G6PDH activities in *Stipa capillata* (Poaceae)[J]. *J Exp Bot*, 2002, 53:1979-1987.
- [7] LIU C L, DU W C, CAI H S, et al. Trivalent chromium pretreatment alleviates the toxicity of oxidative damage in wheat plants exposed to hexavalent chromium[J]. *Acta Physiol Plant*, 2014, 36:787-794.

(下转第 12828 页)

性问题。从 PCR 理论本身来讲,任何可以提供核酸物质的样品都可以进行 PCR 扩增,不论是死细胞还是活细胞,因此,如何确定检测的微生物是否具有活性,是个值得考虑的问题。随着 PCR 技术的不断发展与成熟,通过和其他分子生物学技术联用,技术上会逐渐完善,肯定会被越来越广泛地应用于环境监测中,从生物角度来监测环境、改善环境。

参考文献

- [1] 林梅,宋璐璐,毛国军. PCR 技术的研究进展[J]. 大众科技,2007(11): 109.
- [2] 戴睿,夏四清. PCR 技术在水体微生物检测中的应用[J]. 环境科学与技术,2006,29(9):103.
- [3] 李惠民. PCR 技术在环境监测中的应用[J]. 商洛师范专科学校学报,2005,19(4):37.
- [4] 林秀菊. PCR 技术基本原理及其在环境污染监测中的应用[J]. 福建环境,2000,17(1):37.
- [5] 张丰德,吕宪禹. 现代生物学技术[M]. 2 版. 天津:南开大学出版社,2005:329-345.
- [6] 谢德平,廖宇静. 常用聚合酶链式反应(PCR)技术概述[J]. 生物学教学,2009,34(2):8-10.
- [7] 曹雪雁,张晓东,樊春海. 聚合酶链式反应(PCR)技术研究新进展[J]. 自然科学进展,2007,17(5):580-584.
- [8] 王中民,杨国芬,王武芳,等. 应用 PCR 检测环境水体中的嗜肺军团菌[J]. 实用预防医学,2005,12(2):261-263.
- [9] 陈樑. 水环境中大肠杆菌 PCR 快速检测体系的研究[J]. 环境科技,2010,23(2):52-56.
- [10] 侯彦峰,张照斌,胡建英,等. 定量 RT-PCR 检测雌二醇诱导的青鳉鱼基因表达[J]. 中国环境科学,2006,26(5):599-602.
- [11] 王琪,黄崇,张照斌,等. 实时定量 RT-PCR 方法检测雌二醇诱导原代培养青鳉鱼肝细胞的基因表达[J]. 环境科学学报,2008,28(12):2568-2572.
- [12] 王爱杰,任南琦. 环境中的分子生物学诊断技术[M]. 北京:化学工业出版社,2004:11-15.
- [13] 罗海峰,齐鸿雁,薛凯,等. PCR-DGGE 技术在农田土壤微生物多样性研究中的应用[J]. 生态学报,2003,23(8):1570-1575.
- [14] KASUGA LKURO, FYRUMAI HIROAKI, NAKAJIMA FUMIYUKI, et al. Analysis of Seasonal and Structural Changes in Microbial Community including Algae in Tsukui Lake by PCR-DGGE[J]. Journal of Japan Society on Water Environment, 2001, 24(12):856-864.
- [15] 谢德平,廖宇静. 常用聚合酶链式反应(PCR)技术概述[J]. 生物学教学,2009,34(2):8.
- [16] 张崇森,刘永军,王晓昌,等. 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)技术同时检测水中多种肠道病毒[J]. 环境科学研究,2007,20(3):137-140.
- [17] 林台雯,李丹,吴舒旭,等. 基于 RT-qPCR 选择性检测水中活性病原菌[J]. 环境科学,2012,33(11):4040-4045.
- [18] 许一平,成炜,陈福生. 多重 PCR 技术在食源性病原菌检测中的应用[J]. 食品科学,2007,27(2):355-358.
- [19] 范宏英,吴清平,吴若菁,等. 饮用水 5 种致病菌多重 PCR 技术检测研究[J]. 微生物学通报,2005,32(3):102-107.
- [20] 范宏英,寇晓霞,张菊梅,等. 水体污染中常见致病菌的多重 PCR 分子检测研究[J]. 现代预防医学,2007,34(17):3250-3253.
- [21] 何伟,刘燕,李建林,等. 土壤环境中肠道致病菌的多重 PCR 检测研究初探[J]. 环境科学学报,2013(5):1341-1346.
- [22] 王晶. 屏障系统微生物气溶胶监测及 SPF 级实验动物微生物多重 PCR 分析[D]. 南京:南京农业大学,2011.
- [23] 赵焕英,包金凤. 实时荧光定量 PCR 技术的原理及其应用研究进展[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志,2007,16(4):492-497.
- [24] 刘永军,张崇森,王晓昌,等. 环境水体中肠道病原细菌的定量 PCR 检测[J]. 环境科学,2008,29(5):1175-1180.
- [25] 刘永军,张崇森,王晓昌,等. 环境水体中肠道病原细菌定量 PCR 检测与膜过滤分析方法的比较[J]. 环境科学学报,2008,28(7):1482-1488.
- [26] 徐德顺,吴晓芳,程平庆. 实时荧光定量 PCR 法与常规 PCR 法及细菌培养法检测单增李斯特菌的比较[J]. 中国卫生检验杂志,2007,17(5):861-863.
- [27] 徐恒省,李继影,刘孟宇,等. 实时荧光定量聚合酶链反应快速检测产毒铜绿微囊藻[J]. 中国环境监测,2013,29(4):89-94.
- [28] 朱金余,李海波,陈芳,等. 水中铜绿微囊藻定量 PCR 检测方法的建立[J]. 浙江大学学报,2013,40(2):211-217.
- [29] 赛林霖,张照斌,胡建英,等. 实时定量 RT-PCR 方法评价壬基酚的雌激素效应[J]. 环境科学,2006,27(9):1825-1828.
- [30] 赵传鹏,浦跃朴,尹立红,等. 实时荧光定量 PCR 法检测环境假单胞菌属细菌丰度[J]. 东南大学学报:自然科学版,2006,31(1):143-146.
- [31] 高荣凯. 免疫捕捉 PCR 技术及其应用[J]. 国际免疫学杂志,2006,29(4):249-252.
- [32] 杨万,何苗,李丹,等. 免疫磁珠分离与实时定量 PCR 技术联合检测水中轮状病毒的研究[J]. 环境科学,2009,30(5):1368-1374.
- [33] 周纯. 多环芳烃类环境激素的实时定量免疫 PCR 检测方法研究[D]. 上海:东华大学,2008.
- [34] 黄春晓. PCR-DGGE 技术及其在环境工程生物处理中的应用[J]. 中原工学院学报,2007,18(1):72-75.
- [35] 刘敏,朱开玲,李洪波,等. 应用 PCR-DGGE 技术分析黄海冷水团海域的细菌群落组成[J]. 环境科学,2008(4):1082-1091.
- [36] 刘敏,王子峰,朱开玲,等. 应用 PCR-DGGE 技术分析长江口低氧区的细菌群落组成[J]. 环境科学,2008(6):650-656.
- [37] 郭文静. PCR-DGGE 和 RT-PCR 技术在赤潮藻检测中的应用[D]. 天津:天津科技大学,2010.
- [38] 李江宇,樊景凤,穆贵强,等. 利用 PCR-DGGE 分析海水浴场细菌多样性[J]. 海洋环境科学,2013,32(8):523-528.
- [39] 赵兴青,杨柳燕,陈灿,等. PCR-DGGE 技术用于湖泊沉积物中微生物群落结构多样性研究[J]. 生态学报,2006,26(11):3010-3016.
- [40] 刘新春,吴成强,张昱,等. PCR-DGGE 法用于活性污泥系统中微生物群落结构变化的解析[J]. 生态学报,2005,25(4):842-846.
- [41] 罗海峰,齐鸿雁,薛凯,等. PCR-DGGE 技术在农田土壤微生物多样性研究中的应用[J]. 生态学报,2003,23(8):1570-1575.
- [42] 滕应,骆永明,赵祥伟,等. 重金属复合污染农田土壤 DNA 的快速提取及其 PCR-DGGE 分析[J]. 土壤学报,2004,4(13):343-346.

(上接第 12815 页)

- [8] DENG B L, DONG H S. Ectopic expression of riboflavinbinding protein gene *TsR/BP* paradoxically enhances both plant growth and drought tolerance in transgenic *Arabidopsis*[J]. J Plant Growth Regul, 2013, 32:170-181.
- [9] DENG B L. Antioxidative response of golden agave leaves with different degrees of variegation under high light exposure[J]. Acta physiol Plant, 2012, 34:1925-1933.
- [10] MITTLER R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance[J]. Trends Plant Sci, 2002, 7:405-410.
- [11] GILL S, TUTEJA N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants[J]. Plant Physiol Biochem, 2010, 48:909-930.
- [12] AMIRJANI M. Effect of NaCl on some physiological parameters of rice[J]. Eur J Biol Sci, 2010, 3:6-16.
- [13] LEE D, KIM Y, LEE C. The inductive responses of the antioxidant enzymes by salt stress in the rice (*Oryza sativa* L.) [J]. J Plant Physiol, 2001, 158:737-745.
- [14] LIN C, KAO C. Effect of NaCl stress on H₂O₂ metabolism in rice leaves[J]. Plant Growth Regul, 2000, 30:151-155.
- [15] VAIDYANATHAN H, SIVAKUMAR P, CHAKRABARTY R, et al. Scavenging of reactive oxygen species in NaCl stressed rice (*Oryza sativa* L.) - differential responses in salt tolerant and sensitive varieties[J]. Plant Sci, 2003, 165:1411-1418.
- [16] WILLEKENS H, CHAMNONGPOL S, DAVEY M, et al. Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C3 plants[J]. EMBO J, 1997, 16:4806-4816.
- [17] SHIM I, MOMOSE Y, YAMAMOTO A, et al. Inhibition of catalase activity by oxidative stress and its relationship to salicylic acid accumulation in plants[J]. Plant Growth Regul, 2003, 39:285-292.
- [18] QUAN L, ZHANG B, SHI W, et al. Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of reactive oxygen species network[J]. J Integr Plant Biol, 2008, 50:218.