

缺镁对菜豆幼苗膜脂过氧化及体内 活性氧清除酶系统的影响^①

汪 洪 褚天铎

(中国农业科学院土壤肥料研究所,北京 100081)

摘要 营养液中培养菜豆幼苗,缺镁菜豆植株生长受抑,生物量显著低于正常供应镁的植株,体内镁浓度和镁的积累总量均较低。严重缺镁黄化叶片中叶绿素含量下降。完整叶绿体的希尔反应值在缺镁与正常植株间无差别。缺镁菜豆植株的根和叶膜透性(以相对电导率表示)增加,叶片中丙二醛含量升高。活性氧清除酶系统:SOD、POD、CAT活性在缺镁菜豆真叶中高于正常植株,老叶中抗坏血酸过氧化物酶(AsA-POD)活性增加程度也较大。

关键词 缺镁 菜豆 膜脂过氧化 膜透性 活性氧 叶绿素 希尔反应

逆境胁迫下如水分、温度、光照、盐渍、病害、污染及衰老,均会引起植物体内产生过多的活性氧。其中最重要的是超氧化物自由基 $O_2^{\cdot-}$ 和过氧化氢(H_2O_2)。活性氧在植物体内过多,引发和加剧生物膜脂过氧化作用,膜系统遭破坏,膜透性改变,细胞内生理生化反应紊乱,植物受到伤害^[1]。

植物体内活性氧清除系统包括酶系统和非酶系统,前者是超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT);后者有维生素C、维生素E、谷胱甘肽^[2]。酶系统催化的反应是: $2O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ (SOD); $H_2O_2 + AH_2$ (还原剂) $\rightarrow 2H_2O + A$ (POD); $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$ (CAT)。

某些矿质营养元素的缺乏如锌、铜、铁、硼、镁、锰,也会引起植物体内活性氧代谢不平衡和相应的清除系统的改变,但这方面的研究不多也不够深入。本文以菜豆为材料,测定了植株细胞膜透性和丙二醛(MDA)含量,同时也测定了叶片SOD、POD、CAT活性,以探讨缺镁对植物体内活性氧代谢的影响。

1 材料与方 法

1.1 试验处理

菜豆品种是“供给者”,浸种24小时,25℃下催芽72小时,播于石英砂中,取生长一致的幼苗,清洗干净,移栽于营养液中。

营养液配方(mol/L): K_2SO_4 0.75×10^{-3} , $Ca(NO_3)_2$ 2.0×10^{-3} , KH_2PO_4 0.25×10^{-3} , KCl 0.1×10^{-3} , $FeEDTA$ 4.0×10^{-5} , H_3BO_3 1.0×10^{-5} , $MnSO_4$ 1.0×10^{-6} , $CuSO_4$ 1.0×10^{-7} , $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ 1.0×10^{-8} 。Mg以 $MgSO_4$ 形式供应,处理分为缺镁(0mol/L, -Mg)和正常(1.2×10^{-3} mol/L, +Mg),缺镁处理的加入 1.2×10^{-3}

① 本研究项目在农业部植物营养学重点开放实验室完成

收稿日期 1997-10-14

mol/L Na_2SO_4 调节 SO_4^{2-} 。在容积为1.8升的瓷盆中栽4株幼苗,每周换二次营养液;温度18~25℃,白天利用自然光,并用日光灯补光,光照强度2000~4000lx,光照/黑暗时间分别为14小时/10小时;用通气泵连续通气。

1.2 测定方法

植株中镁的测定 生长至植株第二片真叶刚长出时,分根、茎、老叶(基生叶)、新叶(第一、二片真叶,形态上又称正常叶)四部分取样,用去离子水洗净后,105℃下杀青,60℃~70℃下烘干。 $\text{H}_2\text{SO}_4\text{-HNO}_3\text{-HClO}_4$ (1:8:1)消煮粉碎过的样品,用原子吸收分光光度计测定镁含量,加镧消除干扰。

叶片叶绿素含量测定 参照文献^[9]的方法:用4.5:4.5:1的丙酮:无水乙醇:去离子水直接浸提24小时(冰箱中),浸提液在645nm和663nm波长处用紫外可见分光光度计测吸光值,根据Aron公式计算。

希尔反应的测定 参照文献^[10,11]的方法:用25mL 0.35mol/L NaCl,2mL 10mmol/L Tris-HCl(pH7.8)和少量石英砂研磨提取叶绿体。用对染料2,6-二氯酚钠(0.3mol/L)的还原程度来表示希尔反应值。

植物器官浸提液中相对电导率的测定 参考文献^[11]的方法:当第一片真叶有卷曲症状时,取根、茎、老叶、第一片真叶,投入150mL三角瓶中,加入50mL去离子水(电导率0.06 μ s/cm),25℃下振荡(110r/min)5小时后,测电导率 S_1 ,然后在沸水浴中煮15分钟,冷却后用量筒定容到50mL,再次测电导率 S_2 ,用相对电导率 $S_1/S_2 \times 100\%$ 表示膜透性。

丙二醛和SOD、POD、GAT活性的测定 当第一片真叶有卷曲症状时,取1~2克叶片样品,加入预冷过的50mmol/L磷酸缓冲液(PBS)(pH7.8),在冰浴下研磨成匀浆,4℃下12000g离心10分钟,上清液在冰箱中保存备用。

丙二醛含量用硫代巴比妥酸显色测定^[11]。SOD用硝基四氮唑兰光化还原法测定,抑制对硝基四氮唑兰还原一半时酶量为一个酶活性单位(U)^[12]。POD分别用愈创木酚^[12]和抗坏血酸^[6]作底物,加入 H_2O_2 后,在波长470nm和290nm处用GBC-911A紫外可见分光光度计进行时间扫描。CAT反应底物直接用 H_2O_2 ,在240nm处进行时间扫描测定^[13]。POD和CAT活性单位以单位鲜重或蛋白质每分钟吸光度变化值 ΔA 计算。

蛋白质含量测定 考马斯亮兰G-250比色法^[10],蛋白质含量用于计算酶活性。

2 试验结果

2.1 菜豆植株生长情况

缺镁培养下的菜豆植株,老叶上先出现症状:卷曲,基部和靠近叶脉处出现水渍状斑点,后斑点扩大,最后失绿,坏死。生长后期,第一片真叶上也会出现同样症状。

缺镁菜豆植株生长受到很大抑制,除了老叶外,植株根、茎、新叶的干物质重均显著低于正常条件下的植株(表1)。各部位在总干物质重中所占比例,缺镁处理的茎和新叶比较低,分别为29.1%,30.9%,而正常供镁的菜豆茎和新叶在整株干重中所占比例为33.4%,37.7%,缺镁处理的老叶在整株干重中所占比例为23.5%,高于正常处理的14.8%。有些研究发现^[6,14],缺镁植株叶片蔗糖、淀粉积累。这可能是造成缺镁叶片干物质重较高的原因。

2.2 镁在菜豆植株不同部位中的分布

无论缺镁还是正常生长的菜豆植株,老叶中镁浓度较低。缺镁植株中,老叶、根中镁浓度较高,茎中较低,而正常生长的植株,新叶中镁浓度最高,有充足的镁供给叶片生长需要。

积累吸收总量在缺镁条件下,以老叶中为最多,占整株吸收总量的32.2%,其它部位间差别不大,所占比例在20%~24%间。在外界没有供应镁的情况,植株中镁主要来自种子营养。正常条件下,菜豆新叶中镁积累量最高,占61.4%,其次是老叶,根中最少,才占9.7%(表1)。

表 3 不同镁处理菜豆叶片叶绿素希尔反应

Table 3 Hill reaction value in chloroplast of bean plants with Mg and without Mg supply

处理 Treatment	叶片 Leaves	吸光度变化值 Hill reaction value (ΔA_{620} /h)	希尔反应值 Hill reaction value (ΔA_{620} /mg _{chl} · h)
-Mg	老叶 Primary leaves	0.13±0.01	1.41±0.02
	第一片真叶 First trifoliate leaves	0.10±0.02	1.56±0.04
+ Mg	老叶 Primary leaves	0.16±0.02	1.40±0.03
	第一片真叶 First trifoliate leaves	0.10±0.01	1.39±0.02

表 4 菜豆植株渗出液的相对电导率和叶片中丙二醛含量

Table 4 Electric conductance in extracting solution of organs from bean plants and concentration of malondialdehyde in leaves from bean plants

项目 Item	相对电导率(%) Relative electric conductance			丙二醛含量(nmol/g,FW) Concentration of MDA	
	根	老叶	第一片真叶	老叶	第一片真叶
	Roots	Primary leaves	First trifoliate leaves	Primary leaves	First trifoliate leaves
-Mg	9.78	20.85	10.30	4.26±0.18	4.69±0.10
+ Mg	5.39	9.04	6.33	2.52±0.37	3.29±0.17
增加(%) 值	81.4%	130.6%	62.7%	69.0%	42.6%
	-	-	-	8.50 **	14.27 **

从表4结果可以看出,这二项指标值变化趋势一致:缺镁条件下,老叶和第一片真叶的相对电导率和丙二醛含量均高于正常植株,老叶中增加程度高于真叶。根渗出液相对电导率也是缺镁处理高于正常植株。

2.5 菜豆叶片中SOD、POD、CAT活性

缺镁情况下,植物体内活性氧清除酶系统:SOD、抗坏血酸过氧化物酶(AsA-POD)、愈创木酚过氧化物酶活性在真叶中显著高于正常植株,以鲜重计算,SOD,AsA-POD,愈创木酚过氧化物酶活性分别较正常植株高出34.2%,28.0%,57.8%;若以蛋白质计算,则高出30.8%,23.1%,51.7%。CAT活性缺镁真叶中也较高。以鲜重和蛋白质计算,增加百分数分别为62.4%,57.9%,但统计上不明显。

老叶中AsA-POD活性在缺镁时显著高于正常条件下的老叶,以鲜重和蛋白质计算,增加百分数达到183.7%,200.0%,而老叶中SOD、愈创木酚POD、CAT在镁处理间无显著差异。

不同叶位上的比较:两种镁处理的菜豆植株老叶中愈创木酚POD活性高于真叶,SOD以鲜重计算,老叶中较低,以蛋白质计算,二者差别不大,AsA-POD活性在真叶中较高,而CAT活性在老叶、真叶间差别不大。

老叶和真叶中愈创木酚POD活性都高于AsA-POD。一般认为^[19],在叶绿体叶,清除H₂O₂的过氧化物对底物抗坏血酸专一,对其它电子供体如愈创木酚的亲性和性较小。老叶中AsA-POD活性和丙二醛含量在缺镁时增加程度较大,说明老叶中活性氧代谢紊乱很大程度上发

表 3 不同镁处理菜豆叶片叶绿素希尔反应

Table 3 Hill reaction value in chloroplast of bean plants with Mg and without Mg supply

处理 Treatment	叶片 Leaves	吸光度变化值 Hill reaction value (ΔA_{620} /h)	希尔反应值 Hill reaction value (ΔA_{620} /mg _{chl} · h)
-Mg	老叶 Primary leaves	0.13±0.01	1.41±0.02
	第一片真叶 First trifoliate leaves	0.10±0.02	1.56±0.04
+ Mg	老叶 Primary leaves	0.16±0.02	1.40±0.03
	第一片真叶 First trifoliate leaves	0.10±0.01	1.39±0.02

表 4 菜豆植株渗出液的相对电导率和叶片中丙二醛含量

Table 4 Electric conductance in extracting solution of organs from bean plants and concentration of malondialdehyde in leaves from bean plants

项目 Item	相对电导率(%) Relative electric conductance			丙二醛含量(nmol/g,FW) Concentration of MDA	
	根	老叶	第一片真叶	老叶	第一片真叶
	Roots	Primary leaves	First trifoliate leaves	Primary leaves	First trifoliate leaves
-Mg	9.78	20.85	10.30	4.26±0.18	4.69±0.10
+ Mg	5.39	9.04	6.33	2.52±0.37	3.29±0.17
增加(%) 值	81.4%	130.6%	62.7%	69.0%	42.6%
	-	-	-	8.50 **	14.27 **

从表4结果可以看出,这二项指标值变化趋势一致:缺镁条件下,老叶和第一片真叶的相对电导率和丙二醛含量均高于正常植株,老叶中增加程度高于真叶。根渗出液相对电导率也是缺镁处理高于正常植株。

2.5 菜豆叶片中SOD、POD、CAT活性

缺镁情况下,植物体内活性氧清除酶系统:SOD、抗坏血酸过氧化物酶(AsA-POD)、愈创木酚过氧化物酶活性在真叶中显著高于正常植株,以鲜重计算,SOD,AsA-POD,愈创木酚过氧化物酶活性分别较正常植株高出34.2%,28.0%,57.8%;若以蛋白质计算,则高出30.8%,23.1%,51.7%。CAT活性缺镁真叶中也较高。以鲜重和蛋白质计算,增加百分数分别为62.4%,57.9%,但统计上不明显。

老叶中AsA-POD活性在缺镁时显著高于正常条件下的老叶,以鲜重和蛋白质计算,增加百分数达到183.7%,200.0%,而老叶中SOD、愈创木酚POD、CAT在镁处理间无显著差异。

不同叶位上的比较:两种镁处理的菜豆植株老叶中愈创木酚POD活性高于真叶,SOD以鲜重计算,老叶中较低,以蛋白质计算,二者差别不大,AsA-POD活性在真叶中较高,而CAT活性在老叶、真叶间差别不大。

老叶和真叶中愈创木酚POD活性都高于AsA-POD。一般认为^[19],在叶绿体叶,清除H₂O₂的过氧化物对底物抗坏血酸专一,对其它电子供体如愈创木酚的亲性和性较小。老叶中AsA-POD活性和丙二醛含量在缺镁时增加程度较大,说明老叶中活性氧代谢紊乱很大程度上发

生在叶绿体中^[8]。

表 5 菜豆叶片中SOD、愈创木酚POD、AsA-POD、CAT活性

Table 5 Activities of SOD, guaiacol POD, ascorbate peroxidase, CAT in leaves of bean plants

酶活性 Activities of enzymes		老叶 Primary leaves			第一片真叶 First trifoliate leaves		
		-Mg	+Mg	t值	-Mg	+Mg	t值
SOD	U/g,FW	4.67±0.25	4.80±0.44	0.48	8.21±0.61	6.12±0.52	4.93 * *
	U/mg,protein	0.52±0.02	0.49±0.05	0.40	0.51±0.04	0.39±0.06	7.49 * *
愈创木酚POD	△A/(min·g),FW	30.66±1.71	28.81±12.98	0.44	28.62±1.88	18.14±0.88	4.12 * *
	△A/(min·mg),protein	3.33±0.33	2.95±0.23	0.77	1.76±0.12	1.16±0.09	9.22 * *
AsA-POD	△A/(min·g),FW	4.17±0.25	1.47±0.36	5.05 * *	5.02±0.47	4.10±0.30	2.71 *
	△A/(min·mg),protein	0.45±0.03	0.15±0.04	5.54 * *	0.31±0.03	0.26±0.02	2.26
CAT	△A/(min·g),FW	10.73±1.31	9.27±2.30	0.45	19.44±5.80	11.97±0.27	0.97
	△A/(min·mg),protein	1.16±0.12	0.94±0.20	0.75	1.20±0.40	0.76±0.11	0.95

3 讨 论

镁是植物必需营养元素之一,存在于叶绿素的卟啉环中^[15],对于叶绿体结构和叶绿素的合成都有重要作用,因此缺镁严重时,叶片叶绿素含量下降,出现失绿、坏死症状,植株生长受抑。镁在植物体内能向幼嫩部位移动,所以症状表现在较老的叶片上。当外界供应镁充分时,镁一般多积累在叶片中,尤其在新生叶片中。

本试验测定膜透性和丙二醛的结果说明缺镁菜豆原生质膜透性增加,膜脂发生过氧化作用,在一定程度上反映出植物体内过剩活性氧的毒害。

活性氧产生的部位主要有:(1)细胞壁木质化及解体过程;(2)线粒体呼吸链电子传递过程。(3)在叶绿体中,激发能从PSII系统传递给O₂会形成单线态氧¹O₂;但植物体内活性氧产生的主要部位是在PSI系统中,电子从铁氧化蛋白通过铁氧化蛋白-NADP⁺还原酶传递时,若NADP⁺不足或NADPH累积,电子就传递给分子氧O₂形成O₂⁻,清除系统有SOD(主要是CuZn-SOD)和抗坏血酸过氧化物酶-谷胱甘肽还原酶循环^[1,16]。

缺镁情况下,影响植物体内CO₂同化。原因在于RuBP羧化酶需要镁离子激活,光诱导下叶绿体基质内Mg²⁺增多,pH提高,刺激RuBP羧化酶活性,而且RuBP羧化酶和Mg²⁺结合后,它对CO₂的亲合力增加^[16],从而促进CO₂同化,有利于植物体内糖和淀粉的合成,缺镁势必影响这一反应。另外,缺镁植株体内淀粉和蔗糖积累^[6,14],反馈调节也使CO₂同化作用受抑。本文试验中,老叶生物量在植株干物质中比例较高也是一例证。植物体内CO₂同化受到限制时,体内光合同化力NADPH/NADP⁺就会累积,从而造成在叶绿体中活性氧O₂形成,膜脂发生过氧化作用,原生质膜受到伤害,透性增加。

本试验中,缺镁菜豆叶片中SOD、POD、CAT活性显著高于正常生长的植株,尤以老叶中AsA-POD活性增加程度最高。在前人的^[8,16]试验中,缺镁不仅刺激了活性氧清除酶系统的提

高,而且叶片中抗坏血酸、巯基化合物含量均有所提高。活性氧过多,诱导了清除系统的活性提高,尽管如此,但体内活性氧过多,超过体内防御能力,仍会发生膜脂过氧化作用,丙二醛含量增高,细胞膜透性增加,随时间延长,在外观上就会出现失绿、坏死等症状。随着外界光照强度的增大,更易诱发缺镁症状的出现和植物体内活性氧的清除系统活性提高^[16]。

真正弄清镁素营养与植物体内活性氧代谢关系尚有许多工作要做:缺镁情况下,叶片中蔗糖、淀粉积累原因;体内 O_2^- 、 H_2O_2 等活性氧含量测定,活性氧对膜脂成分、膜结构和功能的影响。

参 考 文 献

- 1 张福锁主编. 环境胁迫与植物营养. 北京农业大学出版社, 1993, 71~100.
- 2 Scandalios JG. Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiol.*, 1993, 101:7~12.
- 3 陈美亿. 锌、锰、铜对冬小麦营养效应的研究. 硕士论文, 中国农业科学院, 1992.
- 4 吴振球, 吴岳轩. 铜、锌对水稻幼苗生长及超氧化物歧化酶的影响. *植物生理学报*, 1990, 16(2):139~146.
- 5 Cakmak L and Marschner H. Enhanced superoxide radical production in roots of Zinc-deficient plants. *J Exp. Bot.*, 1988, 39:1449~1460.
- 6 Hendry GAF and Brockebank KJ. Iron induced oxygen radical metabolism in waterlogged plants. *New Phytol.*, 1985, 101:199~206.
- 7 何子平、皮美美. 硼钾营养相互配合对油菜叶片CAT和POD活性及根膜透性的影响. *华中农业大学学报*, 1993, 12(5):468~471.
- 8 Cakmak I and Marschner H. Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, and glutathione reductase in bean leaves. *Plant Physiol.*, 1992, 98:1222~1227.
- 9 陈福明、陈顺伟. 混合液法测定叶绿素含量的研究. *林业科技通讯*, 1984, 2:4~8.
- 10 张志良主编. 植物生理学实验指导(第二版). 高等教育出版社, 1990.
- 11 朱广廉、钟海文、张爱琴主编. 植物生理学实验. 北京大学出版社, 1990.
- 12 刘祖琪、张石城主编. 植物抗性生理学. 中国农业出版社, 1994.
- 13 Nakano Y and Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.*, 1981, 22: 867~880.
- 14 Fischer ES and Bussler W. Effects of magnesium deficiency on carbohydrates in *Phaseolus vulgaris*. *Z. Pflanzenernahr. Bodenk.*, 1988, 151:259~298.
- 15 Marschner H. Mineral nutrition of higher plants(2nd). Academic press, 1995.
- 16 Marschner H and Cakmak I. High light intensity enhances chlorosis and necrosis in leaves of zinc, potassium, and magnesium deficient bean (*Phaseolus vulgaris*) plants. *J. Plant Physiol.*, 1989, 134:308~315.

EFFECT OF Mg DEFICIENCY ON PLASMA MEMBRANE PERMEABILITY, MEMBRANE LIPID PEROXIDATION AND ENDOGENOUS OXYGEN RADICALS SCAVENGING ENZYMES SYSTEMS IN COMMON BEAN

Wang Hong Chu Tianduo

(Soil and Fertilizer Institute, CAAS, Beijing 100081)

Abstract Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants were cultured in solution with Mg deficient (0 mmol/L) and normal Mg supply (1.2mmol/L). Plants under Mg deficiency showed interveinal chlorosis, necrosis in primary leaves and first trifoliolate leaves. Normal Mg supply increased plants dry matter weight and concentration of Mg in leaves, stems, and roots. There was little difference of concentration of chlorophyll between those leaves without yellow and chlorosis under Mg deficiency and normal leaves with Mg sufficiency, but concentration of chlorophyll in yellowish leaves from Mg deficiency was lower. Hill reaction values of intact chloroplasts in Mg deficient leaves were similar to those in Mg sufficient leaves. Mg deficiency caused the increase of relative electric conductance in extracting solution of leaves and roots. Concentration of malondialdehyde also remained pronounced levels in leaves. Comparing to Mg sufficient leaves, the activities of superoxide dismutase (SOD, EC 1.15.11), ascorbate peroxidase (AsA-POD, EC 1.11.17), guaiacol peroxidase (EC 1.11.17) and catalase (CAT, EC 1.11.16) were significantly enhanced in the leaves by Mg deficiency. It seemed that Mg deficiency affected plasma membrane permeability, membrane lipid peroxidation and endogenous oxygen radicals scavenging enzymes systems in bean seedlings.

Key words Magnesium deficiency Common bean Membrane lipid peroxidation
Membrane permeability Oxygen radical Chlorophyll Hill reaction.