

在盐胁迫下红萍超氧化物歧化酶 SOD 及 叶肉细胞亚显微结构的变化

章 宁 陈 坚 魏文雄* 金桂英 唐龙飞

(福建省农业科学院红萍研究中心, 福州 350013)

摘 要: 细绿萍、小叶萍以及它们的杂种萍对盐浓度的忍受能力的顺序为: 杂种萍>细绿萍>小叶萍, 在低盐 (0.2% NaCl) 下, 能促进红萍生长。低盐浓度胁迫下, SOD 活性随盐浓度的升高而升高, 但到一定盐浓度后 SOD 活性开始下降 (小叶萍在 0.4% NaCl 时、细绿萍和杂种萍在 0.6% NaCl 时, 酶活性开始下降)。SOD 凝胶电泳带染色深浅随盐浓度的升高而加深, 但到一定盐浓度后, 谱带染色变浅, 实验结果与 SOD 活性测定相对应。叶肉细胞亚显微结构的观察表明: 在盐胁迫下, 红萍叶片细胞受损伤的初始部位为叶绿体和线粒体, 随后整个细胞的膜系统受损、混乱、以至破坏, 本文并对 SOD 作为红萍抗盐育种的指标进行了讨论。

关键词: 红萍; 超氧化物歧化酶; 盐胁迫; 膜伤害; 超微结构

Changes in Superoxide Dismutase Activity and Cell Ultrastructure of *Azolla* During Salt Stress

Zhang Ning, Cheng Jing, Wei Wengxiong, Jing Guiying and Tang Longfei

(*Azolla Research Centre, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013*)

Abstract: The result of investigation indicated that tolerance of Hybrid *Azolla* to salt was the best, followed by *A. filiculoides* and *A. microphylla* among three *Azolla* treated with different salt concentrations; during low salt concentration, *Azolla* were grown beneficially. The SOD activity rose higher with the increasing intensity of salt stress, but it started to reduce in certain salt concentrations (*A. filiculoides* and Hybrid *Azolla* in 0.6% NaCl, *A. microphylla* in 0.4% NaCl). The SOD gel electrophoresis showed the same results between SOD activity and straining intensity of enzyme bands. The ultrastructural changes of mesophyll cells showed that damage of membrane systems might be as a result of lipid reoxidation. It is suggested that SOD activity might be as an index of NaCl-resistance breeding.

Key Words: *Azolla*; Superoxide Dismutase; Salt stress; Membrane damage; Cell ultrastructure

1969 年 McCord 和 Fridovich 首次发现超氧化物歧化酶。它主要功能在于消除超氧化物自由基, 减轻脂质过氧化作用和膜伤害^[1,2]。Kalir 等 1981 曾报道盐生植物马齿苋在盐渍下能维持较高的 SOD 活性^[9]。汪宗立 (1987) 也曾对水稻叶片在盐胁迫下质膜透性进行研究, 认为膜系统的伤害可能是脂质过氧化作用的结果^[4]。

红萍作为稻田绿肥在我国已有很久历史。目前, 红萍已由单纯作绿肥向饲料综合利用发

* 魏文雄同志目前在本院生物技术研究中心工作 (福州 350003)。

收稿日期: 1990-12-15

展。大量的海滨滩涂和盐碱地为红萍养殖提供广阔的前景,为此,培育耐盐的红萍品种是项很有意义的工作。本文旨在研究红萍在盐胁迫下 SOD 和细胞亚显微结构变化的关系,为红萍耐盐品种的选育提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 供试材料:细绿萍 (*A. filiculoides*)、小叶萍 (*A. microphylla*) 和由它们作亲本通过有性杂交选育出的杂种萍 (Hybrid *Azolla*) “榕萍 1—4 号”。试验前把它们放在 6302 培养液中预培养 1 周。

1.2 红萍繁殖系数的测定:把细绿萍、小叶萍、杂种萍分别放置在含 0%、0.2%、0.4%、0.6%、0.8% NaCl 的 6302 培养液中进行处理,每个浓度设三次重复,放萍量 5 g。生长状况用繁殖系数表示,按下式计算^[3]:

$$K = \frac{1}{t_2 - t_1} \ln \frac{Ct_2}{Ct_1}$$

(K=繁殖系数 Propagative rate; t_1 =放萍时间 Inoculating time; t_2 =测产时间 Measuring time;

Ct_1 =放萍量 Inoculum; Ct_2 =测产量 Accumulative amount; ln=自然对数 natural logarithm)

1.3 SOD 酶活性测定:按 Rober 等方法进行^[10]。3ml 反应液中含有:50 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH7.8), 13 mmol/L 甲硫氨酸, 75 μ mol/L 氮蓝四唑 (NBT), 2 μ mol/L 核黄素, 100 μ mol/L EDTA。加入适量酶液后在 4000 Lux 荧光灯下光照 15 min,并在 560nm 下测定光密度,以不加酶液的处理作为对照。酶活性单位采用抑制 NBT 光化还原 50% 为 1 个酶活性单位。

1.4 SOD 酶凝胶电泳:采用聚丙烯酰胺垂直平板凝胶电泳,浓缩胶 T=4%,分离胶 T=9%,电泳 4—5 hr。酶活性染色是将凝胶浸泡在 2.45×10^{-3} mol/L NBT; 20 min 后取出凝胶放入含有 0.028 mol/L 四甲基乙二胺, 2.8×10^{-5} mol/L 核黄素和 0.36 mol/L 磷酸钾缓冲液 pH7.8 溶液中 15 min;最后放入 0.05 mol/L 磷酸缓冲液 (pH7.8) 10^{-4} mol/L EDTA 溶液中并按上述条件照光 30—40 min。SOD 酶的活性谱带是出现在蓝色背景上的无色透明区带^[6]。

1.5 叶肉细胞超微结构的观察:红萍经 2.5% 戊二醛和 1% 锇酸液中固定处理后,酒精逐级脱水,环氧丙烷过滤, Epon812 包埋,超薄切片 (Sorvall MT-6000 型超薄切片机),醋酸双氧铀和柠檬铅双重染色,用 JEM-100 cx/ I 型透射电镜观察。

2 试验结果

2.1 不同盐浓度胁迫下红萍生长状况 经不同盐浓度处理 6 天后的红萍繁殖系数测定表明,在 0.2% NaCl 低盐浓度下细绿萍和杂种萍的繁殖系数均比对照 (0% NaCl) 高,但随着盐浓度的提高,繁殖系数开始下降。当盐浓度达到 0.8% NaCl 时,细绿萍和小叶萍繁殖系数呈负值,杂种萍繁殖缓慢 (图 1)。可见耐盐能力为杂种萍 > 细绿萍 > 小叶萍。对培养 4 周的杂种萍形态观察结果表明:未加 NaCl 的对照萍表现嫩、薄、体小,经盐胁迫处理后,红萍形态起了变化。0.2% NaCl 处理的红萍,不但繁殖系数比对照 0% NaCl 高,而且萍体厚、朵大、根多而长。随着盐浓度上升,萍体的叶和根逐渐出现受害症状;上部叶出现脱水干枯,基部叶和根发黑,逐渐脱落;到了 0.8% NaCl 红萍停止生长,根少且短,有的腐烂,仅能维持生存。

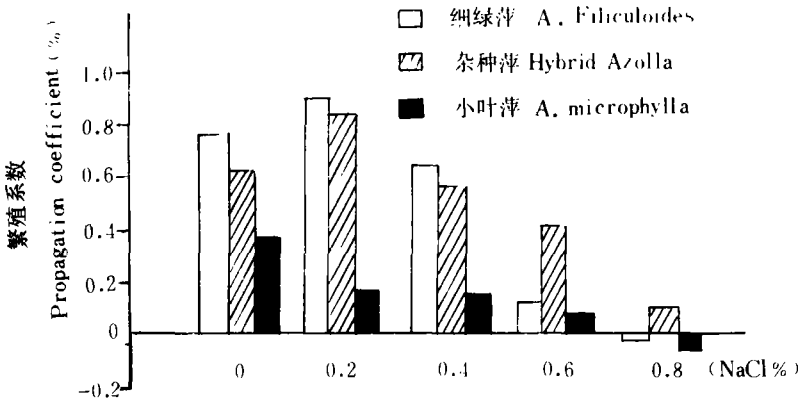


图 1 不同盐浓度处理 6 天后的红萍繁殖系数

Fig. 1 Azolla propagation coefficient treated with different salt concentration after 6 days

2.2 SOD 活性的变化 不经盐处理的三种萍，若以细绿萍为参比进行酶活性比较。结果以杂种萍与细绿萍酶活性差异不大 (t 值不显著)，小叶萍与细绿萍酶活性差异达极显著 (见表)，说明小叶萍在没有盐胁迫下自身所产生的自由基较多，就需要维持比较高水平的 SOD 酶活性才能正常生长，因此在盐胁迫下易受伤害，而杂种萍和细绿萍则相反。

在盐胁迫初期，SOD 活性在数量上无多大变化，但随时间的推移，酶活性发生了变化。在第十二天对不同盐浓度下 SOD 活性进行测定，发现随着盐浓度的升高，SOD 活性相应地提高，但每种萍升高到一定盐浓度后 (杂种萍和细绿萍为 0.6% NaCl，小叶萍为 0.4% NaCl) 有两点明显的不同，一是不耐盐品种起点高，增幅小，而耐盐品种起点低增幅大；其次是前者在较低盐浓度下即达高峰，随后迅速下降，后者可在较高盐浓度下才达到高峰。二者动态曲线有明显区别 (图 2)。

2.3 SOD 酶凝胶电泳 在第十二天同时进行不同盐浓度胁迫下红萍酶凝胶电泳测定，发现细绿萍和杂种萍谱带相似，小叶萍则在负极区少了一条带 (图 3)。另外，由凝胶图谱得知；不同盐浓度下酶带的宽窄和白色的明暗与所测的酶活性相对应。

2.4 SOD 盐胁迫处理后红萍叶肉细胞亚显微结构的变化 红萍叶肉细胞透射电镜观察表明：在正常叶肉细胞中细胞核里充满了电子致密物质和核仁；细胞质中含有带基粒片层和核糖体的椭圆形叶绿体，内脊丰富的线粒体、高尔基体、内质网、液泡以及电子致密物质 (图版 I：1、2、3、4) 以杂种萍为代表 (其它两种萍相类似)。在 0.6% 盐胁迫下受损伤的叶肉细胞中，发现叶绿体膨大，基粒片层向四周扩散 (图版 I：5、6)。盐浓度增到 1% NaCl，叶绿体膜被破坏，片层结构紊乱，线粒体内脊减少，成为透明的圆球体 (图版 II：8、9)；散乱

表 三种对照萍的 SOD 活性和品种酶活性的比较

Table SOD activity of three control Azolla and comparison of SOD activity among species

品种 Species	SOD 活性 SOD activity	t value (值)
细绿萍 A. filiculoides	22.29	
杂种萍 Hybrid Azolla	28.88	NS
小叶萍 A. microphylla	93.90	HS

* 酶单位/克鲜重 Enzyme unit/g fresh weight; NS: 不显著, No Significant; HS: 极显著 < 0.01 Highest Significant

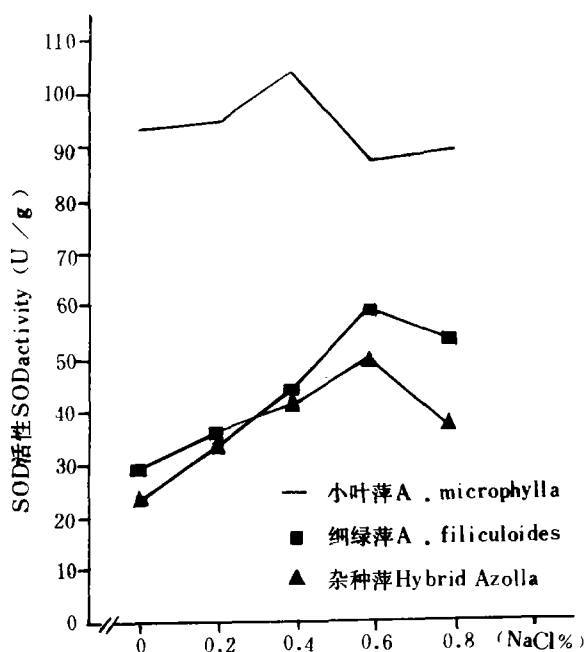


图 2 NaCl 处理 12 天后 SOD 活性随盐浓度的变化

Fig. 2 Changes of SOD activity with concentration after 12 days

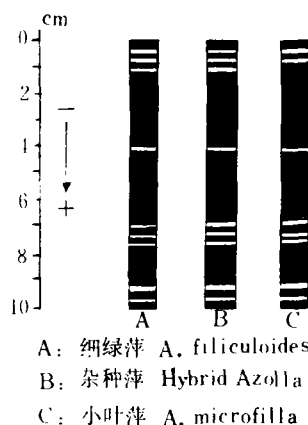


图 3 三种萍的 SOD 同工酶谱

Fig. 3 SOD isoenzyme bands of three Azolla

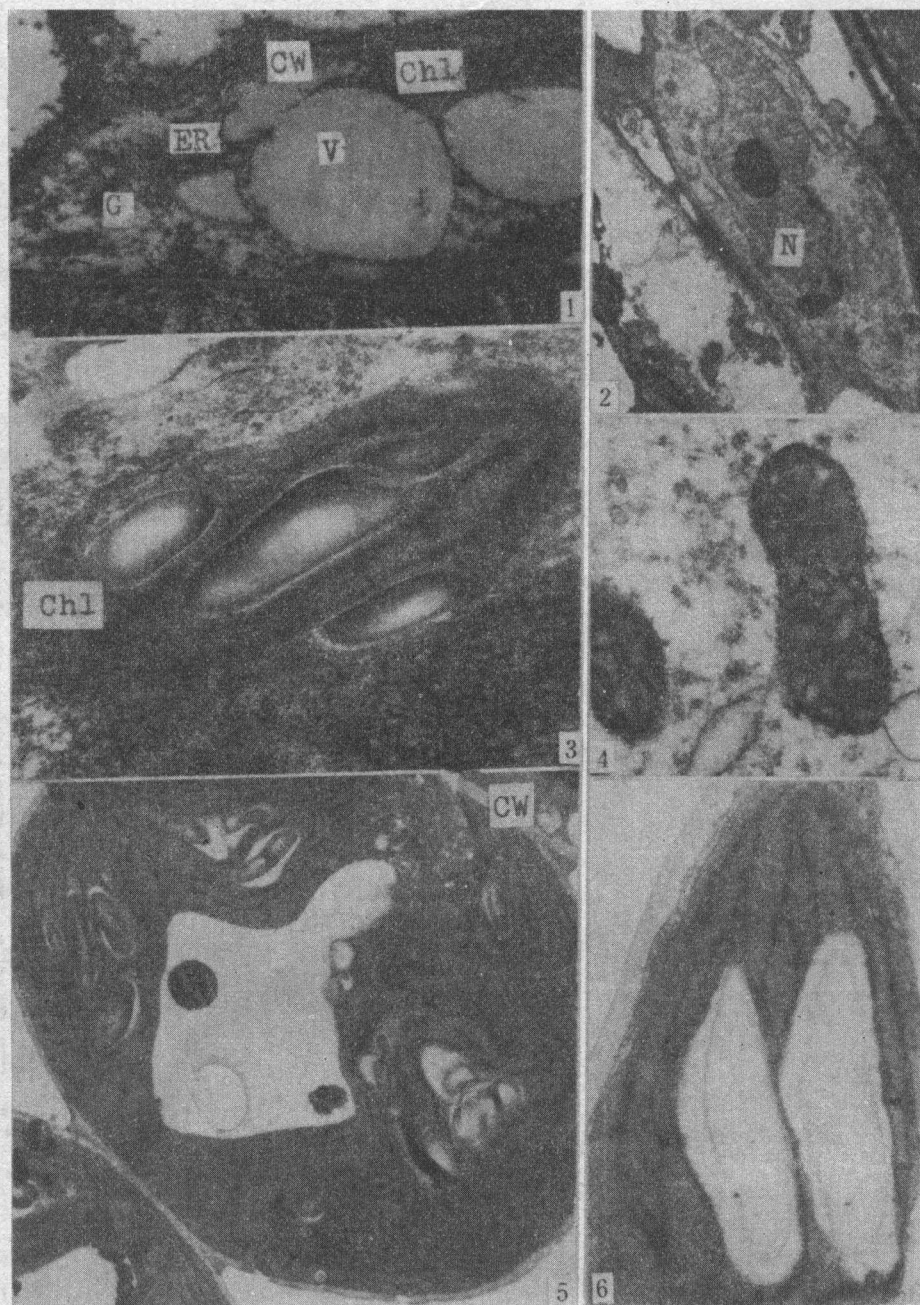
在细胞质中的类囊体片层、残破线粒体和细胞溶质内陷成圆球体，它们都在液泡中被消化（图版Ⅱ：7、9、10）。质膜逐渐脱离细胞壁，核膜开始损伤，在其周围存在电子致密物质

（图版Ⅱ：7、11）。

对细绿萍（图版Ⅱ：7、8、9）和杂种萍（图版Ⅱ：10、11）受损伤的叶肉细胞进行比较，发现在相同盐胁迫条件下，细绿萍中的类囊体片层已严重损伤线粒体内脊消失，以及细胞质液腔化比杂种萍严重。这结果进一步表明，杂种萍的耐盐力比细绿萍强。

3 讨 论

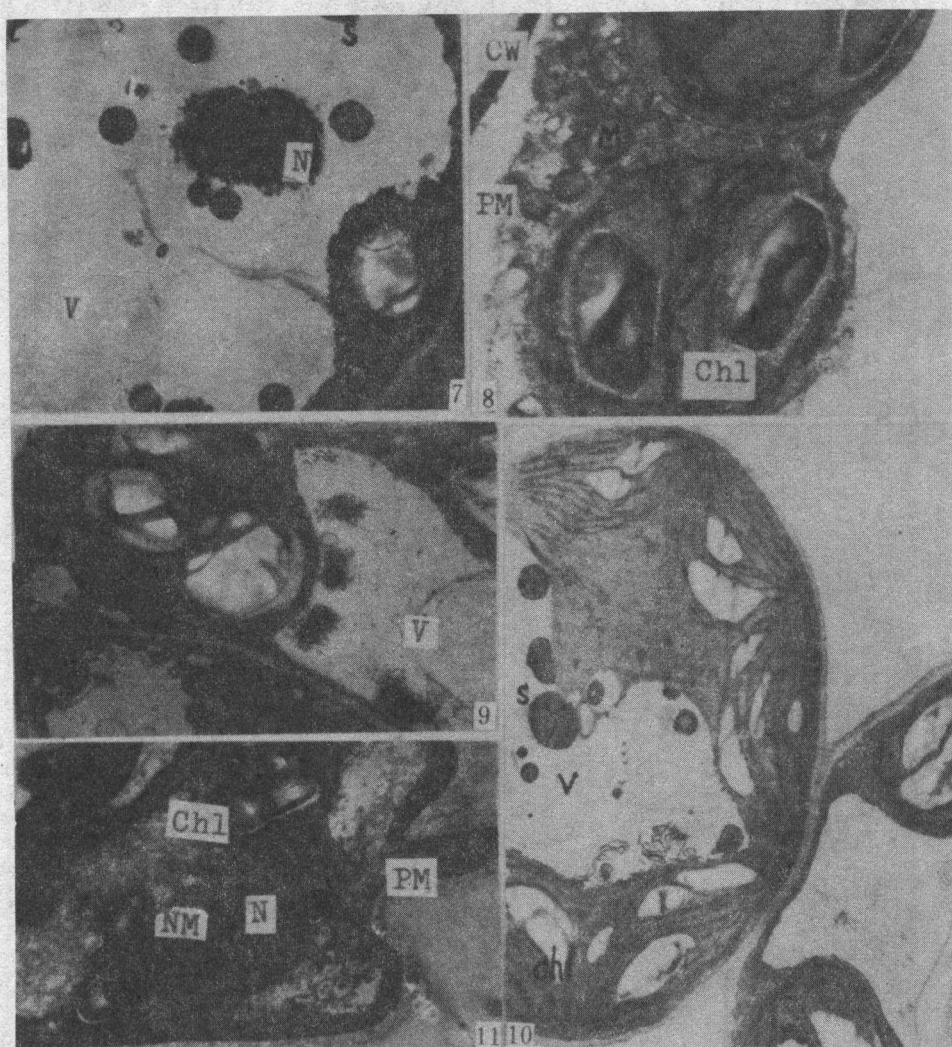
脂质过氧化作用是自由基攻击类脂中不饱和脂肪酸而引发的一系列自由基反应，最终造成膜脂和膜蛋白的损伤而使细胞内膜系统破坏^[5]。正常的植物细胞的叶绿体和线粒体在光合作用和呼吸作用过程中会产生自由基（ O_2 和 $OH\cdot$ ）^[8]，但由于细胞内存在自由基净化剂，通过去除 O_2 以及减少了 O_2 所产生的其它活性氧浓度而对细胞起保护作用。本试验结果表明：随盐浓度的增加，SOD 活性相应地提高，证明红萍叶肉细胞膜伤害与自由基攻击类脂和脂肪酸有关。红萍叶肉细胞亚显微结构的变化亦证明与脂质过氧化作用和膜伤害密切相关。在较低盐胁迫下，耐盐品种细胞能维持较高的 SOD 活性，脂质过氧化作用较弱，电镜下除能观察到叶绿体中类囊体的轻度膨胀外，膜系统基本完整；随着盐胁迫强度加大，SOD 活性下降，脂质过氧化作用加强，叶绿体内片层系统受到严重损伤，质膜断裂、线粒体内脊损伤；电镜观察结果表明：细胞内自由基形成的两个主要场所——线粒体和叶绿体在盐胁迫下超微结构变化较早较为显著，亦暗示着细胞器的损伤可能是自由基伤害的结果。



图版 I 在盐胁迫下红萍超氧化物歧化酶和细胞亚显微结构的变化

Plate I Changes in Superoxides Dismute Activity and Cell Ultrastructure of Azolla During Salt Stress

此外,耐盐性高的杂交萍在盐胁迫下能维持相对高的 SOD 活性,电解质外渗和脯氨酸积累也比耐盐性低的小叶萍少(见另篇报道);由于小叶萍在无盐胁迫状态下,酶活性比细绿萍高(t 值极显著),随盐浓度变化 SOD 的增幅小,以及在 0.4% NaCl 较低盐浓度下增殖高峰就迅速下降,均可推测小叶萍耐盐性较差。综上所述,认为 SOD 活性的变化可作为红萍耐盐选育的指标之一。



图版 II 在盐胁迫下红萍超氧化物歧化酶和细胞亚显微结构的变化

Plate II Changes in Superoxides Dismute Activity and Cell Ultrastructure of Azolla During Salt Stress

图版 I — II 说明

Chl. 叶绿体; N. 细胞核; G. 高尔基体; M. 线粒体; ER. 内质网; V. 液泡; NM. 核膜; S. 圆球体; PM. 质膜; CW. 细胞壁

1. 杂交萍正常的叶肉细胞局部。示叶绿体、线粒体、内质网和液泡。×8009
2. 杂交萍正常的叶肉细胞。示完整的细胞核及细胞器。×5418
3. 杂交萍正常叶绿体。示基粒片层和核糖体。×4018
4. 杂交萍正常线粒体。示丰富的内脊。×40360
5. 0.6%NaCl 处理 5 天后的细绿萍受损伤的细胞。示膨大的叶绿体。×10018
6. 0.6% NaCl 处理 5 天后细绿萍受损伤的叶绿体。示膨胀的叶绿体和不规则的基粒片层。×2000
7. 1%NaCl 处理 5 天后细绿萍受损伤的叶肉细胞。示内陷到液泡中的圆球体和细胞核。×8018
8. 1%NaCl 处理 5 天后细绿萍受损伤的叶绿体。示叶绿体膜破损、基粒片层排列紊乱和线粒体内脊消失。×13418
9. 1%NaCl 处理 5 天后细绿萍受损伤的叶肉细胞。示叶绿体破损和液泡中圆球体的消失。×6709
10. 1%NaCl 处理 5 天后杂交萍受损伤的叶肉细胞, 示叶绿体膨大、基粒片层向四周扩散和圆球体内陷到液泡中。×8018
11. 1%NaCl 处理 5 天后杂交萍的叶肉细胞。示质壁分离, 质膜内陷, 细胞器破损和核膜受损。×4009

Explanation of Plate

1. Part of mesophyll cells of Hybrid Azolla grown under normal condition, showing chloroplasts (Chl), mitochondria (M), endoplasmic reticulum (ER) and vacuoles (V). ×8009
2. Mesophyll cells of Hybrid Azolla grown under normal condition, showing nucleus and organelles. ×5418
3. Chloroplasts of Hybrid Azolla grown under normal condition, showing grana and ribosomes. ×40180
4. Mitochondria of Hybrid Azolla grown under normal condition, showing plentiful crista. ×40360
5. Mesophyll cells of *A. filiculoides* treated by 0.6% NaCl for 5 days, showing the swell of chloroplasts. ×10018
6. Chloroplasts of *A. filiculoides* treated by 0.6% NaCl for 5 days, showing the swell of chloroplasts and confusion of grana lamellae. ×20000
7. mesophyll cells of *A. filiculoides* treated by 1% NaCl for 5 days, showing nucleus and spherosomes. ×8018
8. Chloroplasts of *A. filiculoides* treated by 1% NaCl for 5 days, showing damage of membrane in the chloroplasts and disappearance of crista in the mitochondria. ×13418
9. Mesophyll cells of *A. filiculoides* treated by 1% NaCl for 5 days, showing damage of chloroplasts and disappearance of spherosomes in the vacuoles. ×6709
10. Mesophyll cell of Hybrid Azolla treated by 1% NaCl for 5 days, showing the swell of chloroplasts, swelled grana lamellae and spherosomes in the vacuoles. ×8018
11. Mesophyll cells of Hybrid Azolla treated by 1% NaCl for 5 days, showing the plasmolysis, breakdown of plasmalemma and damage of organelles and nuclear membrane. ×4009

参 考 文 献

- [1] 王以柔等. 1986. 在光照和黑暗条件下低温对水稻光合器官膜脂过氧化作用的影响. 植物生理学报, 12 (3): 244—251
- [2] 刘鸿先等. 1985. 低温对不同耐寒力的黄瓜幼苗子叶各细胞器中超氧化物歧化酶的影响. 植物生理学报, 12 (3): 244—251
- [3] 刘中柱, 郑伟文. 1989. 中国满江红; 59
- [4] 汪宗立等. 1987. 盐逆境下叶片质膜透性的变化及与脂质过氧化作用的关系. 江苏农业学报, 3 (2): 1—9
- [5] 陈瑗, 周玖. 1983. 谈谈脂质过氧化作用. 生命的化学, (3): 16—19
- [6] 罗广华等. 1983. 植物 SOD 的凝胶电泳及活性的显示. 植物生理学通讯, (6): 44—45
- [7] 龚明等. 1989. 盐胁迫下大麦和小麦叶片脂质过氧化伤害与超微结构的关系. 植物学报, 31 (11): 84—846
- [8] Elstner E F. 1982. Oxygen activation and oxygen toxicity. Ann. Rev. Plant Physiol, 33: 73—96
- [9] Kalir A. 1981. Changes in activity of malate dehydrogenase, catalase, Peroxidase and superoxid dismutase in leaves of *Halimione portulacoides* aellen exposed to high sodium chloride concentration. Ann Bot. 47: 75—85
- [10] Rober R C Stewart and J Derek Bewley. 1980. Lipid peroxidation associated with accelerated aging of Soybean axes. Plant Physiol, 65: 245—248