

镍对菠菜离体叶片衰老的调节 Regulation of Senescence of Isolated Leaves of *Spinacia oleracea* by Nickel

石贵玉 周巧劲 刘灵
Shi Guiyu Zhou Qiaojing Liu Ling

(广西师范大学生物系 桂林市育才路3号 541004)

(Department of Biology, Guangxi Normal University, 3 Yucailu, Guilin, Guangxi, 541004)

摘要 取生长一致的菠菜第3、4叶片置于 10^{-3} mol/L NiSO_4 中, 28℃暗处理48 h, 然后测定各项生理指标。结果表明: 镍抑制了叶片在衰老过程中超氧化物歧化酶(SOD)活性的下降和抗坏血酸(ASA)氧化酶活性的上升, ASA、蛋白质和叶绿素含量的下降得到延缓, 降低了膜脂过氧化程度, 从而延缓了菠菜叶片的衰老。

关键词 镍 菠菜叶 膜脂过氧化 衰老

中图法分类号 S 636.101

Abstract The isolated leaves of *Spinacia oleracea* were treated with 10^{-3} mol/L NiSO_4 at temperature 28℃, 48 h, in the dark. The results indicated that the decrease of activity of superoxide dismutase (SOD) and the increase of activity of ascorbic acid oxidase could be inhibited by nickel, while the decrease of contents of ascorbic acid and protein and chlorophyll could also be delayed. Nickel alleviated the level of membrane lipid peroxidation significantly, therefore, it is concluded that nickel could indeed delay the senescence of the isolated leaves of *Spinacia oleracea*.

Key words nickel, *Spinacia oleracea*, membrane lipid peroxidation, senescence

植物组织的衰老是生物不可避免的生理过程, 而叶片的衰老则是植物衰老最明显的特征。研究表明, 叶片的衰老与生物膜的破坏有密切关系, 生物膜破坏原因是体内自由基(O_2^- 、 OH^\cdot)累积使膜脂过氧化造成的结果^[1]。镍(Ni^{2+})和细胞分裂素一样, 对植物衰老有一定的延缓作用^[2], 为探讨镍延缓植物衰老的生理作用, 本文研究了离体菠菜叶脂过氧化作用与几项衰老生理指标的关系及镍对它们的影响, 为研究延缓植物衰老的措施提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为菠菜(*Spinacia oleracea*)。取生长一致的菠菜第3、第4叶置于 10^{-3} mol/L NiSO_4 、20 mg/L 6-苄基腺嘌呤(BA)和蒸馏水中, 28℃暗处理48 h, 然后测定各项生理指标, 每处理重复3次。

1.2 叶绿素含量测定

采用混合液提取^[3], 按Arnon公式计算叶绿素

含量。

1.3 蛋白质含量测定

采用Folin酚法^[4]。

1.4 超氧化物歧化酶(SOD)活性测定

按Giannopolitis和Ries的方法^[10], 以每单位时间内抑制光化还原50%的氮蓝四唑(NBT)为一个酶活性单位。

1.5 抗坏血酸含量测定

参照景国安的方法^[6], 1 g叶片用少量2%偏磷酸(内含8%醋酸)研磨, 再以偏磷酸-醋酸溶液定容至50 mL, 过滤, 吸取5 mL提取液加1 mL偏磷酸-醋酸和水104 mL, 用0.02% 2, 6-二氯酚靛酚溶液滴定。

1.6 抗坏血酸(ASA)氧化酶活性测定

采用碘量法^[5]。

1.7 丙二醛(MDA)含量测定

采用硫代巴比妥酸反应法^[11]。

1.8 膜透性测定

采用电导法^[7], 用电导率 $\mu\Omega/\text{cm}$ 表示膜透性的大小。

表 1 Ni²⁺对离体菠菜叶中 SOD、ASA 氧化酶活性和叶绿素、蛋白质、ASA 含量的影响

Table 1 Effect of Nickel on the activities of SOD and ASA oxidase, and the contents of chlorophyll, protein and ASA in the isolated leaves of *Spinacia oleracea*

处理 Treatment	叶绿素 Chlorophyll content (mg/g °FW)	蛋白质 Protein content (mg/g °FW)	ASA (mg/ 100g °FW)	SOD (酶活单位/g °FW)	ASA 氧化酶 Ascorbic acid oxidase activity (μg/ FW. min)
处理前 Before treatment	2.78 (100.0)	0.79 (100.0)	9.28 (100.0)	549.0 (100.0)	0.16 (100.0)
对照 Control	1.56 (56.1)	0.45 (57.0)	5.50 (59.3)	372.0 (67.8)	0.45 (281.3)
Ni ²⁺ Nickel	2.57 (92.4)	0.62 (78.5)	8.41 (90.6)	435.0 (79.2)	0.23 (143.8)
BA Benzyladenine	2.46 (88.5)	0.59 (74.7)	8.25 (88.9)	451.0 (82.4)	0.25 (156.3)

2 结果与讨论

2.1 Ni²⁺对菠菜叶中叶绿素和蛋白质含量的影响

从表 1 可见, 叶片离体后, 无论是 Ni²⁺、BA 处理还是对照叶中叶绿素和蛋白质含量都下降。暗放置 48 h, 对照叶片叶绿素和蛋白质分别下降了 43.9% 和 43.0%, BA 处理的下降了 11.5% 和 25.3%, 经 Ni²⁺ 处理的下降 7.6% 和 21.5%。表明离体叶片经 Ni²⁺ 处理后, 与 BA 处理一样, 有延缓叶绿素和蛋白质含量减少的趋势和明显的保绿作用。聂先舟等研究认为 Ni²⁺ 是植物内源乙烯生成的抑制剂, Ni²⁺ 不仅影响离体叶内乙烯的生成, 同时也能保持叶片生物膜的完整性^[2,8], 这可能是 Ni²⁺ 延缓叶片衰老的原因之一。

2.2 Ni²⁺对菠菜叶中 SOD 活性的影响

菠菜离体叶片暗放置 48 h 后, SOD 活性均呈下降趋势, 其中经 BA、Ni²⁺ 处理的叶片, SOD 活性下降 17.6% 和 20.8%, 对照则下降 32.2% (表 1)。说明 Ni²⁺ 与 BA 一样, 对菠菜离体叶片中的 SOD 活性的下降, 有一定的延缓作用, 从而有利于减少 O₂⁻ 等有害自由基的积累。

2.3 Ni²⁺对菠菜叶中 ASA 含量和 ASA 氧化酶活性的影响

从表 1 可见, 菠菜离体叶片暗放置 48 h 后, ASA 氧化酶活性均呈上升趋势, 但对照叶内 ASA 氧化酶活性的增加明显高于 Ni²⁺ 或 BA 处理叶的增加量。相反, ASA 含量则呈现下降趋势, 但经 Ni²⁺ 或 BA 处理的叶片 ASA 减少量乃明显低于对照。Mukherjee 等指出, 眉豆叶片经抗氧化剂处理后, 在水分胁迫下, 其 H₂O₂ 含量和 ASA 氧化酶活性降低, 调节了 H₂O₂ 和 ASA 的水平^[12]。本研究亦见, 由于 Ni²⁺ 或 BA 处理的叶片 ASA 氧化酶活性增加小于对照, 保持了较高的 ASA 含量。ASA 是重要的

抗氧化剂, 对植物组织衰老有一定的延缓效应, 这可能是由于 ASA 通过清除体内过多的 H₂O₂, 使产生 °OH 的底物减少, 从而对膜结构和功能起到一定的保护作用^[9]。本实验也表明, Ni²⁺ 或 BA 处理的菠菜叶片保持较高水平的 ASA 含量, 并与 SOD 等协同作用, 可能阻抑了体内的自由基的积累, 从而减轻膜伤害, 延缓了菠菜叶片的衰老过程。

表 2 Ni²⁺对离体菠菜叶 MDA 产生量和膜透性的影响

Table 2 Effect of Nickel on MDA yield and membrane permeability in the isolated leaves of *Spinacia oleracea*

处理 Treatment	膜透性 Membrane permeability (μΩ/cm)	MDA 产量 MDA yield (nmol/g °FW)
处理前 Before treatment	890 (100.0)	15.2 (100.0)
对照 Control	1 290 (144.9)	22.6 (148.7)
Ni ²⁺ Nickel	1 140 (128.1)	20.3 (133.6)
BA Benzyladenine	1 130 (126.9)	17.8 (117.1)

2.4 Ni²⁺对菠菜叶中 MDA 产生量和膜透性的影响

膜透性增加是膜系统损伤的表现, 而膜系统的脂质过氧化产物是 MDA。从表 2 可知, 菠菜离体叶片暗放置 48 h 后, MDA 产生量和质膜透性均有所增加; BA 和 Ni²⁺ 处理的叶片, MDA 产生量明显低于对照的, 膜透性的增加亦明显低于对照。说明 Ni²⁺ 与 BA 一样对菠菜离体叶片 MDA 产生量和膜透性的增加具有不同程度的阻抑作用, 表明 Ni²⁺ 或 BA 处理的菠菜叶, 脂质过氧化程度低于对照。这可能与 Ni²⁺、BA 处理的叶片内 SOD 活性高于对照 (表 1), 及时清除过多的自由基, 减轻膜伤害有关。

致谢

廖静、黄廷娟和李永源同志参加部分测试工作, 特此致谢!

参考文献

- 1 王建华, 刘鸿先, 徐同. 超氧化物歧化酶(SOD)在植物逆境和衰老生理中的作用. 植物生理学通讯, 1989, (1): 1.
- 2 聂先舟, 徐竹生, 刘道宏等. 镍(Ni^{2+})银(Ag^+)对延缓水稻叶片衰老的效应. 湖北农业科学, 1988, (9): 8.
- 3 陈福民, 陈顺伟. 混合液法测定叶绿素含量的研究. 农业科技通讯, 1984, (2): 4.
- 4 袁晓华等. 植物生理生化实验指导. 北京: 高等教育出版社, 1983. 53.
- 5 波钦诺克 X H. 植物生物化学分析方法. 荆家海等译. 北京: 科学出版社, 1981. 209.
- 6 景国安, 忻秋萍, 卢国芬. 2,6-二氯酚靛酚测定果蔬还原型抗坏血酸方法的改进. 植物生理学通讯, 1985, (5): 41.
- 7 上海植物生理学会编. 植物生理学实验手册. 上海: 上海科技出版社, 1985. 67.
- 8 聂先舟, 刘道宏, 徐竹生. 乙烯在离体水稻叶片衰老中的作用. 华中农业大学学报, 1989, 8(3): 218.
- 9 赵会杰, 林学梧. 抗坏血酸对小麦旗叶衰老过程中膜脂过氧化的影响. 植物生理学通讯, 1992, 28(5): 351.
- 10 Giannopolitis C N, Ries S K. Superoxide dismutases I. occurrence in higher plants. Plant Physiology, 1977, 59: 309~314.
- 11 Dhindsa R S, Matovec W. Drought tolerance in two mosses: correlated with enzymatic defence against lipid peroxidation. J Exp Bot, 1981, 32: 79.
- 12 Mukherjee S P, Choudhuri M A. Implications of water stress induced changes in the levels of endogenous ascorbic acid and hydrogen peroxide in vigna seedlings. Plant Physiology, 1983, 58: 166.

(责任编辑: 邓大玉)

(上接第 233 页 Continue from page 233)

- 8 Larkin P J. Purification and viability determinations of plant protoplasts. Planta, 1976, 128: 213~216.
- 9 Lee L, Schroll R E, Grimes H D et al.. Plant regeneration from indica rice (*Oryza sativa* L.) protoplasts. Planta, 1989, 178: 325~333.
- 10 Mor K, Kinoshita T, Yamada Y. Callus formation and protoplast isolation in rice (*Oryza sativa* L.) and its related species. Journal of the Faculty of Agriculture, Hokkaido University, 1991, 64(4): 304~310.
- 11 Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant, 1962, 15: 473~497.
- 12 Peng J, Ononowicz H, Hodges T K. Transgenic indica rice plants. Theor Appl Genet, 1992, 83: 855~863.
- 13 Suh S C, Kim H I, Park W. Plant regeneration from rice protoplast culture in japonica (cv. Texmont). Research Reports of the Rural Development Administration, Biotechnology, 1992, 34(1): 1~9.
- 14 Wu C Y, Zapata E J. Plant regeneration from protoplasts isolated from primary callus of four japonica rice (*Oryza sativa* L.) varieties. Plant Science (Limerick), 1992, 86(1): 83~87.
- 15 Yang T B, Wu J D, Wei Z M et al.. Plant regeneration from protoplasts of indica rice. Chinese Journal of Biotechnology, 1992, 8(1): 60~64.
- 16 Xue Q Z, Earle E D. Plant regeneration from protoplasts of cytoplasmic male sterile lines of rice (*Oryza sativa* L.). Plant Cell Reports, 1995, 15: 76~81.

(责任编辑: 蒋汉明)