

植物单盐毒害和离子拮抗机理研究 I. 单盐和混合盐对植物原生质体膜某些特性、超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性的影响

何若天 覃伟

(广西农学院第一实验中心, 南宁)

摘要 单盐(KCl, CaCl₂或MgCl₂)和混合盐(KCl+CaCl₂或KCl+MgCl₂)对植物原生质体完整率、存活率和膜透性等均有明显影响。K⁺、Ca²⁺或Mg²⁺等单种阳离子明显降低原生质体膜完整率和存活率而增加其物质渗漏量,其中以单价阳离子K⁺的影响为甚。上述单种阳离子还明显降低小麦幼叶超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶活性。只有由单价和二价阳离子组成的平衡混合盐才能使原生质体维持较高的完整率、存活率和较正常的膜透性,并能使细胞维持较高的SOD和过氧化氢酶活性。

认为单盐毒害机理可能是首先引起细胞膜发生不正常的膜相变或细胞累积较多的有害氧自由基,引起膜脂发生过氧化或脱酯化而破坏膜结构。在离子平衡混合盐作用下,膜系才能维持正常液晶相,具有较高活性的SOD和过氧化氢酶等生物保护性酶系是离子拮抗作用之原因。

关键词 单盐和混合盐;植物原生质体;膜完整性;膜透性;超氧化物歧化酶;过氧化氢酶;单盐毒害和离子拮抗机理

早在本世纪初就已清楚单盐对植物生长有毒害作用^[20]。植物矿质营养研究中单盐毒害和离子拮抗作用的研究尽管积累了不少资料,但对其生理实质迄今仍仅限于推测可能与原生质及质膜的亲水胶体有关^[1],到底关系如何,知之甚少。为究其实质,须选用合适的研究系统。近年来,游离的植物原生质体已越来越受重视。因为利用游离原生质体能直接研究质膜结构和各种性质,因此不少研究者用它作为研究工具^[15]。但迄今尚未见采用游离原生质体进行有关单盐毒害和离子拮抗作用机理的研究。为逐步阐明单盐毒害和离子拮抗作用的实质提供一些资料,本试验在过去工作基础上^[2],采用植物原生质体着重研究了一价、二价阳离子及其混合盐对原生质体活力、质膜完整率、膜透性及与细胞清除自由基等毒物有关的酶活性的影响,并对单盐毒害和离子拮抗作用机理作初步讨论。

材料与方 法

(一)测试单盐与混合盐对原生质体完整率和存活率的影响时,供试材料和处理方法见下页表 观测方法与标准:1.用Olympus通用研究显微镜检查(400×)统计完整和破损原生质体,每处理统计100个以上视野,取平均值。用血球计数板测定处理前后完整原生质体数。标准:质膜清晰完好,内部可见结构(主要为液泡膜)完好无损者为完整原生质体,否则为破损原生质体。

2.用0.1%酚藏花红染色法检查存活原生质体,不着色者为活原生质体。

(二)测试单盐和混合盐对原生质体膜透性的影响时,供试材料为小麦(品种623)幼叶 将叶片切成宽约1mm小碎片后按上法用1.5%纤维素酶Onozuka R-10,0.5%果胶酶

试验方式*	植物名称	供试材料	原生质体分离和盐液处理
I	1. 甘蔗 (<i>Saccharum officinarum</i> L. 品种台糖134) 田间栽培植株 无菌培养苗	梢部幼叶 幼叶、根尖	分别用下列介质(浓度单位: $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$): (1) KCl 0.39; (2) $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.28; (3) MgCl_2 0.33; (4) KCl 0.19+ $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.14; (5) KCl 0.19+ MgCl_2 0.16 分别配制的EA3-867 纤维素酶(1%, 根尖用1.5%)混合液(pH5.6~5.8)于30℃ 恒温水浴中酶解1~4小时(视不同材料而异)。
	2. 萱草 (<i>Heimerocallis fulva</i> L.)	幼叶	
	3. 小麦 (<i>Triticum aestivum</i> L.)	第一片幼嫩真叶	
	4. 马尾松 (<i>Pinus massoniana</i> Lamb.)	子叶、下胚轴	
II	萱草	幼叶	1. 用2%纤维素酶Onozuka R-10, 1%果胶酶(Serva)和 $0.6\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 甘露醇混合液(pH 5.6)分离原生质体; 2. 离心(100g)法纯化原生质体后, 分成5等份, 用与I相同的介质分别在25℃水浴中处理10小时。

* 试验方式为I。原生质体分离期间单盐和混合盐对原生质体完整性的影响; II。单盐和混合盐对游离原生质体完整性和活力的影响。各盐溶液的溶质势均约为-15.1~-16.2巴。

(Serva)和 $0.55\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 甘露醇混合液(pH5.6~5.8)分离原生质体。纯化后分成若干等份, 分别用如表3所列的五组不同浓度单盐和混合盐(溶质势均在-14~-15巴左右)处理, 于室温($28 \pm 1^\circ\text{C}$)下静置保温5小时后, 离心(1420g)10分钟, 取定量上清液用茚三酮显色, 于580nm处测O.D.值, 再计算游离氨基酸量^[3]。

测定介质电阻值时, 将经各组不同浓度单盐和混合盐处理过5小时的原生质体, 用离心(100g)法除去盐溶液后, 改加 $0.55\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 甘露醇溶液, 于室温($28 \pm 1^\circ\text{C}$)保温6小时, 离心(1420g)10分钟, 取定量上清液, 用蒸馏水稀释一定倍数, 用DDS-11型电导仪测其电阻值。取同量 $0.55\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 甘露醇溶液加蒸馏水稀释同样倍数, 以其电阻值校正各处理材料的介质电阻值。

(三) 超氧化物歧化酶(SOD)的提取和活性测定

1. 将小麦幼叶切成长约1cm切段, 混合均匀后分别称取6份0.5g叶段置小锥形瓶内。分别加定量蒸馏水, $0.39\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl , $0.28\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $0.33\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ MgCl_2 , $0.19\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ $\text{KCl}+0.14\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $0.19\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ $\text{KCl}+0.16\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ MgCl_2 , 减压渗入后, 在室温($28 \pm 1^\circ\text{C}$)静置15~16小时。去除处理溶液并用蒸馏水洗两遍, 冷冻2小时后用预冷的磷酸盐缓冲液(pH7.8)冷磨提取。在 $0 \sim 4^\circ\text{C}$ 下离心(1420g)5分钟, 上清液再于6000g下离心10分钟, 上清液为SOD粗提液。

2. 按Giannopolitis和Ries(1977)法^[16]稍加修改测定SOD活性。在3ml反应液中含有 $5 \times 10^{-3}\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液(pH7.8)、 $13 \times 10^{-3}\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 甲硫氨酸、 $75 \times 10^{-6}\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 氮蓝四唑、 $100\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ EDTA和 $2 \times 10^{-6}\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 核黄素。加入 $60\mu\text{l}$ SOD后(对照管用磷酸盐缓冲液代替酶液), 在3500Lux蓝光下照光20分钟, 中断照光后罩以

黑布。用Shimadzu UV-120-02分光光度计于650 nm处测O.D.值, 计算反应抑制百分数, 以能引起反应初速度(不加酶时)半抑制(50%)时的酶量为一个SOD活性单位。

(四) 过氧化氢酶的提取和活性测定 1. 供试材料和盐液处理及酶液提取均同(三), 但改用5 ml含1%聚乙烯吡咯烷酮的50 mmol·l⁻¹磷酸盐缓冲液(pH7.0)提取。

2. 过氧化氢酶活性测定按李伯林和梅慧生(1989)法^[4]略加修改。5 ml反应液中含50 mmol·l⁻¹磷酸盐缓冲液(pH7.0)和30 mmol·l⁻¹ H₂O₂, 加入100 μl酶液, 30℃水浴中反应2分钟后加入2 ml 10% H₂SO₄终止反应。用0.1 NKMnO₄滴定残留 H₂O₂。按 H₂O₂消失量计算过氧化氢酶活性。

实验结果

一、单盐和混合盐对原生质体分离的影响

单盐(KCl, CaCl₂或MgCl₂)和混合盐(KCl+CaCl₂或KCl+MgCl₂)对原生质体产量有明显影响(表1)。二价阳离子(Ca²⁺或Mg²⁺)对原生质体的分离普遍有不同程度

表1 单盐和混合盐对植物原生质体产量和完整率的影响*

Table 1 Effect of single salt and complex salts on yields and integrity of plant protoplasts*

植物材料 Plant materials	盐液类型** Type of salt	原生质体产量 Protoplasts yields		完整原生质体 %	破损原生质体 %
		×10 ⁶ g ⁻¹ fw	%	Intact Protoplasts %	Damaged Protoplasts %
甘蔗梢部幼叶 Young leaf of sugarcane	KCl	5.89	174.8	21.5	78.5
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	2.09	62.0	47.8	52.2
	KCl+CaCl ₂ ·2H ₂ O	3.37	100	70.9	29.1
	KCl	3.10	236.6	22.6	77.4
	MgCl ₂	0.96	73.3	19.8	80.2
	KCl+MgCl ₂	1.31	100	55.2	44.8
无菌培养的甘蔗幼苗叶片 Leaf of sterilized cultural sugarcane seedling	KCl	1.97	109	34.0	66.0
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.47	81.2	56.0	44.0
	KCl+CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.81	100	62.3	37.7
	KCl	1.37	107	34.0	66.0
	MgCl ₂	1.13	88.3	62.0	38.0
	KCl+MgCl ₂	1.28	100	63.0	37.0
甘蔗根尖 Root tip of sugarcane	KCl	2.05	12.5	43.5	56.5
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.20	73.2	71.4	28.6
	KCl+CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.64	100	83.2	16.8
	KCl	1.94	160.3	49.3	50.7
	MgCl ₂	0.74	61.2	60.7	39.3
	KCl+MgCl ₂	1.21	100	77.5	22.5

续表1

植物材料 Plant materials	盐液类型** Type of salt	原生质体产量 Protoplasts yields		完整原生质体 %	破损原生质体 %
		$\times 10^8 g^{-1} fw$	%	Intact Protoplasts %	Damaged Protoplasts %
萱草叶片 Leaf of <i>Hemerocallis fulva</i>	KCl	0.90	257	25.9	74.1
	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.09	25.7	56.1	43.9
	$KCl + CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.35	100	63.8	36.2
	KCl	2.91	133.5	52.3	47.7
	$MgCl_2$	0.76	34.9	47.7	52.3
	$KCl + MgCl_2$	2.18	100	67.6	32.4
小麦幼苗叶片 Leaf of wheat seedling	KCl	1.48	119.4	35.2	64.8
	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1.31	106	45.4	54.6
	$KCl + CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1.24	100	65.9	34.1
	KCl	1.48	82.2	35.2	64.8
	$MgCl_2$	0.21	11.7	13.0	87.0
	$KCl + MgCl_2$	1.80	100	59.3	40.7
马尾松幼苗子叶 Cotyledon of <i>Pinus massoniana</i> seedling	KCl	1.66	128.7	33.5	66.5
	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.30	23.3	53.6	46.4
	$KCl + CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1.29	100	60.6	39.4
	KCl	0.86	168.6	33.5	66.5
	$MgCl_2$	0.49	96.0	38.9	61.1
	$KCl + MgCl_2$	0.51	100	59.2	40.8
马尾松幼苗下胚轴 Hypocotyl of <i>Pinus massoniana</i> seedling	KCl	0.81	158.8	17.2	82.8
	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.48	94.0	62.9	37.1
	$KCl + CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.51	100	68.0	32.0
	KCl	0.81	324	17.2	82.8
	$MgCl_2$	0.51	204	16.3	83.7
	$KCl + MgCl_2$	0.25	100	66.7	33.3

• 三次实验的平均值

• The mean value of three experiments

• 各单盐浓度 ($mol \cdot l^{-1}$) 为: KCl 0.39; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.28; $MgCl_2$ 0.33

混合盐中各盐浓度为: KCl 0.19 + $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.14; KCl 0.19 + $MgCl_2$ 0.16

• Each concentration ($mol \cdot l^{-1}$) of single salt is KCl 0.39; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.28; $MgCl_2$ 0.33.

The concentration of complex salts are KCl 0.19 + $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.14; KCl 0.19 + $MgCl_2$ 0.16.

表2 单盐和混合盐对萱草叶肉原生质体完整率和存活率的影响
Table 2 Effect of single salt and complex salts on the percentage of integrity and vitality of isolated mesophyll protoplasts of *Hemerocallis fulva*

处 理 Treatment	试验编号 Experiment No.	完整原生质体 Intact protoplasts ($\times 10^4 \cdot \text{ml}^{-1}$)		破坏原生质体数 Amount of damaged Protoplasts ($\times 10^4 \cdot \text{ml}^{-1}$)	破坏原生质体(%) Damaged Protoplasts (%)	完整原生质体(%) Intact protoplasts (%)	存活原生质体(%) Vital Protoplasts (%)
		处理前 Before treatment	处理后 Behind treatment				
+0.39 mol · l ⁻¹ KCl	1	20.75	12.38	8.37	40.3	59.7	—
	2	15.38	5.97	9.41	61.2	38.8	—
	3	29.94	15.67	14.27	47.7	52.3	5.8
	4	11.13	0.89	10.24	92.0	8.0	1.8
	5	16.02	2.15	13.87	86.6	13.4	1.0
	\bar{x}	18.64	7.41	11.23	65.6	34.4	2.9
+0.28 mol · l ⁻¹ CaCl ₂ · 2H ₂ O	1	20.75	14.13	6.62	31.9	68.1	—
	2	15.38	11.71	3.67	23.9	76.1	—
	3	24.88	15.30	9.58	38.5	61.5	70.5
	4	11.25	2.03	8.22	73.1	26.9	57.9
	5	15.52	2.97	12.55	80.9	19.1	28.3
	\bar{x}	17.56	9.43	8.13	49.7	50.3	52.2
+0.19 mol · l ⁻¹ KCl +0.14 mol · l ⁻¹ CaCl ₂ · 2H ₂ O	1	34.75	28.75	6.00	17.3	82.7	—
	2	15.38	14.08	1.30	8.5	91.5	—
	3	24.53	15.98	8.55	34.9	65.1	66.1
	4	12.61	7.55	5.06	40.1	59.9	80.9
	5	16.46	8.83	7.63	46.4	53.6	73.5
	\bar{x}	20.75	15.04	5.71	29.4	70.6	73.5
+0.33 mol · l ⁻¹ MgCl ₂	1	22.27	13.17	9.10	40.9	59.1	32.5
	2	20.60	8.59	12.01	58.3	41.7	44.3
	3	24.32	12.46	11.86	48.8	51.2	35.6
	\bar{x}	22.40	11.41	10.99	49.3	50.7	37.5
+0.19 mol · l ⁻¹ KCl +0.16 mol · l ⁻¹ MgCl ₂	1	19.92	13.28	6.64	33.3	66.7	39.9
	2	31.89	16.57	15.32	48.0	52.0	67.6
	3	27.74	19.85	7.89	28.4	71.6	65.8
	\bar{x}	26.52	16.57	9.95	36.2	63.4	57.8

的抑制效应。而单价阳离子K⁺通常对原生质体分离有明显促进作用。

但从原生质体的完整率看, 以单盐处理者, 在各供试材料中, 所得完整原生质体百分率均降低, 破损率增高, 尤以K⁺离子的影响为严重。以混合盐处理者, 完整原生质体百分率

较高, 破损率低。和单盐处理者相比, 在混合盐存在下, 完整原生质体在甘蔗梢部幼叶和无菌培养的甘蔗幼苗叶中分别高35.0%和16.2%, 在甘蔗根尖中高24.0%, 在萱草幼叶中高20.2%, 在小麦幼叶中高30.4%, 在马尾松幼苗子叶和下胚轴中分别高20.0%和38.9%。

二、单盐和混合盐对游离原生质体完整率与存活率的影响

由表2可见, 经KCl, CaCl₂或MgCl₂等单盐处理者, 残存的完整原生质体分别平均为34.4%, 50.3%和50.7%, 存活原生质体分别为2.9%, 52.2%和37.5%。经KCl+CaCl₂或KCl+MgCl₂混合盐处理者, 完整原生质体分别平均为70.6%和63.4%, 存活原生质体分别为73.5%和57.8%。即在KCl+CaCl₂处理下, 完整原生质体和存活原生质体分别比K⁺处理者提高36.2%和70.6%, 分别比Ca²⁺处理者提高20.3%和21.3%。在KCl+MgCl₂处理下, 完整原生质体和存活原生质体分别比K⁺处理者提高29.0%和54.9%, 分别比Mg²⁺处理者提高12.7%和20.3%。

三、单盐和混合盐对小麦叶肉原生质体游离氨基酸渗漏量和介质电阻值的影响

为阐明单盐和混合盐对质膜透性的影响, 我们选用细胞游离氨基酸渗漏量和介质电阻值

表3 单盐和混合盐对小麦叶肉原生质体游离氨基酸渗漏量和介质电阻值的影响*

Table 3 Effect of single salt and complex salts on the percolating amount of free amino acid and the medium electric resistance value of wheat mesophyll protoplasts*

盐 液 类 型 Type of salt	介质游离氨基酸量 Amount of free amino acid in medium		介质电阻值 Electric resistance value of medium	
	μgNH ₃ -N·100mg ⁻¹ fw	%	10MΩ·g ⁻¹ fw	%
5 mM KCl+0.545M mannitol	50.4±16.3	409.8	16.56±5.1	67.5
5 mM CaCl ₂ ·2H ₂ O+0.54M mannitol	40.7±15.9	330.9	19.46±3.1	79.3
2.5mM KCl+2.5mM CaCl ₂ ·2H ₂ O+0.54M mannitol	12.3±4.6	100	24.55±10.0	100
5 mM KCl+0.545M mannitol	50.4±16.3	504	16.56±5.1	54.6
5 mM MgCl ₂ +0.54M mannitol	33.6±2.5	336	14.80±6.2	48.8
2.5mM KCl+2.5mM MgCl ₂ +0.54M mannitol	10.0±4.5	100	30.31±3.6	100
10mM KCl+0.535M mannitol	25.8±2.8	179.2	13.54±1.6	27.8
10mM CaCl ₂ ·2H ₂ O+0.53 mannitol	22.3±4.2	154.9	20.73±2.1	42.6
5 mM KCl+ 5 mM CaCl ₂ ·2H ₂ O+0.53M mannitol	14.4±1.7	100	48.64±7.3	100
10mM KCl+0.535M mannitol	25.8±2.8	314.6	13.54±1.6	50.1
10mM MgCl ₂ +0.53M mannitol	27.7±2.5	337.8	18.74±2.7	69.3
5 mM KCl+ 5 mM MgCl ₂ +0.53M mannitol	8.2±2.0	100	27.03±3.4	100
50mM KCl+0.46M mannitol	159.8±40.2	258.2	17.61±6.6	60.6
50mM CaCl ₂ ·2H ₂ O+0.454M mannitol	125.1±31.0	202.1	10.47±3.8	36.0
25mM KCl+25mM CaCl ₂ ·2H ₂ O+0.458M mannitol	61.9±14.6	100	29.08±5.9	100

续表3

盐液类型 Type of salt	介质游离氨基酸量 Amount of free amino acid in medium		介质电阻值 Electric resistance value of medium	
	$\mu\text{gNH}_2\text{-N} \cdot 100\text{mg}^{-1}\text{fw}$	%	$10\text{M}\Omega \cdot \text{g}^{-1}\text{fw}$	%
50mM KCl+0.46M mannitol	159.8±40.2	217.4	17.61±6.6	72.1
50mM MgCl ₂ +0.454M mannitol	124.7±17.7	169.7	9.99±2.0	40.9
25mM KCl+25mM MgCl ₂ +0.458M mannitol	73.5±11.7	100	24.44±8.9	100
10mM KCl+0.378M mannitol	95.1±11.7	184.7	8.25±2.0	42.0
10mM CaCl ₂ ·2H ₂ O+0.375M mannitol	81.7±8.0	158.6	9.17±2.2	46.6
50mM KCl+50mM CaCl ₂ ·2H ₂ O+0.364M mannitol	51.5±7.8	100	19.67±5.9	100
10mM KCl+0.378M mannitol	95.1±11.7	198.9	8.25±2.0	32.6
10mM MgCl ₂ +0.375M mannitol	90.3±4.9	188.9	10.41±4.6	41.2
50mM KCl+50mM MgCl ₂ +0.364M mannitol	47.8±13.9	100	25.28±7.0	100
0.39M KCl	90.7±13.4	185.5	2.56±2.7	46.5
0.28M CaCl ₂ ·2H ₂ O	64.9±6.1	132.7	3.44±2.8	62.4
0.19M KCl+0.14M CaCl ₂ ·2H ₂ O	48.9±10.1	100	5.51±2.0	100
0.39M KCl	24.1±5.1	169.7	4.55±0.5	61.9
0.33M MgCl ₂	22.7±5.0	159.9	5.08±0.6	69.1
0.19M KCl+0.16M MgCl ₂	14.2±3.0	100	7.35±0.8	100

• 均为四次实验的平均值。

• The mean value of four experiments.

为膜透性的指标。表3表明, 经不同浓度KCl、CaCl₂或MgCl₂等单盐处理的小麦叶肉原生质体游离氨基酸渗漏量均明显高于用KCl+CaCl₂或KCl+MgCl₂等混合盐处理的。其中用KCl、CaCl₂等单盐处理者, 其游离氨基酸渗漏量比用K⁺+Ca²⁺混合盐处理的分别高79.2~309.8%和32.7~230.9%; 用KCl、MgCl₂等单盐处理的, 游离氨基酸渗漏量比用K⁺+Mg²⁺混合盐处理的分别高69.7~404%和59.9~237.8%。

经不同浓度KCl、CaCl₂或MgCl₂等单盐处理的小麦叶肉原生质体的介质电阻值均明显低于用KCl+CaCl₂或KCl+MgCl₂等混合盐处理的介质电阻值。经KCl、CaCl₂等单盐处理者分别比用K⁺+Ca²⁺混合盐处理者低32.5~72.7%和20.7~64.0%; 经KCl、MgCl₂等单盐处理者分别比用K⁺+Mg²⁺混合盐处理者低27.9~67.4%和30.7~59.1%。

质膜渗漏电解质多, 电阻就小^[5]。因此, 上述两项测定结果非常吻合。均表明单盐明显破坏膜的正常透性, 导致外渗电解质和非电解质增多, 从而介质导电率增高即电阻值低。而由单价和二价金属离子(K⁺+Ca²⁺或K⁺+Mg²⁺)组成的混合盐对膜透性有明显保护作用。

不同浓度的单盐和混合盐对小麦叶肉原生质体游离氨基酸渗漏量和介质电阻值的影响并

无表现随盐浓度增高而渗漏量增加之现象。这可能与各批所取试验材料不同有关。

四、单盐和混合盐对小麦叶SOD和过氧化氢酶活性的影响

已知需氧生物在还原 O_2 至 H_2O 的过程中会产生带有单个电子的氧自由基 O_2^- (superoxide), 许多生物分子的自动氧化也能产生 O_2^- 。 O_2^- 还能诱生如 H_2O_2 及羟基自由基 $OH\cdot$ 等

表4 单盐和混合盐对小麦叶SOD活性的影响

Table 4 Effect of single salt and complex salts on the activity of superoxide dismutases in wheat leaf

处 理 Treatment	超氧化物歧化酶活性 SOD activity (Units · g ⁻¹ Fw)				%
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	\bar{x}	
0.39 mol · l ⁻¹ KCl	31.6	17.3	66.0	38.3	32.8
0.28 mol · l ⁻¹ CaCl ₂ · 2H ₂ O	54.2	70.5	65.3	63.3	54.3
0.19 mol · l ⁻¹ KCl+0.14 mol · l ⁻¹ CaCl ₂ · 2H ₂ O	114.0	90.8	145.0	116.6	100
0.39 mol · l ⁻¹ KCl	70.2	17.3	66.0	77.6	54.6
0.33 mol · l ⁻¹ MgCl ₂	4.9	47.3	115.0	55.7	39.2
0.19 mol · l ⁻¹ KCl+0.16 mol · l ⁻¹ MgCl ₂	128.3	170.6	127.7	142.2	100

*与K⁺+Ca²⁺混合盐处理的比为66.6%，与K⁺+Mg²⁺混合盐处理的比为54.6%。

*The 66.6% is ratio that treatment with K⁺+Ca²⁺ complex salts, and the 54.6% is ratio that treatment with K⁺+Mg²⁺ complex salts.

表5 单盐和混合盐对小麦叶过氧化氢酶活性的影响

Table 5 Effect of single salt and complex salts on the catalase activity in wheat leaf

处 理 Treatment	过氧化氢酶活性 Catalase activity ($\mu\text{MH}_2\text{O}_2 \cdot \text{g}^{-1}\text{Fw} \cdot \text{min}^{-1}$)				%
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	\bar{x}	
0.39 mol · l ⁻¹ KCl	1868.0	2245.5	998.0	1703.8	81.6
0.28 mol · l ⁻¹ CaCl ₂ · 2H ₂ O	1856.9	2230.4	991.3	1692.9	81.1
0.19 mol · l ⁻¹ KCl+0.14 mol · l ⁻¹ CaCl ₂ · 2H ₂ O	2789.5	2479.2	991.7	2086.8	100
0.39 mol · l ⁻¹ KCl	1556.7	2495.0	998.0	1683.2	78.0
0.33 mol · l ⁻¹ MgCl ₂	1859.7	988.1	988.2	1278.7	59.3
0.19 mol · l ⁻¹ KCl+0.16 mol · l ⁻¹ MgCl ₂	2480.8	2743.4	1246.5	2156.9	100

*与K⁺+Ca²⁺混合盐处理的比为122.0%，与K⁺+Mg²⁺混合盐处理的比为118.1%。

*The 122.0% is ratio that treatment with K⁺+Ca²⁺ complex salts, and the 118.1% is ratio that treatment with K⁺+Mg²⁺ complex salts.

[6, 12—14]。这些物质对细胞尤其是膜系统有毒害作用^[10]。SOD能清除氧自由基,其活性变化与细胞内氧自由基的活动密切相关。因此,通过测定SOD活性可了解细胞内自由基的动态。小麦幼苗叶片经KCl、CaCl₂或MgCl₂等单盐及KCl+CaCl₂或KCl+MgCl₂等混合盐处理后,其SOD活性有明显差别(表4)。即凡经单盐处理者,SOD活性均极显著地低于用混合盐处理的。用KCl处理者,其SOD活性比K⁺+Ca²⁺或K⁺+Mg²⁺混合盐处理者分别低67.2%和45.4%;CaCl₂处理者比K⁺+Ca²⁺处理者低45.7%;MgCl₂处理者比K⁺+Mg²⁺处理者低60.8%。上述结果表明单盐明显降低了细胞内SOD活性,而由单价和二价金属离子组成的混合液不仅没有降低SOD活性,反比经蒸馏水处理的高。这意味着混合盐对SOD活性似乎有激发效应。尽管所用盐溶液浓度(溶质势均在-14巴左右)会给细胞造成水分胁迫,有可能改变SOD活性,但在此看来,水分胁迫的影响并非主要因素。

经单盐处理的小麦幼叶过氧化氢酶活性同样明显地低于用混合盐处理的。经KCl处理者,其过氧化氢酶活性分别比经K⁺+Ca²⁺或K⁺+Mg²⁺混合盐处理者低18.4%和22%;CaCl₂处理者,比K⁺+Ca²⁺处理者低18.9%;MgCl₂处理者比K⁺+Mg²⁺处理者低40.7%。与SOD相反,凡经单盐或混合盐处理的,其过氧化氢酶活性均明显低于用蒸馏水处理的。这意味着过氧化氢酶活性似乎对水分胁迫和/或盐敏感。

讨 论

1. 我们所用含一价和二价金属离子的无机盐均为氯化物,即只存在一种相同的单价氯离子。本试验结果表明,单种K⁺、Ca²⁺或Mg²⁺的氯化物处理,不管对原生质体的酶解分离中的原生质体或对已游离的原生质体来说,破损原生质体均较多,存活原生质体明显减少,其中以K⁺处理者为至,而含一价和二价阳离子的氯化物混合盐尽管和单盐溶液一样均为高溶质势溶液,但在保护原生质体完整性与存活力等方面却起了重要作用。

对质膜透性亦有类似影响,与含一价和二价阳离子的氯化物混合盐相比,含单种金属离子的盐类对质膜透性有明显改变。从介质游离氨基酸和电阻值来看,单种K⁺、Ca²⁺或Mg²⁺等氯化物均明显地增加了细胞电解质和非电解质的渗漏量。此种渗漏量的增加表明质膜透性增加或受损^[12],其中亦以K⁺处理者为甚。而含一价和二价阳离子的氯化物混合盐处理者,渗漏量明显降低。这与上述混合盐在保护质膜的完整性方面起重要作用的结论是一致的。

显然,由于我们所用的盐类均为氯化物,所不同者仅为阳离子,因此,对原生质体完整性和存活力及膜透性的影响起主要作用的是阳离子而非阴离子Cl⁻。这与大多数生理学者的看法^[10]一致。

2. 迄今对单盐毒害和离子拮抗作用机理主要有两种看法。一种认为单价阳离子能增加膜透性,二价阳离子降低膜透性,此种单方向透性变化最终会导致细胞死亡,只有一价和二价阳离子以合适比例共存才能维持膜的正常透性^[20]。另一种看法认为二价阳离子对原生质结构具有浓缩作用,而一价阳离子则有稀释作用,这些作用之产生主要是由于它们改变了原生质内大分子(如蛋白质)间的平均距离,当两类阳离子以合适比例共存时才能维持原生质结构的正常状态^[11]。前者侧重于膜透性的改变,后者着重于细胞质内物相之变化。此外,再没有提出更进一步的想法和实验证据。按本实验观测结果,单价和二价阳离子不仅引起质

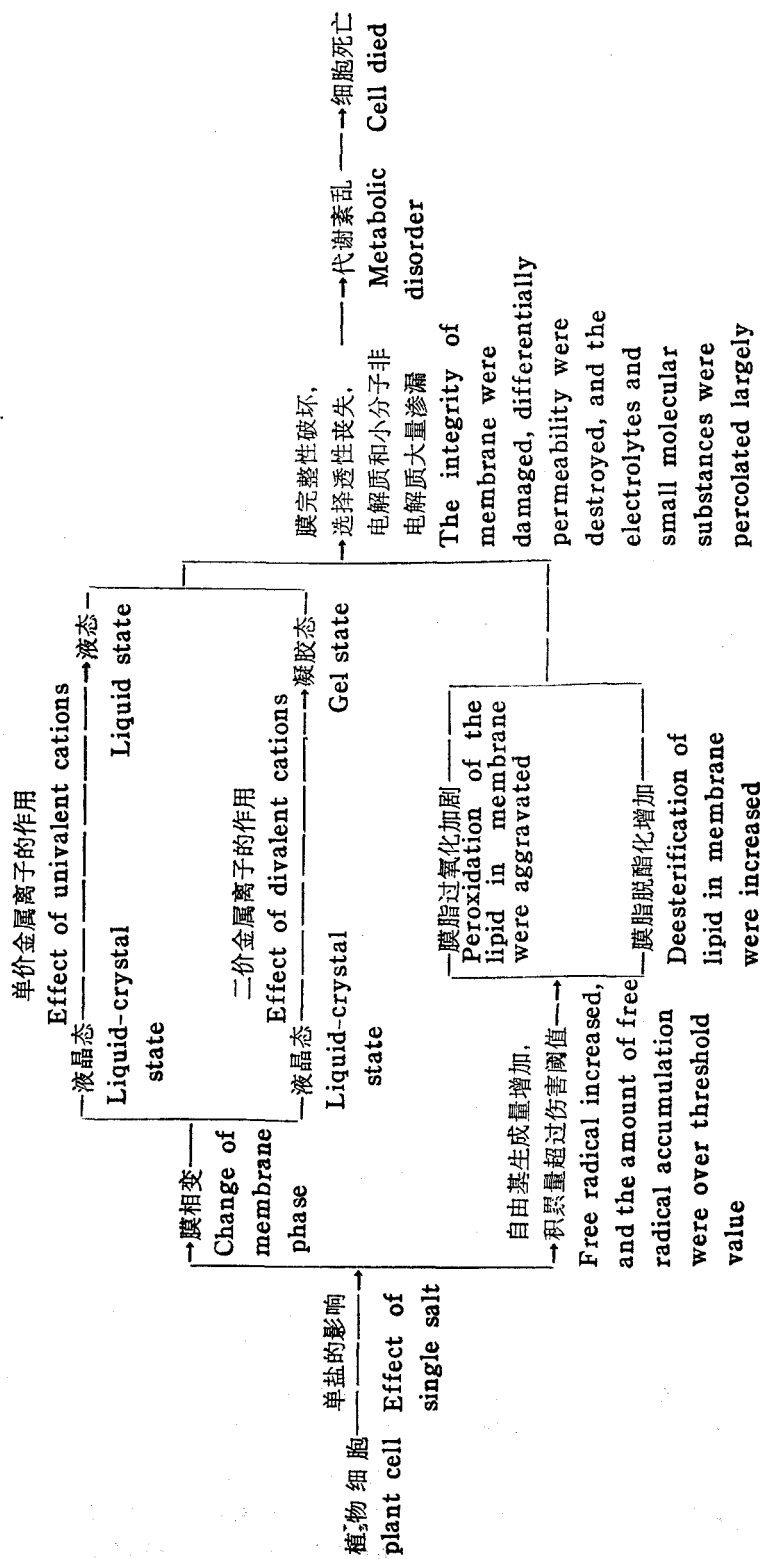


图1 单盐对植物细胞毒害的可能机理

Fig. 1 The probable harmful mechanism of single salt on the plant cell

膜发生不同程度的破裂,而且引起内部可见的液泡膜也发生破裂,其中以单价阳离子的破坏作用为甚。此种现象之产生,我们初步认为单价 K^+ 离子和二价 Ca^{2+} 或 Mg^{2+} 离子可能首先改变膜的物相变化,继而导致细胞正常结构破坏。在正常生理条件下,膜相表现为液晶态,单价阳离子(如 K^+)可能促使膜双脂层由液晶态转为液态而引起膜破裂。二价阳离子(如 Ca^{2+} 或 Mg^{2+})可能促使膜双脂层由液晶态转变为凝胶态。Boss和Mott(1980)曾借助5-硝酰硬脂酸为探针,测定胡萝卜原生质体的电子自旋共振所得曲线图谱证明10mM和更高浓度的 Ca^{2+} 明显降低膜脂的流动性^[9]。Onishi和Ito(1973,1974)据其人工膜试验所得结果,认为 Ca^{2+} 结合到负电荷的磷脂上,会使双脂层中的脂类集结成不连续的群丛^[21,22]。这些结果均表明二价阳离子使膜脂转变为凝胶态,此种膜相变结果会使膜收缩而发生“龟裂”^[18],从而导致膜破裂,但破裂程度可能不如单价离子的影响那么大。

此外,鉴于盐害会引起细胞内产生诸如 O_2^- 、 H_2O_2 、 $HO\cdot$ 和 1O_2 等对细胞有毒害的自由基^[6]。这些自由基累积量超过伤害阈值时会首先破坏膜的结构。它们会引起膜脂过氧化加剧和膜脂脱酯化增加,从而破坏膜结构的完整性,表现为选择透性增大,电解质和某些小分子有机物(如氨基酸)漏失^[6,10]。因此,我们不能排除在高浓度的单种盐类作用下,有可能诱发自由基产生或积累较多而导致膜破坏。SOD和过氧化氢酶均为生物保护性酶,它们能清除机体中有害氧自由基和 H_2O_2 以保护生物膜免遭伤害^[7,8,14]。通过测定SOD活性还可以洞察细胞内自由基的动态^[7]。本试验结果表明,单种金属离子明显降低SOD和过氧化氢酶活性,而单价和二价金属离子混合物处理则提高SOD活性,对过氧化氢酶活性并无多大影响。这些结果意味着在单盐作用下,细胞内超氧化物阴离子自由基可能高于用混合盐处理的。再因过氧化氢酶活性降低,其细胞内残留 H_2O_2 较多,有可能会通过 $O_2^- + H_2O_2 \rightarrow OH\cdot + OH^- + ^1O_2$ 反应产生毒性更强的氢氧自由基 $OH\cdot$ 和单线态氧 1O_2 ^[6,8]。这些产物的累积,有可能引起膜脂发生过氧化而遭受破坏。这些结果和上述透性的破坏以及膜破裂较多的现象一致。因此,综上所述,我们初步提出简图1来表示单盐对植物细胞毒害的可能机理。只有在单价和二价金属离子以合适比例共存时,才能使膜系维持正常的液晶态和维持较高活性的SOD和过氧化氢酶等生物保护性酶。这也许是所谓“离子拮抗作用”的原因。

参 考 文 献

- (1) 曹宗巽、吴相钰编,1979:植物生理学,上册。人民教育出版社,北京,170页。
- (2) 何若天,1986:单盐和混合盐对原生质体存活率的影响。中国植物生理学会第四次全国会议论文摘要汇编,249页。
- (3) 山东农学院、西北农学院编,1980:植物生理实验指导。山东科学技术出版社,济南,239~243页。
- (4) 李伯林等,1989:燕麦叶片衰老与活性氧代谢的关系。植物学报,15(1):6~12。
- (5) 王荣富,1987:植物抗寒指标的种类及其应用。植物生理学通讯,1987(3):49~55。
- (6) 王宝山,1988:生物自由基与植物膜伤害。植物生理学通讯,1988(2):12~16。
- (7) 武宝珩、格林·托德,1985:小麦幼苗中过氧化物歧化酶活性与幼苗脱水忍耐力相关性的研究。植物学报,27(2):152~160。
- (8) 王建华等,1989: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):1~7。

- (9) Boss, W.F.² and R.L. Mott, 1980 : Effects of divalent cations and polyethylene glycol on the membrane fluidity of protoplast. *Plant Physiol.* 66 : 835~837.
- (10) Curtis, O.F. and D.G. Clark, 1950 : An Interoduction to Plant Physiology. McGraw-Hill Book Co. Inc. New York, p.353.
- (11) Сабинин, Д. А., (刘富林译), 1957 : 植物营养生理学原理。科学出版社, 北京, 205页。
- (12) Fridovich, I., 1975 : Superoxide dismutase. *Ann. Rev. Biochem.* 44 : 147~159.
- (13) Fridovich, I., 1976 : Oxygen radicals, hydrogen peroxide, and oxygen toxicity. In : *Free Radical In Biology* (ed. by W.A. Pryor), Academic Press, New York, Chap. 6.
- (14) Fridovich, I., 1978 : The biology of oxygen radicals. The superoxide radical is an agent of oxygen toxicity; Superoxide dismutase provide an important defence. *Science*, 201 : 875~880.
- (15) Galun, E., 1980 : Pant protoplasts as physiological tools. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 32 : 237~266.
- (16) Giannopolits, C.N. and S.K. Ries, 1977 : Superoxide Dismutases I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiol.* 59 : 309~314.
- (17) Greenham, C.G. and H. Daday, 1957 : Electrical determination of cold hardiness in *Trifolium repens* L. and *Medicago sativa* L. *Nature* 180(4585) : 541~543.
- (18) Lyons, J.M., 1973 : Chilling injury in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol* 24 : 445~466.
- (19) Mead, J.F., 1976 : Free radical mechanisms of lipid damage and consequences for cellular membranes. In : *Free Radical In Biology* (ed. by W.A. Pryor), Academic Press, New York, Chap. 2.
- (20) Miller, E.C., 1938 : *Plant Physiology*. McGraw-Hill Book Co. Inc. New York, P. 268~271.
- (21) Ohnishi, S-I. and T. Ito, 1973 : Clustering of lecithin molecules in phosphatidylserine membranes induced by calcium ion binding to phosphatibylserine. *Biochem. Biophys. Res. Commum* 51 : 132~138.
- (22) Ohnishi, S-I. and T. Ito, 1974 : Calcium-induced phase separations in phosphatidylserine-phosphatidylcholine membrances. *Biochemistry* 13 : 881~887.

STUDIES ON MECHANISM OF HARMFUL EFFECT OF SINGLE SALT AND ION ANTAGONISM I. EFFECT OF SINGLE SALT AND COMPLEX SALTS ON SOME CHARACTERISTICS OF PROTOPLAST MEMBRANE, THE ACTIVITIES OF SUPEROXIDE DISMUTASE AND CATALASE IN WHEAT LEAF

He Ruotian and Qin Wei

(Agronomy Department, Guangxi College of Agriculture, Nanning)

Abstract The percentages of intact protoplasts from young leaf and root tip of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.), leaf of orange daylily (*Hemerocallis fulva* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.), cotyledon and hypocotyl of masson pine (*Pinus massoniana* Lamb.) were decreased obviously during enzymatic isolation when the single salt (KCl, CaCl₂ or MgCl₂) was used. On the contrary, the percentages of intact protoplasts were increased during enzymatic isolation when the complex salts of KCl+CaCl₂ or KCl+MgCl₂ were used.

In similar manner, single salt of K⁺, Ca²⁺ or Mg²⁺ had unfavourable effect on the integrity and vitality of isolated mesophyll protoplasts of orange daylily. On the contrary, their complex salts could increase the percentage of intact and vigorous protoplasts.

The percolating amount of free amino acids in the wheat mesophyll protoplasts were increased obviously, so that the medium resistance value was decreased when the single salt of K⁺, Ca²⁺ or Mg²⁺ was used. On the contrary, their complex salts could decrease the percolating amount of free amino acid and so that the medium value was increased.

The single salt of K⁺, Ca²⁺ or Mg²⁺ could decrease obviously the activities of superoxide dismutase (SOD) and catalase in wheat leaf. In contrast, the SOD activity was increased obviously and the higher activity of catalase can be maintained when their complex salts were used.

The above experimental results indicated that the harmful effect of single salt destroyed essentially the cell membrane system. The univalent cations, e.g. K⁺ or Na⁺, probably changed the phase of cell membrane from liquid-crystal state into liquid state. In contrast, the bivalent cations, e.g. Ca²⁺ or Mg²⁺ probably changed the phase of cell membrane from liquid-crystal state into gel state. Moreover, the free radical were increased probably because of SOD activity was decreased, and the amount of free radical accumulation could be over threshold value, and consequent the peroxidation and/or deesterification of lipid in membrane were increased.

As a result of above permeability, the integrity of membrane were damaged, differentially permeability were destroyed, and the electrolytes and small molecular substances were percolated largely, and therefore the metabolism was disordered and the plant cell was ultimately died. The normal liquid-crystal structure of cell membrane and the higher activities of SOD and catalase can be maintained when the univalent cations and bivalent cations are coexisted with appropriate proportion.

Key words single salt and complex salts; plant protoplast; integrity of membrane; permeability of membrane; superoxide dismutase; catalase; mechanism on harmful effect of single salt and ion antagonism

欢迎订阅《草业科学》

《草业科学》系国内外公开发行的自然科学学术双月刊，宗旨是沟通国内外草业科学信息，推进草业科学研究，培养草业科学人材，坚持草业科学为社会主义经济建设服务，内容以中国草业科学为主，兼纳世界草学精华，设有草业发展战略、草地农业系统、资源开发利用、草业生态经济、草地生理生态、草地病理生态、草地培养生态、草原管理、牧草学术活动、草业小辞典等30个栏目。编辑设计上遵循国际国内有关标准，论文均附有中、英文摘要、关键词和英文目录。采用电脑排版、胶版印刷，尽可能使内容与形式完美统一。邮发代号54—51，ISSN 1001—0629，CN62—1069，16开72页，定价1.50元。欢迎到当地邮局(所)订阅。

编辑部地址：730020兰州市61信箱，电话：498187。