

5 氨基乙酰丙酸促进水稻耐低温光抑制与抗氧化酶活性有关

刘芳 郭晶晶 龚丽丽 许晓明*

(南京农业大学 生命科学学院, 江苏 南京 210095; * 通讯联系人, E-mail: xuxm@njau.edu.cn)

Increasing Resistance of Rice to Low Temperature Photoinhibition by Spraying 5-Aminolevulinic Acid was Associated with Activities of Antioxidant Enzymes

LIU Fang, GUO Jingjing, GONG Lili, XU Xiaoming*

(College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; * Corresponding author, E-mail: xuxm@njau.edu.cn)

Abstract: The primary mechanism of significant increase in resistance of rice to low temperature photoinhibition was studied by foliar spray with 250 mg/L aqueous solution of 5-aminolevulinic acid (ALA). Low concentration ALA treatment enhanced the resistance of rice to low temperature photoinhibition, for the significant enhancement of the ascorbate peroxidase (APX) and glutathione reductase (GR) activities as well as the less decline superoxide dismutase (SOD) activity which alleviates the photoinhibition of photosystem by reducing the accumulation of the hydrogen peroxide (H₂O₂) rather than strengthening the thermal energy dissipation through xanthophyll cycle. Moreover, the increased activity of APX was probably resulted in the accumulation of heme.

Key words: 5-aminolevulinic acid; rice; low temperature photoinhibition; antioxidant enzyme

摘要: 研究了喷施 250 mg/L 5 氨基乙酰丙酸 (ALA) 明显提高水稻对低温光抑制适应能力的主要机制。低浓度的 ALA 提高水稻耐低温强光的主要机制不是通过叶黄素循环加强热耗散, 而是通过显著增加叶绿体抗氧化酶系统中抗坏血酸过氧化物酶 (APX)、谷胱甘肽还原酶 (GR) 的活性, 减少超氧化物歧化酶 (SOD) 活性的下降, 从而降低过氧化氢 (H₂O₂) 的含量, 减轻 PS 的光抑制。而且, APX 活性的增加可能是由于亚铁血红素库积累而引起的。

关键词: 5 氨基乙酰丙酸; 水稻; 低温光抑制; 抗氧化酶

中图分类号: Q945.78; S311; S511.01

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2008)04-0411-05

在水稻生育期, 早春苗常遭遇连绵阴雨后突然转晴的低温强光胁迫, 引起烂秧, 其主要原因是在低温强光下, 光能利用受到限制, 过剩的光能伤害水稻的光合器官^[1], 即引起低温光抑制的产生。植株吸收的光能超过光合作用需要时, 就会形成光胁迫, 导致超氧阴离子和 H₂O₂ 等活性氧的产生^[2], 而 H₂O₂ 能够生成活性更强、毒害更大的 ·OH。活性氧对细胞具有潜在的毒害作用, 因此, 它必须得到有效的控制, 使其产生与清除之间达到动态平衡^[3]。在长期的进化过程中, 水稻形成了两种主要的保护机制: 一方面, 可以通过叶黄素循环来耗散过剩能量^[4], 如长期 ABA 处理可以通过加强叶黄素循环增强对光抑制的防御能力^[5]; 另一方面, 也可以通过提高活性氧清除能力增强植物适应低温强光的能力^[4]。Prasad 等^[3] 证明通过增加抗氧化酶活性能提高植株对低温光抑制的防御能力。

5 氨基乙酰丙酸 (5-aminolevulinic acid, ALA) 是所有生物卟啉类化合物如叶绿素、亚铁血红素等

的一个关键前体^[6]。在植物中, 高浓度的 ALA 能用作除草剂^[7], 而低浓度的 ALA 则能调节植物生长发育, 促进作物增产^[8], 提高植株的耐盐性及冷适应能力^[6, 9, 11]。因此, 目前 ALA 在设施农业生产实践中的应用已成为一个研究热点。然而, 对于低浓度的 ALA 是否能增强植株对低温强光的耐受性, 尚未见报道。本研究旨在通过研究 ALA 对水稻幼苗在低温强光下保护机制的影响, 为进一步在水稻等农作物中合理应用 ALA 防御低温强光的伤害提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料培养与处理

供试水稻 (*Oryza sativa* L.) 品种为籼稻 93

收稿日期: 2007-12-17; 修改稿收到日期: 2008-05-12。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30300217)。

第一作者简介: 刘芳 (1982-), 女, 硕士研究生。

11 材料培养与处理参考曹云英等的方法^[12],略有改动。水稻种子经 0.1% 氯化高汞溶液浸泡 15 min,再用自来水洗净,播于垫有湿润滤纸的培养皿内,培养温度(25±2),光照强度 500 μmol/(m²·s),每天光照 12 h。1 叶 1 心期后,挑选整齐一致的小苗移至营养均一的钵中,每钵 6 苗,置于网室自然光照条件下。在 4 叶 1 心时,用 50、150、250 mg/L 的 ALA 于每天 20:00 均匀喷施(添加 0.01% 吐温),每钵喷施 2 mL,以喷清水为对照(添加 0.01% 吐温),每处理重复 3 次,取第 5 全展叶用于实验。

1.2 实验方法

1.2.1 低温光抑制处理

参考 Xu 等^[1]的方法,略有改动。切取 4 cm 长的叶片中段置于连接超级循环水浴的水槽中,控制水温在 6,叶片上表面朝上,光源为汞灯,通过控制叶片与汞灯的距离,使叶片暴露在 1200 μmol/(m²·s)光强下,分别处理 30、60、90、120 min。

1.2.2 二硫苏糖醇(DTT)处理

参考 Xu 等^[1]的方法,取第 5 叶连叶鞘在水中切割,然后插于 3 mol/L 二硫苏糖醇(DTT)溶液中,以蒸馏水处理为对照。在 15 μmol/(m²·s)光强、25 条件下处理 3 h,DTT 和蒸馏水通过蒸腾作用引入叶片。

1.2.3 光合放氧速率的测定

用氧电极法(Chlorolab 2, Hansatech, 英国)测定光合放氧速率。取 1 cm² 叶片,切成 1 mm² 大小的颗粒,然后用真空渗入法把反应介质(NaHCO₃ 20 mmol/L, Tris 60 mmol/L)渗入到叶片内,测定光强为 1000 μmol/(m²·s),温度为 25。

1.2.4 叶绿素荧光参数的测定

叶片预先暗适应 30 min,用脉冲调制式荧光仪(PAM-2100, Walz, 德国)测定叶绿素荧光参数。测定用的调制光、作用光和饱和脉冲光分别为 0.07、210 和 6 000 μmol/(m²·s)。F_v/F_m = (F_m - F₀)/F_m^[13]。

1.2.5 抗氧化酶活性和 H₂O₂ 含量的测定

超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽还原酶(GR)、抗坏血酸过氧化物酶(APX)活性以及 H₂O₂ 的含量测定参考 Jiang 等^[14]的方法。

1.2.6 亚铁血红素的测定

参考 Stillman 等^[15]的方法,用丙酮和液氮(体积比为 9:1)研磨叶片,离心去上清,沉淀用 80% 的丙酮洗 3 次,最后沉淀用含 2% HCl 的丙酮抽提 3 次,然后把抽提的混合物用非过氧化乙醚洗 3 次,浓

缩后测定,每 1 nmol 的消光值是 20.7。

以上处理均重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 低温强光下喷施不同浓度的 ALA 对水稻叶片光合速率的影响

在 6、1200 μmol/(m²·s)光照下,随着低温强光处理时间的延长,植株叶片光合速率明显下降,经过 2 h,对照叶片光合速率下降了 83%,而喷施 50、150 和 250 mg/L ALA 的叶片光合速率则分别下降了 77%、59% 和 42%(图 1)。可见,ALA 能明显缓解低温强光对光合速率的影响,并且随着浓度的增加,其缓解作用加强。

2.2 低温强光下喷施 ALA 对水稻叶片叶绿素荧光参数的影响

最大光化学效率 F_v/F_m 反映了当所有的 PS 反应中心均处于开放状态时的量子效率,通常作为衡量 PS 光抑制程度的一个指标^[16]。在 6、1200 μmol/(m²·s)光照条件下,随着处理时间的延长,F_v/F_m 呈下降趋势,表明水稻发生严重的光抑制。2 h 后,对照叶片 F_v/F_m 下降了 41.06%,而喷施 250 mg/L ALA 的叶片 F_v/F_m 仅下降了 17.02%,两者差异极显著(P<0.01)(图 2)表明喷施 ALA 对水稻光合器官有明显的保护作用。

DTT 是叶黄素循环的专一性抑制剂。为了进一步了解叶黄素循环在水稻低温光抑制保护机制中的作用及喷施 250 mg/L ALA 后对水稻叶黄素循环保护机制的影响,本研究还比较了 DTT 处理条

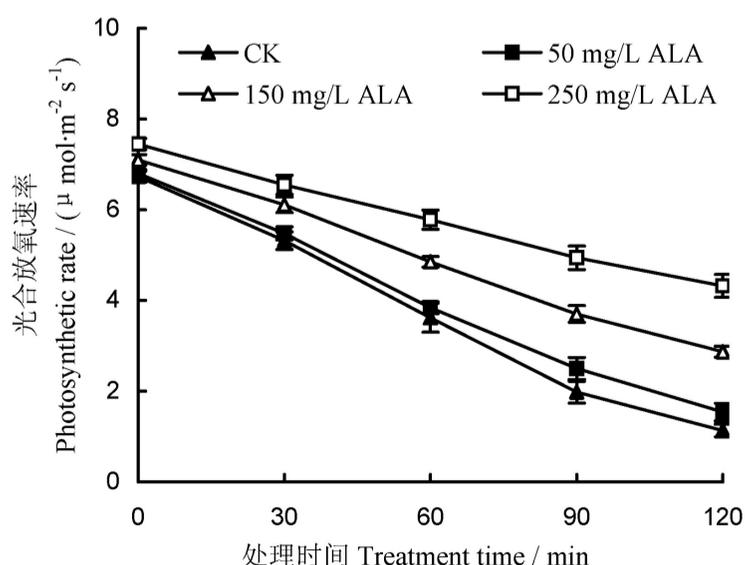


图 1 喷施不同浓度 ALA (50, 150 and 250 mg/L) 对低温强光下水稻叶片光合速率的影响

Fig. 1 Effects of aqueous solution of ALA at concentrations of 50, 150 and 250 mg/L on photosynthetic rate in leaves of rice under low temperature and high light intensity.

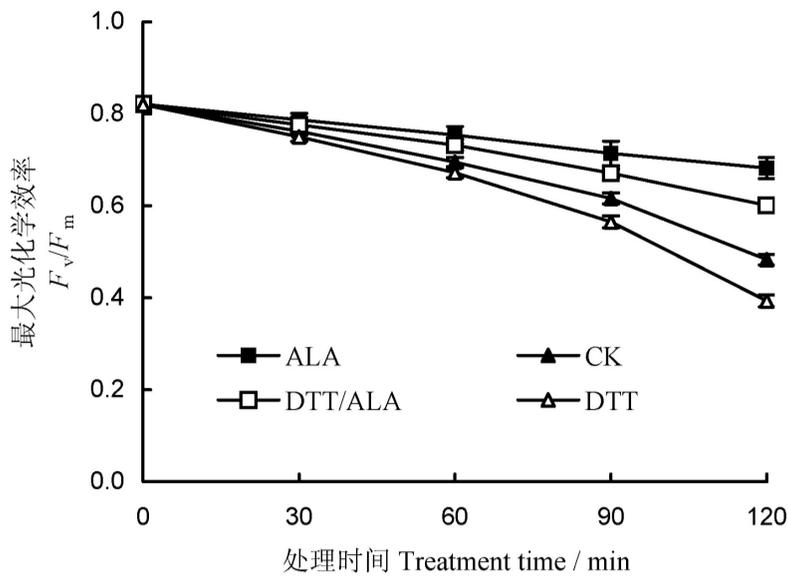
图 2 低温强光下喷施 ALA 对水稻叶片 F_v/F_m 的影响

Fig. 2 Effects of foliar application of ALA at 250 mg/L on F_v/F_m in leaves of rice under low temperature and high light intensity .

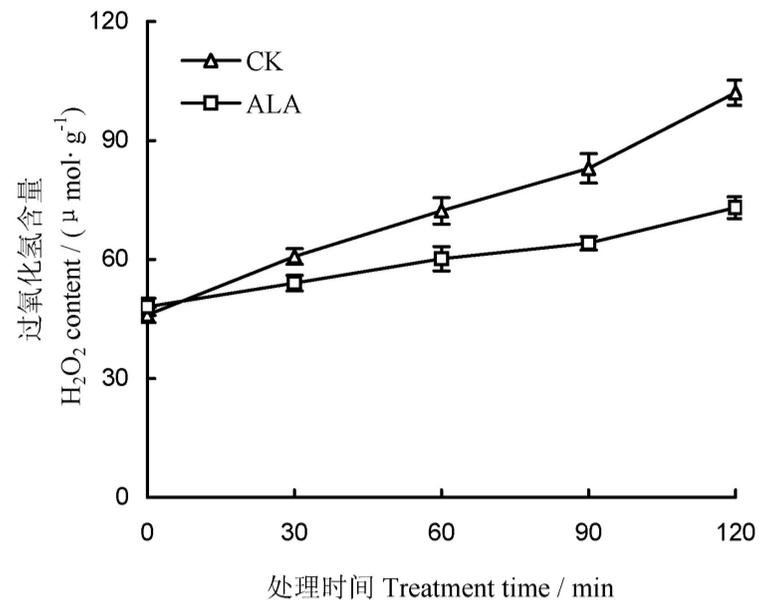
图 3 低温强光下喷施 ALA 对水稻叶片 H_2O_2 含量的影响

Fig. 3 Effects of foliar application of ALA at 250 mg/L on content of H_2O_2 in leaves of rice under low temperature and high light intensity .

件下的对照和喷施 ALA 的叶片对低温强光的耐受能力。结果显示,随着处理时间的延长,DTT 处理使两者叶片的 F_v/F_m 均大幅度下降。在低温强光下处理 2 h 后,DTT 处理的水稻叶片 F_v/F_m 较对照下降了 18%,而 DTT/ALA 处理的叶片 F_v/F_m 较 ALA 处理下降了 12%(图 2),两者差异不显著 ($P > 0.1$)。由此可见,尽管依赖于叶黄素循环的热耗散在水稻的低温光抑制防御机制中起重要作用,但并不是 ALA 提高水稻耐低温光抑制的主要原因。

2.3 低温强光下喷施 ALA 对水稻叶片 H_2O_2 含量的影响

PS 的光抑制往往与光合器官产生的 H_2O_2 密切相关^[17]。进一步分析了在低温强光下叶片中

H_2O_2 的含量,结果表明,叶片暴露在 6、1200 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 光照下,随着处理时间延长,喷施 250 mg/L ALA 和对照的叶片中 H_2O_2 含量都显著升高,但两者升高幅度明显不同。处理 2 h 后,对照叶片中 H_2O_2 的含量增加了 156%,而喷施 ALA 叶片中 H_2O_2 的含量增加了 50%,两者差异达极显著水平 ($P < 0.01$)。可见,ALA 明显降低了叶片中 H_2O_2 的含量(图 3)。

2.4 低温强光下喷施 ALA 对水稻叶片中抗氧化酶活性的影响

在长期的进化过程中,植物已经形成了一个复杂的清除活性氧的防护系统。如图 4 所示,经低温强光处理后,随着处理时间的延长,喷施 250 mg/L ALA 叶片中的抗氧化酶活性显著高于对照叶片。

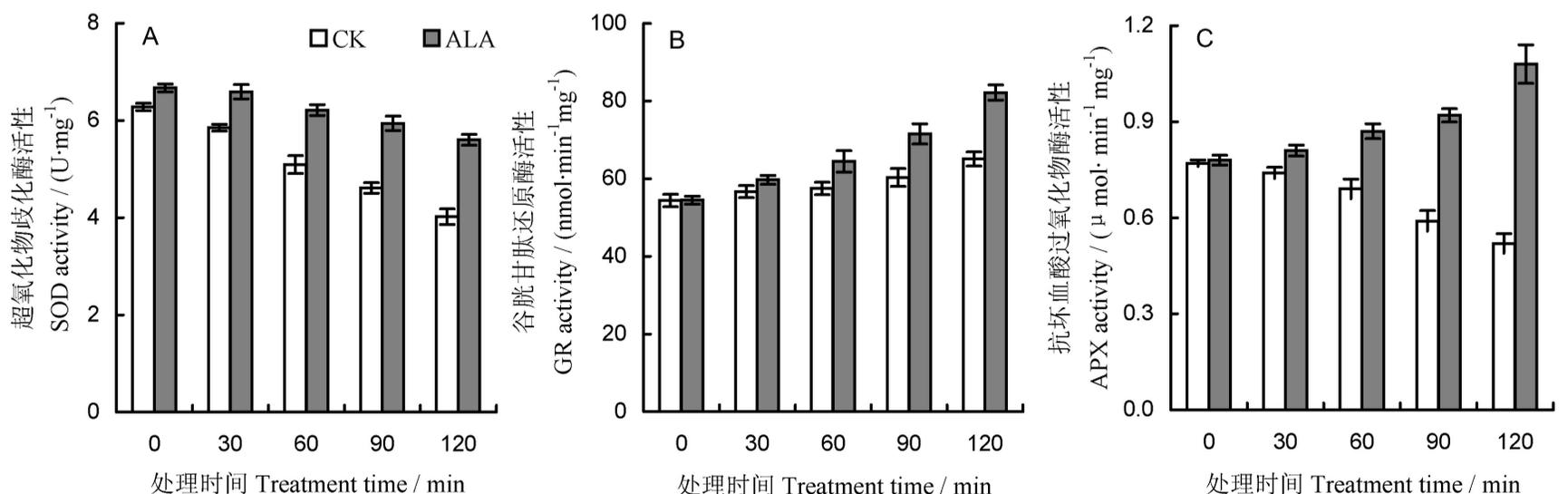


图 4 低温强光下喷施 ALA 对水稻叶片中超氧化物歧化酶(A)、谷胱甘肽还原酶(B)和抗坏血酸过氧化物酶(C)活性的影响

Fig. 4 Effects of foliar application of ALA at 250 mg/L on the activities of SOD(A), GR(B) and APX(C) in leaves of rice under low temperature and high light intensity .

2 h 后,对照中 SOD 活性下降了 33%,但喷施 ALA 的叶片仅下降了 16% (图 4 A);对照 GR 活性增加了 20%,喷施 ALA 的叶片中 GR 活性增加了 31% (图 4 B);尤其是对照样品中的 APX 活性下降了 33%,喷施 ALA 的叶片中 APX 活性却增加了 138% (图 4 C)。上述差异均达到极显著水平 ($P < 0.01$)。结果表明,ALA 显著促进了水稻叶片的抗氧化酶活性。

3 讨论

低浓度的 ALA 能明显缓解低温强光对水稻光合作用的影响,这也在其他水稻品种中得到验证 (数据未列出),但浓度不同缓解效果也不一致。在本实验条件下,250 mg/L ALA 对低温强光条件下水稻光合作用的缓解效应最大。研究表明不同的外源物质对低温光抑制保护机制是不一样的^[1,5]。Xu 等^[1]认为喷施抗坏血酸增加水稻对低温光抑制的适应能力是由于叶黄素循环的增强。然而,本研究结果表明,喷施 ALA 缓解水稻光抑制的机制与喷施抗坏血酸明显不同,它并非通过增强叶黄素循环耗散过剩光能而保护光合机构。

植物受光抑制的程度往往与光合器官产生的 H_2O_2 密切相关^[18],在叶绿体中,活性氧的清除酶主要有 SOD、GR 以及 APX。其中 SOD 是主要清除 O_2^{\cdot} 的酶之一,它使 O_2^{\cdot} 转化为 H_2O_2 ,而 APX 具有很强的还原 H_2O_2 能力,GR 也是叶绿体中清除活性氧自由基的关键酶,它通过 ASA-GSH-NADPH 循环来清除细胞内的 H_2O_2 和 O_2^{\cdot} ,从而避免活性氧的潜在伤害^[19]。因此,SOD、GR 以及 APX 能够减轻光抑制对光合机构的伤害^[6]。本实验测得 ALA 处理的水稻叶片相对于对照在胁迫条件下 GR 活性明显增加;同时也观察到 ALA 处理的水稻叶片维持较高的 SOD 活性,但其具体机制尚不清楚。本研究认为光抑制条件下喷施 ALA,水稻叶片 H_2O_2 含量减少主要是由于 GR 和 APX 活性大幅上升所致,特别是 APX 活性在对照中下降了 33%,而喷施 ALA 的叶片其活性却增加了 138%。这表明 ALA 主要通过诱导叶片中 APX 活性的增加提高光抑制条件下活性氧的清除能力。

Nishihara 等^[6]认为离体叶绿体由于外部供应 ALA,新合成的亚铁血红素增加,而且用 ^{14}C 标记的 ALA 处理豌豆后,这些 ^{14}C 出现在过氧化物酶分子的辅基和其他一些卟啉分子,如细胞色素和过氧化物酶中。因此,我们进一步测定了叶片中亚铁血红

素的含量,对照水稻叶片中亚铁血红素含量为 $(0.69 \pm 0.065) \mu\text{g/g}$,而喷施 ALA 的叶片中含量为 $(0.99 \pm 0.105) \mu\text{g/g}$,亚铁血红素含量显著增加。因此,我们认为在胁迫条件下,APX 的增加可能是由于体内亚铁血红素库积累引起的。

总之,本研究认为喷施 ALA 的水稻叶片能明显缓解 PS 的低温光抑制。其主要的保护途径不是通过增强依赖于叶黄素循环的热耗散,而是通过显著增加叶绿体抗氧化酶系统中 GR 和 APX 的活性,稳定 SOD 活性,清除积累的 H_2O_2 ,从而缓解 PS 的光抑制。而 APX 的活性增加主要是由亚铁血红素库积累造成的。

参考文献:

- [1] Xu C C, Lin R C, Kuang T Y, et al. Increasing resistance to low temperature photoinhibition following ascorbate feeding is attributable to an enhanced xanthophylls cycle activity in rice (*Oryza sativa* L.) leaves. *Photosynthetica*, 2000, 38: 221-226.
- [2] Xu C C, Li L B, Kuang T Y. The inhibited xanthophylls cycle is responsible for the increase insensitivity to low temperature photoinhibition in rice leaves fed with glutathione. *Photosynth Res*, 2000, 65(2): 107-114.
- [3] Prasad K V S, Saradhi P P. Enhanced tolerance to photoinhibition in transgenic plants through targeting of glycinebetaine biosynthesis into the chloroplasts. *Plant Sci*, 2004, 166: 1197-1212.
- [4] 段伟,李新国,赵世杰,等.低温下的植物光抑制机理.西北植物学报,2003,23(6):1017-1023.
- [5] Jia H S, Lu C M. Effect of abscisic acid on photoinhibition in maize plants. *Plant Sci*, 2003, 165: 1403-1410.
- [6] Nishihara E, Kondo K, Parvez M M. Role of 5 aminolevulinic acid (ALA) on active oxygen scavenging system in NaCl treated spinach (*Spinacia oleracea*). *J Plant Physiol*, 2003, 160: 1085-1091.
- [7] 汪良驹,姜卫兵,章镇.5-氨基乙酰丙酸的生物合成和生理活性及其在农业中的潜在应用.植物生理学通讯,2002,39(2):185-192.
- [8] Hotta Y, Tanaka T, Takaoka H. New physiological effects of 5 aminolevulinic acid in plants: The increase of photosynthesis, chlorophyll content, and plant growth. *BioSci Biotechnol Biochem*, 1997, 61: 2025-2028.
- [9] Watanabe K, Tanaka I, Hotta Y, et al. Improving salt tolerance of cotton seedlings with 5-aminolevulinic acid. *Plant Growth Regul*, 2000, 32: 99-103.
- [10] Wang L J, Jiang W B, Liu H, et al. Promotion by 5 aminolevulinic acid of germination of pakchoi (*Brassica campestris* ssp. *chinensis* var. *communis* Tsen et Lee) seeds under salt stress. *J Integr Plant Biol*, 2005, 47(9): 1084-1091.

- [11] Hotta Y , Tanaka T , Bingshan L , et al . Improvement of cold resistance in rice seedlings by 5 aminolevulinic acid . *J Pest Sci* , 1998 , 23(1) : 29-33 .
- [12] 曹云英 , 赵 华 . 高温胁迫下油菜素内酯对水稻幼苗的保护作用 . *中国水稻科学* , 2007 , 21(5) : 525-529 .
- [13] Schreiber U , Schliwa U , Bilger W . Continuous recording of photochemical and nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer . *Photosynth Res* , 1986 , 10 : 51-62 .
- [14] Jiang M Y , Zhang J H . Effect of abscisic acid on active oxygen species , antioxidative defence system and oxidative damage in leaves of maize seedlings . *Plant Cell Physiol* , 2001 , 42(11) : 1265-1273 .
- [15] Stillman L C , Gassman M L . Protoheme extraction from plant tissue . *Anal Biochem* , 1978 , 91 : 166-172 .
- [16] Schansker G , Rensen J S . Performance of active photosystem centers in photoinhibited pea leaves . *Photosynth Res* , 1999 , 62 : 175-184 .
- [17] Jia H S , Han Y Q , Li D Q . Photoinhibition and active oxygen species production in detached apple leaves during dehydration . *Photosynthetica* , 2003 , 41(1) : 151-156 .
- [18] Nishiyama Y , Allakhverdiev S I , Murata N . A new paradigm for the action of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem . *Biochim Biophys Acta* , 2006 , 1757 : 742-749 .
- [19] Hu X , Jiang M , Lu J , et al . Abscisic acid induced apoplastic H₂O₂ accumulation up regulates the activities of chloroplastic and cytosolic antioxidant enzymes in maize leaves . *Planta* , 2005 , 223 : 57-68 .