

三唑酮对离体水稻叶片衰老的延缓作用

卢少云, 郭振飞, 李宝盛, 李明启

(华南农业大学生物技术学院, 广东 广州 510642)

摘要: 用质量浓度为 20 mg/L 的三唑酮溶液处理提高叶片的蛋白质含量和叶绿素含量, 表明三唑酮能延缓水稻叶片的衰老。叶片衰老过程中, 超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)活性和抗坏血酸(AsA)、还原型谷胱甘肽(GSH)含量降低, 三唑酮处理抑制了它们的降低。过氧化物酶(POD)活性和丙二醛(MDA)含量提高, 三唑酮处理抑制它们的提高。结果表明, 三唑酮提高叶片膜脂过氧化作用的保护能力是其延缓衰老的原因。

关键词: 三唑酮; 水稻叶片; 衰老

中图分类号: Q 945

文献标识码: A

自由基学说在植物衰老机理研究中受到广泛重视, 植物衰老过程中自由基积累, 自由基清除剂能力降低^[1]。过去的研究表明, 植物生长调节剂调节植物衰老, 是由于它们对自由基的清除作用^[2,3]。表油菜素类酯(epiBR)和脱落酸(ABA)促进植物叶片衰老, 则是它们降低了叶片的自由基的清除系统活性^[4,5]。

三唑酮是一种三唑类杀菌剂, 其化学结构与 PP333 极相似, 也具有生长调节作用^[6], 能延缓植物生长, 提高植物的抗旱性、抗冷性^[7-9], 它还能延缓大麦和小麦的衰老, 具有类似 CTK 活性^[10]。但三唑酮延缓植物衰老的生理原因尚不清楚。本文报道它对水稻叶片衰老的延缓作用, 为三唑酮应用于水稻生产提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料及处理

水稻(*Oryza sativa* L.)为青珍 8 号, 种子经 HgCl₂ 消毒后, 用自来水浸种、萌发, 于培养皿以 H₂O 培养 15 d 后, 移栽于盛土的塑料盆(*d* 为 25 cm), 每盆株, 生长 2 月后供实验用。

以顶端第 2 片叶为材料, 在距离叶片尖端 15 cm 处剪下叶片切段, 移至含不同质量浓度的三唑酮(200 g/L 乳油, 江苏省建湖县农药厂生产)或 H₂O 的小瓶中, 于人工气候箱内培养 θ 为(28±2)℃, 光强 3 000 kx, 每天照光 16 h。试验均设 4 次重复。

1.2 SOD 活性测定

称取 0.2~0.3 g 叶片, 加入 50 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 7.8), 4℃下 15 000 g 离心 15 min, 上清液定容

至 5 mL, 为粗酶液。按 Giannopolitis 和 Ries 方法^[11]测定 SOD 活性。在 3 mL 反应液中含甲硫氨酸 13 mmol/L, NBT 63 μ mol/L, 核黄素 13 μ mol/L 和 50 mmol/L 的磷酸缓冲液(pH 7.8)。加入 50 μ L 酶液后照光约 10 min, 立即在 560 nm 波长下测定光密度。酶活性采用抑制 NBT 光化学还原 50%为一个酶活性单位表示。

1.3 CAT 活性测定

用上述测 SOD 的粗酶液, 参照 Kraus 和 Fletcher^[12]方法测定。总体积 3 mL 的反应介质中含 H₂O₂ 33 mmol/L, 50 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 7.0), 加入 100 μ L 经适量稀释的酶液启动反应, 记录 2 min 内 240 nm 波长下的光密度下降。酶活性单位用 μ mol·min⁻¹·g⁻¹鲜质量表示。

1.4 POD 活力测定

参照 Kraus 和 Fletcher^[12]方法测定。总体积为 3 mL 的反应介质中含 H₂O₂ 8.5 mmol/L, 愈创木酚 16 mmol/L, 50 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 6.0), 加入 50 μ L 经适量稀释的酶液启动反应, 记录 3 min 内 470 nm 波长下的光密度下降。酶活性单位用 μ mol·min⁻¹·g⁻¹鲜质量表示。

1.5 AsA 和 GSH 含量测定

参照 Tanaka 等^[13]方法提取 AsA 和 GSH。称取 0.2~0.3 g 叶片, 加入 50 g/L 三氯乙酸(TCA)研磨, 15 000 g 离心 15 min, 上清液定容至 3 mL。取一定体积上清液, 按 Tanaka 等^[13]方法测定 AsA 含量, 按 Ellman^[14]测定 GSH 含量。

1.6 蛋白质含量测定

用上述测定 SOD 的粗酶液,按 Bradford^[13] 的方法测定,以 BSA 作为标准蛋白。

1.7 MDA 含量测定

称取 0.5 g 水稻叶片加入 50 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.8),研磨,4℃下 15 000 g 离心 15 min,上清液定容至 5 mL。取 1.5 mL,加入 2.5 mL 5 g/L 的硫代巴比妥酸 (TBA),溶于 200 g/L TCA,在沸水浴中保温 30 min 后,立即冷却,离心后按赵世杰等^[16] 方法测定 MDA 含量。

1.8 叶绿素含量测定

按 Amon^[17] 方法进行。

2 结果分析

2.1 三唑酮对水稻离体叶片衰老的延缓作用

叶片衰老过程中蛋白质和叶绿素含量降低。以质量浓度为 20 mg/L 三唑酮溶液处理离体叶片,伴随叶片的衰老,处理和对照的蛋白质含量和叶绿素含量均降低,但处理的蛋白质含量和叶绿素含量明显高于对照 (图 1),说明三唑酮处理延缓了离体叶片的衰老。

2.2 三唑酮对水稻叶片 SOD 和 CAT 活性的影响

图 2 表明,随叶片的衰老,SOD 和 CAT 活性持续降低,3 d 时它们分别降低了 52.4% 和 44.8%,三唑酮处理减轻了它们的降低程度,处理叶片分别只降低 35.5% 和 26.8% (图 2)。

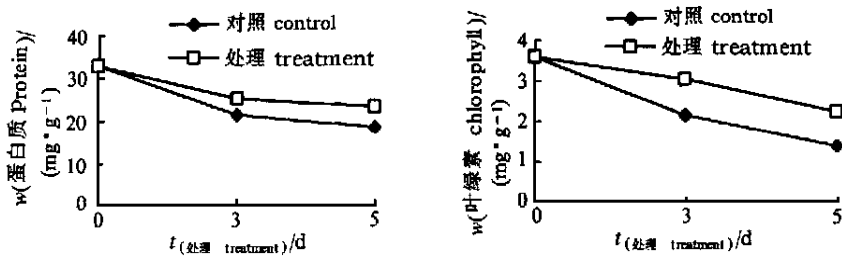


图 1 三唑酮对离体水稻叶片蛋白质和叶绿素含量的影响

Fig. 1 Effects of triadimefon on protein and chlorophyll contents in detached rice leaves

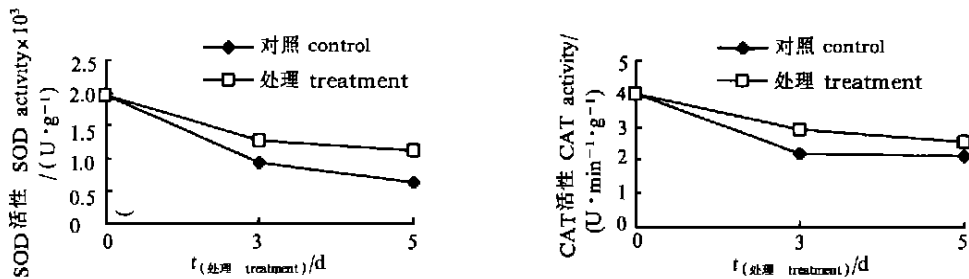


图 2 三唑酮对离体水稻叶片 SOD 和 CAT 活性的影响

Fig. 2 Effects of triadimefon on SOD and CAT activity in detached rice leaves

2.3 三唑酮对水稻叶片 AsA 和 GSH 含量的影响

在离体叶片衰老过程中 AsA 含量不断降低,三唑酮处理延缓了它们的降低,例如 3 d 和 5 d 时,对照叶片 AsA 含量降低了 25.3% 和 44.1%,三唑酮处

理在 3 d 时不降低,5 d 时仅降低 31.1% (图 3)。GSH 含量的降低较缓慢,在 3 d 时尚未降低,5 d 时才明显降低,但三唑酮处理的叶片的 GSH 含量稍高于对照 (图 3)。

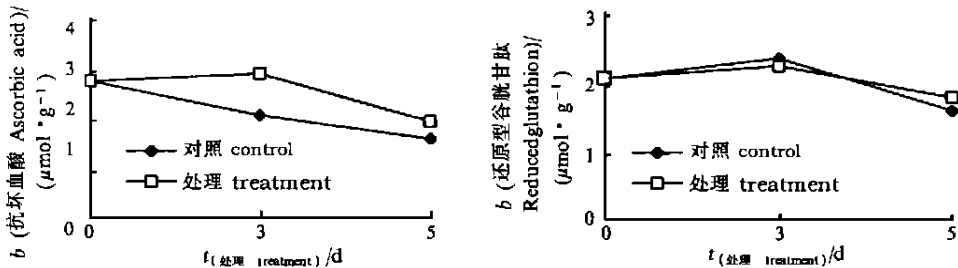


图 3 三唑酮对离体叶片 AsA 和 GSH 含量的影响

Fig. 3 Effects of triadimefon on AsA and GSH contents in detached rice leaves

2.4 三唑酮对水稻叶片 POD 活性和 MDA 含量的影响

随着叶片的衰老, POD 活性提高^[4, 5]. 本文也观察到这种变化, 对照叶片 POD 活性随时间延长不断升高, 5 d 时提高了 81.6%, 三唑酮处理叶片 POD 活

性升高受到抑制, 5 d 时仅提高了 44.1%(图 4). 随水稻叶片衰老, 对照的 MDA 含量也不断提高, 3 d 和 5 d 时分别是 0 d 的 2.3 倍和 4.3 倍, 处理叶片 3 d 时 MDA 仍未提高, 5 d 时是 0 d 的 3.4 倍(图 4).

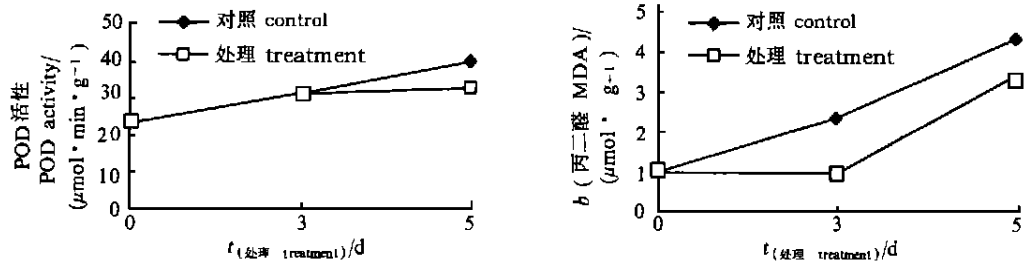


图 4 三唑酮对离体水稻叶片 POD 活性和 MDA 含量的影响

Fig. 4 Effects of triadimefon on POD activity and MDA contents in detached rice leaves

3 讨论

按照叶片衰老的自由基学说, 细胞自由基产生与清除之间平衡的破坏导致自由基积累是引起衰老的主要原因^[1]. 植物衰老过程中 $O_2^{\cdot -}$ 产生速率增大^[18], 各种清除自由基的保护酶活性降低^[19]. 该结果支持叶片衰老的自由基学说^[1]. ABA、epiBR 等生长调节剂促进叶片衰老, 其机理是降低了 SOD、CAT、和 GR 活性以及降低了 GSH 和 AsA 含量^[4, 5].

Buchenauer 等^[19] 曾发现三唑酮具有类似于 CTK 的作用, 延缓小麦和大麦幼苗的衰老和叶绿素分解. 在光照引起黄化黄瓜幼苗子叶转绿过程中, 三唑酮提高了叶绿素含量和 CTK 水平^[10]. 本文实验结果表明, 随着离体水稻叶片的衰老, 叶片的蛋白质和叶绿素含量降低, 但三唑酮处理后, 叶片的 SOD 和 CAT 活性比对照提高, AsA 和 GSH 含量亦提高(图 2, 3). 表明提高了细胞的保护系统活性, 因而 MDA 含量降低(图 4), 降低了衰老过程中膜脂过氧化程度.

叶片衰老过程中, POD 活性提高. POD 亦能起催化活性氧产生的作用^[20]. 水稻叶片衰老过程中, POD 活性亦提高, 三唑酮处理延缓衰老, 也抑制 POD 活性的提高(图 4). 综上所述, 三唑酮提高膜脂过氧化的保护能力是其延缓离体水稻叶片衰老的原因.

三唑酮作为杀菌剂, 已在农业生产上广泛应用. 它又能抑制植物地上部生长^[19], 可作为矮化剂使用. 三唑酮还能提高花生、大豆、豌豆和萝卜的抗旱性^[21], 我们曾报道三唑酮能提高水稻幼苗的抗旱性, 其原因是提高了水稻幼苗的膜脂过氧化保护能力^[22]. 我们还观察到, 盆栽生长 60~70 d 的水稻喷施 200

mg/L 的三唑酮后, 提高了抗旱性, 亦延缓了叶片衰老(待发表结果). 因此, 进一步试验三唑酮对大田水稻产量的效应是很有意义的.

参考文献:

[1] DHINDSA R S, DHINDSA P P, THOVPE T A. Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability, and lipid peroxidation and decreased levels of superoxide dismutase and catalase [J]. J Exp Bot, 1981, 32: 93~101.

[2] 李柏林, 梅慧生. 燕麦叶片衰老和活性氧代谢的关系 [J]. 植物生理学报, 1989, 15(1): 6~12.

[3] DHINDSA R S, DHINDSA P P, REIS D M. Leaf senescence and lipid peroxidation: Effects of some phytohormones and scavengers of free radical and singlet free radicals and singlet oxygen [J]. Physiol Plant, 1982, 56: 453~457.

[4] 何宇炯, 徐如涓, 赵毓橘. 表油菜素内酯对绿豆幼叶衰老的促进作用 [J]. 植物生理学报, 1996, 22(1): 58~62.

[5] 林植芳, 李双顺, 林桂珠. ABA 加速离体叶片衰老过程中一些内源活性氧清除剂的变化 [J]. 中国科学院华南植物研究所集刊, 1989, 4: 161~167.

[6] 郭振飞, 潘瑞炽. 三唑酮及其对植物的生理作用 [J]. 植物生理学通讯, 1989, (1): 75.

[7] FLETCHER R A, NATH V. Triadimefon reduces transpiration and increases yield in water stress plants [J]. Physiol Plant, 1984, 62: 422~426.

[8] ASARE-BOAMAH N K, FLETCHER R A. Protection of bean seedling against heat and against heat and chilling injury by triadimefon [J]. Physiol Plant, 1986, 67: 353~358.

[9] ASARE-BOAMAH N K, Hofstra G, Fletcher R A, et al. Triadimefon protectets bean plants from water stress through its effects on abscisic acid [J]. Plant Cell Physiol, 1986, 27: 383

~ 390.

[10]

FLETCHER R A, ARNOLD V. Stimulation of cytokinins and chlorophyll synthesis in cucumber cotyledons by triadimefon[J] .
Physiol Plant. 1986.66:197~ 201.

[11]

GIANNOPOLITIS C N, RIES S K. Superoxide dismutase I. occurrence in higher plants[J] . Plant Physiol. 1997, 59: 309 ~ 314.

[12]

KRAUS T E, FLETCHER R A. Paclobutrazol protects wheat seedlings from heat and paraquat injury. Is detoxification of activated oxygen involved[J] ? Plant Cell Physiol. 1994, 35: 45 ~ 52.

[13]

TANAKA K, SUDA Y, KONDO N, et al. Ozone tolerance and the ascorbate— dependent hydrogen peroxide decomposing system in chloroplasts[J] . Plant Cell Physiol. 1985, 26: 1 425 ~ 1 431.

[14]

ELIMAN G L. Tissue sulfhydryl groups[J] . Arch Biochem Biophys. 1959, 82: 70~ 77.

[15]

BRADFORD M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding[J] . Anal Biochem. 1976

[16]

赵世杰, 许长成, 邹琦, 等. 植物组织中丙二醛测定方法的改进[J] . 植物生理学通讯, 1994, 30(3): 207 ~ 210.

[17]

ARNON D. Copper enzymes in isolated chloroplast polyphenol oxidase in *Beta Vulgaris*[J] . Plant Physiol. 1949, 24: 1~ 15.

[18]

LYNCH D V, Thompson J E. Lipoxygenase-mediated production of superoxide anion in senescing plant tissue[J] . FEBS Letters. 1984, 173: 251~ 254.

[19]

BUCHENAUER H, GROSSMAN F. Triadimefon: mode of action in plants and fungi[J] . Neth J Plant Pathol. 1986, 83: 93 ~ 103.

[20]

THOMPSON J E, LEGGE R L, BARBER R F. The role of free radicals in senescence and wounding[J] . New Phytol. 1987, 105: 317~ 344.

[21]

郭振飞, 潘瑞炽. 三唑酮提高花生幼苗抗旱性的效应[J] . 中国油料, 1989, (2): 14~ 18.

[22]

郭振飞, 卢少云, 李明启. 三唑酮提高水稻幼苗抗旱性的研究[J] . 植物学报, 1997, 39(6): 541 ~ 545.

Retardation of Senescence by Tridadimefon in Detached Rice Leaves

LU Shao-yun, GUO Zhen-fei, LI Bao-sheng, LI Ming-qi
(College of Biotechnology, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: The contents of soluble proteins and chlorophyll of the detached leaves of rice treated by triadimefon (mass concentration=20 mg/L) increased. The results indicated that triadimefon retarded the senescence of rice leaves. During the senescence of detached rice leaves, both the activities of superoxide dismutase and catalase and the contents of ascorbic acid and reduced glutathione decreased, which was inhibited by triadimefon. These results suggested that triadimefon enhanced the protective ability against enhanced lipid peroxidation.

Key words: triadimefon; rice leaves; senescence

【责任编辑 李玲】