

不同形态铝对小麦抗氧化系统的影响¹⁾

朱雪竹 董 斌 谢翼飞 包 亮 孔繁翔²⁾

(南京大学环境学院, 污染控制与资源化研究国家重点实验室, 南京, 210093)

蒋 新 周健明

(中国科学院南京土壤研究所, 南京, 210008)

摘 要

研究了铝在不同 pH 条件下的形态分布, 测定了单核铝和多核铝对小麦根中超氧化物歧化酶 (SOD) 和过氧化物酶 (POD) 活性的影响. 结果表明, 低浓度 Al_a 和 Al_b 激发了小麦根 SOD 活性; POD 活性在 $pH \leq 5.0$ 时被显著激活, 而当 $pH \geq 5.5$, Al_a 与 Al_b 浓度较低时 POD 被显著地抑制; SOD 与 POD 活性均在 $pH 4.5$, $75 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ $[Al]$ 时达到本实验最高值, 与 Al_b 浓度的增加相关. 本实验结果显示两种形态的铝对植物的致毒机理可能存在一定差异.

关键词: 铝, 小麦, 超氧化物歧化酶, 过氧化物酶.

铝是土壤中含有最多的金属元素, 随着酸沉降问题的日益严重, 土壤 pH 值降低, 致使铝的溶解性提高, 铝污染已成为抑制植物生长的重要因素之一. Zheng^[1] 等曾报道铝污染导致了世界上 40% 的可耕地粮食减产. 铝的生物毒性已引起了广泛关注. 一般认为铝对植物的毒害作用表现在抑制了根细胞的分裂与伸长, 使植物呈现类似于营养缺乏的症状. 铝可以通过脂质过氧化而对植物产生氧化胁迫^[2]. 目前, 已有的研究主要集中在 $pH \leq 4.5$ 条件下单核铝的生物毒性, 而关于多核铝的生理生化毒性研究较少. 一般认为铝离子为铝的主要致毒形态. 但也存在不同的观点, Parker^[3,4] 将铝的存在形态分为 Al_a , Al_b , Al_c ; 不仅 Al_a (如 Al^{3+}) 具有生物毒性, Al_b (如 Al_{13}) 等多聚物也对植物造成毒害. 研究表明, Al_b 为 $3 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 时对小麦根的抑制率与 Al^{3+} 为 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 相当.

本实验选取了冬小麦 (*Triticum aestivum*) 作为实验生物, 以超氧化物歧化酶 (SOD) 和过氧化物酶 (POD) 作为指标, 研究不同 pH 条件下, 铝的不同形态对小麦抗氧化系统的影响, 以深入研究铝对植物的毒害作用机理.

1 材料与方 法

1.1 生物及培养方法

冬小麦 (宁麦九号) 从南京市种子公司获得. 将小麦种子用 0.1% Hg_2Cl_2 溶液灭菌

1) 国家重点基础发展规划项目资助 (G1999011801-3). 2) 通讯联系人.

10min, 水洗净后, 25℃黑暗发芽. 在营养液^[5] ($0.4\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}\text{CaCl}_2$, $0.65\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}\text{KNO}_3$, $0.25\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $0.01\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $0.04\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}\text{NH}_4\text{NO}_3$) 中光照培养 (培养温度为 25℃, 光:暗为 14:10, 光强为 4000 Lux) 至根长为 $2.0 \pm 0.5\text{cm}$ 幼苗, 留待染毒.

1.2 溶液 pH 值及铝浓度

在营养液中加入 $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, 使其 Al^{3+} 理论浓度为 0.0, 25.0, $75.0\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, 并用 $0.01\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}\text{HCl}$ 与 NaOH 调节营养液的 pH 值分别为 4.0, 4.5, 5.0, 6.0. 染毒液每 24h 更换一次. 4d 后取样, 用液氮冷冻后, 真空冷冻干燥 14d.

1.3 铝形态测定

取新鲜营养液用 Ferron^[6] 方法测定各形态的含量. 按不同形态铝与 Ferron 试剂络合速度的不同将铝分为三种形态. Al_a 是指在 1min 内与 Ferron 试剂反应的部分, 一般认为主要是由单核铝络合物组成, 如 Al^{3+} , $\text{Al}(\text{OH})^{2+}$, $\text{Al}(\text{OH})_2^+$; Al_b 是 1min 之后到 120min 之间与 Ferron 试剂反应的部分, 一般认为是由多核羟基铝络合物或聚合物组成, 如 $\text{Al}_2(\text{OH})_2^{4+}$, $\text{Al}_3(\text{OH})_3^{5+}$ 等; Al_c 是在 120min 内未与 Ferron 试剂反应的部分, 如 $\text{Al}(\text{OH})_{3(\text{am})}$ 等形态.

1.4 酶的提取及活性测定

称取一定量的小麦根, 用 Tris:硼酸盐缓冲液 ($0.1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}:0.3\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, pH7.5, $5\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}\text{EDTA}$, $7\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}\beta$ -巯基乙醇) 在 0℃ 下研磨提取 10min, 离心 ($\times 10000\text{g}$), 4℃, 上清液储存于 -30℃ 下, 用于蛋白含量与酶活性测定.

蛋白含量按色素结合法测定, 以小牛血清蛋白 (BAS) 为标准蛋白; 超氧化物歧化酶活性 (SOD) 按邹国林等方法测定^[7]; 过氧化物酶活性 (POD) 按 Silberstein 等^[8] 方法测定.

生化制品均为美国 Sigma 公司产品; 数据统计分析采用 STATGRAPHICS 软件包进行.

2 结果与讨论

不同 pH 条件下铝的形态分布见图 1 和图 2.

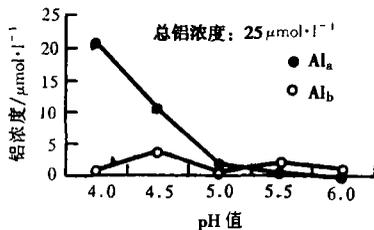


图 1 总铝浓度为 $25\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 营养液中铝的形态分布

Fig. 1 The concentrations of Al_a and Al_b in the test solutions with $25\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ total Al

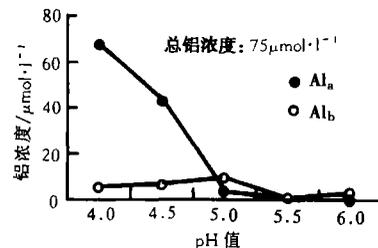


图 2 总铝浓度为 $75\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 营养液中铝的形态分布

Fig. 2 The concentrations of Al_a and Al_b in the test solutions with $75\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ total Al

在总铝浓度为 $25 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 和 $75 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 时, Al_a 浓度随 pH 值的上升而减少, 在 $\text{pH} \leq 5.0$ 时, $[\text{Al}_a]$ 与 pH 值的相关系数达到 -0.98 . Al_b 的浓度并不随 pH 值的增加而降低. Al_a 和 Al_b 浓度均在 $\text{pH} > 5.0$ 时明显下降. 由于单核铝容易被生物所吸收, 因此, 在不同处理组溶液中总铝浓度 ($\text{Al}_a + \text{Al}_b$) 均低于 $25 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 和 $75 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

在各对照组中 SOD 活性受 pH 的影响较小 (图 3). 在不同的 pH 条件下 ($\text{pH} 5.0, 25 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1} [\text{Al}]$ 除外), 本实验的两个铝浓度 ($25 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}, 75 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) 均显著地激活了 SOD 的活性 ($p < 0.01$). SOD 是一种抗氧化组分, 由环境污染物引起的生物体内氧自由基所诱导产生, 并可清除体内过量 O_2^- , 以保护细胞免受损伤. 因此, 是一种环境质量的生化指标. 随 pH 值的升高, $[\text{Al}_a]$ 与 $[\text{Al}_b]$ 比值降低, SOD 活性的激发程度也相应减少. 当 pH 为 4.5 时, $[\text{Al}_a]$ 为 $43.54 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $[\text{Al}_b]$ 为 $7.11 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, SOD 活性增加达到本次实验的最高值, 为对照的 133%. $\text{pH} > 5.0$ 时, 由于 $[\text{Al}_a]$ 小于 $3 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, 可以推测主要是由 Al_b 激发了 SOD 的活性. Parker 认为, 当 $[\text{Al}_a] < 3 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 时, 可忽略 $[\text{Al}_a]$ 对小麦根的抑制作用. 本实验结果表明当 pH 为 6.0 时, $[\text{Al}_a]$ 未检出, $[\text{Al}_b]$ 为 $1.23 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, SOD 的活性也被显著地激活了 ($p < 0.01$), 这进一步说明了 $[\text{Al}_b]$ 的生物毒性. 生物体内 SOD 活性随细胞内 O_2^- 浓度的增加而增加已为很多实验所证实^[9]. 说明在本实验条件下, 单核铝与多核铝都可以诱导小麦根细胞内氧自由基含量增高, 对小麦产生了氧化胁迫.

铝对 POD 活性的影响在不同的 pH 条件下结果不同 (图 4). 与 SOD 类似, POD 在植物体内的主要作用也是清除过氧化物. 当 $\text{pH} \leq 5.0$ 时, POD 活性被铝 ($25 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 和 $75 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) 显著激活 ($p < 0.01$); $\text{pH} \geq 5.5$ 时, 铝抑制了 POD 的活性 ($p < 0.01$). POD 的活性也在 pH 值 4.5, 总铝浓度为 $75 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 时, 达到本次实验的最大值, 为对照的 199.2%. 在 $\text{pH} \geq 5.5$ 时, $[\text{Al}_a] \leq 1.67 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $[\text{Al}_b] \leq 0.63 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, POD 活性被显著地抑制. 根据已有报道^[10], 铝通过诱导 POD 的活性, 促进细胞壁内伸展素、果胶或半纤维素等发生交联, 从而在很大程度上降低细胞壁的伸展性, 使细胞壁硬化, 最终抑制细胞伸长. 根据实验结果可以推测, 在 $\text{pH} \leq 5.0$ 时, 铝对小麦根的抑制作用与 POD 活性的增加有一定相关性.

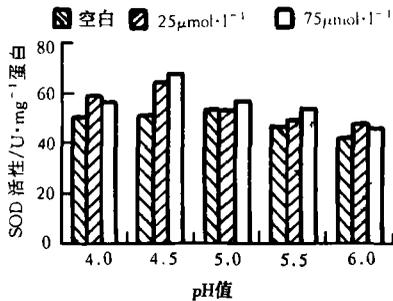


图 3 不同 pH 值条件下铝对小麦根中超氧化物歧化酶的影响

Fig. 3 Effects of Al on SOD in wheat at different pH

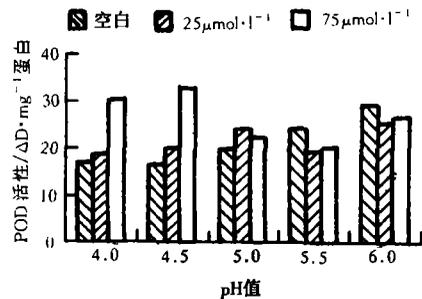


图 4 不同 pH 值条件下铝对小麦根中过氧化物酶的影响

Fig. 4 Effects of Al on POD in wheat at different pH

实验结果中 SOD 与 POD 均在 pH 为 4.5 时达到最大值. 这与 Moore 的结果一致^[4], 他们认为 pH 值升高时形成了一种有毒的单核铝. Parker 认为铝的水解产物 AlOH^{2+} 可能是铝的主要致毒形态. Kinraide^[11]曾报道 H^+ 可缓解铝毒. 本实验中当 pH 为 4.5 时, 总铝为 $75\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 的营养液中, $[\text{Al}_a]$ 虽然由 $67.72\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 降至 $43.54\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, 但 $[\text{Al}_b]$ 则由 $5.41\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 上升至 $7.11\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. 这可能是在 pH4.5 的条件下, 形成了有毒形态的多核铝从而诱导了这两种酶的活性, 使它们达到本实验的最大值.

本实验中存在一个 pH 临界值, 当 pH 高于或低于 5.0 时, SOD 与 POD 活性的变化趋势均有所改变. 从铝各形态的浓度可看到, 当 pH 上升到 5.0 时, $[\text{Al}_a]$ 已降至与 $[\text{Al}_b]$ 相当, 按 Parker 的观点认为可忽略低浓度 Al_a 对根的抑制作用, 而酶活性变化趋势改变的原因可能是因这两种铝形态的致毒害机理的差异所造成.

3 结论

(1) 在不同的 pH 条件下, 较低浓度的 Al_a 和 Al_b 均提高了超氧化物歧化酶 (SOD) 的活性, 但在 pH5.0 处理组中例外.

(2) 过氧化物酶 (POD) 的活性在不同的 pH 条件下, 对铝的反应各不相同. 推测是由于 Al_a 和 Al_b 对小麦的致毒机理不同而引起的. 在 pH 较低条件下, 铝激活的 POD 活性对根的抑制有一定贡献.

(3) SOD 与 POD 活性均在 pH 4.5, $75\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ $[\text{Al}]$ 处理组中达到最大值. 结合铝形态含量变化可推测 Al_b 毒性比 Al_a 大.

参 考 文 献

- [1] Zheng S J, Jiang F M, Hideaki M, High Aluminum Resistance in Buckwheat. *Plant Physiol.* 1998, **117**:745—751
- [2] Keith D Richards, Eric J Schott, Aluminum Induces Oxidative Stress Genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 1998, **116**:409—418
- [3] Parker D R, Kinraide T B, Zelazny L W, On the Phytotoxicity of Polynuclear Hydroxy - Aluminum Complexes. *Soil Sci. AM. J.*, 1989, **53**:789—796
- [4] Parker D R, Kinraide T B, Zelazny L W, Aluminum Speciation and Phytotoxicity in Dilute Hydroxy - Aluminum Solutions. *Soil Sci, AM. J.*, 1988, **52**:438—444
- [5] Aniol A, Induction of Aluminum Tolerance in Wheat Seedlings by Low Doses of Aluminum in the Nutrient Solution. *Plant Physiol.* 1984, **75**:551—555
- [6] 冯利, 栾兆坤, 汤鸿霄. 铝的水解聚合形态分析方法研究. *环境化学*, 1993, **12** (5) :373—379
- [7] 邹国林, 桂兴芬. 一种 SOD 的测活方法. *生物化学与生物物理进展*, 1996, **4**:71—73
- [8] Silberstein L, Siegel B Z, Siegel S M et al., Comparative Studies on *Xanthoria parietina*, a Pollution - Resistant Lichen, and *Ramalina duriaei*, a Sensitive Species II. Evaluation of Possible Air Pollution - Protection Mechanism. *Lichenologist*, 1996, **28**:367—383
- [9] 邹琦, 许长成, 午间强光胁迫下 SOD 对大豆叶片光合机构的保护作用. *植物生理学报*, 1995, **21** (4) :397—401
- [10] 尤程, 张志良, 红光和 Ca^{2+} 对与绿豆下胚轴伸长有关的细胞壁酶的影响. *植物生理学报*, 1997, **23** (2) :199—203
- [11] Kinraide T B, Peter R Ryan, Interactive Effects of Al^{3+} , H^+ , and other Actions on Root Elongation Considered in Terms

of Cell - Surface Electrical Potential. *Plant Physiol.* 1992, 99:1461—1468

2000 年 7 月 9 日收到.

EFFECTS OF Al SPECIATION ON THE ANTIOXIDANT SYSTEM IN WHEAT

Zhu Xuezhu Dong Bin Xie Yifei Bao Liang Kong Fanxiang

(School of the Environment, State Key laboratory of Pollution Control and Resource Reuse,
Nanjing University, Nanjing, 210093)

Jiang Xin Zhou Jianmin

(Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing, 210008)

ABSTRACT

This study was conducted to examine the relationships between aluminum speciation and its phytotoxicity. The toxicity of Al_a and Al_b on the relevant enzyme activities of *Triticum aestivum* was investigated. The results showed that both Al_a and Al_b significantly induced the activities of superoxide dimutase (SOD) at low concentration. The activities of peroxidase (POD) dramatically enhanced by Al when $pH \leq 5.0$, whereas they were inhibited by low doses of Al_a and Al_b ($Al_a \leq 0.81 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$, $Al_b \leq 2.21 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$). The activities of SOD and POD arrived at maximum of this experiment at pH4.5 with $75 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ total Al. These results indicated that there might exist some differences in the toxicity mechanisms of Al_a and Al_b .

Keywords: *Triticum aestivum*, aluminum, SOD, POD.