

毒死蜱和鬼臼毒素胁迫对蔬菜上海青抗氧化酶系及丙二醛的影响

徐敦明¹, 马志卿¹, 冯俊涛¹, 傅建炜², 魏 辉², 张 兴¹

(1. 西北农林科技大学无公害农药研究服务中心, 陕西 杨凌 712100; 2 福建农业科学院植物保护研究所, 福建 福州 350013)

摘 要: 采用田间试验方法, 探讨了不同浓度的化学杀虫剂 48% 毒死蜱乳油和植物源农药 0. 75% 鬼臼毒素乳油对蔬菜上海青抗氧化酶系及丙二醛的影响。结果表明, 50 倍液的毒死蜱严重抑制了超氧化物歧化酶(SOD)的活性, 造成过氧化氢酶(CAT)活性下降, 诱导过氧化物酶(POD)活性上升和丙二醛(MDA)含量升高, 致使谷胱甘肽过氧化物酶(GSHPx)活性先降低后上升。受中低浓度的毒死蜱和高浓度的鬼臼毒素胁迫后抗氧化酶系活性和 MDA 含量均有一定的升高。中低浓度的鬼臼毒素基本不影响 SOD、CAT、POD、GSHPx 的活性及 MDA 含量。

关键词: 上海青; 抗氧化酶系; 丙二醛; 毒死蜱; 鬼臼毒素

中图分类号: S131. 1 文献标识码: A 文章编号: 1672 - 2043(2004)06 - 1089 - 04

Effects of Chlorpyrifos and Podophyllotoxin on Anti - oxidative Enzymes and the MDA of Vegetable (*Brassica rapa* L.)

XU Dun-ming¹, MA Zhi-qing¹, FENG Jun-tao¹, FU Jian-wei², WEI Hui², ZHANG Xing¹

(1. R&D Center of Biorational Pesticide, Northwest Sci - tech University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, China;

2. Institute of Plant Protection, Fujian Agricultural Academy, Fuzhou 350013, China)

Abstract: The effect of chlorpyrifos and podophyllotoxin on the anti - oxidative enzyme system and the MDA in *Brassica rapa* L. was investigated. The activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POD), and glutathione peroxidase (GSHPx), were measured with NBT assay, Na₂S₂O₃ titration method, ABTS method, and DTNB method, respectively. The thio-barbituric assay (TBA) was used to analyze malondialdehyde (MDA). The results showed that SOD and CAT activities were inhibited, the activity of POD and the content of MDA were increased, and the activity of GSHPx was firstly reduced and later increased by chlorpyrifos with a dosage of 50 × (9. 6 mL · L⁻¹). Under the other concentrations of chlorpyrifos, the activities of anti - oxidative enzymes were promoted and the content of MDA increased slightly. The activity of anti - oxidative enzyme system and the content of MDA were improved by podophyllotoxin with the dosage of 50 × (9. 6 mL · L⁻¹). The lower concentrations (250 × and 500 ×) of podophyllotoxin had little effect on the anti - oxidative enzyme system and the content of MDA. The results suggested that the low concentration of pesticides applied on the vegetable might have no severe effect on the growth of the plant because of the regulation of anti - oxidative enzyme system and MDA.

Keywords: *Brassica rapa* L.; anti - oxidative enzyme; MDA; chlorpyrifos; podophyllotoxin

有关化学杀虫剂对动物体和除草剂对植物影响的研究已相当广泛和深入, 但有关杀虫剂对植物生长

影响的研究却相当罕见。此外, 重金属等胁迫及大气污染对植物的影响研究也有大量报道, 但有关杀虫剂胁迫对植物的生理生化的研究甚少, 有关植物源杀虫剂的就更少。研究表明^[1], 植物在逆境如干旱、盐害、环境污染等条件下, 植物体内会产生过量的对细胞膜结构和功能起破坏作用的活性氧自由基, 这些过剩的活性氧能使细胞结构过氧化作用加强, 致使植株体内

收稿日期: 2004 - 04 - 05

基金项目: 国家“十五”攻关项目(2002BA516A04); “863”

(2001AA246016)

作者简介: 徐敦明(1977—), 男, 博士研究生。

E - mail: dunmingxu@163. com

联系人: 张 兴

源抗氧化能力减弱,造成整个植株体代谢系统紊乱。因此,本研究以化学杀虫剂毒死蜱和植物源农药鬼臼毒素为材料,探讨了它们对蔬菜上海青抗氧化酶系及丙二醛的影响,以期找到在遭受农药胁迫时,植物体反应比较敏感的生物标记物。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

试剂: 48% 毒死蜱乳油(美国陶氏益农公司)、0.75% 鬼臼毒素乳油(西北农林科技大学无公害农药研究服务中心提供)、磷酸缓冲液(pH7.8、pH7.0、pH5.5)、核黄素、甲硫氨酸、EDTA、氮蓝四唑(NBT)、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 、KI、 $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ 、淀粉、愈创木酚、 H_2O_2 、三氯乙酸(TCA)、 NaN_3 、谷胱甘肽(还原型)、二硫代二硝基苯甲酸(DTNB)、硫代巴比妥酸(TBA)。

仪器: 722型分光光度计、岛津UV-120分光光度仪等。

1.2 供试植物

田间散播的上海青(*Brassica rapa* L.), 试验前不施肥,不喷药,植株上方覆盖精细网架,防虫取食。散播后的第10d第1次喷药(9月11日),以后每隔2d喷1次(9月14日和9月17日),共喷施3次。每种药剂有3个处理,浓度分别为50倍液($9.6\text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$)、250倍液($1.92\text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$)、和500倍液($0.96\text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$)。另设一不喷药的空白对照。

1.3 取样时间及样品前处理

最后一次喷药后的第1d(9月18日)开始取样,以后第5d(9月22日)和第10d(9月27日)各取样1次,取植株的地上部分,共取样3次。每次取样时,设有3个重复。田间取回的样品用蒸馏水冲洗,并自然晾干。然后,称取一定重量的样品,根据试验要求采用不同的方法进行酶液提取。

1.4 测定方法

超氧化物歧化酶(SOD)活性测定采用NBT法^[1,2],过氧化氢酶(CAT)活性测定采用碘量法^[3,4],过氧化物酶(POD)活性测定采用愈创木酚法^[1,5],谷胱甘肽过氧化物酶(GSHPx)活性测定采用DTNB法^[6,7],丙二醛(MDA)含量的测定采用TBA法^[8,9]。

2 结果与分析

2.1 对上海青 SOD 活性的影响

毒死蜱和鬼臼毒素对上海青 SOD 活性影响的试验结果列于表 1,结果表明,最后一次喷药后的第 1d,对照组 SOD 的活性与毒死蜱的 3 个处理之间存在显著差异,高浓度毒死蜱(50×和 250×)严重抑制了 SOD 活性,然而,低浓度毒死蜱(500×)的处理组 SOD 活性高于对照组 CK。高浓度(50×和 250×)鬼臼毒素的处理组 SOD 活性高于 CK,低浓度(500×)处理与 CK 不存在显著差异。不同浓度的毒死蜱处理之间 SOD 活性存在显著差异,但不同浓度的鬼臼毒素处理

表 1 毒死蜱和鬼臼毒素对上海青 SOD 活性的影响($\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ FW)

Table 1 Effect of pesticides on SOD activity of aboveground parts of *Brassica rapa* L. ($\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ FW)

处理时间	CK	毒死蜱			鬼臼毒素		
		50×	250×	500×	50×	250×	500×
9/18	2.13c	0.00a	1.60b	3.93d	4.14d	3.91d	2.12c
9/22	1.75bc	0.00a	1.96bcd	4.35e	2.25cd	2.33d	1.60b
9/27	1.76c	0.13a	1.26b	1.71bc	1.64bc	1.52bc	1.38bc

注:表中数据后的不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著,下同。

之间 SOD 活性差异不显著。

随着时间的推移,CK 中 SOD 的活性逐渐降低,50×毒死蜱处理中 SOD 的活性则慢慢升高,250×和 500×毒死蜱处理中先升高后下降。鬼臼毒素处理后,SOD 的活性变化与毒死蜱处理的有所不同,随着时间的推移,CK 和不同浓度鬼臼毒素的处理中 SOD 的活性均是逐渐降低。

2.2 对上海青 CAT 活性的影响

毒死蜱和鬼臼毒素对上海青 CAT 活性的影响见图 1。结果表明:毒死蜱处理后上海青中的 CAT 的

活性均低于 CK(图 1-A)。高浓度鬼臼毒素(50×)处理后 CAT 的活性低于 CK,但中低浓度(250×和 500×)处理后 CAT 活性与 CK 差异不显著(图 1-B)。化学农药处理和高浓度的植物源农药处理,CAT 活性在一定程度上受到抑制,且随浓度增大受到抑制越明显,这可能是农药胁迫所造成。CAT 是能够有效清除叶片中的 H_2O_2 ,阻止 H_2O_2 在体内积累而限制潜在的氧伤害。该试验中化学农药处理的 CAT 活性受到了抑制,这样有可能导致 H_2O_2 的积累,从而导致植物膜结构受损。试验过程中观察到 50×毒死蜱处

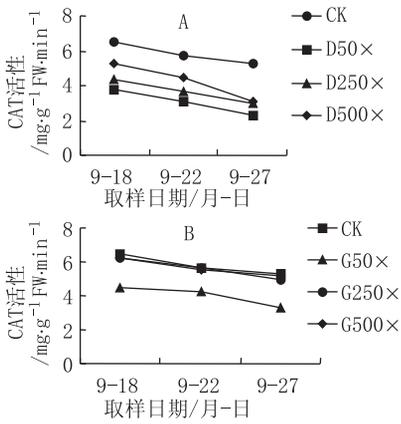


图 1 毒死蜱(A)和鬼臼毒素(B)对上海青 CAT 活性的影响
Figure1 Effect of pesticides on CAT activity in *Brassica rapa* L.

理的上海青有药害发生,在一定程度上药害与 CAT 活性受到抑制应该是有关系的。

2.3 对上海青 POD 活性的影响

毒死蜱和鬼臼毒素对上海青 POD 活性影响列于表 2,结果表明:

(1) 毒死蜱对上海青 POD 活性的影响显著,处理组 POD 活性高于 CK,250 × 处理 POD 活性最高,这可能是化学农药作为一种环境胁迫因子诱导所致。

(2) 鬼臼毒素对上海青中 POD 活性影响不显著,不同浓度间差异也不显著。

(3) 就时间动态上,CK 和所有处理的 POD 活性都是随着上海青的不断成熟而升高。有研究表明,POD 随着细胞老化,其活性逐渐增加^[12],本研究结果也证实了这一结果。

2.4 对上海青 GSHPx 活性的影响

图 2 列出了毒死蜱和鬼臼毒素处理后对上海青中 GSHPx 活性影响情况,结果表明:

(1) 在低浓度(500X)毒死蜱处理、不同浓度鬼臼毒素处理与 CK 中 GSHPx 活性差异不显著,并随着上海青发育进程,GSHPx 活性逐渐地降低(图 2 - A)。

(2) 毒死蜱处理,最后一次喷药后的第 1 d,高浓度(50 ×)处理 GSHPx 活性比 CK 低,但是,随着时间推进 GSHPx 活性不断地升高,250 × 处理 GSHPx 活性

先升高后降低,在最后一次喷药后的第 5 d 之后,GSHPx 活性均高于对照(图 2 - B)。有研究表明,GSHPx 与 SOD 以协同作用方式完成抗氧化功能^[9],本研究的结果也验证了这一结果,以 50 × 毒死蜱处理分析,即随着时间的推移,SOD 活性逐渐降低(表 1),而 GSHPx 活性却不断升高(图 2 - B)。

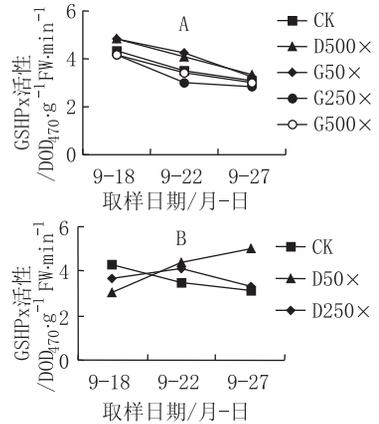


图 2 毒死蜱(A)和鬼臼毒素(B)对上海青 GSHPx 活性的影响
Figure 2 Effect of pesticides on GSHPx activity in *Brassica rapa* L.

2.5 对上海青 MDA 含量的影响

图 3 表明,上海青植株受到农药胁迫后,MDA 的含量均显著增高。毒死蜱处理浓度越高,组织内的 MDA 含量越高,然而,鬼臼毒素处理表现不明显。随着时间的推移,CK、250 × 和 500 × 鬼臼毒素处理,MDA 的含量略有增加,但增加幅度很小,不同浓度的毒死蜱和 50 × 鬼臼毒素处理,MDA 含量呈下降趋势,这可能是农药胁迫的慢慢缓解,使得植株开始恢复到原来的平衡。

3 小结与讨论

SOD、CAT、POD、GSHPx 等酶类是细胞抵御活性氧伤害的重要保护酶系统,它们在清除超氧自由基、过氧化氢和过氧化物以及阻止或减少羟基自由基形成等方面起着重要作用^[11]。在逆境条件下,保护酶活性下降及系统活力失调会导致 -OH 形成,它的累积会启动并加剧膜脂过氧化而造成整体膜的损伤。

表 2 毒死蜱和鬼臼毒素对上海青 POD 活性的影响(ΔOD470 · g⁻¹ FW · min⁻¹)

Table 2 Effect of pesticides on POD activity of aboveground parts of *Brassica rapa* L. (ΔOD 470 · g⁻¹ FW · min⁻¹)

处理时间	CK	毒死蜱			鬼臼毒素		
		50 ×	250 ×	500 ×	50 ×	250 ×	500 ×
9 月 18 日	0.63a	1.41c	1.63c	0.76ab	0.89b	0.62a	0.56a
9 月 22 日	0.71a	1.74d	2.00e	1.01c	0.90bc	0.83ab	0.81ab
9 月 27 日	1.08a	1.91cd	2.13d	1.71bc	1.21a	1.19a	1.34ab

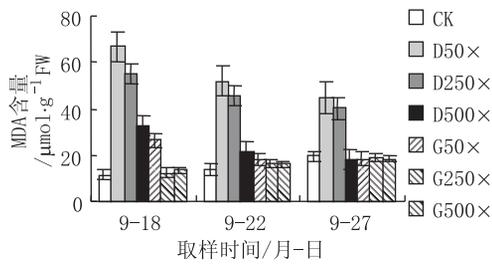


图3 毒死蜱和鬼臼毒素对上海青 MDA 含量的影响

Figure 3 Effect of pesticides on MDA content in *Brassica rapa* L.

试验结果表明, 高浓度的毒死蜱严重抑制 SOD 和 CAT 的活性, 诱导 POD 活性升高, 促使 GSHPx 活性先降低后升高。这说明高浓度胁迫严重影响了植物体内活性氧清除系统的活力及作用平衡, 使活性氧累积, 促进膜脂过氧化, 破坏膜结构。田间观察到高浓度处理组对上海青会出现药害症状, 进一步说明了高浓度胁迫严重影响抗氧化酶活性及系统平衡。

许多研究表明^[12, 13], 在适度逆境诱导下, 植物能增加抗氧化酶的活性以提高其适应能力, 抵抗逆境而得以生存。该研究表明, 受中低浓度的毒死蜱和高浓度的鬼臼毒素胁迫后抗氧化酶系活性有一定的升高, 中低浓度的鬼臼毒素基本不影响抗氧化酶系活性。这可能是植物细胞受到一定的刺激, 此时植物自身可以通过正常的生理调节作用, 增加保护酶系统活性, 以适应这种环境的变化。

另外, 试验也表明上海青植株受到毒死蜱胁迫后, MDA 的含量显著增高, 且胁迫处理浓度越高, 组织内的 MDA 含量越高, 然而, 鬼臼毒素处理 MDA 含量变化与对照相似, 变化不明显。植物器官衰老时, 或在逆境条件下, 往往发生膜脂过氧化作用, 丙二醛 (MDA) 是其产物之一, 通常利用它作为脂质过氧化指标, 表示细胞膜脂过氧化程度和植物对逆境条件反应的强弱^[1]。由此可见, 上海青受到化学杀虫剂毒死蜱胁迫后, 抗氧化酶受到抑制, MDA 大量积累, 其膜系统受到了一定程度的破坏; 植物源农药鬼臼毒素没有造成 MDA 积累, 这从一定意义上讲是没有导致膜结构的破坏。

综合上述, 高浓度的化学农药胁迫, 能严重影响植物体内活性氧清除系统的活力及作用平衡, 促使 MDA 的大量累积, 导致植物受害。植物源农药对植物抗氧化酶系的影响较小。在农业生产上, 选择适当的浓度用药不会给植物生理生化过程造成紊乱。值得一提的是, 植物源农药的这种影响更为微小。

参考文献:

- [1] 李合生主编. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000. 164 - 165, 167 - 169.
- [2] Giannopolitis C N, Ries S K. Superoxide dismutase I: Occurrence in higher plants[J]. *Plant Physiol*, 1977, 59: 309 - 314.
- [3] Dhindsa R S, Dhindsa P P, and Thorpe. T A. Leaf senescence: Correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase[J]. *J Experimental Botany*, 1981, 32: 93 - 101.
- [4] 西北农业大学主编. 基础生物化学实验指导[M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1986. 92 - 93.
- [5] Cakmak I, Strbac D, Marschner H. Activities of hydrogen peroxide - scavenging enzymes in germination wheat seeds[J]. *J Experimental Botany*, 1993, 44: 127 - 132.
- [6] George L Ellman. Tissue sulfhydryl groups[J]. *Archives Biochemistry and Biophysics*, 1959, 82: 70 - 77.
- [7] 于同泉, 秦岭, 陈静, 等. 水分胁迫对板栗幼苗抗氧化酶及丙二醛的影响[J]. 北京农学院学报, 1996, 11(1): 48 - 52.
- [8] Heath R L, Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts I: Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation[J]. *Archives Biochemistry and Biophysics*, 1968, 125: 189 - 198.
- [9] 中国科学院上海植物生理研究所编. 现代植物生理学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1999. 305 - 306.
- [10] 严重玲, 李瑞智, 钟章成. 模拟酸雨对绿豆、玉米生理生态特性的影响[J]. 应用生态学报, 1995, 6(6): 124 - 131.
- [11] Gutteridge J M. Superoxide dependent formation of hydroxy radicals and lipid peroxidation in the presence of iron salts[J]. *Biochem*, 1982, 206: 605 - 609.
- [12] 严重玲, 付舜珍, 方重华, 等. Hg、Cd 及其共同作用对烟草叶绿素含量及抗氧化酶系统的影响[J]. 植物生态学报, 1997, 21(5): 468 - 473.
- [13] Chen L M, Chuan C L, Kao C H. Copper toxicity in rice seedlings: Changes in antioxidative enzyme activities, H₂O₂ level, and cell wall peroxidase activity in roots[J]. *Bot Bull Acad Sin*, 2000, 41: 99 - 103.