

金鱼藻抗氧化酶对水体无机氮升高的响应

曹特 倪乐意

(中国科学院水生生物研究所东湖湖泊生态系统试验站, 武汉 430072)

摘要:为了研究水体富营养化引起的无机氮升高对沉水植物的胁迫,本研究用4种浓度的碳酸铵和5种浓度的硝酸钾对金鱼藻进行急性处理,分别在5—48h内测定植株超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)和抗坏血酸过氧化物酶(APX)的活力。结果表明铵盐处理下4种酶中CAT活性变化最大,在5—15h时其活性与处理浓度正相关。更长时间24h处理则导致响应停止。硝酸盐处理下SOD、APX和CAT活性在24h时才有明显升高。SOD和CAT活性在4种酶中变化最大,它们对处理浓度变化的响应趋势都是在低浓度处理上升然后在较高浓度下降。在铵盐和硝酸盐处理下APX活性都是在4种酶中最低,其变化规律与CAT相当一致。本研究表明CAT对铵盐胁迫响应较快;SOD和CAT对硝酸盐胁迫的响应速度较铵盐慢;这两种抗氧化酶可作为检验无机氮浓度升高对沉水植物胁迫的敏感指标。

关键词:金鱼藻; 胁迫 SOD; CAT; POD; APX

中图分类号: Q948.8 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2004)03-0299-05

干旱、冻害、强光、重金属和空气污染等环境胁迫均能导致植物体内活性氧中间物的过量产生^[1-5],活性氧中间物主要包括O₂^{•-}、¹O₂、H₂O₂和HO[•],其反应性极强,能使膜脂过氧化、蛋白质变性和核酸突变^[6,7],植物在进化过程中发展了一套完善的抗氧化体系,专门用于清除植物体内这些有害物质。这个体系主要包括一些小分子抗氧化物(抗坏血酸、生育酚、谷胱甘肽和胡萝卜素等)和多种抗氧化酶(超氧化物歧化酶SOD、过氧化氢酶CAT、过氧化物酶POD和抗坏血酸过氧化物酶APX等)^[8],它们在植物受不同胁迫时会相应升高,由于几种抗氧化酶分布的细胞器和作用的活性氧种类有所差异,植物抗氧化酶体系活性变化特征成为指示植物对环境胁迫响应类型的指标。

湖泊富营养化使湖水和底泥中的氮磷含量急剧上升,低浓度时它们作为营养元素显著促进沉水植物生长,随营养水平增加它们逐渐引起植物过量生长,富营养化最终引起沉水植被消失^[9,10],其机理可能是多个胁迫因子协同作用的结果,已有研究进展表明:富营养水体中植物富集营养引起其碳水化合物库存下降,根系受底质还原物质毒害,浮游植物和

附生植物对沉水植物在光、无机碳竞争优势以及可能的化感抑制作用,都是沉水植物衰亡的原因^[11,12]。然而至今还很少有关水柱氮磷升高对沉水植物直接胁迫效应的研究。本研究根据已有的在水生植物和陆生植物生长试验中氮磷升高抑制生长的证据,设计用植物可直接利用的无机氮源(氨氮和硝酸氮)对金鱼藻进行急性处理,研究沉水植物抗氧化酶体系对高氮胁迫的响应规律,初步探讨富营养化对水生高等植物的胁迫机制,为沉水植物的保护提供敏感指标。

1 材料与方法

1.1 材料和处理 实验用的金鱼藻(*Ceratophyllum demersum*)于2002年7月29日取自洪湖,用武汉东湖底泥加自来水在室外培养繁殖。培养25d后截下每三株植物(每株包含10个侧枝)放入一个含30L自来水(TN 1.17mg/L, NH₄N可忽略)的水族缸中,在室外培养2d,共10缸培养。

NH₄N处理实验:分别往4缸里加入(NH₄)₂CO₃,使NH₄N的浓度分别达到1mg/L、10mg/L、30mg/L和100mg/L(按加入量计算),另以不加(NH₄)₂CO₃的一缸

收稿日期: 2003-04-25; 修订日期: 2003-12-20

基金项目: 中国科学院知识创新重大项目(编号: KZCX1-SW-12); 国家自然科学基金项目(编号: 30270259)资助

作者简介: 曹特(1978—),男,广东廉江人; 研究生; 主要从事水生植物生理生态学研究

通讯作者: 倪乐意

作为对照。分别在处理 5h、15h 和 25h 后每株截下一个顶枝作为样品(约 0.5g)测定。

$\text{NO}_3^- \text{N}$ 处理实验: 分别往 5 缸里加入 KNO_3 , 使 $\text{NO}_3^- \text{N}$ 的浓度分别为: 1mg/L、5mg/L、10mg/L、15mg/L 和 20mg/L(按加入量计算), 在处理 10h、24h 和 48h 后每株截下一个顶枝作为样品。

所有截下的顶枝均用自来水冲洗后于-20℃度保存, 并在 24h 内作进一步的处理。实验期间气温最高为 36℃, 最低为 30℃。

1.2 酶的提取 将每缸中截下的三个顶枝用蒸馏水冲洗并吸干后放入研钵中加液氮研磨成粉末, 后转移到冰浴的烧杯中加入 5ml 预冷的酶提取液(pH7.8, 50mmol/L 的磷酸缓冲液: 内含 1mmol/L PMSF、0.1mmol/L EDTA 和 1% w/v PVPP) 提取 5min, 提取液经四层纱布过滤后滤液在 4℃下 15 000r/min 离心 20min, 收集上清液保存在 4℃下并在 48h 内进行酶活力的测定。

上清液中蛋白质含量的测定采用考马斯亮蓝染色法, 根据用小牛血清蛋白组分 4 种的蛋白质标准曲线计算上清液中的总蛋白质含量, 每个样品测三个重复取平均值。

1.3 酶活力的测定 APX(EC 1.11.1.11)活力的测定是根据 Rout 和 Show^[13]的方法略作修改, 使用 pH 7.025mmol/L 的磷酸缓冲液(内含 0.1mmol/L EDTA、1mmol/L H_2O_2 和 0.5mmol/L 抗坏血酸)。在 3mL 混合反应液的体系中加入适当的酶提取液启动反应, 用分光光度计(SHIMADZU UV-1601)记录 290nm 处吸光度的变化, 根据抗坏血酸在 290nm 处的光吸收准曲线计算酶活力。

CAT(EC 1.11.1.6) 和 POD(EC 1.11.1.7)活力的测定采用 Chance 和 Maeohly^[14]的方法略作修改。CAT 活力测定在 pH 6.8 25mmol/L 的磷酸缓冲液(含 20mmol/L H_2O_2)进行, 3mL 的反应体系中加入适当的酶提取液启动反应, 用分光光度计记录 240nm 处的吸光度变化, 根据 H_2O_2 在 240nm 处的光吸收标准曲线计算酶活力。POD 活力的测定使用 25mmol/L pH6.8 的磷酸缓冲液(内含 10mmol/L H_2O_2 和 0.1% v/v 愈疮木酚), 3mL 的反应体系中加入适当的酶提取液启动反应, 用分光光度计记录 470nm 处吸光度的变化, 按愈疮木酚在 470nm 处的摩尔吸光系数(26.6mmol/L/cm)计算酶活力。

SOD(EC 1.15.1.1)活力的测定按 Bayer 和 Fridovich^[14]的方法略作修改, 3mL 反应液(pH 7.8 50mmol/L 的磷酸缓冲液: 含 75μmol/L NBT、

13mmol/L Met 和 2μmol/L 核黄素)中加入适量的酶提取液(约抑制 50% 光显色), 在受光均匀的培养箱(PHILIPS 15Wx4)中光照反应 20min, 反应完毕后测定 560nm 处的光吸收, 以抑制 50% 光显色反应所需的酶量为一个酶单位, 以不加入酶提取液的一组为对照。所有酶反应均在 25℃下进行, 每个样品测三个重复取平均值。

2 结果

金鱼藻抗氧化酶受 $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 浓度和作用时间的共同影响。在 5h 处理中, SOD 活力随 $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 浓度增加而下降, 但处理 25h 后其变化趋势与此相反。POD 活力较 SOD 低, 而且对 30mg/L 以上的 NH_4^-N 处理不敏感; 当 NH_4^-N 为 10mg/L 时 POD 活力变化较大, 5h 后升至对照的 1.6 倍, 但随时间增加其活性又呈明显下降趋势, 到 25h 时只有对照的 0.6。CAT 对处理的浓度变化响应相当强烈, 如 100mg/L 的 NH_4^-N 处理 15h 后其活力达到对照的 3 倍多; 并且在 5h 和 15h 的处理中, CAT 活力呈现明显随处理浓度增加而上升的趋势, 但处理 25h 后, CAT 活力随 $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 浓度变化不大, 接近对照的水平。APX 活力的变化幅度最小, 只有 1U/mg 蛋白; 在处理 15h 时, 其活力随 $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 浓度增加而增加, 但在 5h 和 25h 的处理中, 其活力随处理浓度变化不大, 与对照相当(图 1)。

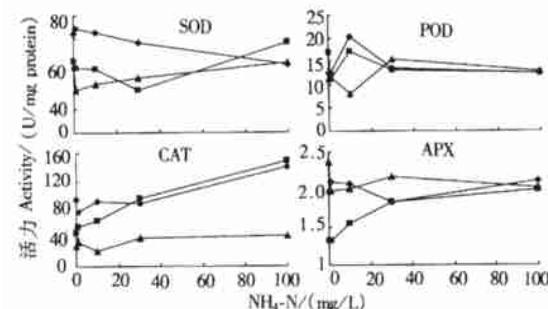


图 1 不同浓度的 $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 处理对金鱼藻四种抗氧化酶活力的影响

Fig. 1 The activities of the four antioxidant enzymes of *C. demersum* after $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ treatments.

(5h: —◆—, 15h: —■—, 25h: —▲—)

与 $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 处理后的响应有所不同, KNO_3 处理后 SOD 活力最高, 其他酶活力高低顺序都相同, 即 CAT 较高, APX 最低。所有处理浓度上的抗氧化酶在 24h 内或者完全呈现下降趋势(SOD), 或只在低浓度下降, 高浓度变化不大(CAT, APX)。处理

48h 后除 POD 外其他抗氧化酶活性都呈现相同趋势: 即在 5mg/L 时较对照上升 30% 左右, 而在更高浓度时随浓度增加而下降, 10mg/L 时接近或低于对照, 15mg/L 时只有对照的 60%—80%, 20mg/L 又有回升。KNO₃ 浓度对 POD 的活力在 24h 内影响不大, 所有处理的 POD 活力基本上与对照相似。在处理 48h 后 POD 呈现随处理浓度增加而下降趋势(图 2)。

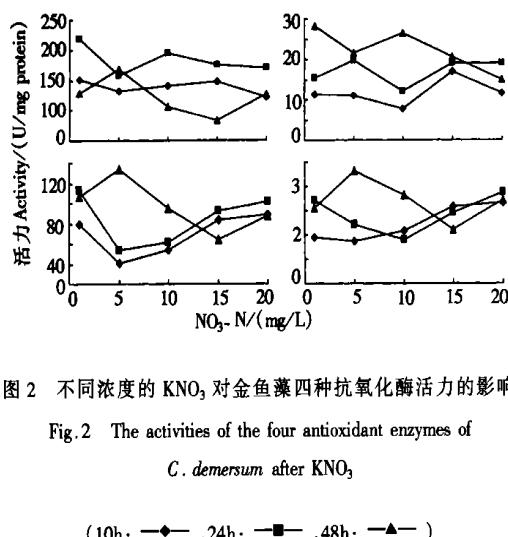


图 2 不同浓度的 KNO₃ 对金鱼藻四种抗氧化酶活力的影响

Fig. 2 The activities of the four antioxidant enzymes of *C. demersum* after KNO₃

(10h: —◆— , 24h: —■— , 48h: —▲—)

3 讨论

国外报道氨氮对植物生长胁迫非常明显。但对金鱼藻的生长胁迫只有 Best^[15] 一例实验, 而且还没有入手研究其胁迫生理学。作者在 2001 年研究了 4 种沉水植物在富营养水和底质中生长营养和物质储存, 和 POD 活性的影响, 报道了微齿眼子菜的结果^[16]。这些研究表明水培条件下 1mg/L 氨氮促进金鱼藻生长, 5mg/L 氨氮开始抑制生长。而在富营养水和底质条件下, 0.6mg/L 氨氮即抑制生长和升高 POD 活性。本研究属于急性胁迫实验, 因此处理浓度范围远大于生长实验, 以快速获得响应结果。根据生态学原理, 单因子胁迫浓度会高于多个胁迫因素存在时的胁迫浓度。可以推测, 急性试验的胁迫浓度会高于具有积累效应的生长实验和存在较多胁迫因素的自然水体。本研究 5mg/L 以上的氨盐开始引起 CAT 响应, 而且 5h 时即测得较高活性和较好的剂量相关性, 表明该指标灵敏。然而 25h 时所有处理浓度的酶活较对照都没有明显不同, 显示 CAT 对铵盐胁迫的响应时间短。

CAT 和 APX 均以 H₂O₂ 为底物, 前者主要存在于过氧化物酶体中, 由于其活性不需要还原性底物

以及对 H₂O₂ 较高的 V_{Max} 值和较低的 K_m 值, 它对于清除细胞受到胁迫时大量产生的 H₂O₂ 是必不可少的^[17, 18]。APX 存在于多种细胞器如叶绿体、线粒体、过氧化物酶体和细胞质中, 通过 Asada-Hallirwell^[19] 循环将 H₂O₂ 还原成 H₂O, 由于其 V_{Max} 值较低但对 H₂O₂ 的 K_m 值较高, 能很好地对 H₂O₂ 进行精细调节, 因此认为当细胞内的 H₂O₂ 浓度较低时, 它在维持 H₂O₂ 的稳态水平和抗氧化反应的信号传导中有重要作用, 而不是细胞受到胁迫时 H₂O₂ 的主要清除体系^[17]。本研究中 CAT 和 APX 对铵盐处理响应的同步性和低 APX 变化水平, 与以上原理相吻合。

已有研究发现高浓度的铵处理使植物的耗氧量增加 41%, 推测把 NH₄⁺ 从细胞内运出细胞时要耗费巨大的能量^[20]; 更传统研究认为氨氮对植物毒害的机理是使光合磷酸化解偶联和降低细胞内碳水化合物, 可能是通过合成谷胱酰氨基途径进行解毒^[21—23]。这两种产能途径都会大量增加活性氧。根据本研究中 SOD 不响应, CAT 强烈响应的特点, 推测活性氧种类为过氧化氢而不是超氧化物。并推测本研究中铵盐处理 24h 后 CAT, APX 和 POD 停止响应的原因可能是植物的碳水化合物库已经极度消耗, 因而无法维持酶的响应活力。

以往报道表明硝酸盐升高对金鱼藻没有明显的生长胁迫。高达 105mg/L 的硝酸盐处理不改变金鱼藻的生长曲线^[15]。本研究发现在 5mg/L 硝酸盐处理下金鱼藻的 SOD, CAT 和 APX 明显升高, 表明在过氧化物酶体中有大量超氧化物产生。抗氧化酶对硝酸盐的响应时滞表明活性氧的产生可能和硝酸还原酶的合成有关: Sagid 等^[24] 用 NaNO₃ 处理麦草 1d 后其硝酸还原酶才出现最高的酶活力, 与本研究中抗氧化酶的响应时间吻合。活性氧也可能是硝酸盐在组织中过量积累所诱导。因为植物组织需要的氮为 1.3%, Best 用 1—105mg/L 硝酸盐处理金鱼藻 4 周后发现其组织氮含量稳定在 4% 左右, 远超过其需求量。细胞维持高氮含量是耗能行为, 可能诱导活性氧大量产生, 在这种前提下, 本研究中抗氧化酶响应时滞可解释为硝酸盐需要一定时间被吸收并在组织内积累。已报道植物可以通过两种途径吸收硝酸盐: 硝酸盐浓度低时, 植物是通过 IHATS(可诱导的高亲和力转运体系)吸收, 浓度高时通过 CLATS(结构性低亲和力转运体系)吸收^[23], 在本实验中高浓度硝酸盐处理(15mg/L 和 20mg/L) 时可能启动了 CLATS, 推迟了硝酸盐在细胞中的积累, 因此高浓度处理 24h 时没有活性氧产生和抗氧化酶的响应。由

于缺乏系统的实验证据,以上推论还有待通过深入的研究进行取证和鉴别。

参考文献:

- [1] Yu Q, Rendel Z. Drought and salinity differentially influence activities of superoxide dismutases in narrow-leaved lupins[J]. *Plant Sci.*, 1999, **142**: 1—11
- [2] Lee D H, Lee C B. Chilling stress induced changes of antioxidant enzymes in the leaves of cucumber: in gel enzyme activity assays[J]. *Plant Sci.*, 2000, **159**: 75—85
- [3] González A, Steffen K L, Lynch J P. Light and excess manganese, Implications for oxidative stress in Common Bean[J]. *plant physiol.*, 1998, **118**: 493—504
- [4] Hegedűs A, Erdei S, Horváth G. r. Comparative studies of H_2O_2 detoxifying enzymes in green and greening barley seedlings under cadmium stress[J]. *Plant Sci.*, 2001, **160**: 1085—1093
- [5] Wellbum A, Wellbum F. Air pollution and radical protection responses of plants, in: J. Scandalios(Ed.), *Antioxidants Defenses* [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997, 861—876
- [6] Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance[J]. *Trends in Plant Sci.*, 2002, **7**: 405—410
- [7] Bowler C, Van Montagu M, In 'ze D. Superoxide dismutase and stress tolerance[J]. *Ann. Rev. Plant Physiol.*[J]. *Plant Mol. Biol.*, 1992, **43**: 83—116
- [8] Alscher, R G, Hess J L. Antioxidants in higher plants[M]. CRC Press, Boca Raton, 1993, 31—58
- [9] Ozimek T, Kowalczewski A. Long term changes of the submersed macrophytes in eutrophic lake Mikołajskie(North poland)[J]. *Aquat. Bot.*, 1984, **19**: 1—11
- [10] Pokorný J, Květ J, Ondok J P. Functioning of the plant component in densely stocked fishponds[J]. *Bull. Ecol.*, 1990, **21**(3) : 44—48
- [11] Sager E P S, Whillans T H, Fox M G. Factors influencing the recovery of submersed macrophytes in four coastal marshes of Lake Ontario. *Wetlands*, 1998, **18**: 256—265
- [12] Barko J W, Adams M S, Clesceri N I . Environmental factors and their consideration in the management of submersed aquatic vegetation: A Review[J]. *J. Aquat. Plant Manage.*, 1986, **24**: 1—10
- [13] Rout N P, Show B P. Salt tolerance in aquatic macrophytes: possible involvement of the antioxidative enzymes[J]. *Plant Sci.*, 2001, **160**: 15—23
- [14] Chance B, Maehly A. Assay of catalase and peroxidase, in: S. P. Cobwick, N. O. Kaplan(Eds.), *Methods in Enzymology*, New York, Academic Press[J]. 1995, 764—775
- [15] Best E P H. Effects of nitrogen on the growth and nitrogenous compounds of *Ceratophyllum demersum*[J]. *Aquat. Bot.*, 1980, **8**: 197—206
- [16] Ni L. Effects of water column nutrient enrichment on the growth of *Potamogeton maackianus* A. Bean [J]. *J. Aquat. Plant manage*, 2001, **39**: 83—87
- [17] Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance[J]. *Trends in Plant Sci.* 2002, **7**: 405—410
- [18] Willekens H. Catalase is a sink for H_2O_2 and is indispensable for stress defence in C_3 plants[J]. *EMBO*, 1997, **16**: 4806—4816
- [19] Nakano Y, Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts[J]. *Plant Cell Physiol.*, 1982, **22**: 867—880
- [20] Britto D T. Futile transmembrane NH_4^+ cycling: a cellular hypothesis to explain ammonium toxicity in plants[J]. *Pro. Natl. Acad. Sci.* 2001, **98**: 4255—4258
- [21] Beck T, Feller U. Ammonium stimulated potassium release from *Lemna minor* L. grown on a medium containing nitrate as N source[J]. *Aquat. Bot.*, 1991, **39**: 255—266
- [22] Gerendas J. Physiological and biochemical processes related to ammonium toxicity in higher plants [J]. *Zeit. Pflanzenenähr. Bodenkd.*, 1997, **160**: 239—251
- [23] Litav M, Lehrer Y. The effects of ammonium in water on *Potamogeton lucens*. *Aquat. Bot.*, 1978, **5**: 127—138
- [24] Sagi M, Lips H S. The level of nitrate reductase and MoCo in annual ryegrass as affected by nitrate and ammonium nutrition [J]. *Plant Sci.*, 1998, **135**: 17—24

RESPONSES OF ANTIOXIDASES OF *CERATOPHYLLUM DEMERSUM* TO THE INCREASE OF INORGANIC NITROGEN IN WATER COLUMN

CAO Te and NI Le-Yi

(Donghu Experimental Station of Lake Ecosystems, The Institute of Hydrobiology, CAS, Wuhan, 430072)

Abstract: Acute responses of four antioxidant enzymes: superoxide dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), catalase (CAT, EC 1.11.1.6) peroxidase (POD, EC 1.11.1.7) and ascorbate peroxidase (APX, EC 1.11.1.11), of *Ceratophyllum demersum* to inorganic nitrogen enrichment in water column were investigated after 5—24h incubations with potassium nitrate or ammonium carbonate, and thus to evaluate the stress of inorganic nitrogen enrichment in water column on submersed macrophytes. In this experiment, the concentrations of NO_3^- -N were ranged from 1mg/L to 20mg/L, and the concentrations NH_4^+ -N were ranged from 1mg/L to 100mg/L.

The results show that in the ammonium treatments, CAT activity was the highest among the four enzymes. In the 5h and 15h after the treatments, the activity of CAT showed a concentration dependent increase, but there were no significant differences in CAT activity among treatments as the incubation prolonged to 24h. In the treatments with nitrate, SOD, APX and CAT activities changed significantly only at 24 hr after the treatment. SOD and CAT activities were the highest in the four enzymes. The activities of both enzymes showed a peak at 5mg/L nitrate.

APX activity was the lowest among the four enzymes both in ammonium and nitrate treatments. The trend of APX was similar to that of CAT. This experiment suggested that CAT show a quick response to ammonium enrichment in water, whereas SOD and CAT show delayed response of 15—24h to that of nitrate. CAT and SOD are possible indicators for submersed macrophytes under the stress of inorganic nitrogen enrichment in water.

Key words: *Ceratophyllum demersum*; Stress; SOD; CAT; POD; APX