

钙对 NaCl 胁迫下玉米幼苗 保护酶活性等生理特性的影响

王玉凤, 王庆祥, 商丽威

(沈阳农业大学农学院, 辽宁 沈阳 110161)

摘要: 采用水培法研究了不同浓度钙对盐胁迫下玉米幼苗生长、叶绿素含量、游离氨基酸含量及保护酶活性等生理特性的影响。结果表明适量的 Ca^{2+} (4 mmol/L) 供应能有效促进玉米生长, 抑制叶绿素含量降低, 降低细胞膜透性, 提高玉米叶片和根系中的 SOD 和 POD 活性, 随着 Ca^{2+} 浓度增加根系中 CAT 活性增加, 叶片 CAT 活性有所下降。增加 Ca^{2+} 浓度, 根系中游离氨基酸含量和可溶性蛋白含量呈现出先升高 (2~4 mmol/L) 后降低 (6 mmol/L) 趋势, 叶片中可溶性蛋白含量随 Ca^{2+} 浓度增加而降低。表明适量的 Ca^{2+} 供应可提高玉米幼苗耐盐性。

关键词: 钙; 盐胁迫; 玉米幼苗; 保护酶活性; 膜透性

中图分类号: S311 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7601(2008)03-0119-05

添加外源营养物质以提高植物抗盐性已成为植物营养学家研究的热点。钙是植物生长、发育必需的营养元素之一, 在植物的生理过程中具有重要作用。已经证明, 钙与维持细胞质膜的完整性、降低逆境下细胞膜的透性、增加逆境下脯氨酸的含量等多种抗逆境的生理过程有关。近年来的研究表明, 钙能提高植物组织或细胞的多种抗性, 如抗冷性^[1]、抗热性^[2]、抗盐性^[3]、抗旱性^[4]以及抗矿质元素毒害胁迫等^[5]。但有关钙如何影响盐胁迫条件下玉米幼苗叶片和根系中多种生物酶的活性及其相互之间协调作用以缓解盐害方面的报道甚少。本文研究了外源钙对盐胁迫下玉米幼苗的生长、细胞膜透性、叶片和根系中保护酶活性等方面的影响, 探讨了钙在提高玉米幼苗耐盐性中的作用, 以期为进一步探讨钙缓解植物逆境伤害机理提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 植物的培养与处理

供试材料为较耐盐的玉米品种郑单 958。种子用 10% 的 NaClO_4 消毒 10 min, 自来水充分冲洗, 后用蒸馏水冲洗数遍, 28℃ 萌发, 挑选发芽一致的种子培养, 培养桶外裹双层黑遮光布。水培至一叶一心后用 1/2 的 Hoagland 营养液培养, 昼夜温度分别为 28℃ 和 20℃, 每天光照 16 h, 每 3 d 换一次营养液。幼苗三叶一心时进行如下处理: (1) 对照 (CK): 1/2 Hoagland, 营养液中 Ca^{2+} 浓度为 2 mmol/L; (2) 处

理 1 (Ca1): 150 mmol/L NaCl + 1/2 Hoagland (营养液中 Ca^{2+} 浓度为 2 mmol/L); (3) 处理 2 (Ca2): 150 mmol/L NaCl + 1/2 Hoagland + 2 mmol/L CaCl_2 (营养液中 Ca^{2+} 浓度为 4 mmol/L); (4) 处理 3 (Ca3): 150 mmol/L NaCl + 1/2 Hoagland + 4 mmol/L CaCl_2 (营养液中 Ca^{2+} 浓度为 6 mmol/L)。处理期间每 2 d 换一次营养液, 营养液 pH 6.2, 全天通气培养。处理 6 d 后采样测定各项指标, 每个处理至少重复 3 次。

1.2 分析方法

利用电导率法测定细胞质膜透性, 细胞质膜透性以前后两次电导的比值即相对电导率来表示^[6]; 乙醇丙酮法测定叶绿素含量^[6]; NBT 光化还原法测定 SOD 活性^[7], 以抑制光还原 NBT 50% 为一个酶活单位; 愈创木酚法测定 POD 活性^[8]; 高锰酸钾滴定法测定 CAT 活性^[8]; 茚三酮溶液显色法测定游离氨基酸含量^[6]; 考马斯亮蓝 G-250 染色法测定可溶性蛋白含量^[8]。

2 结果与分析

2.1 钙对 NaCl 胁迫下玉米幼苗生长的影响

试验结果表明 150 mmol/L NaCl 处理 6d 后, 地上部和根系干重明显下降 (图 1), 2 mmol/L Ca^{2+} 处理的玉米幼苗地上部干重和根系干重分别是对照的 50.8%, 76.9%。适量增加营养液中 Ca^{2+} 浓度能缓解 NaCl 胁迫对玉米幼苗生长的抑制。与对照相比

收稿日期: 2007-10-20

作者简介: 王玉凤 (1978-), 女, 博士。E-mail: wyf0811@yahoo.com.cn.

通讯作者: 王庆祥 (1956-), 男, 教授。

4 mmol/L 和 6 mmol/L Ca^{2+} 处理玉米幼苗地上部干重分别为对照的 59.2%, 45.8%, 根系干重分别为对照的 119.4%, 95.3%。盐胁迫下植株根冠比明显增加, 对照根冠比为 0.34, NaCl 胁迫后 2 mmol/L、4 mmol/L、6 mmol/L Ca^{2+} 处理的根冠比分别为 0.52、0.69 和 0.71。说明玉米幼苗地上部更容易受到盐害, 外源钙明显促进根系生长, 盐胁迫下根冠比增加有利于增加作物的耐盐性。

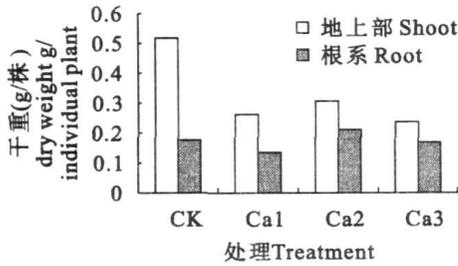


图 1 不同浓度 Ca^{2+} 对 NaCl 胁迫下玉米幼苗生长影响

Fig. 1 Effect of concentration of Ca^{2+} on the growth of maize seedlings under NaCl stress

2.2 钙对 NaCl 胁迫下玉米幼苗叶绿素含量的影响

NaCl 胁迫玉米幼苗叶片中叶绿素 a、叶绿素 b 含量均明显下降(图 2)。盐胁迫导致了植物叶片叶绿素的合成减少, 而降解增加, 进而影响叶片制造光合营养的能力, 植株生长缓慢。增加营养液中 Ca^{2+} 浓度后叶绿素含量有所增加。盐胁迫下 2 mmol/L Ca^{2+} 处理的叶绿素 a、叶绿素 b 分别为对照的 0.62 倍、0.66 倍。当营养液中 Ca^{2+} 浓度提高到 4 mmol/L 时叶绿素 a、叶绿素 b 分别为对照的 0.74、0.79 倍, 当 Ca^{2+} 浓度为 6 mmol/L 时叶绿素 a、叶绿素 b 相对于 4 mmol/L Ca^{2+} 处理略有降低, 分别为对照的 0.72 倍、0.78 倍。

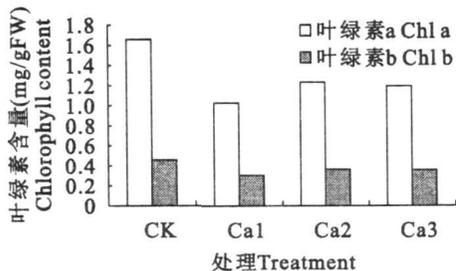


图 2 不同浓度 Ca^{2+} 对 NaCl 胁迫下玉米幼苗叶绿素含量的影响

Fig. 2 Effect of concentration of Ca^{2+} on chlorophyll content of maize seedlings under NaCl stress

2.3 钙对 NaCl 胁迫下玉米幼苗叶片细胞膜透性的影响

相对电导率是反应细胞膜透性的重要指标, NaCl 胁迫下玉米幼苗叶片的相对电导率明显增加

(图 3), Ca^{2+} 为 2 mmol/L 处理的相对电导率为对照的 2.46 倍, 当 Ca^{2+} 为 4 mmol/L 和 6 mmol/L 时相对电导率分别为对照的 1.71 和 2.12 倍, 说明增加溶液中 Ca^{2+} 处理抑制了细胞电解质的渗漏。

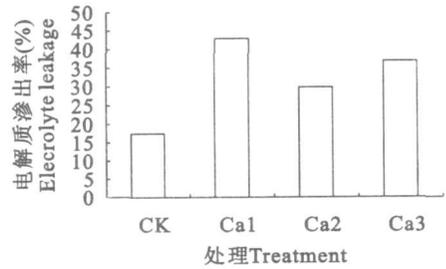


图 3 不同浓度 Ca^{2+} 对 NaCl 胁迫下玉米幼苗细胞膜透性的影响

Fig. 3 Effect of concentration of Ca^{2+} on cell membrane permeability of maize seedlings under NaCl stress

2.4 钙对 NaCl 胁迫下玉米幼苗游离氨基酸含量的影响

NaCl 胁迫可以显著提高叶片中的游离氨基酸含量(图 4), 与对照相比, 2 mmol/L Ca^{2+} 处理叶片中的游离氨基酸含量为对照的 1.71 倍, 根系中的变化不大。在 NaCl 胁迫下增加营养液中 Ca^{2+} , 根系和叶片中的游离氨基酸含量明显升高, 与对照相比, 4 mmol/L Ca^{2+} 处理的叶片中游离氨基酸含量为对照的 1.81 倍, 而根系中游离氨基酸含量为对照的 1.82 倍。6 mmol/L Ca^{2+} 处理的叶片中游离氨基酸含量有所下降, 为对照的 1.05 倍, 根系中为对照的 1.29 倍。

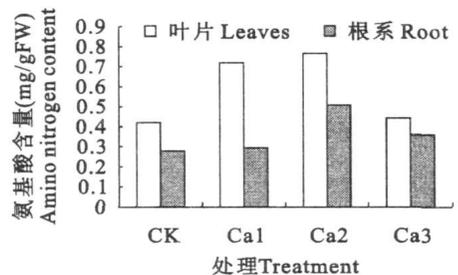


图 4 不同浓度 Ca^{2+} 对 NaCl 胁迫下玉米幼苗游离氨基酸含量的影响

Fig. 4 Effect of concentration of Ca^{2+} on free amino acids content of maize seedlings under NaCl stress

2.5 钙对 NaCl 胁迫下玉米幼苗可溶性蛋白含量的影响

从图 5 可以看出, NaCl 胁迫使玉米幼苗叶片和根系中的可溶性蛋白含量显著升高, 与对照相比, 盐胁迫下 2 mmol/L Ca^{2+} 处理叶片和根系中的可溶性蛋白含量增加, 分别为对照的 1.40 倍和 1.38 倍, 加钙处理后叶片中的可溶性蛋白含量下降, 4 mmol/L

和 6 mmol/L Ca²⁺ 处理可溶性蛋白含量分别为对照的 0.97 倍和 0.92 倍,随着 Ca²⁺ 含量的增加根系中可溶性蛋白变化表现为先升高后降低的趋势,4 mmol/L 和 6 mmol/L Ca²⁺ 处理根系可溶性蛋白含量分别为对照的 1.64 倍和 1.13 倍。

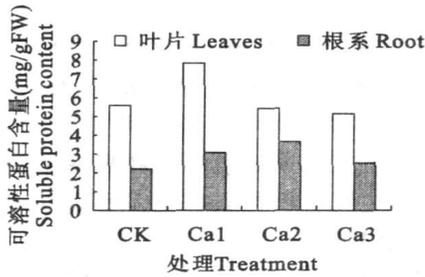


图5 不同浓度 Ca²⁺ 对 NaCl 胁迫下玉米幼苗可溶性蛋白含量的影响

Fig.5 Effect of concentration of Ca²⁺ on soluble protein content of maize seedlings under NaCl stress

2.6 钙对 NaCl 胁迫下玉米幼苗 SOD 活性的影响

NaCl 胁迫下玉米幼苗叶片和根系中 SOD 活性明显降低(图6)。盐胁迫明显抑制了玉米幼苗叶片的 SOD 活性,随着 Ca²⁺ 含量的增加叶片中 SOD 活性先升高后降低,2 mmol/L、4 mmol/L 和 6 mmol/L Ca²⁺ 处理叶片 SOD 活性分别为对照的 0.72、0.94 倍和 0.81 倍。无论是正常处理还是盐胁迫处理,根系中的 SOD 活性始终低于叶片,NaCl 胁迫对根系中 SOD 活性影响大于对叶片的影响,2 mmol/L、4 mmol/L 和 6 mmol/L Ca²⁺ 处理根系中 SOD 活性分别为对照的 0.50 倍、0.75 倍、0.54 倍,可见 NaCl 胁迫对根系中 SOD 活性抑制程度大于对叶片的抑制。叶片和根系中均以 4 mmol/L Ca²⁺ 处理效果较好,而 Ca²⁺ 过高(6 mmol/L)则 SOD 活性有所降低。

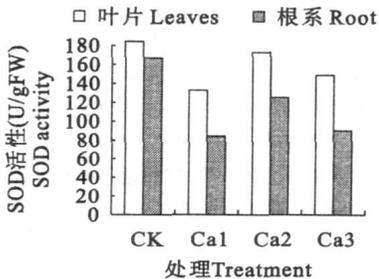


图6 不同浓度 Ca²⁺ 对 NaCl 胁迫下玉米幼苗 SOD 活性的影响

Fig.6 Effect of concentration of Ca²⁺ on SOD active of maize seedlings under NaCl stress

2.7 钙对 NaCl 胁迫下玉米幼苗 CAT 活性的影响

植物体内的过氧化氢酶(CAT)可以清除 H₂O₂, 是植物体内重要的活性氧清除系统之一。如图7所示,NaCl 胁迫使玉米幼苗叶片和根系中的 CAT 活

性增强,随着营养液中的 Ca²⁺ 增加,叶片和根系中的 CAT 活性变化趋势不同,NaCl 胁迫下叶片中的 CAT 活性随着 Ca²⁺ 浓度增加而下降,2 mmol/L、4 mmol/L 和 6 mmol/L Ca²⁺ 处理的 CAT 活性分别为对照的 1.34 倍、1.16 倍、1.01 倍。NaCl 胁迫下根系中的 CAT 活性随着 Ca²⁺ 浓度增加先增加后降低,2 mmol/L、4 mmol/L 和 6 mmol/L Ca²⁺ 处理的 CAT 活性分别为对照的 4.03 倍、6.50 倍、4.39 倍。

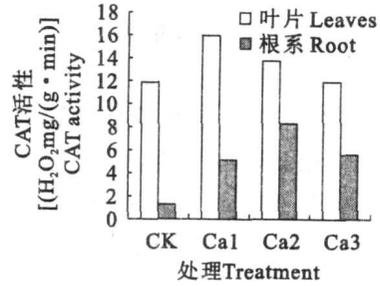


图7 不同浓度 Ca²⁺ 对 NaCl 胁迫下玉米幼苗 CAT 活性的影响

Fig.7 Effect of concentration of Ca²⁺ on CAT active of maize seedlings under NaCl stress

2.8 钙对 NaCl 胁迫下玉米幼苗 POD 活性的影响

POD 是植物体内重要的活性氧清除酶,对减少活性氧积累,清除 MDA 抵御膜脂过氧化和维护膜结构的完整性有重要作用^[9]。从图8可以看出与 SOD 和 CAT 不同,玉米幼苗根系中 POD 活性明显高于叶片。对照处理根系中 POD 活性为叶片中的 3.7 倍,2 mmol/L、4 mmol/L 和 6 mmol/L Ca²⁺ 处理根系中 POD 活性分别为叶片的 4.5 倍、4.4 倍和 4.6 倍。NaCl 胁迫使玉米幼苗叶片中 POD 活性增加,适量加钙处理后叶片中 POD 活性增加,过量的钙则使其活性降低。2 mmol/L、4 mmol/L 和 6 mmol/L Ca²⁺ 处理叶片 POD 活性分别为对照的 1.05 倍、1.11 倍和 0.94 倍。NaCl 胁迫使根系中的 POD 活性增加,2 mmol/L 和 4 mmol/L Ca²⁺ 处理根系中 POD 活性分别为对照的 1.27 倍、1.33 倍。6 mmol/L Ca²⁺ 处理根系中 POD 活性为对照的 1.17 倍。

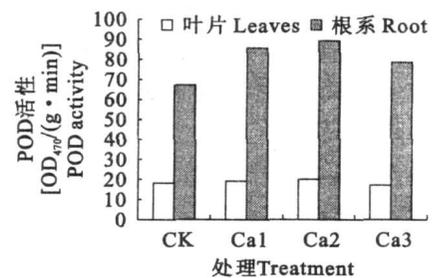


图8 不同浓度 Ca²⁺ 对 NaCl 胁迫下玉米幼苗 POD 活性的影响

Fig.8 Effect of concentration of Ca²⁺ on POD active of maize seedlings under NaCl stress

3 讨论

盐分对非盐生植物最显著的效应就是阻止生长^[10]。在本试验中, NaCl 胁迫使玉米幼苗的生长明显受到抑制, 且对地上部的抑制程度大于对根系的抑制, 增加 Ca^{2+} 浓度可以缓解这种抑制作用, 增加地上部和根系的干物质积累, Ca^{2+} 对根系的盐害缓解与生长的促进作用大于叶片, 增加 Ca^{2+} 浓度使根冠比增加, 从而增加了植物对逆境的适应能力。

盐胁迫下作物质膜渗漏的增加是盐害的重要特征之一。本试验结果表明钙能降低质膜透性, 缓解盐害, 原因可能是 Ca^{2+} 与膜磷脂的极性头部相连接, 发生交联作用, 从而使得膜脂上的蛋白质和磷脂结合紧密, 降低膜透性^[11]。另外有研究表明钙可以通过防止膜脂过氧化作用降低质膜透性, 进而维持细胞内的区域化, 从而保证细胞内的各种代谢正常进行, 提高植物细胞的抗盐能力^[12]。

盐胁迫下自由基对叶绿体有直接的破坏作用, 膜脂过氧化中间产物和终产物 MDA 也会加速叶绿体降低, 导致光合色素含量下降。另外过量的 Cl^- 渗入细胞后, 使原生质凝聚, 叶绿素破坏^[10]。本研究表明玉米幼苗的叶绿素含量对 NaCl 胁迫反应敏感。NaCl 胁迫下叶绿素 a、叶绿素 b 含量均明显下降。增加 Ca^{2+} 浓度可以抑制叶绿素含量的下降。表明一定量浓度的 Ca^{2+} 有助于保护叶绿体膜, 保持其结构的稳定性, 维持叶片较高的叶绿素含量, 从而对维持盐胁迫下玉米较高的光合效率有一定促进作用。

目前, 尽管人们对植物在逆境条件下植物体内游离氨基酸来源的机制不太清楚, 但游离氨基酸与氮代谢密切相关, 逆境胁迫可以导致游离氨基酸含量增加^[13]。本研究中 NaCl 胁迫下叶片和根系中的游离氨基酸含量增加, 增加营养液中 Ca^{2+} 含量, 叶片中游离氨基酸含量增加, 但这种增加作用在根系中表现更明显; 无论是叶片还是根系均以 Ca^{2+} 浓度为 4 mmol/L 最高。目前认为, 胁迫条件下产生的游离氨基酸可能起着维持细胞水势、消除物质毒害和储存氮素的功能^[14]。可溶性蛋白含量变化与游离氨基酸有所不同, 叶片中可溶性蛋白含量随 Ca^{2+} 浓度的增加而降低, 根系则以 Ca^{2+} 浓度为 4 mmol/L 时最高。游离氨基酸和可溶性蛋白的这种变化与钙在氮的合成与代谢中所起的作用有关。这种变化是由于加钙处理后促进或抑制氮的吸收、同化、转运利用有待于进一步研究。

盐胁迫下, 植物体内活性氧的积累是导致盐害的主要机理之一^[15]。SOD、CAT、POD 等保护酶类

在植物体内协同作用, 在逆境胁迫中清除过量的活性氧, 维持活性氧的代谢平衡、保护膜结构, 从而使植物在一定程度上忍耐、减缓或抵御逆境胁迫伤害^[16]。SOD 的主要功能为催化超氧阴离子发生歧化反应, 从而消除其毒害作用, 而歧化反应过程中所产生的 H_2O_2 则由 CAT、POD 等来清除^[17]。本试验中, 并非钙离子浓度越高越好, 以 Ca^{2+} 浓度为 4 mmol/L 处理叶片和根系中 SOD 活性最高, 其中叶片恢复到接近对照水平。这表明适量的钙能有效提高 NaCl 胁迫下玉米幼苗叶片和根系中 SOD 酶的活性, 减少活性氧物质的累积量从而降低植物细胞内活性氧自由基对质膜和膜脂过氧化作用的伤害, 维持细胞膜的稳定性和完整性。钙对提高根系中 CAT 和 POD 活性的作用大于叶片中的作用, 盐胁迫下玉米幼苗根系中 CAT、POD 活性均以 4 mmol/L Ca^{2+} 处理活性最强。适量增加 Ca^{2+} 浓度可在一定程度上提高盐胁迫下植株保护酶活性, Ca^{2+} 浓度过高则表现出抑制作用, 这可能是高浓度的 Ca^{2+} 对植物组织细胞形成了新的离子伤害, 使盐害加重, 其具体原因还有待于进一步的研究。这表明单纯的钙处理在调控修复植物逆境胁迫伤害中的能力有限。在盐胁迫下虽然根中的 SOD 活性受到明显抑制、但 CAT 和 POD 活性明显升高, 且这种升高的幅度明显大于叶片, 这可能是地上部较根系更容易受到盐害的原因之一。

参考文献:

- [1] 张燕, 方力, 李天飞, 等. 钙对低温胁迫的烟草幼苗某些酶活性的影响[J]. 植物学通报, 2002, 19(3): 342-347.
- [2] 王利军, 李家承, 刘允芬, 等. 高温干旱胁迫下水杨酸和钙对柑橘光合作用和叶绿素荧光的影响[J]. 中国农学通报, 2003, 19(6): 185-189.
- [3] 李青云, 葛会波, 胡淑明, 等. 盐胁迫下钙对草莓叶片脂肪酸含量及组成的影响[J]. 河北农业大学学报, 2004, 27(6): 56-59.
- [4] 杨根平, 荆家海, 王韶唐, 等. 钙在水分胁迫植物体内作用的初步研究[J]. 西北植物学报, 1992, 12(5): 13-17.
- [5] 李其星, 唐新莲, 沈方科, 等. 铝胁迫下外源 Ca^{2+} 对黑麦幼根膜脂过氧化及保护酶活性的影响[J]. 广西农业科学, 2006, 37(3): 249-252.
- [6] 张宪政. 作物生理研究法[M]. 北京: 农业出版社, 1992.
- [7] 邹琦. 植物生理生化实验指导[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000.
- [8] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2003.
- [9] 王代军. 温度胁迫下几种冷季型草坪草抗性机制的研究[J]. 草业学报, 1998, 7(1): 75-80.
- [10] 刘祖祺, 张石城. 植物抗性生理学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1994.

- [11] 蔡妙珍, 罗安程, 林咸永, 等. Ca^{2+} 对过量 Fe^{2+} 胁迫下水稻保护酶活性及膜脂过氧化的影响[J]. 作物学报, 2003, 29(3): 447-451.
- [12] 赵可夫. 作物耐盐机理研究进展及提高作物抗盐性的对策[J]. 植物学通报, 1997, 14(增刊): 235-240.
- [13] 曹让, 梁宗锁, 武永军. 分根交替渗透胁迫下玉米幼苗叶片中游离氨基酸的变化[J]. 干旱地区农业研究, 2004, 22(1): 49-54.
- [14] Shen L M, David M, Joyce G F. Influence of drought on the concentration and distribution of 2, 4-diamino-butyric acid and other free amino acids in tissues of flatpea (*Lathyrus sylvestris* L.)[J]. *Enviro Expt Bot*, 1990, 30: 497-504.
- [15] Gossett D R, Millhollon E P, Lucas M C. Antioxidant response to NaCl in salt-tolerant and salt-sensitive cultivars of cotton[J]. *Crop Science*, 1994, 34: 706-714.
- [16] Liang Y C, Chen Q, Liu Q, et al. Exogenous silicon (si) increase antioxidant enzyme activity and reduce lipid peroxidation in roots of salt-stressed barley (*Hordeum vulgare* L.)[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2003, 160: 1157-1164.
- [17] 陈华新, 李卫军, 安沙舟, 等. 钙对 NaCl 胁迫下杂交酸模幼苗叶片光抑制的减轻作用[J]. 植物生理与分子生物学学报, 2003, 29(5): 449-454.

Effect of calcium on protective enzymes activeness and physiological characteristics of maize seedlings under salt stress

WANG Yufeng, WANG Qing-xiang, SHANG Li-wei

(College of Agronomy, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110161, China)

Abstract: A solution culture was conducted to study the effect of Ca^{2+} on the growth of maize seedlings, chlorophyll content, free amino acids content, the activeness of several protective enzymes and other physiological characteristics. The results show that the Ca^{2+} concentration at 4 mmol/L could obviously increase plant growth and restrain the decrease of chlorophyll content reduced permeability of cell membrane, and enhance SOD and POD activity in leaves and roots. With the increase of Ca^{2+} concentration, the CAT activeness in roots was increased but that in leaves was decreased. The free amino acids and soluble protein content in roots increased in terms of 2~4 mmol/L of Ca^{2+} concentration but decreased in that of 6 mmol/L. Soluble protein in leaves was decreased with the increase of Ca^{2+} concentration. The above results suggested that the appropriate Ca^{2+} supply can enhance the salt tolerance in maize growing in salt stress.

Keywords: calcium; salt stress; maize; protective enzymes activeness; membrane permeability

(上接第 114 页)

Molecular cloning of starch synthase II partial sequences and construction of its antisense and RNAi expression vectors

KANG Guo-zhang¹, YUE Cai-feng¹, GUAN Chun-yun^{1,2}, HAN Qiao-xia¹,
GUO Tian-cai¹, ZHU Yun-ji¹, WANG Yong-hua¹

(1. National Engineering Research Centre for Wheat, Henan Agricultural university, Zhengzhou 450002;

2. Agronomy of Institute, Hunan Agricultural University, Changsha 410012, China)

Abstract: Starch synthase II (SS II) partial cDNA sequences (600bp) (GenBank No. EF221761) from grains of common wheat (*Triticum aestivum*, Yujiao 2 cultivar) was amplified by RT-PCR. The result demonstrated that the cloned SS II gene sequences were 99% identified with the reported SS II genes in GenBank previously. In addition, its antisense expression vector was constructed with pCMBIA1301, and RNAi vector was also constructed with pFGC5941. These constructed vectors will provide a good background to study the function of SS II on biosynthesis of starch in wheat plants.

Key words: wheat (*Triticum aestivum*); starch synthase II gene; expression vectors