

外源 Ca^{2+} 和 H_2O_2 对 NaCl 胁迫下枸杞离体叶片叶绿体中活性氧代谢的影响研究

毛桂莲, 付晓辉
(宁夏大学生命科学学院, 宁夏 银川 750021)

摘要: 以枸杞离体叶片为材料, 研究 NaCl 胁迫下外源 Ca^{2+} 和 H_2O_2 对枸杞离体叶片叶绿体中 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 产生速率、丙二醛(MDA)含量及抗坏血酸过氧化物酶(APX)、过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)活性的影响。结果表明: 在 NaCl 胁迫下 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 产生速率呈上升趋势, 丙二醛含量增大, 保护酶 APX、CAT、POD 活性较对照升高。在 NaCl 胁迫下, 加入外源 Ca^{2+} 和 H_2O_2 时丙二醛(MDA)含量和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 产生速率较单纯 NaCl 胁迫下降低; 保护酶 APX、CAT、POD 活性较单纯 NaCl 胁迫下升高。表明外源 Ca^{2+} 和 H_2O_2 在一定程度上可以缓解 NaCl 胁迫对植物体造成的伤害。

关键词: 枸杞; 外源 Ca^{2+} 和 H_2O_2 ; NaCl 胁迫; 活性氧代谢
中图分类号: Q945.78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7601(2009)05-0191-05

盐渍化是影响全球粮食产量及植物生长的最广泛的土壤危害, 制约着近 40% 世界可耕地的生产。叶绿体不仅是植物光合作用的场所, 还是植物体产生活性氧的一个重要细胞器, 也是细胞中对盐最敏感的细胞器。盐胁迫能诱导植物叶绿体活性氧的积累, 引发氧化胁迫^[1~3], 为了避免活性氧过量产生及其产生的伤害作用, 植物特别是耐盐植物在长期的进化过程中形成了一套较为精细的去除、中和及捕获活性氧的抗氧化防御体系, 主要包括抗氧化物酶系和非酶系的抗氧化剂类^[4]。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)等是植物清除活性氧的主要抗氧化酶类, 能够清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、 H_2O_2 和 $\cdot\text{OH}$ 等活性氧, 减轻盐对植物体的损伤。

钙作为植物生长发育的营养素之一, 在植物抗逆生理中起着重要作用。已有研究证明^[4], 钙与多种植物的抗逆性关系密切, 一般认为钙对植物生物膜的结构与功能有重要作用。

活性氧是植物正常代谢的产物, 它们普遍存在于植物体内。越来越多的资料表明活性氧对植物具有双重性, 一方面高浓度的活性氧是有害的, 另一方面低浓度的活性氧可能是有利的和必需的, 如 H_2O_2 的积累能够激活 Ca^{2+} 通道活性, 从而启动基因表达, 引起一系列生理变化, 进而提高植物对逆境的适应性。枸杞抗性生理已有一些研究报道, 但有关钙和 H_2O_2 、尤其是有关细胞器(叶绿体)的研究较少,

本实验以枸杞离体叶片为材料, 研究外源 Ca^{2+} 和 H_2O_2 对 NaCl 胁迫下枸杞离体叶片叶绿体中活性氧的积累与其保护酶活性的影响, 以期从自由基的产生及清除角度探讨 Ca^{2+} 和 H_2O_2 对枸杞在逆境下缓解作用。为枸杞整体抗盐机理的研究奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料培养及处理

试验于 2008 年 3 月至 4 月在宁夏大学生命科学学院基础生物学实验室中进行, 试验材料来自植物园温室宁杞 1 号。叶片用打孔器打成小圆片, 然后按设计处理, 在同一时间浸泡在不同条件下的培养皿中, 每一个培养皿中浸泡 100 片。试验处理如下: CK NaCl (0 mmol/L)、 NaCl (100 mmol/L)、 H_2O_2 (10 $\mu\text{mol/L}$) + NaCl (100 mmol/L)、 Ca^{2+} (20 mmol/L) + NaCl (100 mmol/L)、 H_2O_2 (10 $\mu\text{mol/L}$) + Ca^{2+} (20 mmol/L) + NaCl (100 mmol/L)。胁迫 1 d 后取样进行各项的测定。

1.2 测定项目

1.2.1 叶绿体制备方法 参照郝再彬^[5]的方法提取叶绿体略加改动。将枸杞叶片剪碎加入 3 倍 (W/V) 的预冷试剂 1 (含 0.4 mol/L 蔗糖、0.05 mol/L Tris、0.002 mol/L EDTA 和质量分数为 0.1% 巯基乙醇, 用 HCl 调至 pH=7.8) 研磨成匀浆, 用 4 层纱布

收稿日期: 2009-03-16
基金项目: 宁夏回族自治区自然科学基金(NZ0809); 宁夏大学科研基金(ZR200733)
作者简介: 毛桂莲(1974—), 女, 宁夏中宁人, 硕士, 主要从事教学和抗性生理研究。

过滤,滤液在 0℃ 以下 1 000 r/min 离心 2 min, 弃去沉淀, 上清液在 0℃ 以下 4 000 r/min 离心 15 min, 弃去上层悬浮液, 所得沉淀为叶绿体。再向沉淀部分加入大约 10 ml 的预冷试剂 1 在 0℃ 以下 4 000 r/min 离心 15 min, 收集沉淀, 再加入 10 ml 预冷试剂 2(内含 0.05 mol/L 的 PBS, 5 mmol/L 的 EDTA, pH7.8) 悬浮叶绿体, 用于以下指标的测定。

1.2.2 $O_2^{\cdot -}$ 产生速率的测定 取上述悬浮液 0.5 ml, 采用羟胺反应法。羟胺反应产物 NO_2^- 与对氨基苯磺酸及 α -萘胺反应生成粉红色的偶氮染料, 在 530 nm 处比色, 由 $[NO_2^-]$ 浓度的 2 倍得 $[O_2^{\cdot -}]$, 记录时间和样品蛋白质含量, 即得样品产生 $O_2^{\cdot -}$ 的产生速率^[6] $[nmol/(min \cdot g \text{ FW})]$ 。

1.2.3 丙二醛(MDA)含量的测定 采用硫代巴比妥酸(TBA)法^[7], 含量用 mmol/g 表示。

1.2.4 抗坏血酸过氧化物酶(APX)活性的测定 参照邹琦《植物生理生化实验指导》^[7] 酶活性可用每克鲜重每小时氧化 AsA 的微摩尔数 $\mu mol/(g \cdot h)$ 表示。

1.2.5 过氧化物酶(POD)活性测定 参照高俊凤《植物生理生化实验指导》^[8]。用愈创木酚法进行测定。

1.2.6 过氧化氢酶(CAT)活性测定 参照高俊凤《植物生理学实验指导》^[8]。用紫外分光光度法进行测定。

2 结果与分析

2.1 外源 Ca^{2+} 和 H_2O_2 对盐胁迫下枸杞离体叶片叶绿体中活性氧产生的影响

活性氧伤害植物的机理之一在于参与启动膜脂过氧化或脱脂作用^[9], 从而破坏膜结构, 引起膜脂过氧化作用。由图 1 和图 2 可知, 在 NaCl 胁迫下, 枸杞离体叶片中 $O_2^{\cdot -}$ 的产生速率总体呈升高趋势; 当加入 $CaCl_2$ 后, $O_2^{\cdot -}$ 的产生速率有所降低, 加入 $CaCl_2$ 与只加 NaCl 时相比 $O_2^{\cdot -}$ 产生速率降低了 98.3 $nmol/(min \cdot g \text{ FW})$ 。表明在盐胁迫时外源钙能减少活性氧物质的产生, 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。当加入外源 H_2O_2 时枸杞叶片叶绿体中的 $O_2^{\cdot -}$ 产生速率较盐胁迫下时降低了 83.5 $nmol/(min \cdot g \text{ FW})$; 同时加入 H_2O_2 和 Ca^{2+} 时较盐胁迫下 $O_2^{\cdot -}$ 产生速率降低了 96.5 $nmol/(min \cdot g \text{ FW})$, 由此推断, 在盐胁迫时外源 H_2O_2 能减少活性氧物质的产生。

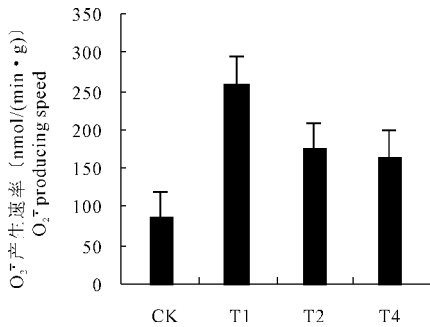


图 1 外源 H_2O_2 对 NaCl 胁迫下枸杞离体叶片叶绿体中 $O_2^{\cdot -}$ 产生速率的影响

Fig.1 Effects of exogenous H_2O_2 on $O_2^{\cdot -}$ production rate of gouqi chloroplast under NaCl stress

图中 T1: NaCl; T2: NaCl + H_2O_2 ; T3: NaCl + $CaCl_2$; T4: NaCl + H_2O_2 + $CaCl_2$ 。下图同。

In Fig.1 and Fig.2, T1: NaCl; T2: NaCl + H_2O_2 ; T3: NaCl + $CaCl_2$; T4: NaCl + H_2O_2 + $CaCl_2$. They are the same in the following figures.

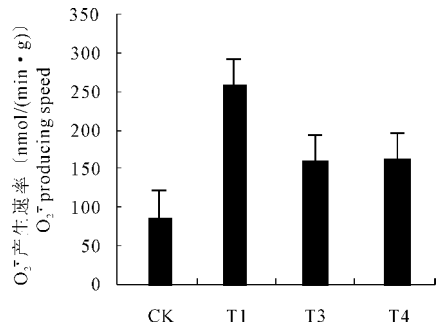


图 2 外源 Ca^{2+} 对 NaCl 胁迫下枸杞离体叶叶绿体中 $O_2^{\cdot -}$ 产生速率的影响

Fig.2 Effects of exogenous Ca^{2+} on $O_2^{\cdot -}$ production rate of gouqi chloroplast under NaCl stress

2.2 外源 Ca^{2+} 和 H_2O_2 对盐胁迫下枸杞离体叶片叶绿体中丙二醛 MDA 含量的影响

MDA 是膜脂氧化的主要产物之一, 其积累量反映过氧化程度的高低, 由图 3 和图 4 可以看出, 在盐胁迫下 MDA 含量较 CK 高出 0.67 $mmol/g \text{ FW}$ 。这可能是 NaCl 胁迫通过抑制、清除内源活性氧酶的活性, 导致活性氧的积累和膜脂过氧化加剧, MDA 含量增加, 致使细胞膜受到伤害。在图 3 中可以看出, 当加入 NaCl 后再加入 H_2O_2 , MDA 含量较盐胁迫

下降低了 0.597 $mmol/g \text{ FW}$; 当在 NaCl 胁迫下加入外源 Ca^{2+} 丙二醛 MDA 含量较 NaCl 胁迫下下降了 0.54 $mmol/g \text{ FW}$, 在 NaCl 胁迫下同时加入外源 H_2O_2 和 Ca^{2+} 时 MDA 较仅 NaCl 胁迫降低了 0.577 $mmol/g \text{ FW}$, 由此说明外源 H_2O_2 和 Ca^{2+} 在一定程度上可缓解 NaCl 胁迫对植物的伤害。

2.3 外源 Ca^{2+} 和 H_2O_2 对盐胁迫下枸杞离体叶片叶绿体中 POD 活性的影响

POD 是清除超氧自由基、过氧化物以及阻止或

减少羟基自由基形成等方面的主要酶类,也是植物体内一种重要的抗氧化酶,它可以清除膜脂过氧化作用的最终产物。由图 5、图 6 可知在 NaCl 胁迫下,枸杞离体叶片叶绿体中该酶的活性与 CK 相比有所提高,说明当植物在 NaCl 胁迫下能激发保护酶活性,以保护植物免受伤害,由图 6 可知在 NaCl 胁迫下加入 CaCl_2 与只加入 NaCl 相比 POD 活性升高了

40.54 U/g FW;在 NaCl 胁迫下加入 H_2O_2 与只加入 NaCl 相比 POD 活性升高了 28.84 U/g FW(图 5),从图 5 和图 6 可以发现同时加入 H_2O_2 和 CaCl_2 后 POD 较只在 NaCl 胁迫 POD 活性升高了 23.94 U/g FW。由此推断,钙和 H_2O_2 对 POD 都起作用,可以提高保护酶的活性,减轻活性氧自由基对膜脂的毒害,从而提高植物的耐盐性和生长能力。

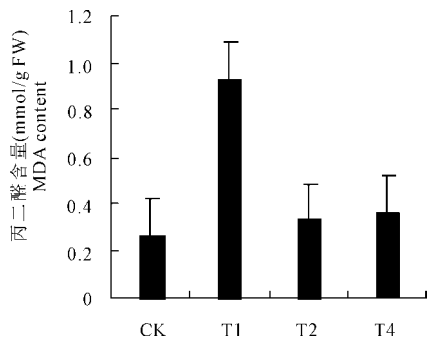


图 3 外源 H_2O_2 对枸杞离体叶片叶绿体中 MDA 含量的影响

Fig. 3 Effects of exogenous H_2O_2 on MDA content of gouqi chloroplast under NaCl stress

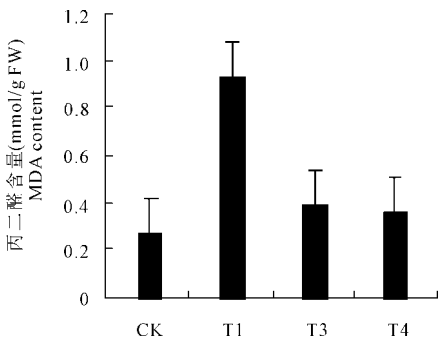


图 4 外源 Ca^{2+} 对枸杞叶片叶绿体中 MDA 含量的影响

Fig. 4 Effects of exogenous Ca^{2+} on MDA content of gouqi chloroplast under NaCl stress

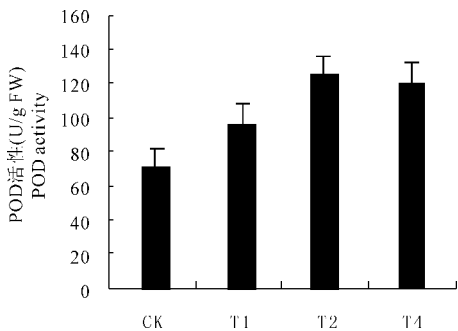


图 5 外源 H_2O_2 对枸杞离体叶片叶绿体中 POD 活性的影响

Fig. 5 Effects of exogenous H_2O_2 on POD activity of gouqi chloroplast under NaCl stress

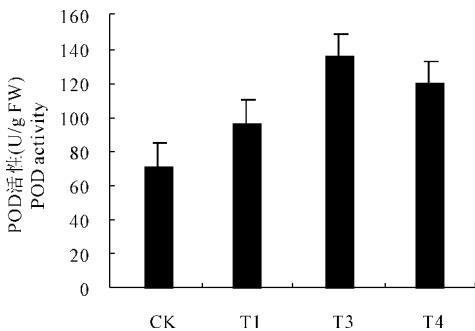


图 6 外源 Ca^{2+} 对枸杞叶片叶绿体中 POD 活性的影响

Fig. 6 Effects of exogenous Ca^{2+} on POD activity of gouqi chloroplast under NaCl stress

2.4 外源 Ca^{2+} 和 H_2O_2 对盐胁迫下枸杞离体叶片叶绿体中 CAT 活性的影响

CAT 是植物体内重要的活性氧清除系统之一,它可以清除植物在代谢过程中所产生的 HO^- 。由图 7 和图 8 可知,在 NaCl 胁迫下,枸杞离体叶片叶绿体中 CAT 活性与 CK 相比都有所提高。NaCl 胁迫下加入 CaCl_2 与只加 NaCl 相比, CAT 活性升高了 58.8%;在 NaCl 胁迫下加入 H_2O_2 与 NaCl 相比, CAT 活性升高了 16.9%;NaCl 胁迫下同时加入 H_2O_2 和 CaCl_2 后 CAT 活性与只 NaCl 胁迫比较升高了 39%。

2.5 外源 Ca^{2+} 和 H_2O_2 对盐胁迫下枸杞离体叶片叶绿体中 APX 活性的影响

抗坏血酸过氧化物酶(APX)是以抗坏血酸为电

子供体,在某些细胞器中,当无过氧化氢酶存在时,抗坏血酸-谷胱甘肽循环(AsA-GSH)就会起作用。一般认为,APX 是叶绿体中清除 H_2O_2 的主要酶。由图 9、图 10 可知在 NaCl 胁迫下,APX 活性较 CK 升高了 $0.63 \mu\text{molAsA}/(\text{min} \cdot \text{g})$ 。当在 NaCl 胁迫下加入 H_2O_2 后 APX 的活性与只在 NaCl 胁迫下升高了 $0.37 \mu\text{molAsA}/(\text{min} \cdot \text{g})$ 。在 NaCl 胁迫下加入外源 Ca^{2+} 后 APX 活性与 NaCl 胁迫比升高了 $0.39 \mu\text{molAsA}/(\text{min} \cdot \text{g})$ 。同时加入外源 Ca^{2+} 和 H_2O_2 时 APX 活性较只在 NaCl 胁迫下升高了 $0.45 \mu\text{molAsA}/(\text{min} \cdot \text{g})$ 。说明 APX 可以消除体内的活性氧;同时外源 Ca^{2+} 和 H_2O_2 可以增强枸杞叶离体叶片叶绿体中 APX 活性。

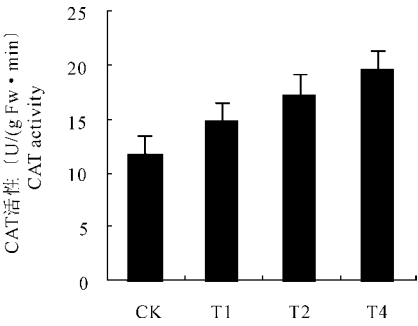


图 7 外源 H₂O₂ 对枸杞离体叶片叶绿体中 CAT 活性的影响

Fig.7 Effects of exogenous H₂O₂ on CAT activity of gouqi chloroplast under NaCl stress

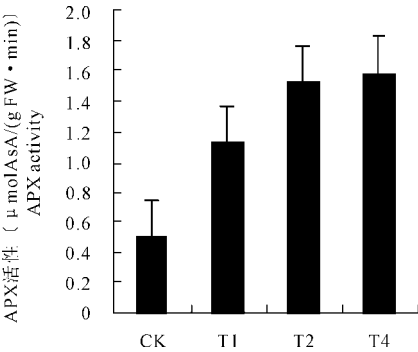


图 9 外源 H₂O₂ 枸杞离体叶片叶绿体中 APX 活性的影响

Fig.9 Effects of exogenous H₂O₂ on APX activity of gouqi chloroplast under NaCl stress

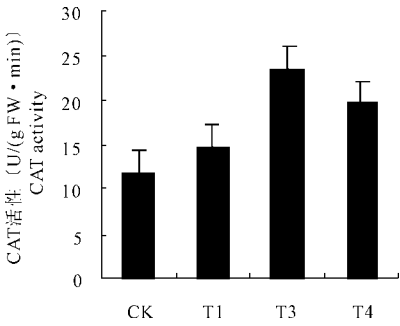


图 8 外源 Ca²⁺ 对枸杞叶片叶绿体中 CAT 活性的影响

Fig.8 Effects of exogenous Ca²⁺ on CAT activity of gouqi chloroplast under NaCl stress

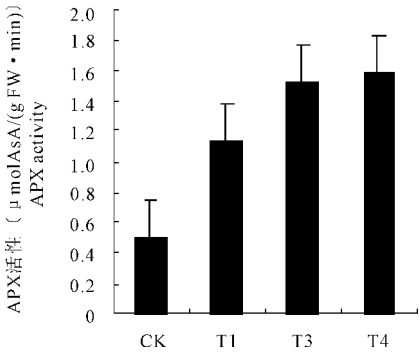


图 10 外源 Ca²⁺ 对枸杞叶片叶绿体中 APX 活性的影响

Fig.10 Effects of exogenous Ca²⁺ on APX activity of gouqi chloroplast under NaCl stress

3 讨论

叶绿体是植物光合作用的场所,也是细胞中对盐最敏感的细胞器^[10]。正常情况下,叶绿体内活性氧的产生和清除处于动态平衡。NaCl 胁迫下,叶片 Na⁺ 含量升高,引起气孔收缩,气孔导度降低,限制了 CO₂ 向叶绿体的输送,使叶绿体内 CO₂ 同化受抑制,而光合电子传递受影响相对较小^[11],因而更多电子传递到 O₂,导致 O₂^{·-} 形成,产生 H₂O₂,造成了叶绿体中 H₂O₂ 的积累,从而破坏叶绿体膜结构,本试验结果表明:NaCl 胁迫下,O₂^{·-} 产生速率呈现出明显的升高状态,MDA 含量也增加,当在 NaCl 胁迫下加入外源 Ca²⁺ 时 O₂^{·-} 产生速率、MDA 含量与只在 NaCl 胁迫下都有所下降。同时在加入 Ca²⁺ 时枸杞离体叶片叶绿体中抗氧化物酶 POD、CAT、APX 的活性都较只在 NaCl 胁迫下有所升高。由此说明当植物受到逆境胁迫时,细胞质游离 Ca²⁺ 启动基因表达,引起一系列生理变化,从而提高植物对逆境的适应性,同时 Ca²⁺ 在阻止膜脂过氧化反应及保护膜膜的完整性方面具有重要作用,它能增加膜的流动性,从而提高植物的抗逆能力^[12,13]。

长期以来,H₂O₂ 被认为跟其他活性氧·OH、O₂^{·-} 一样,是对植物细胞具有毒害作用的代谢产物,近年来 H₂O₂ 作为植物细胞内的一个信号分子受到人们关注,H₂O₂ 信号转导作用已经被越来越多的试验证实。在本试验中当加入外源 H₂O₂,枸杞离体叶片叶绿体中 O₂^{·-} 产生速率、MDA 含量与只在 NaCl 胁迫下都有所下降。同时在加入 H₂O₂ 枸杞离体叶片叶绿体中抗氧化物酶 POD、CAT、APX 活性都较只在 NaCl 胁迫下有所升高。说明 H₂O₂ 能通过细胞膜的水通道进行跨膜运输,而其他活性氧种类不能在细胞间运输^[14,15],这一重要的生理功能,可引起细胞内游离 Ca²⁺ 浓度增加,启动钙信号系统,从而缓解盐胁迫对植物的伤害。同时从本试验的结果也可以看出,在盐胁迫下同时加入 Ca²⁺ 和 H₂O₂ 与只加钙相比,其缓解能力有所降低,其原因还有待于进一步研究。

参考文献:

[1] 胡学剑,孙明高,夏 阳. NaCl 胁迫对无花果实与海棠膜质过氧化作用及保护酶活性的影响[J]. 西北植物学报,2005,25(5): 937-943.

[2] 毛桂莲,徐 兴.枸杞耐盐突变体的筛选及生理生化分析[J].西北植物学报,2005,25(2):275—280.

[3] 田 敏.植物细胞中的活性氧及其生理作用[J].植物学通讯,2005,41(2):235—241.

[4] ALLEN R D. Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants[J]. Plant Physiol, 1995,107:1049—1054.

[5] 郝再彬,苍 晶.植物生理实验[M].哈尔滨:哈尔滨工业大学出版社,2004:60—63.

[6] 王爱国,罗广华.植物产生 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 速率的测定[J].植物生理学通讯,1990,26(6):55—57.

[7] 邹 琦.植物生理生化实验指导[M].北京:中国农业出版社,1995:55—58.

[8] 高俊凤.植物生理学实验指导[M].北京:高等教育出版社,2000:145—148.

[9] 蒋明义,郭绍川.水分亏缺诱导的氧化胁迫和植物的抗氧化作用[J].植物生理学报,1996,22(2):144—150.

[10] Cheeseman J M. Mechanism of salinity tolerance in plants[J]. Plant Physiol, 1988,87:547—550.

[11] KE Y Q, PAN T G. Effect of salt stress on the ultrastructure of chloroplast and the activities of some protective enzymes in leaves of sweet potato[J]. Acta Phytophysiol Sin, 1999,25(3):229—233.

[12] Liu H T, Li B, Shang Z L, et al. Calmodulin is involved in heat shock signal transduction in wheat. Plant physiol, 2003,132:1186—1195.

[13] 高洪波,郭世荣,刘艳红,等.低氧胁迫下 Ca^{2+} 、 La^{3+} 和 EGTA 对网纹甜瓜幼苗活性氧代谢的影响[J].南京农业大学学报,2005,28(2):17—21.

[14] Neill S, Desikan R, Hancock J. Hydrogen peroxide signaling[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2002,(5):388—395.

[15] Karpinski S, Reynolds H, Karpinska B, et al. Systemic signaling and acclimation in response to excess excitation energy in Arabidopsis [J]. Science, 1999,284:654—657.

Effects of exogenous Ca^{2+} and H_2O_2 on active oxygen metabolism of isolated leaves of *Lycium barbarum* L. chloroplast under NaCl stress

MAO Gui-lian, FU Xiao-hui

(Life Science Academy of Ningxia College, Yinchuan, Ningxia 750021, China)

Abstract: In this study, the effects of exogenous calcium and H_2O_2 on the activity of oxygen ($\text{O}_2^{\cdot-}$) themalondialdehyde content (MDA), the activity of superoxide dismutase (SOD), the activity of peroxide (POD), catalase (CAT) and antiscorbutic acid peroxide enzyme (APX) were examined in *Lycium barbarum* L. chloroplast under NaCl stress. The results indicated that, under NaCl stress, $\text{O}_2^{\cdot-}$ production rate and MDA content generally increased, meanwhile CAT and POD activities were also higher than those of control. When adding exogenous Ca^{2+} and H_2O_2 under NaCl stress, MDA content and $\text{O}_2^{\cdot-}$ production rate were slower than those of NaCl stress, while protecting enzyme APX, CAT and POD activities increased compared to NaCl stress. It indicated that exogenous Ca^{2+} and H_2O_2 alleviated NaCl stress injury to plants to some extent.

Keywords: *Lycium barbarum* L.; exogenous Ca^{2+} and H_2O_2 ; NaCl stress; active oxygen metabolism

(上接第 190 页)

Activities of antioxidative enzymes of *Vicia faba* under PEG stress

WU Yong-jun¹, XIANG Yan¹, CAO Rang¹, WANG Pei-xian¹, LIANG Zong-suo^{1,2}

(1. College of Life Sciences, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2. Institute of Soil and Water Conservation, CAS, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Antioxidative defense system plays important roles in drought resistance of plants. In this study, we investigated the changes of SOD, POD and CAT of *Vicia faba* leaves using PEG treatment and leaf baken methods. The results showed that the activity of SOD, POD and CAT all increased during the course of PEG treatment. SOD activity decreased with increasing stress degree, POD and CAT activity showed no obvious tendency. In total, SOD has more tolerance among three antioxidative enzymes.

Keywords: *Vicia faba*; drought resistance; water stress; antioxidative enzymes