

# 水分胁迫下钙对大豆膜脂过氧化保护酶系统的影响

高向阳<sup>1</sup> 杨根平<sup>2</sup> 许志强<sup>1</sup> 徐凤彩<sup>1</sup>

(1 华南农业大学生物技术学院, 广州, 510642; 2 西北农业大学基础部)

**摘要** 用控制营养钙量的方法培养大豆幼苗,得到3种钙水平的大豆幼苗作材料,对水分胁迫下(-0.5 MPa PEG-6000),不同钙水平大豆叶片饱和持水,超氧化物歧化酶、过氧化物酶、过氧化氢酶及其同工酶进行研究,以期从膜脂过氧化的角度探讨钙在植物抗旱中的作用。

**关键词** 水分胁迫;钙;膜脂过氧化;保护酶系统

**中图分类号** Q 946.5

钙对植物生长发育的重要性早已众所周知,它不仅是植物的大量元素,更重要的是作为植物细胞内功能调节的第2信使,与钙调素(CaM)结合调节细胞内多种具重要功能的酶活性和细胞功能(Poovalah, 1987)。钙在植物抗逆性中亦具有重要作用,例如,钙与植物高温(Cooke, 1986)、低温(Arora, 1988)、盐害(Cramer, 1985)、紫外辐射(Murphy, 1988)等逆境及植物抗逆性均有一定关系,并认为钙具有稳定细胞膜系统和保持细胞完整性的作用。植物在干旱逆境胁迫下,细胞内自由基过多积累,启动了膜脂过氧化或膜脂脱氧化反应,破坏了膜结构和完整性,使其差向透性增加,离子渗漏,细胞代谢紊乱。但是,植物细胞中存在着能清除活性氧自由基的保护酶系,如超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)等,它们的协调作用能有效地清除 $O_2^-$ 、 $OH^-$ 、 $H_2O_2^-$ 等自由基,防御着膜脂过氧化,从而使细胞膜免受其伤害。目前已经有众多的报道,小麦(王宝山等,1987)、玉米(王振镒,1989)、苔藓(Dhindsa, 1981)、眉豆(Mukerjee, 1985)等均证明保护酶活性与植物的抗旱性有一定的关系。但是,在水分胁迫下,钙与植物细胞膜脂过氧化保护酶系统的关系报道甚少。本实验以大豆为材料,从自由基伤害对膜脂过氧化作用的影响来研究钙在植物抗旱中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

大豆(*Glycine max* C.V *Dong Xie Xuan*)由西北农业大学农一站提供。

### 1.2 材料培养与处理

大豆种子于水中浸种,在28℃恒温培养箱中催芽,待胚轴伸长至5cm,依次移种于1/2 Hoagland营养液(约1周)和完全Hoagland营养液中,培养至真叶展开后,再分别移至缺钙Hoagland营养液、完全Hoagland营养液、高钙Hoagland营养液培养约2周。缺钙营养液在配方中不加 $Ca(NO_3)_2$ 代之以 $NaNO_3$ ;高钙营养液配方中 $Ca(NO_3)_2$ 为330.4mg,即含 $Ca^{2+}$ 14mmol/L,正常营养液 $Ca^{2+}$ 为5mmol/L。pH均调至6.8~7.0,玻璃温室自然光照培养,待苗长出第3片三

出复叶时,用 PEG-6000 配制成  $-0.5$  MPa 营养液进行根际渗透胁迫处理,分别处理 24、48、72 h,取第 2 片三出复叶进行各项指标测定.各种处理均重复 3 次.

### 1.3 方法

1.3.1 相对含水量测定 相对含水量测定按华东师范大学(1980)方法,按下式计算相对含水量:

$$\text{相对含水量}(RWC) = \frac{W_f - W_d}{W_t - W_d} \times 100$$

式中  $W_f$  为材料鲜质量;  $W_d$  为材料干质量;  $W_t$  为饱和吸水重.

1.3.2 SOD 活性及其同工酶测定 取 0.25 g 新鲜叶片,加入 0.1 mol/L、pH 7.8 磷酸缓冲液冰浴上研磨,于 12 000 r/min,4 °C 离心 20 min,上清液为酶液.酶活性测定采用 Giannopolitis(1977)方法,酶活力单位定义为抑制四氮唑蓝(NBT)光氧化还原 50% 的酶量为 1 个活力单位.同工酶分析按罗广华等(1984)方法,NBT 负染.

1.3.3 POD 活性及其同工酶测定 取 0.2 g 新鲜叶片,加入 0.1 mol/L、pH 8.0 Tris-HCl 缓冲液冰浴研磨,于 12 000 r/min,4 °C 离心 15 min,采用王宝山等(1987)的方法测定上清液中 POD 活性,以每分钟增加 0.001OD 值的酶量为 1 个活力单位.其同工酶分析参照吴少伯(1979)方法,醋酸联苯胺活性染色.

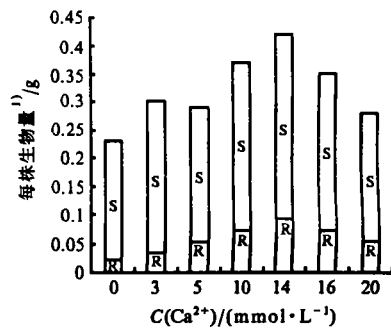
1.3.4 过氧化氢酶(CAT)活性及其同工酶测定 取 0.25 g 新鲜叶片,加入 0.1 mol/L、pH 7.0 磷酸缓冲液,冰浴上研磨,于 12 000 r/min,4 °C 离心 20 min,上清液为酶液.酶活性测定按蒋传葵(1982)方法,以每分钟减少 0.001OD 值的酶量为一个酶活单位.同工酶的活性染色采用 Vallejos(1983)的方法进行.

1.3.5 可溶性蛋白质含量测定 按 Bradford(1976)的方法.

## 2 结果与分析

### 2.1 培养液钙浓度的选择

钙对植物生长有一定影响,实验设置了一系列钙浓度(0、3、5、10、14、16、20 mmol/L)的 Hoagland 营养液处理,以其对大豆生物量的影响判断高钙、低钙培养范围.结果(图 1)表明,在 0~14 mmol/L  $Ca^{2+}$  浓度范围内,随着营养液钙浓度的提高,大豆植株无论其根系还是地上部分干质量均逐渐增加,14 mmol/L  $Ca^{2+}$  浓度时生物量达最大,在此浓度以上的各处理随钙浓度的增加植株地下和地上部分干质量均逐渐减少.表明当钙浓度在 14 mmol/L 范围内,对大豆植株生长有一定的促进作用超过此浓度范围,则表现出抑制作用.用原子吸收分光光度法对 0、5、14 mmol/L 钙浓度营养液培养的大豆



S、R 分别代表地上部分和地下部分的干质量

1) 生物量以干质量表示

1 不同钙浓度对大豆幼苗生物量的影响

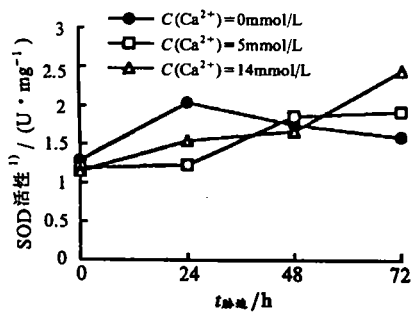
叶片钙含量分析,发现培养液中钙浓度愈高,植物叶片积累钙愈多,它们之间差异显著性达极显著水平.因此,这里把 14 mmol/L  $Ca^{2+}$  作为高钙处理,0 mmol/L  $Ca^{2+}$  作为缺钙处理,5 mmol/L  $Ca^{2+}$  是正常 Hoagland 营养液的钙浓度,作为中钙处理.

## 2.2 水分胁迫下钙对大豆叶片相对含水量(RWC)的影响

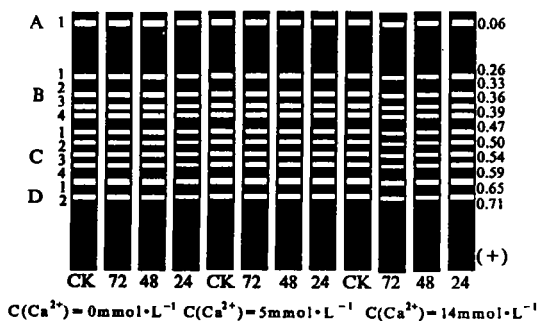
在正常供水情况下,不同钙处理,大豆叶片 RWC 保持在 85% 左右,三者之间无显著差异,但在水分胁迫下,三者之 RWC 均急剧下降,此时随钙浓度增加,RWC 下降越少,特别是在胁迫 72 h 时这种差异更为明显变化,此时缺钙、中钙、高钙的 RWC 分别为 23%、30%、35%,说明钙在一定条件下能增强大豆植株的保水能力,改善植株的水分状况。

## 2.3 水分胁迫下钙对 SOD 活性及其同工酶的影响

在正常供水的条件下,不同钙浓度培养下的大豆叶片细胞 SOD 活性依次为缺钙 > 中钙 > 高钙(图 2a)。在水分胁迫下,缺钙叶片的 SOD 活性在胁迫初期(24 h)迅速上升达最高,随后逐步下降;中钙和高钙的在处理 48 h 前 SOD 活性明显低于缺钙的,但在 48 h 后 SOD 活性不断上升,至 72 h 时都明显高于缺钙的,以高钙者 SOD 活性最高。水分胁迫下钙对大豆叶片 SOD 同工酶活性的影响和对 SOD 活性的影响基本一致(图 2b)(CK 为正常供水),其 SOD 活性最高的,其同工酶带较粗、较亮;SOD 活性低者,其同工酶带较细、较淡,但不同钙浓度下水分胁迫不同的时间,SOD 同工酶谱带条数均没有发生变化。这与他人在玉米(王振镒,1989)、黄瓜(陈贻竹,1991)等的报道相似。本实验大豆叶片中各处理均有 10 条 SOD 同工酶谱带,这与罗广华报道大豆(品种为瑞豆选)种子中 SOD 同工酶谱带只有 7~8 条不同,可能是由于品种或不同生育期所致。



1) SOD 活性以每毫克蛋白的单位活力表示



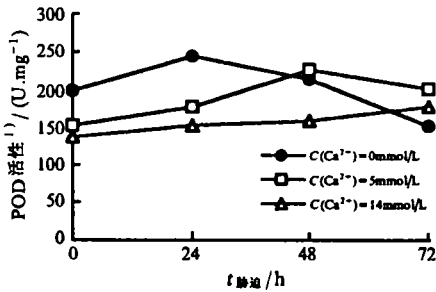
C(Ca<sup>2+</sup>) = 0 mmol·L<sup>-1</sup> C(Ca<sup>2+</sup>) = 5 mmol·L<sup>-1</sup> C(Ca<sup>2+</sup>) = 14 mmol·L<sup>-1</sup>

图 2a 水分胁迫下钙对大豆叶片 SOD 活性的影响 图 2b 水分胁迫下不同钙水平大豆叶片 SOD 同工酶谱

## 2.4 水分胁迫下钙对 POD 活性及其同工酶的影响

在正常供水的条件下,不同钙浓度下培养的大豆叶片内 POD 活性不同,其中缺钙叶片的 POD 活性最高,中钙的居中,高钙的最低(图 3a),经统计分析,它们之间的差异达极显著水平。从图 3a 中可见,当水分胁迫时,缺钙处理植株在 24 h 内叶片 POD 活性急剧升高,24 h 后逐渐下降,至 72 h 后 POD 活性达最低水平;中钙叶片的 POD 活性在 48 h 逐渐升高,但仍低于缺钙处理的水平,48 h 后达最高,此时超过缺钙处理的 POD 活性,随后下降;高钙处理叶片 POD 活性,在水分胁迫 72 h 内 POD 活性逐步升高,但约在 64 h 前 POD 活性的水平比中钙的、缺钙的都低。胁迫处理 72 h 的 POD 活性依此为中钙 > 高钙 > 缺钙。供试大豆叶片的过氧化物同工酶共有 9 条酶带,从阴极到阳极可将整个酶谱分成 1 个零位带和 A、B、C、和 D 4 个区(图 3b)。无论正常供水(CK)还是水分胁迫下,不同钙水平植株叶片 POD 同工酶谱带数有差异,缺钙叶

片均有一条  $C_2$  ( $Rf = 0.59$ ) 条带; 中钙和高钙叶片特有  $A_2$  ( $Rf = 0.19$ )、 $B_2$  ( $Rf = 0.32$ ) 2 条条带, 说明这 3 条酶带与钙的作用有关, 是钙作用的结果, 钙诱导了基因的表达. 水分胁迫下高钙叶的 POD 同工酶比正常供水下新出现了 1 条同工酶谱带 ( $Rf = 0.87$ ), 并随时间延长, 此同工酶活性增强, 与酶总活性变化趋势一致.



1) POD 活性以每毫克蛋白的单位活力表示  
图 3a 水分胁迫下钙对 POD 活性的影响

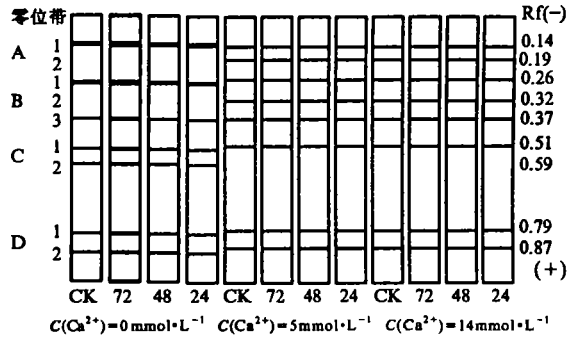
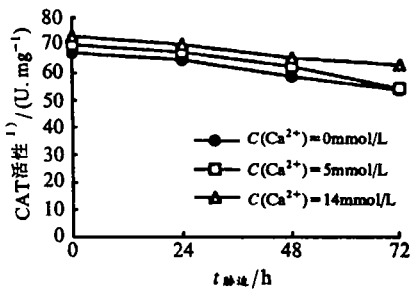


图 3b 水分胁迫下不同钙水平大豆叶片 POD 同工酶谱

### 2.5 水分胁迫下钙对 CAT 活性及其同工酶的影响

在正常供水的条件下, 不同钙浓度下培养的大豆叶片的 CAT 活性随钙浓度(参试浓度)的升高而增加(图 4a), 但各钙浓度之间无显著的差异. 在  $-0.5 \text{ MPa}$  水分胁迫下, CAT 活性随胁迫时间延长而下降, 高钙的酶活性水平较高, 低(缺)钙的酶活性水平较低, 胁迫至 72 h 仍然如此, 这可能由于干旱使过氧化物酶体膜受损伤, 膜透性增加, 从而导致 CAT 活性下降, 而钙对维持膜的稳定性有一定作用, 因而高钙叶片中 CAT 活性下降较小. 水分胁迫下, 不同钙浓度对过氧化氢同工酶的影响如图 4b (CK 为正常供水), 无论是缺钙还是高钙 CAT 同工酶都是 3 条谱带, 说明水分胁迫下, 钙对 CAT 同工酶类型无影响, 但其中  $Rf$  值为 0.27 和 0.42 的酶带在不同水分胁迫时间和不同钙浓度下条宽和亮度均有一定的变化, 上述酶活性的变化可能是发生在这 2 条酶带上.



1) CAT 活性以每毫克蛋白的单位活力表示

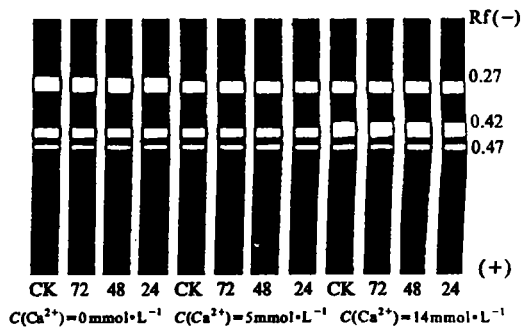


图 4b 水分胁迫下不同钙水平大豆叶片 CAT 同工酶谱

## 3 讨论

钙与植物抗旱性关系极为密切, 我们以不同钙水平 Hoagland 营养液培养的大豆幼苗为材

料进行实验,实验表明在 0~14 mmol/L  $Ca^{2+}$  浓度范围内,随着钙浓度的增加,植株生长越旺盛,根系越发达,干质量积累越多。在同等程度的渗透胁迫下,高钙叶片  $RWC >$  中钙叶片  $RWC >$  缺钙叶片  $RWC$ ,说明钙处理能使植株在水分胁迫下保持较高的水分含量,维持细胞的膨压,从而保障体内各种生理生化过程的正常进行,也维持了膜的完整性。干旱对植物膜系统造成伤害的现象普遍存在,目前普遍用生物自由基理论来解释。我们实验结果表明,水分胁迫下,不同钙水平叶片中 SOD 活性均有上升,但以高钙的上升幅度最大;POD 活性随胁迫时间延长,呈“先上升,后下降”的趋势,缺钙叶片在水分胁迫 24 h 下降,中钙的在 48 h 后下降,高钙的在 72 h 以内仍保持上升趋势;各种钙水平处理下 CAT 活性随水分胁迫时间的延长而持续下降,同等胁迫程度下,高钙叶片 CAT 活性  $>$  中钙的  $>$  缺钙的。干旱条件下,SOD 活性增加在一定程度上保护了植物免受自由基伤害, $Ca^{2+}$  参与了 SOD 活性的调节,增强植物对干旱的适应能力, $RWC$  增加。POD 也是作为植物体内的保护酶与 SOD、CAT、谷胱甘肽氧化酶等协同作用,清除逆境下体内产生的有害自由基, $Ca^{2+}$  可以延迟 POD 活性下降的程度,说明钙也参与 POD 活性调节。细胞内 CAT 主要存在于过氧化物酶体内,干旱使膜受损伤,膜透性增加,从而导致 CAT 活性下降,钙对 CAT 活性的影响可能是由于钙维护了其膜的完整性所致。对 SOD、CAT 同工酶的检测结果表明,在水分胁迫下,它们同工酶类型没有变化,其中某些条带的宽窄、亮度有一定的变化,而且这种变化与其相应的酶活性高低直接关联,这种现象有待于进一步研究。对 POD 同工酶的检测发现,在正常供水和水分胁迫下缺钙和中钙都有  $Rf = 0.87$  酶带,但高钙叶片在正常供水条件下此酶带消失,水分胁迫下又重新出现,并且随着胁迫时间延长,此酶活性逐渐增强,从各级钙水平叶片此酶出现的顺序来分析,推测这条酶带可能与细胞受到的胁迫程度有关,即当细胞所承受的逆境胁迫达一定“阈值”时,诱导出的同工酶带,从而加强代谢以适应逆境条件,因而这条小分子酶带可能与抗旱机制有关。这与王振镓(1989)在玉米抗旱品种得出的结论有类似之处,这也进一步说明了高钙培养的植株与抗旱品种在抗旱机制上的一些相似性。缺钙叶片无论正常供水还是水分胁迫都特有 1 条酶带( $Rf = 0.59$ )、中钙、高钙叶片无论正常供水和水分胁迫都特有另 2 条酶带( $Rf = 0.19, Rf = 0.32$ ),由于正常供水和水分胁迫都有同样的酶带因而可排除水分胁迫的效应,认为这 3 条酶带是与钙作用有关的,钙是通过什么方式来诱导此基因的表达,现尚少见报道。

钙能使大豆植株保护酶活性增高或维持其较高水平,同时钙能增强植株对水分胁迫的耐受性,可能是膜脂过氧化程度降低,这些情况我们将另予报道。

### 参 考 文 献

- 王宝山,赵思齐.1987.干旱对小麦幼苗膜脂过氧化及保护酶的影响.山东师范大学学报(自然科学版), (2):29~39
- 王振镓,郭嵩光,罗淑平.1989.水分胁迫对玉米 SOD 和 POD 活力及同工酶的影响.西北农业大学学报,17 (1):45~49
- 王爱国,罗广华,邵从本,等.1983.大豆种子超氧化物歧化酶的研究.植物生理学报,9(1):77~83
- 华东师范大学生物系植物生理教研室主编.1980.植物生理学实验指导.北京:高等教育出版社,143
- 吴少伯.1979.植物组织中蛋白质及同工酶的聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳.植物生理学通讯,(1):30~33
- 陈贻竹,B.帕特森.1988.低温对植物超氧化物歧化酶、过氧化物酶和过氧化氢水平的影响.植物生理学报, 14(4):323~328

- 罗广华, 邵从本, 王爱国, 等. 1984. 大豆和花生种子超氧化物歧化酶的同工酶研究. 植物生理学报, 10(10): 175 ~ 180
- 蒋传葵, 金承德, 吴仁龙, 等. 1982. 工具酶的活力测定. 上海: 上海科学技术出版社, 168 ~ 169
- Arora R, Palta J P. 1988. In vivo perturbation of membrane - associated calcium by freeze - thaw stress in onion bulb cells. *Plant Physiol*, 87: 622 ~ 628
- Bradford M M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantity of protein utilizing the principle of protein - dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248 ~ 254
- Cooke A, Cookson A, Ealshaw M J. 1986. The mechanism of action of calcein in the inhibition of high temperature - induced leakage of betacyanin from beet root discs. *New Phytol*, 102: 491 ~ 497
- Cramer G R, Lauchli A, Polito V S. 1985. Displacement of  $Ca^{2+}$  by  $Na^{+}$  from the plasmalemma of root cells. A primary response to salt stress? *Plant Physiol*, 79: 207 ~ 211
- Giannopolitis C N, Ries S K. 1977. Superoxide dismutase. Purification and quantitative relationship with water - soluble protein in seedling. *Plant Physiol*, 59: 309 ~ 314
- Murphy T M. 1988.  $Ca^{2+}$  dependence and  $La^{3+}$  interference of ultraviolet radiation - induced  $K^{+}$  efflux from rose cells. *Plant Physiol*, 74: 537 ~ 543

## Effect of Calcium on Anti-Oxidant Enzymes of Lipid Peroxidation of Soybean Leaves Under Water Stress

Gao Xiangyang<sup>1</sup> Yang Genping<sup>2</sup> Xu Zhiqiang<sup>1</sup> Xu Fengcai<sup>1</sup>

(1 College of Biotechnology, South China Agric. Univ, Guangzhou, 510642;

2 Dept. Basic Science, Northwestern Agric. Univ.)

**Abstract** In order to probe the roles of calcium in drought resistance of plants, the soybean seedling grown in the solution with different calcium concentration (0, 5, 14 mmol·L<sup>-1</sup>) were used to study the effects of water stress (-0.5 MPa, PEG 6 000) on the activities of SOD, POD and CAT and their isozymes in the leaves of different calcium. The results showed that under water stress, the SOD activity increased, the CAT activity decreased. Similar tendency of POD activity was found among the leaves of three Ca<sup>2+</sup> treatments, it was "increased Before decreased." The PAGE analysis showed that under water stress condition, there were 10 bands of SOD, 3 bands of CAT in the leaves of different Ca<sup>2+</sup> treatments. There were changes in bands of POD under both conditions.

**Key words** water stress; calcium; membrane lipid peroxidation; anti-oxidant enzymes

【责任编辑 李玲】