

# 水分胁迫下钙对大豆叶片膜脂 过氧化程度的影响

高向阳 许志强 徐凤彩

(华南农业大学生物技术学院,广州,510642)

**摘要** 用控制营养钙量(0、5、14 mmol/L)的方法,培养大豆幼苗,以获得3种钙水平的大豆叶片作为材料,研究水分胁迫(-0.5 MPa)下,不同钙水平大豆叶片中质膜透性、膜脂过氧化程度以及膜脂脂肪酸的组成、脂肪酸不饱指数的变化。结果表明:水分胁迫下,细胞质膜透性增大,以缺钙叶片变化幅度最大,MDA含量的变化趋势与膜透性变化一致。叶片内源抗氧化物质ASA随胁迫时间延长,其含量逐渐下降,但高钙叶片ASA一直维持在较高水平。无论正常供水还是水分胁迫下,钙处理的饱和脂肪酸含量均降低,而不饱和脂肪酸含量增加,脂肪酸不饱指数增大。

**关键词** 水分胁迫;钙;膜脂过氧化;脂肪酸不饱指数

**中图分类号** Q 946

干旱缺水对植物生长影响严重,是限制农业生产发展的主要因素之一,干旱已成为全球性的严重问题,我国1/3的可耕地处在干旱或干旱地区。钙在植物体内的重要作用已众所周知,随着钙调素(CaM)的发现,钙在植物体内的功能的研究日益深入。人们已经注意到钙在植物抗逆性中的重要作用。按生物自基理论,正常情况下植物细胞内自由基的产生与清除处于动态平衡状态,在逆境胁迫下,该平衡遭到破坏,自由基产生或积累过多,启动膜脂脱氧化反应,破坏膜结构和膜完整性,使膜差向透性增大,产生离子渗透,细胞代谢紊乱。由于细胞中存在清除自由基的保护酶系和小分子抗氧化物质如谷胱甘肽(GSH)、抗坏血酸(ASA)、类胡萝卜素(Car)等,能协调起来有效清除自由基,从而保护了细胞膜系统免受伤害,这些已有较多的报道。在低温(陈贻竹,1988)、高盐分、SO<sub>2</sub>(谭常,1981)、O<sub>3</sub>(Lee,1982)、衰老(Matters,1987;林植芳,1984)等植物逆境生理研究中得到了较好的证实。从自由基伤害和膜脂过氧化作用的角度来研究钙在植物抗旱中的作用,少见报道。本试验研究在水分胁迫下,钙与细胞内抗氧化的小分子物质与膜脂过氧化程度之间的关系,为抗旱机理及早农研究提供基础性资料。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试材料

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

### 1.2 材料培养及处理

大豆种子,水中浸种,于28℃恒温培养箱内催芽后,移至1/2 Hoaglong营养液培养1周,再在完全Hoaglong营养液培养至真叶展开,以后分别移至缺钙Hoaglong(Ca<sup>2+</sup>为0 mmol/L)、完全Hoaglong(Ca<sup>2+</sup>为5 mmol/L)、高钙Hoaglong(Ca<sup>2+</sup>为14 mmol/L)营养液处理约2周。均调pH

6.8~7.0,玻璃温室自然光照,昼夜温度为27~28℃/15~18℃下培养.待苗长出第3个三出复叶时,用PEG-6000配制成-0.5 MPa营养液,进行根际水分胁迫处理,分别处理24、48、72 h,取第2片三出复叶进行各项测定.

### 1.3 测定方法

1.3.1 细胞膜相对透性测定 细胞膜相对透性测定按西北农业大学(1987)方法,并按下式计算:

$$\text{细胞膜相对透性}(\%) = \frac{\text{煮沸前电导值}}{\text{煮沸后电导值}} \times 100.$$

1.3.2 丙二醛含量测定 丙二醛(MDA)含量测定按林植芳(1984)方法,单位是 $\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ ,依下式计算:

$$b(\text{MDA}) = \frac{(OD_{532} - OD_{663}) \times V_{\text{液}}}{1.55 \times 10^5 \times m_{\text{料干}}}$$

1.3.3 抗坏血酸含量测定 ASA含量测定按夏贤明等(1985)方法,用荧光分光光度计以350 nm为激发波长,测定待测溶液在430 nm波长处的荧光强度.按下式处理:

$$w(\text{ASA}) = \frac{(\text{样品荧光强度} - \text{样品空白荧光强度}) \times \text{ASA标准溶液浓度} \times V_{\text{液}}}{\text{标准空白荧光强度} \times m_{\text{料干}}}$$

1.3.4 细胞膜脂的抽提与分析 (1)原生质体游离:叶肉细胞原生质体的游离按Schwenk(1981)方法.(2)原生质膜和混合细胞器的分离:按刘丽英等(1991)的方法,将分离的原生质体悬浮于40 mL内含0.25 mol/L山梨醇、1 mmol/L  $\text{MgSO}_4$ 、10 mmol/L Tris-HCl pH 7.4的缓冲液中.再用注射器吸入原生质体悬浮液并用力挤压使原生质体破裂.此悬浮液用来抽提膜脂.(3)膜脂抽提和脂肪酸甲酯化:参照刘丽英等(1991)方法进行.(4)脂肪酸分析:脂肪酸分析采用岛津GC-9A气相色谱仪.分离柱长1.6 m;担体:Chromosorb. W.A.W. DMCS 60-80目;固定液: $w(\text{DEGS}) = 12\%$ ;柱温:195℃;载气:高纯 $\text{N}_2$ ;流速:35 mL/min;  $\text{H}_2$ :0.5 kg/cm<sup>2</sup>;空气:0.5 kg/cm<sup>2</sup>;进样器温度:240℃.(5)脂肪酸含量测定:采用峰面积归化方法计算.

## 2 结果与分析

### 2.1 水分胁迫下钙对大豆叶片细胞膜透性的影响

在正常情况下,3种钙浓度处理大豆叶片细胞膜透性的差异很小(图1).从图1可以看出,在水分胁迫下缺钙大豆叶片细胞膜相对透性急剧增大,远高于中钙和高钙处理,后者膜透性在48 h前变化比较缓慢,中钙处理的比高钙处理的相对透性较高,但差异不明显.胁迫48 h后,3种膜的相对透性都急剧增加,但到处理72 h前3种处理的膜相对透性仍然依次为:缺钙>中钙>高钙,而且这种差异较为明显,表明钙能增强膜对水分胁迫的抵抗能力.

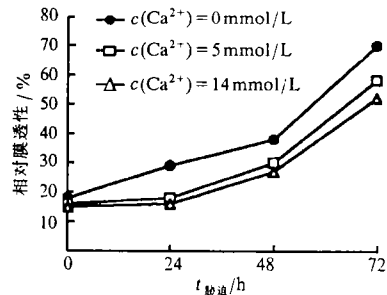


图1 水分胁迫下钙对大豆叶片细胞相对膜透性的影响

### 2.2 水分胁迫下钙对大豆叶片丙二醛含量的影响

丙二醛是膜脂过氧化作用主要产物之一(Robert, 1980),一般可以用MDA含量表示膜脂氧化的程度.正常供水条件下,缺钙叶片MDA含量最高,中钙的次之,高钙的最低(图2).水分胁迫下,大豆叶片MDA含量随着胁迫时间的延长而增加.在同等水分胁迫下,缺钙处理的

叶片 MDA 含量亦最高,中钙的次之,高钙处理的仍最低.特别是在水分胁迫后期(72 h),这种差异经统计分析,达极显著水平.

### 2.3 水分胁迫下钙对大豆叶片抗坏血酸含量的影响

抗坏血酸是植物内抗氧化的保护物质之一,水分胁迫下钙对大豆叶片 ASA 含量的影响如图 3. 图 3 表明,在正常供水条件下,不同钙浓度处理的大豆叶片中 ASA 含量差异不明显.在水分胁迫条件下:缺钙处理的叶片的 ASA 含量随着胁迫时间的延长而急剧下降,至胁迫 72 h 时已降低了 69.74%;中钙处理叶片在胁迫 48 h 后 ASA 的含量略有上升.这就表明:在正常供水条件下,钙与 ASA 含量可能没有直接关系,但当水分胁迫高钙水平能维持叶片内 ASA 的较高水平.水分胁迫下钙有助于 ASA 的合成还是抑制 ASA 氧化酶活性,尚需进一步研究.

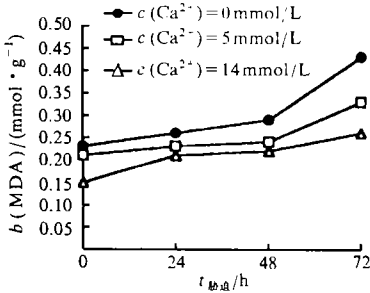


图 2 水分胁迫下钙对大豆叶片 MDA 含量的影响

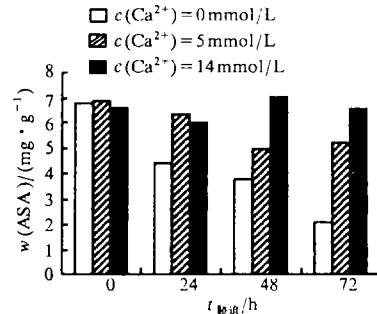


图 3 水分胁迫下钙对大豆叶片 ASA 含量的影响

### 2.4 水分胁迫下钙对大豆叶片膜脂组成和脂肪酸不饱和指数的影响

膜脂组成和脂肪酸组成决定着生物膜的流动性,其组分的变化影响着膜的抗逆性(刘丽君,1991).本实验测定了膜脂中的几种主要脂肪酸:棕榈酸(C<sub>16:0</sub>)、硬脂酸(C<sub>18:0</sub>)、亚油酸(C<sub>18:2</sub>)和亚麻酸(C<sub>18:3</sub>)的组成比例及脂肪酸不饱和指数.无论在正常供水还是水分亏缺条件下,钙对膜脂组成和不饱和指数均有一定影响.正常供水条件下,缺钙处理的大豆叶片膜脂饱和脂肪酸(C<sub>16:0</sub>、C<sub>18:0</sub>)摩尔分数高(42.19%).钙处理降低了棕榈酸摩尔分数(分别为 24.10%、26.08%),而不饱和脂肪酸 C<sub>18:3</sub>摩尔分数增加(缺钙为 31.15%,钙处理分别为 52.99%、50.22%),C<sub>18:2</sub>略有下降,不饱和脂肪酸总摩尔分数增加(缺钙为 57.81%,钙处理分别为 68.12%、63.95%),这种变化主要发生在 C<sub>18:3</sub>的含量的变化上,钙处理使 C<sub>18:3</sub>含量增加.

在水分胁迫下,上述脂肪酸的组成比例也出现了同样的情况.钙处理的饱和脂肪酸含量明显低于缺钙的,钙处理的不饱和脂肪酸高于缺钙的.以胁迫 24 h 为例,缺钙处理的饱和脂肪酸摩尔分数为 43.79%,而钙处理分别为 36.60%、36.51%;缺钙处理的不饱和脂肪酸摩尔分数为 56.21%,而钙处理分别为 64.40%、63.49%.这进一步说明钙处理后对脂肪酸的上述组成比例有明显的影 响,只是在 5、14 mmol·L<sup>-1</sup> Ca<sup>2+</sup> 浓度下,这种影响与钙浓度关系不大.

表 1 表明,在正常供水条件下,缺钙处理的 IUFA 明显低于有钙的,在 5、14 mmol·L<sup>-1</sup> Ca<sup>2+</sup> 浓度下的 IUFA 无显著差异;水分胁迫下

表 1 水分胁迫下钙对大豆叶片膜类脂的 IUFA 的影响

t(水分胁迫)/h	c(Ca <sup>2+</sup> )/mmol·L <sup>-1</sup>		
	0	5	14
0(CK)	156.77	189.23	178.12
24	151.76	181.15	171.58
48	147.75	168.84	187.16
72	156.15	177.71	179.30

的仍是缺钙的 IUFA 低于钙处理的, 而且各钙浓度之间的 IUFA 差异不明显. 李锦树(1983)证实, 用 PEG 胁迫 3 叶期玉米幼苗 1 d 时, 线粒体膜脂棕榈酸和亚油酸含量下降, 而亚麻酸含量增加, 膜脂不饱和脂肪酸不饱和指数增大, 我们的上述实验结果与之基本相似, 只是钙处理后, 效果更为明显, 因此说明钙在大豆水分胁迫逆境下起到了有效的调节作用.

### 3 讨论

细胞质膜透性对干旱反应比较敏感(史兰波, 1989). 本实验的结果表明, 水分胁迫下大豆叶片细胞质膜透性增大, 但不同钙处理透性变化不同, 缺钙叶片透性迅速增大, 中钙叶片透性增加较小, 高钙叶片透性增加最小. 钙是二价阳离子, 它可以与磷脂分子的极性端结合而引起磷脂分子间距离的变化, 同时钙也可以桥接蛋白质分子的羧基, 增加膜脂的亲脂性而稳定膜结构, 以减轻水分胁迫造成的膜伤害和减少电解质外渗, 同时在于旱条件下, 植物体内吸收的钙量减少, 引起质膜结合钙量减少, 可能使膜的透性增大.

在于旱条件下, 细胞易产生和积累过多的自由基, 导致膜脂过氧化反应, 这可能是膜透性变化和膜受到伤害的另一个重要原因(王宝山, 1988). 钙可以降低衰老黄瓜子叶、成熟土豆、跃变后果实膜脂过氧化物的积累, 防止膜脂的过氧化损伤. 我们实验结果与上述实验结果基本一致. 无论在正常供水还是水分胁迫下, 值得注意的是, 在正常供水条件下, 缺钙叶片 MDA 含量最高, 中钙的次之, 高钙的最低. 值得注意的是, 在正常供水条件下, 缺钙叶片膜透性几乎未改变的情况下, MDA 含量升高, 说明缺钙叶片在防止或降低 MDA 产生的能力较低, 钙在阻止膜脂过氧化反应、保护膜完整性方面具有较重要的作用, 这是否为钙的直接作用的结果, 尚不清楚.

抗坏血酸、类胡萝卜素等抗氧化物质是膜脂过氧化的非酶体系, 它们在清除自由基, 增强植物对低温、臭氧、衰老和干旱等抗性有着积极的作用. Chowdhury(1985)以眉豆为材料证明植物组织中 ASA 水平可影响膜的完整性, 从而影响植物的耐旱性, 我们的实验结果支持这一观点. 在正常供水条件下, 不同钙浓度下的大豆叶片 ASA 含量相差不大; 在水分胁迫下 ASA 含量均有所下降, 下降幅度依次为缺钙叶片的 > 中钙叶片的 > 高钙叶片的. 因此高钙处理大豆植物较中、缺尤其是缺钙植株表现出较强的抗旱能力.

膜类脂脂肪酸组分在研究植物抗性机理方面已越来越得到重视. 膜类脂和脂肪酸组分决定着生物膜的流动性, 其组分的变化必然影响着膜的抗逆性(刘丽君等, 1991). 我们测定了水分胁迫下钙对大豆叶片细胞膜膜脂的 4 种主要脂肪酸, 结果表明, 无论正常供水还是水分胁迫下, 钙处理均能降低饱和脂肪酸含量, 增加不饱和脂肪酸含量和脂肪酸不饱和指数. 钙对膜脂的这种影响, 增加了膜流动性, 从而提高了植株的抗旱能力. 这与李锦树(1983)对 PEG 胁迫下不同抗旱性玉米叶片中膜脂的研究结果基本一致.

### 参 考 文 献

- 史兰波, 李云荫. 1990. 水分胁迫对冬小麦幼苗几种生理指标和叶绿体超微结构的影响. 植物生理学通讯, (2): 28 ~ 33
- 刘丽君, 尹田夫. 1991. 大豆原生质膜及混合细胞器膜脂脂肪酸对干旱胁迫的反应. 大豆科学, 10(1): 46 ~ 52
- 李锦树, 王洪春, 王文英, 等. 1983. 干旱对玉米叶片细胞膜透性及膜脂的影响. 植物生理学报, 9(3): 223

~ 228.

- 林植芳,李双顺,林桂珠,等.1984.水稻叶片的衰老与超氧化物歧化酶及脂质过氧化作用的关系.植物学报,26(6):605~615
- 夏贤明,饶泽清.1985.荧光法测定食品中的抗坏血酸.营养学报,(7):303~309
- 谭常,刘愚,李振国,等.1981.植物对SO<sub>2</sub>的反应和抗性的研究.自由基清除剂对SO<sub>2</sub>的伤害和保护作用.环境科学学报,(3):179~206
- 西北农业大学植物生理教研室.1987.植物生理学实验指导.西安:陕西科学技术出版社,57~58
- Chowdhury R S, Choudhuri M A. 1985. Hydrogen peroxide metabolism as an index of water stress tolerance in jute. *Physiol Plant*, 65:476~480
- Lee E H, Bennett J H. 1982. Superoxide dismutase: A possible protective enzyme against ozone injury in snap beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Physiol*, 69:1444~1449
- Matters G L, Scandalios J G. 1987. Synthesis of isozymes of superoxide dismutase in maize leaves in response to O<sub>3</sub>, SO<sub>2</sub> and elevated O<sub>2</sub>. *J Exp Bot*, 38:842~852
- Patterson B D, Mackae E A, Ferguson I B. 1984. Estimation of hydrogen peroxide in plant extracts using Titanium (IV). *Anal Biochem*, 139:487~492
- Robert R C, Stewart, Bewley J D. 1980. Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes. *Plant Physiol*, 65:245~248
- Schwenk F W, Pearson C A, Roth M R. 1981. Soybean mesophyll protoplasts. *Plant Science Letter*, 23:153~155

## Effect of Calcium on the Membrane Lipid Peroxidation of Soybean Leaves Under Water Stress

Gao Xiangyang Xu Zhiqiang Xu Fengcai

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

**Abstract** The soybean seedlings 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 on the plasma membrane permeability (PMP), membrane lipid peroxidation and composition of membrane lipid and the index of unsaturated fatty acid (IUFA). The results showed that under water stress, the PMP of [Ca<sup>2+</sup>] - treated leaves increased and no - Ca<sup>2+</sup> - treated had the greatest change in PMP. The contents of MDA changed in the same tendency as PMP. ASA content decreased gradually with water stress, but the highest ASA content was observed in the high Ca<sup>2+</sup> treated leaves. linolenic acid content of leaves was decreased by Ca<sup>2+</sup> treatment, but palmitic acid content and IUFA increased under both conditions.

**Key words** water stress; calcium; membrane lipid peroxidation; IUFA

【责任编辑 李玲】