

钙离子参与一氧化氮促进盐胁迫下的玉米种子萌发

唐静, 韩宇, 陈康, 王玉图, 刘新*

莱阳农学院生命科学学院, 山东青岛 266109

摘要: 0.001~1.0 mmol·L⁻¹ 一氧化氮(NO)供体硝普钠(SNP)均能提高玉米种子的发芽率, 缓解盐胁迫下种子萌发的抑制作用, 其中 0.1 mmol·L⁻¹ SNP 的效果最佳。用胞外游离 Ca²⁺ 螯合剂 EGTA、质膜 Ca²⁺ 通道阻断剂 LaCl₃ 和液泡 Ca²⁺ 释放抑制剂钌红与 0.1 mmol·L⁻¹ SNP 共处理, 均能减弱或抵消 SNP 促进种子萌发的作用。据此推测, 钙离子参与 SNP 促进盐胁迫下玉米种子萌发的信号转导过程。

关键词: 钙离子; 一氧化氮; 盐胁迫; 玉米; 种子萌发

Ca²⁺ Involved in Seed Germination of Maize (*Zea mays* L.) Induced by Nitric Oxide under Salt Stress

TANG Jing, HAN Yu, CHEN Kang, WANG Yu-Tu, LIU Xin*

School of Life Sciences, Laiyang Agricultural College, Qingdao, Shandong 266109, China

Abstract: 0.001–1.0 mmol·L⁻¹ sodium nitroprusside (SNP), an exogenous nitric oxide (NO) donor, could increase the seed germination percentage of maize (*Zea mays*) and relieve the inhibition of salt stress to seed germination. The effect of 0.1 mmol·L⁻¹ SNP was the best. After treatment of extracellular dissociation Ca²⁺ chelant EGTA, in combination with blocker of plasma membrane Ca²⁺ channels LaCl₃ and inhibitor of vacuole Ca²⁺ release ruthenium red, the effect of SNP was decreased. Our results suggested that Ca²⁺ was involved in the signal transduction of maize seed germination induced by SNP under salt stress.

Key words: Ca²⁺; nitric oxide; salt stress; maize (*Zea mays*); seed germination

盐胁迫是制约农作物产量的逆境因素之一, 提高植物抵御盐胁迫的能力, 进而提高农作物产量一直是研究的热点。一氧化氮(nitric oxide, NO)是一种广泛存在于植物体内的信号分子, 参与种子萌发、衰老、对胁迫的响应等过程。最新的研究表明, NO 可以打破拟南芥种子的休眠, 促进拟南芥种子的萌发(Bethke 等 2006), 外源 NO 供体硝普钠(sodium nitroprusside, SNP)能促进黄瓜、豌豆、刺槐等种子的萌发(周永斌等 2005; 张少颖等 2004)。但 NO 是否影响盐胁迫下的玉米种子萌发还未见有报道, NO 促进种子萌发的信号转导机制至今尚不清楚。

作为植物体内的第二信使 Ca²⁺ 不仅是细胞的结构物质, 而且还调节植物响应环境变化的过程。采用 Ca²⁺ 荧光探针已证实, 盐胁迫诱导玉米原生质体胞质中 Ca²⁺ 水平持续几分钟升高(霍书新等 2005)。在 NO 调控的气孔运动中, 可能涉及一部分液泡内 Ca²⁺ 向胞质的释放和胞外 Ca²⁺ 的内

流, 并且胞外 Ca²⁺ 的内流在 NO 调控气孔关闭过程中更为重要(刘新等 2003)。但 Ca²⁺ 是否参与 NO 的其他生理作用? 为此, 本文研究 NO 供体 SNP 对盐胁迫下的玉米种子萌发影响, 以及 Ca²⁺ 在 SNP 调控种子萌发过程中的作用, 以期探明 NO 作用机制建立基础。

材料与方法

玉米(*Zea mays* L.)品种为‘郑单 958’(购自本校种子公司)。SNP、氯化镧(LaCl₃)、钌红(ruthenium red, RR)均购自 Sigma 公司; EGTA、NaCl 均为国产分析纯。

精选饱满度一致且无病虫害的种子以 0.1%

收稿 2006-12-25 修定 2007-04-13

资助 山东省教育厅基金(J04C13)和国家自然科学基金(30370141)。

* 通讯作者(E-mail: liuxin6080@yahoo.com.cn; Tel: 0532-88030224)。

HgCl₂ 消毒 10 min, 漂洗干净, 在 25 ℃ 下, 以蒸馏水浸种 12 h 后播种到垫有 2 层滤纸、直径为 15 cm 的培养皿中(每皿 50 粒)。滤纸用蒸馏水、SNP、NaCl、EGTA、LaCl₃ 和 RR 溶液分别进行处理或共处理, 经过前期实验筛选出最适实验浓度, 最终确定 SNP 的终浓度分别为 0、0.001、0.01、0.1、1.0 mmol·L⁻¹, NaCl 为 150 mmol·L⁻¹, EGTA 为 5 mmol·L⁻¹, LaCl₃ 为 3 mmol·L⁻¹, RR 为 0.5 mmol·L⁻¹。每隔 12 h 更换一次滤纸, 用处理液重新湿润, 整个培养过程中保持滤纸湿润。各处理均重复 3 次, 处理后于 28 ℃ 下暗培养, 测定其发芽率。发芽率测定于种子催芽后 72 h 统计, 以芽长超过种子长度 1/2 计为发芽。发芽率为规定发芽时间结束时统计的各组发芽数与试验的种子数之间的比值, 以百分比表示。

实验结果

1 SNP对玉米种子发芽率的影响

由表 1 可见, 在 0.001~1.0 mmol·L⁻¹ 范围内, 玉米发芽率随着 SNP 浓度的提高而升高, 其中以

表 1 不同浓度 SNP 对玉米种子发芽率的影响

Table 1 Effects of different concentrations of SNP on the germination percentage of maize seeds

SNP 浓度 /mmol·L ⁻¹	发芽率 /%
0 (对照)	93.33±1.53
0.001	94.00±2.00
0.01	96.67±2.31*
0.1	99.33±0.15**
1.0	94.67±2.31

处理后玉米种子于 28 ℃ 下暗培养催芽 72 h; 发芽率(%)=发芽种子数/试验种子数×100; 平均数±标准差, n=3, 与对照相比, *P<0.05, **P<0.01。图 1~4 同此。

0.1 mmol·L⁻¹ 的效果最好, 说明 SNP 可以促进玉米种子萌发; 浓度达到 1.0 mmol·L⁻¹ 时, 发芽率即下降。这与前人研究的较低浓度的 NO 对植物细胞有保护作用的结果相一致(Beligni和Lamattina 1999)。所以在以下实验中均不用 1.0 mmol·L⁻¹ SNP。

2 SNP对盐胁迫下玉米种子发芽率的影响

分别用蒸馏水、150 mmol·L⁻¹ NaCl、0.001~0.1 mmol·L⁻¹ SNP和 150 mmol·L⁻¹ NaCl 共处理的结果显示, SNP 可以缓解盐胁迫对种子萌发的抑制, 促进盐胁迫下种子的萌发, 并且从低浓度到高浓度呈上升趋势, 其中 0.1 mmol·L⁻¹ SNP 的缓解作用最好(图 1)。说明 SNP 有缓解盐胁迫下种子萌发的作用。

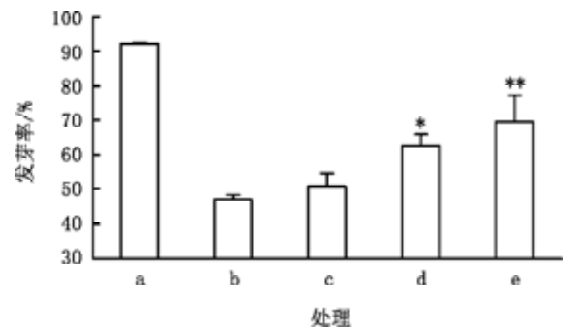


图 1 不同浓度 SNP 对盐胁迫下玉米种子发芽率的影响

Fig.1 Effects of different concentrations of SNP on the germination percentage of maize seeds under salt stress

a : 对照; b : 150 mmol·L⁻¹ NaCl; c : 0.001 mmol·L⁻¹ SNP+150 mmol·L⁻¹ NaCl; d : 0.01 mmol·L⁻¹ SNP+150 mmol·L⁻¹ NaCl; e : 0.1 mmol·L⁻¹ SNP+150 mmol·L⁻¹ NaCl。

3 Ca²⁺对 SNP 缓解盐胁迫下玉米种子萌发率的影响

图 2~4 显示:(1)经过能整合外源 Ca²⁺ 和胞外

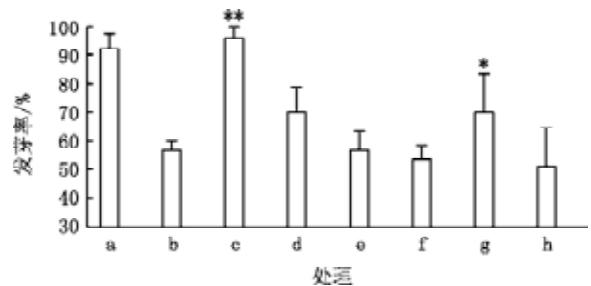


图 2 EGTA 对盐胁迫下玉米种子发芽率的影响

Fig.2 Effects of EGTA on the germination percentage of maize seeds under salt stress

a : 对照; b : 5 mmol·L⁻¹ EGTA; c : 0.1 mmol·L⁻¹ SNP; d : 0.1 mmol·L⁻¹ SNP+5 mmol·L⁻¹ EGTA; e : 150 mmol·L⁻¹ NaCl; f : 150 mmol·L⁻¹ NaCl+5 mmol·L⁻¹ EGTA; g : 0.1 mmol·L⁻¹ SNP+150 mmol·L⁻¹ NaCl; h : 0.1 mmol·L⁻¹ SNP+150 mmol·L⁻¹ NaCl+5 mmol·L⁻¹ EGTA。

游离 Ca^{2+} , 从而间接降低胞内游离 Ca^{2+} 浓度的胞外游离 Ca^{2+} 整合剂 EGTA 处理后, 玉米发芽率明显下降, 表明 EGTA 可以抵消 SNP 促进种子萌发的作用; 经过 EGTA 处理的 SNP 缓解盐胁迫种子萌发的作用几乎完全消失(图 2)。(2)作为质膜 Ca^{2+} 通道阻断剂的 LaCl_3 能阻断 Ca^{2+} 向胞内流入, 明显抑制玉米种子萌发。SNP 与 LaCl_3 共处理的, 几乎完全消除 SNP 对种子萌发的促进作用, 削弱 SNP 对盐胁迫下玉米种子萌发的促进作用(图 3)。(3)作为液泡 Ca^{2+} 释放抑制剂的 RR 能抑制胞内 Ca^{2+} 的释放, 直接影响胞内 Ca^{2+} 的浓度, 显著抑

制 SNP 对盐胁迫下玉米种子萌发的促进作用, 其抑制效果比 EGTA 和 LaCl_3 更加明显(图 4)。

讨 论

NO 可以提高植物抗性并参与多种生理过程的报道已有很多。Caro 和 Puntarulo (1999) 根据大豆种子萌发过程中 NO 的产生, 推测 NO 可能对大豆种子萌发有作用。张绪成等(2005)用 NO 供体 SNP 和 *N*-亚硝基-乙青霉胺(SNAP)处理需光才能萌发的葛笋种子后, 其在黑暗中也能萌发, 且种子发芽率与 SNP 和 SNAP 的剂量呈正比。但本文结果表明, SNP 促进玉米种子萌发的作用是低浓度促进而高浓度抑制(表 1), 类似于生长素促进生长的作用, 这与 Libourel 等(2006)的结果是相似的。

Ca^{2+} 是普遍存在于植物体内的胞内信使, 可以提高植物的抗盐胁迫能力。王广印等(2004)报道, Ca^{2+} 可以削弱盐对南瓜和黄瓜种子萌发的胁迫。Ruan 等(2004)认为 NO 缓解盐对种子萌发的胁迫与其可调节植物体内的离子平衡相关, Ca^{2+} 信使参与这一过程。本文结果也表明, NO 供体 SNP 可促进盐胁迫下玉米种子萌发, EGTA、 LaCl_3 、RR 和 SNP 共处理均可削弱或抵消 SNP 促进种子萌发的作用。据此可以推测, 胞外 Ca^{2+} 、胞外 Ca^{2+} 的内流和 Ca^{2+} 在胞内的释放都与 SNP 调控的盐胁迫下玉米种子萌发有密切关系, Ca^{2+} 参与 NO 供体 SNP 介导的盐胁迫下的玉米种子萌发中的信号转导过程。

动物细胞中 NO 和 Ca^{2+} 之间的联系已多有研究。而植物体内 NO 与 Ca^{2+} 之间相互关系的研究还刚起步, 但越来越多的研究表明, NO 在植物体内的作用与 Ca^{2+} 之间有联系。但迄今有关植物体内 NO 信号转导途径的报道甚少, 对其组成成员的了解更少, 有哪些成员参与植物体内 NO 信号转导途径, NO 是否也经 cGMP 传导, 进而激活对 cGMP 依赖的蛋白激酶活性, 提高 Ca 通道活性, Ca^{2+} 下游的靶蛋白又如何, 都需进一步研究。

参考文献

霍书新, 杜国强, 张小红(2005). 钙缓解植物盐害的作用机制研究

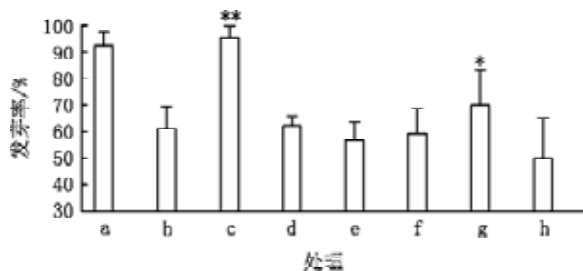


图 3 LaCl_3 对盐胁迫下玉米种子发芽率的影响

Fig.3 Effects of LaCl_3 on the germination percentage of maize seeds under salt stress

a: 对照; b: $3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{LaCl}_3$; c: $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{SNP}$; d: $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{SNP} + 3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{LaCl}_3$; e: $150 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{NaCl}$; f: $150 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{NaCl} + 3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{LaCl}_3$; g: $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{SNP} + 150 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{NaCl}$; h: $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{SNP} + 150 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{NaCl} + 3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{LaCl}_3$.

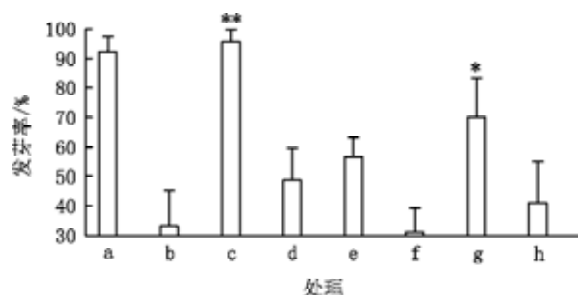


图 4 RR 对盐胁迫下玉米种子发芽率的影响

Fig.4 Effects of RR on the germination percentage of maize seeds under salt stress

a: 对照; b: $0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{RR}$; c: $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{SNP}$; d: $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{SNP} + 0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{RR}$; e: $150 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{NaCl}$; f: $150 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{NaCl} + 0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{RR}$; g: $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{SNP} + 150 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{NaCl}$; h: $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{SNP} + 150 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{NaCl} + 0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{RR}$.

- 进展. 土壤肥料, 6: 3~6
- 刘新, 张蜀秋, 娄成后(2003). Ca^{2+} 参与 NO 对蚕豆气孔运动的调控. 植物生理与分子生物学学报, 29 (4): 342~346
- 王广印, 周秀梅, 张建伟, 沈军(2004). Ca^{2+} 对 NaCl 胁迫下黄瓜和南瓜种子发芽的影响. 浙江农业科学, 6: 307~309
- 张少颖, 任小林, 程顺昌, 李善菊(2004). 外源一氧化氮供体浸种对玉米种子萌发和幼苗生长的影响. 植物生理学通讯, 40 (3): 309~310
- 张绪成, 上官周平, 高世铭(2005). NO 对植物生长发育的调控机制. 西北植物学报, 25 (4): 812~818
- 周永斌, 殷有, 苏宝玲, 陈志坚, 刘立伟(2005). 外源一氧化氮供体对几种植物种子的萌发和幼苗生长的影响. 植物生理学通讯, 41 (3): 316~318
- Beligni MV, Lamattina L (1999). Nitric oxide counteracts cytotoxic processes mediated by reactive oxygen species in plant tissues. *Planta*, 208: 337~344
- Bethke PC, Libourel IG, Jones RL (2006). Nitric oxide reduces seed dormancy in *Arabidopsis*. *J Exp Bot*, 57 (3): 517~526
- Caro A, Puntarulo S (1999). Nitric oxide generation by soybean embryonic axes. Possible effect on mitochondrial function. *Free Radic Res*, 31 (Supp): S205~S212
- Libourel IGL, Bethke PC, De Michele R, Jones RL (2006). Nitric oxide gas stimulates germination of dormant *Arabidopsis* seeds: use of a flow-through apparatus for delivery of nitric oxide. *Planta*, 223: 813~820
- Ruan HH, Shen WB, Xu LL (2004). Nitric oxide modulates the activities of plasma membrane H^+ -ATPase and PPase in wheat seedling roots and promotes the salt stress. *Acta Bot Sin*, 46 (4): 415~422