

钙对玉米幼苗热激诱导抗盐性的影响

郭丽红¹ 陈善娜² 龚明^{3,*}

¹昆明师范高等专科学校生物系, 昆明 650031; ²云南大学生命科学学院, 昆明 650091; ³云南师范大学生命科学学院, 昆明 650092

提要 热激处理的玉米幼苗抗盐性提高, 盐胁迫期间的谷胱甘肽还原酶 (GR) 活性和脯氨酸含量也较高。Ca²⁺ 处理可增强热激诱导的玉米幼苗抗盐性, GR 活性和脯氨酸含量也进一步提高; Ca²⁺ 螯合剂 EGTA 处理的效果正好相反。

关键词 玉米幼苗; 热激; 抗盐性; CaCl₂; 谷胱甘肽还原酶; 脯氨酸

Effect of Calcium on Heat-shock-induced Salt Resistance in Maize Seedlings

GUO Li-Hong¹, CHEN Shan-Na², GONG Ming^{3,*}

¹Department of Biology, Kunming Teachers College, Kunming 650031; ²School of Life Sciences, Yunnan University, Kunming 650091; ³School of Life Sciences, Yunnan Normal University, Kunming 650092

Abstract Heat-shock pretreatment could improve salt resistance and enhance glutathione reductase (GR) activity and proline content in maize seedlings during salt stress. Ca²⁺ treatment further increased the heat-shock-induced salt resistance, GR activity and proline content in the heat-shocked seedlings under the salt stress, but the Ca²⁺ chelator EGTA treatment had opposite effect.

Key words maize seedling; heat shock; salt resistant; CaCl₂; glutathione reductase; proline

以 Ca²⁺ 和 CaM (钙调素) 为核心的钙信使系统在植物对外界信号的感受、传递和响应过程中起作用^[1,2]。业已查明, 启动 Ca²⁺ 信使系统的中心环节是胞质中 Ca²⁺ 浓度的改变^[2]。近年的研究表明, 植物对不同的逆境胁迫存在交叉适应^[3,4], 即当植物经受某种胁迫后, 不仅对这种胁迫的抗性有提高, 而且对其它胁迫的抵抗力也增强。如热激 (非致死温度的热锻炼) 处理提高植物的抗盐性就是一种交叉适应。但交叉适应的机制至今还不清楚。一般来说, 多种逆境都可诱发植物细胞内活性氧浓度的增加而导致氧化胁迫^[5], 植物的抗氧化作用是植物适应逆境的一个重要方面^[6]。据报道, 外源脯氨酸有清除活性氧的作用^[7], 因此内源脯氨酸与抗氧化系统的关系也引起人们的极大关注。本文采用 CaCl₂ 浸种结合热激处理来提高植物的抗盐性, 探讨外源 Ca²⁺ 对玉米幼苗在热激诱导抗盐性过程中抗氧化酶谷胱甘肽还原酶 (glutathione reductase, GR, EC 1.6.4.2) 活性、游离脯氨酸含量和质膜相对透性的影响、Ca²⁺ 在热激诱导抗盐性过程中的作用, 以及植物对不同胁迫交叉适应的生理基础。

材料与方 法

实验材料为玉米 (*Zea mays*) 品种晴 3。种子以 0.1% HgCl₂ 消毒 10 min, 漂洗干净, 分别

用蒸馏水 (对照)、20 mmol·L⁻¹ CaCl₂ 和 5 mmol·L⁻¹ EGTA [乙二醇双 (α-氨基乙基) 醚四乙酸, pH 6.5] 在 25℃ 下浸种 12 h, 而后滤干种子, 播种到垫有 6 层湿润滤纸的磁盘中, 于 28℃/25℃ (昼/夜) 下暗萌发 60 h。取生长均匀的玉米幼苗备用。

玉米幼苗的热激处理和盐处理按前文^[4]方法进行。把上述暗萌发 60 h 幼苗的一部分转移到 42℃ 暗中热激 4 h, 然后在 28℃ 下恢复 4 h, 作为热激幼苗; 另一部分在热激处理期间一直置于 28℃ 下, 作为未热激幼苗。热激和未热激的幼苗皆转移到 700 mmol·L⁻¹ NaCl 溶液中, 盐处理 5 d。热激处理和盐处理均在暗中进行。处理结束后, 幼苗转移到 25℃、光照 16 h·d⁻¹ (平均光强为 65 μmol·m⁻²·s⁻¹) 的环境中恢复 8 d, 计算存活率。取恢复 8 d 后能变绿并重新生长的幼苗为存活的幼苗, 测定叶绿素含量^[8], 观察幼苗生长情况, 测定幼苗鲜重和幼苗高度。

谷胱甘肽还原酶的测定按 Knörzer 等^[9]的方

收稿 2003-03-24 修定 2003-09-27

资助 国家自然科学基金 (39860007)、云南省自然科学基金重点项目 (98C002Z) 及教育部高校优秀青年教师教学科研奖励计划 (2001 年度)。

* 通讯作者 (E-mail: gongming@public.km.yn.cn, Tel: 0871-5516244)。

法, 并作一些修改^[10]; 蛋白质含量的测定采用 Bradford^[11]的方法, 以牛血清蛋白为标准; 游离脯氨酸含量测定参照张殿忠等^[12]的磺基水杨酸法; 质膜相对透性的测定参照文献 13 的方法。

上述所有实验均重复2次, 每次实验中有2个取样重复和6次测定重复。图表中所有数据均为平均值±标准误。

结果与讨论

1 Ca^{2+} 对玉米幼苗热激诱导的抗盐性的影响

前文^[14]结果表明, $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{CaCl}_2$ 或 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{EGTA}$ 浸种玉米种子后, 萌发 60 h 的玉米幼苗胚芽鞘中 Ca^{2+} 的含量显著提高或降低, 但对种子萌发和幼苗早期生长无明显影响。本文与前文同样处理的结果 (表 1) 表明, 在盐胁迫下未经热激的幼苗的存活率最小, 经热激处理的则明显增加。热激结合 Ca^{2+} 浸种处理的玉米幼苗存

活率最高, EGTA 处理最低。在盐胁迫后的恢复期间, 叶绿素含量、幼苗鲜重和幼苗高度也有差异 (表 1), 其中热激结合 CaCl_2 浸种处理的幼苗, 叶色浓绿, 粗壮, 而且株高增长快。说明 CaCl_2 浸种结合热激处理幼苗后, 不仅玉米的抗盐性大于仅作热激处理的, 而且生长能力的恢复也增强, 热激可诱导玉米幼苗对盐胁迫的交叉适应。同时还显示外源 Ca^{2+} 或 EGTA 处理可提高或降低玉米幼苗的 Ca^{2+} 含量^[14] 及其抗盐性 (表 1), 暗示 Ca^{2+} 参与热激诱导玉米幼苗抗盐性的调控。

2 Ca^{2+} 对热激诱导玉米幼苗抗盐性过程中谷胱甘肽还原酶活性的影响

植物抗逆性的形成常常与细胞抗氧化胁迫能力的增强密切相关^[5,6]。已有的文献资料表明, 植物不同抗逆性的交叉适应的形成需要抗氧化系统的参与, 并受 Ca^{2+} 信使系统的调控^[3,15]。GR 是植物抗氧化系统中受 Ca^{2+} 调控的一个重要组成部分,

表1 Ca^{2+} 对热激诱导的玉米幼苗抗盐性的影响

Table 1 Effect of Ca^{2+} on heat-shock-induced salt resistance in maize seedlings

处理(+或-)			存活率/%	叶绿素含量/ $\text{mg g}^{-1}(\text{DW})$	幼苗鲜重/ mg 株^{-1}	幼苗高度/ cm
热激	Ca^{2+}	EGTA				
-	-	-	$38.5 \pm 3.3 \text{ a}$	$9.68 \pm 2.2 \text{ a}$	$1.05 \pm 0.11 \text{ a}$	$12.33 \pm 0.3 \text{ a}$
+	-	-	$68.9 \pm 4.1 \text{ b}$	$13.26 \pm 2.0 \text{ a}$	$1.33 \pm 0.15 \text{ a}$	$16.08 \pm 0.3 \text{ b}$
+	+	-	$86.6 \pm 3.4 \text{ c}$	$17.01 \pm 3.0 \text{ b}$	$1.57 \pm 0.15 \text{ b}$	$18.53 \pm 0.4 \text{ c}$
+	-	+	$45.2 \pm 2.1 \text{ a}$	$11.54 \pm 2.1 \text{ a}$	$1.24 \pm 0.09 \text{ a}$	$13.99 \pm 0.2 \text{ a}$

表中 a、b、c 表示 5% 水平的差异分析结果, 相同字母表示差异不显著, 不同字母表示差异显著。

在抗逆性形成中起重要作用^[10,16]。图 1 显示, 在盐胁迫初期玉米幼苗胚芽鞘中 GR 的活性明显上升, 3 d 左右达到最高, 之后急剧下降, 5 d 降至较低水平。从整个过程来看, 无论是哪一时期, 热激处理幼苗的 GR 活性均比未经热激的幼苗高, 热激结合 CaCl_2 浸种的玉米幼苗中 GR 酶活性最高, 热激结合 EGTA 处理的最低, 表明热激能提高 GR 活性, 且 Ca^{2+} 对 GR 酶有激活效应。

3 Ca^{2+} 对热激诱导玉米幼苗抗盐性过程中游离脯氨酸含量的影响

脯氨酸有清除活性氧的作用^[7]。如图 2 所示, 在盐胁迫过程中, 脯氨酸的含量迅速上升; 经热激诱导的幼苗的比未热激的高, 热激结合 CaCl_2 处理幼苗的最高, 热激结合 EGTA 处理的最低。这表明热激可促进内源脯氨酸累积, Ca^{2+} 可加强这

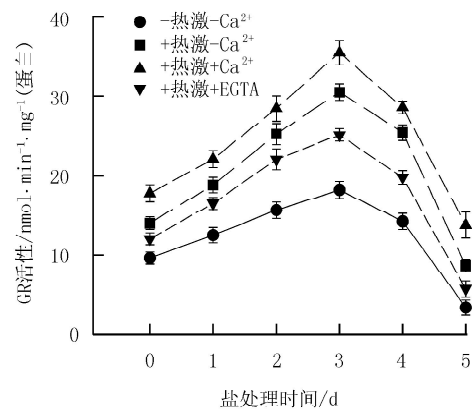


图1 热激结合 Ca^{2+} 处理对玉米幼苗在盐胁迫中 GR 活性的影响

Fig. 1 Effect of heat shock and Ca^{2+} treatment on GR activity during salt stress in maize seedlings

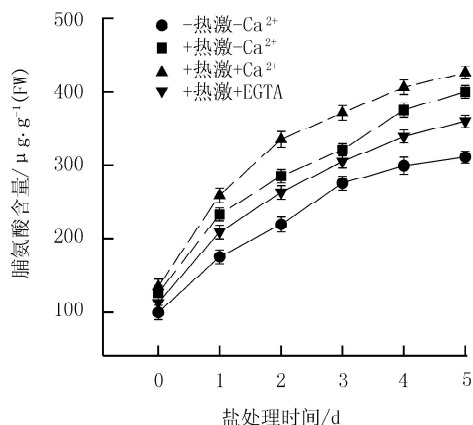


图2 热激结合Ca²⁺处理对玉米幼苗在盐胁迫中脯氨酸含量的影响

Fig. 2 Effect of heat shock and Ca²⁺ treatment on proline content during salt stress in maize seedlings

一作用, EGTA 的作用正好相反。其中机制可能是热激通过促进内源脯氨酸的累积而提高活性氧的清除能力; 外源Ca²⁺ 则是通过加强脯氨酸的累积而提高玉米幼苗热激诱导的抗盐性, 因而, 最终导致玉米幼苗抗盐性的增强。

4 Ca²⁺对热激诱导玉米幼苗抗盐性过程中胚芽鞘质膜相对透性的影响

图3显示, 玉米幼苗胚芽鞘的质膜相对透性在盐胁迫期间随着盐处理时间的增加而增加, 而在盐胁迫期间尽管热激处理后质膜相对透性也随着胁迫程度的增加而增加, 但增加的程度比未经热激的小, 结合CaCl₂处理的增加程度最小, 结合

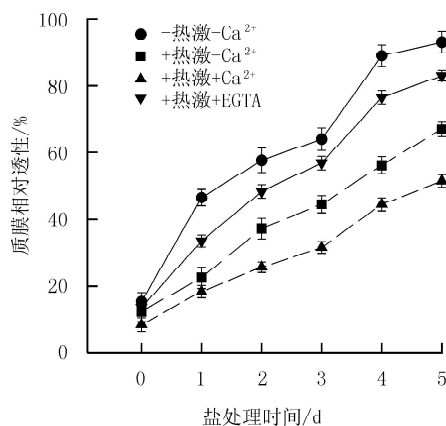


图3 热激结合Ca²⁺处理对玉米幼苗在盐胁迫过程中质膜相对透性的影响

Fig. 3 Effect of heat shock and Ca²⁺ treatment on cytoplasmic membrane permeability during salt stress in maize seedlings

EGTA 处理的增加最大。表明热激可缓解盐胁迫过程中质膜相对透性的增加, Ca²⁺ 则促进热激的此种缓解效应。

总之, 在整个盐胁迫期间经热激处理的玉米幼苗保持较高的GR活性(图1)和脯氨酸含量(图2); Ca²⁺可进一步提高热激幼苗的GR活性和脯氨酸含量, 而Ca²⁺螯合剂EGTA处理的效果则否(图1, 2)。这暗示热激后细胞抗氧化能力增强是热激诱导玉米幼苗抗盐性的生理基础之一, 而Ca²⁺可能通过增强细胞抗氧化系统而调控热激诱导的玉米幼苗对盐胁迫的交叉适应。

参考文献

- 1 Snedden WA, Fromm H. Calmodulin as a versatile calcium signal transducer in plants. *New Phytol*, 2001, 151:35~66
- 2 Rudd JJ, Franklin-Tong VE. Unravelling response-specificity in Ca²⁺ signalling pathways in plant cells. *New Phytol*, 2001, 151: 7~33
- 3 Sabehat A, Weiss D, Lurie S. Heat-shock proteins and cross-tolerance in plants. *Physiol Plant*, 1998, 103:437~441
- 4 Gong M, Chen B, Li ZG et al. Heat-shock-induced cross adaptation to heat, chilling, drought and salt stress in maize seedlings and involvement of H₂O₂. *J Plant Physiol*, 2001, 158: 1125~1130
- 5 Alscher RG, Donahue JL, Cramer CL. Reactive oxygen species and antioxidants: relationships in green cells. *Physiol Plant*, 1997, 100:224~233
- 6 Mallick N, Mohn FH. Reactive oxygen species and antioxidants: response of algal cells. *J Plant Physiol*, 2000, 157:183~193
- 7 Sminoff N, Cumbes QJ. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochem*, 1989, 28:1057~1060
- 8 波钦诺克 X H 著. 荆家海, 丁钟荣译. 植物生物化学分析方法. 北京: 科学出版社, 1981. 255~258
- 9 Knörzer OC, Durner J, Böger P. Alterations in the antioxidative system of suspension-cultured soybean cells (*Glycine max*) induced by oxidative stress. *Physiol Plant*, 1996, 97:388~396
- 10 郭丽红, 陈善娜, 龚明. 钙对玉米幼苗谷胱甘肽还原酶活性的影响. *植物生理学通讯*, 2002, 38(2):115~117
- 11 Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal Biochem*, 1976, 44:276~287
- 12 张殿忠, 汪沛洪, 赵会贤. 测定小麦叶片游离脯氨酸含量的方法. *植物生理学通讯*, 1990, 26(4):62~65
- 13 刘宁, 高玉葆, 贾彩霞等. 渗透胁迫下多花黑麦草叶内过氧化物酶活性和脯氨酸含量以及质膜相对透性的变化. *植物生理学通讯*, 2000, 36(1):11~14
- 14 Gong M, Li YJ, Dai X et al. Involvement of calcium and calmodulin in the acquisition of heat-shock induced thermotolerance in maize seedlings. *J Plant Physiol*, 1997, 150: 615~621
- 15 Bowler C, Fluhr R. The role of calcium and activated oxygens as signals for controlling cross-adaptation. *Trends Plant Sci*, 2000, 5: 241~246
- 16 Mullineaux PM, Creissen GP. Glutathione reductase: Regulation and role in oxidative stress. In: Mullineaux PM (ed). *Oxidative Stress and The Molecular Biology of Antioxidant Defenses*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997. 667~712