

干旱对小麦幼苗 SOD 活性和 CaM 水平的影响

黄国存 崔四平 马春红 崔 洋 魏建昆

(河北省农林科学院农业物理生理生化研究所, 石家庄 050051)

摘 要 本研究结果表明, 干旱引起小麦幼苗中超氧化物歧化酶 (SOD) 活性和丙二醛 (MDA) 含量增高, 钙调素 (CaM) 水平下降。萎蔫的幼苗复水 4 天后, SOD 活性和 MDA 含量又下降, 恢复到对照水平, 而 CaM 含量急剧上升且高于对照。研究还表明, SOD 可能不受 CaM 的调节。同时对 SOD 活力测定计算方法也进行了探讨。

关键词 干旱 小麦幼苗 超氧化物歧化酶 钙调素

迄今, 世界上许多地区, 干旱仍然是农业的巨大威胁。一般认为, 干旱能增加植物体内活性氧含量, 而活性氧能促进膜脂过氧化或膜脱酯作用, 从而破坏膜结构。同时, 人们又发现氧自由基的产生和清除又被细胞中的生物膜保护酶系统所控制, 而 SOD 便是膜保护酶系统中一种占主导地位的酶蛋白。自从发现 SOD 的酶学特征以来, 以 SOD 为中心的生物活性氧代谢研究进展很快。大量事实表明, SOD 与干旱密切相关。武宝珏^[5]等报道小麦幼苗经受干旱时 SOD 酶活性升高, 当重新吸水时它又回到原来水平。张敬贤等^[9]研究认为, 无论抗旱或非抗旱小麦品种, 干旱处理后 SOD 活性均呈增加趋势, 但玉米幼苗受到水分胁迫后, SOD 活性却明显下降^[10]。干旱条件下 SOD 活性如何变化, 需进一步研究证实。自从发现 Ca-CaM 是植物体内信使系统以来, 人们已发现 CaM 是许多酶的激活因子, 例如 NAD 激酶^[4]、Ca²⁺-ATP 酶^[1]、蛋白质激酶等。也有人报道 SOD 可能也受 CaM 的调节^[7], 但缺乏直接证据。CaM 与 SOD 是否有关并不明确, 需研究证实。

1 材料和方法

1.1 材料

选用细胞原生质基态浓度即 Og 值较高的 78 农-1 小麦种子, 经 HgCl₂ 消毒、自来水冲洗后, 在去离子水中吸胀 12 h, 置 25℃ 暗中萌发 24 h。将发芽整齐的种子播在蛭石中 (每千克蛭石加 1L Hoagland 液), 置于生化培养箱中育苗。培养箱昼温 25℃, 夜温 20℃; 光强 20000 lx, 光周期 13/11h。每天补充水分以保持蛭石含水量, 三叶期时停止补水。随着干旱程度不断加重, 取幼苗地上部分分析测定。

1.2 方法

1.2.1 SOD 粗提液的制备及测定, 基本参考 Giannopolitis 等人的方法, 以 4 ml 反应液中抑

制氮蓝四唑 (NBT) 50% 的酶量为一个酶活单位。

1.2.2 丙二醛 (MDA) 的测定, 参考 Heath 等人的方法^[6]。

1.2.3 CaM 粗提液的制备 取幼苗剪碎, 加入 10 倍体积的缓冲液 (50 mmol/L Tris 1 mmol/L EGTA, 0.25 mmol/L NaCl, pH7.5), 研钵中研成匀浆 (以上均在 4℃ 下进行), 15000rpm 冰冻离心 20min。上清液测蛋白以后, 于 95℃ 水浴中加热 3 min, 15000 rpm 冰冻离心 30 min, 上清液即为待测 CaM 粗提液。

1.2.4 CaM 含量测定, 采用酶联免疫吸附法 (ELISA 法), 参照赵升皓等^[8]。标准 CaM 从花椰菜 (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) 中获得, 用 Phenyl-Sepharose 4B 疏水亲和柱提取^[12]。所用抗体中一抗为兔抗小麦 CaM 抗血清, 二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG。聚苯乙烯酶标反应板规格 12×8=96 孔。酶标仪为 DG-3022 型。

2 结果与分析

2.1 SOD 酶促动力曲线以及活力单位的计算

在 SOD 测活过程中发现, 对于同一样品, 由于加样量不同 (即 SOD 对 NBT 的抑制率不同), 经公式计算得出不同的酶比活结果。图 1 显示, 随着 SOD 粗提液加样量增大, 对 NBT 抑制率也不断增大。当加样量为 50 μ gPr 时, 曲线基本达到平台区, 当超过 50 μ gPr 时, 抑制率依然保持在 90% 左右不再升高, 这可能是有 10% 左右的 NBT 光化学反应不需通过 $O_2^{\cdot-}$ 作为中介, 而有其它途径。图 1 还显示, 随着 SOD 量增大, 经公式推导的 SOD 活力单位数越小, 这给实验带来人为误差。按照 SOD 酶活力单位定义, SOD 测活时应通过调整加样量使 NBT 抑制率控制在 50% 左右, 再代入公式计算才能减少误差的出现。

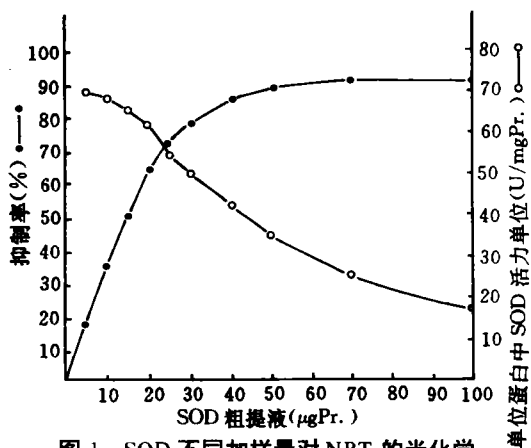


图 1 SOD 不同加样量对 NBT 的光化学反应抑制率和 SOD 活力单位的影响

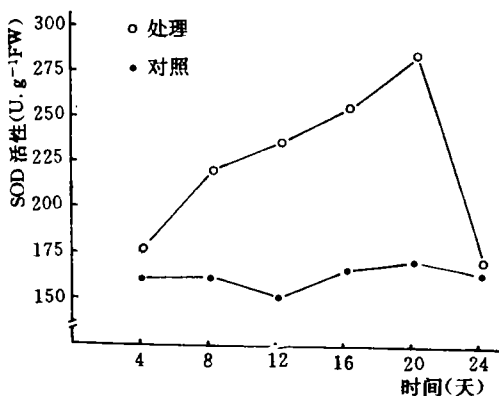


图 2 干旱对小麦幼苗 SOD 活性的影响

2.2 干旱对小麦幼苗 SOD 活性的影响

图 2 显示, 随着干旱程度的加重, 小麦幼苗 SOD 活性逐渐增大, 处理 20 天后复水, 其活性又下降, 恢复到对照水平。为证实 SOD 活性变化是否为特异性变化, 以每毫克蛋白中所含 SOD 单位作图 (图 3)。图 3 显示, SOD 酶蛋白在可溶性蛋白质中所占比例随干旱程度的加重不断增大, 10 天左右达峰值, 以后逐渐下降, 复水后明显下降并低于对照水平。干旱引起 SOD 活性增大, 说明供试小麦存在较强的 SOD 合成调节系统, 干旱可能是这种调节系统的诱因。

SOD 酶活性变化不随可溶性蛋白的变化而变化, 意味着植物具有一定的抗旱潜力。

2.3 干旱对小麦幼苗丙二醛含量的影响

丙二醛是膜脂氧化的产物。随着干旱程度的加重, 小麦幼苗丙二醛含量不断增加, 第 20 天复水前达到峰值, 复水 4 天后又恢复到对照水平 (图 4)。干旱能增加植物体内活性氧自由基含量, 而自由基导致膜脂过氧化, 从而使 MDA 增加。

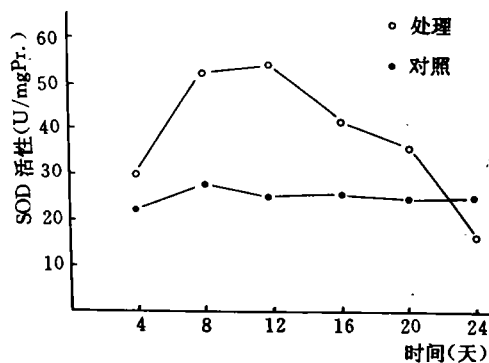


图 3 干旱对小麦幼苗 SOD 活性的影响

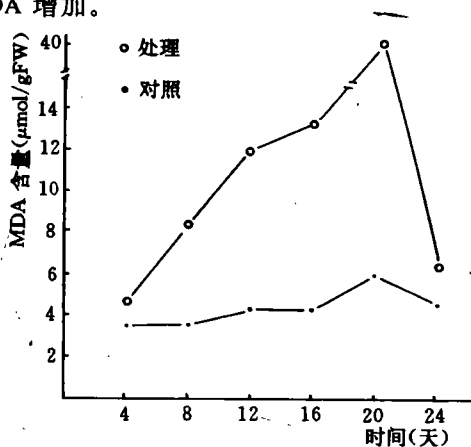


图 4 干旱对小麦幼苗 MDA 含量的影响

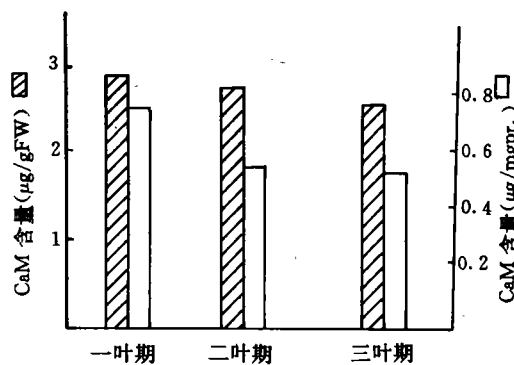


图 5 不同苗龄的小麦幼苗 CaM 水平变化

2.4 不同苗龄的小麦 CaM 水平变化

图 5 是小麦幼苗一、二、三叶不同时期含量变化趋势。无论以鲜重还是可溶性蛋白计算, 随着苗龄的增大, CaM 含量都有不同程度的降低。

2.5 干旱对小麦幼苗 CaM 含量的影响

图 6 显示, 干旱 4 天后 CaM 含量大幅度降低, 约为对照的 30%。随着干旱程度的加重, CaM 总量继续呈下降趋势, 但降低程度较小。第 20 天复水, 4 天后 CaM 含量又上升且高于对照。如果以可溶性蛋白计算 (图 7), 情

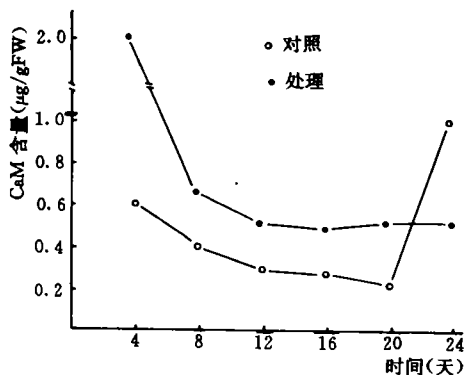


图 6 干旱对小麦幼苗 CaM 水平的影响

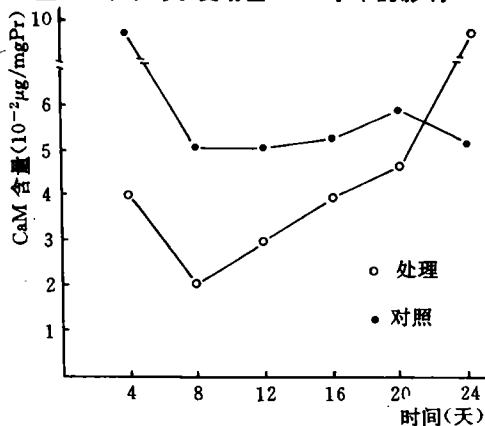


图 7 干旱对小麦幼苗 CaM 水平的影响

况大致相似, 但变化趋势与图 6 不完全一样, 这是由于干旱也是引起蛋白质代谢变化的原因, 说明干旱引起的 CaM 含量变化并不随可溶性蛋白质的变化而变化, 对植物的抗逆性可能具有重要意义。

2.6 外源 CaM 和 CaM 抑制剂 TFP (三氟啦嗪) 对 SOD 活性的影响

为探讨 SOD 活性是否受 CaM 的调节, 试验时在 NBT-SOD 溶液中加入外源 CaM 或 TFP, 黑暗放置 30 min 后, 再进行照光处理。结果显示, 对照、CaM 和 TFP 处理的活性 (U/mgPr) 分别为 21.1 ± 1.4 、 23.1 ± 3.3 和 23.1 ± 2.7 , 表明无论加入 CaM 还是 TFP, 对 SOD 活性几乎无影响, 说明在本实验条件下, SOD 与 CaM 无直接关系, 但还需进一步研究证实。

3 讨论

根据上述研究结果, 干旱引起 SOD 活性上升, 当幼苗重新吸水时, 酶活性又恢复到大致原来水平, 这和武宝珏等人的研究结果相一致。一般来说, 具有这种反应的植物应当属于抗旱型的或具有一定抗旱力的类型。干旱敏感型植物没有这种类型的反应, 在逆境条件下, 其细胞内的 SOD 酶活性下降, 伴随着过氧化分解作用的加强, 结果造成不可逆伤害。因此, SOD 酶活性的高低及其在干旱情况下的变化类型, 可能为我们提供一个判定植物抗旱性强弱的可靠指标。

随着缺水程度的加重, 膜脂过氧化产物 MDA 含量逐渐增加, 这和张敬贤等^[10]在玉米上的研究结果相一致。

无论在低温胁迫^[6]还是盐逆境^[11]下, 通常是 SOD 活性下降, MDA 含量升高, 二者呈显著的负相关, 但本研究结果表明, 二者对干旱的反应是一致的, 这可能是不同逆境机制不同所致。李妙等发现感病棉花品种其 MDA 含量及 SOD 活性明显高于健壮株, 本研究结果与之相类似。

小麦三叶期, 随着幼苗叶片数目的增多, CaM 水平逐渐下降。幼苗进一步生长, 最后其含量维持在 $0.5 \mu\text{g/g FW}$ 或 $0.05 \mu\text{g/mg Pr}$ 左右不再降低。一般认为, 种子萌发初期生命代谢旺盛, 种胚内 CaM 水平大量增加^[2], 随着种子生活力的降低及幼苗的生长, CaM 水平不断降低到某一特定水平, 以满足正常代谢的需要。

干旱引起 CaM 含量下降, 其原因可能是干旱时依赖于 CaM 的酶类活性降低或丧失, CaM 的合成减少所致。在干旱条件下, CaM 含量下降而 SOD 活性却上升, 变化方向相反, 说明二者可能无直接调节和被调节关系。根据外加 CaM 和 TFP 对 SOD 活性影响试验结果, 也说明了这一点, 但还需进一步研究证实。

参 考 文 献

- 1 郝鲁宁, 余叔文. 大麦根细胞质膜 Ca^{2+} -ATP 酶和 Ca^{2+} 转运系统的特性. 植物生理学报, 1993, 19 (3): 172~180
- 2 李卓杰, 袁小丽, 傅家瑞. 萌发花生种子 CaM 含量变化与种子活力. 种子, 1990, 1: 78~79
- 3 李妙, 王校栓, 李延增等. 不同抗枯萎类型棉花品种超氧化物歧化酶和过氧化物酶活性研究. 华北农学报, 1993, 8 (增): 19~22

- 4 王友爱, 武淑萍. 豌豆 NAD 激酶的提纯及活力测定. 植物生理学通讯, 1992, 28 (1): 54~56
- 5 武宝珏, 格林·托德. 小麦幼苗中过氧化物歧化酶活性与幼苗脱水忍耐力相关性的研究. 植物学报, 1985, 27 (2): 152~160
- 6 王以柔, 刘鸿先, 李平等. 在光照和黑暗条件下低温对水稻幼苗光合器官膜脂过氧化作用的影响. 植物生理学报, 1986, 12 (3): 244~251
- 7 杨成德, 种康, 敬兰花等. 钙调素对黄瓜子叶 CuZn-SOD 的激活作用. 见: 中国植物生理学会第五次全国会议论文摘要汇编, 1990, 3
- 8 赵升皓, 于宏林, 张明志等. 钙调素的酶联免疫测定法. 徐州医学院学报, 1988, 8 (1): 54~58
- 9 张敬贤, 崔四平, 李俊明等. 干旱对不同抗旱性小麦幼苗超氧化物歧化酶的影响. 华北农学报, 1990, 5 (3): 9~13
- 10 张敬贤, 李俊明, 崔四平. 玉米细胞保护酶活性对苗期干旱的反应. 华北农学报, 1990, 5 (增刊): 19~23
- 11 赵可夫, 卢元芳, 张宝泽等. Ca 对小麦幼苗降低盐害效应的研究. 植物学报, 1993, 35 (1): 51~56
- 12 Riro RL, Sun Dyie. Characterization of oat calmodulin and radioimmunoassay of its subcellular distribution. Plant Physiol, 1984, 75: 382~386

Influence of Water Stress on SOD Activities and Calmodulin Levels

Huang Guocun Cui Siping Ma Chunhong
Cui Yang Wei Jiankun

(Agro-Physics, Plant Physiology and Biochemistry Institute, Hebei Academy of
Agricultural and Forestry Sciences, Shijiazhuang)

Abstract With the development of water stress, the activities of superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) content increased, the calmodulin (CaM) levels declined. The SOD activities and MDA content declined to the control level, while the CaM content greatly increased higher than control levels 4 days after rewartering the flaccid seedlings. The results showed that SOD might be not regulated by CaM. The experiment also contained a study on SOD activity assay and the calculating methods.

Key words: Water stress; Wheat seedlings; Superoxide dismutase; Calmodulin