

低 Ca 对拟南芥幼苗生长及盐胁迫影响初探

王 静¹, 陈建华¹, 伊力奇¹, 冯利霞², 祁 智¹, 亢 燕¹

(1. 内蒙古大学 生命科学学院, 内蒙古 呼和浩特 010021; 2. 内蒙古师范大学 附属中学, 内蒙古 呼和浩特 010021)

摘要:以模式植物拟南芥为研究材料,探讨了 Ca 在拟南芥根生长发育及抵御盐胁迫过程中的重要生理作用。结果表明,低 Ca 条件会导致拟南芥幼苗鲜质量降低、抑制主根生长、侧根发育及根毛发育与生长。研究发现,50 mmol/L NaCl 胁迫会导致对照培养植物产生 1 个细胞质 Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$) 升高峰值,为 0.325 $\mu\text{mol/L}$;而低 Ca 培养植物产生 3 个 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 升高值,升高频率明显增多,最高达 0.467 $\mu\text{mol/L}$,是对照的 1.40 倍。由此推断,低 Ca 条件使植物对盐胁迫更敏感。

关键词:拟南芥;低 Ca;幼苗;盐胁迫

中图分类号:Q945.78 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2014)02-0170-04

Effect of Calcium Deficiency on the Growth of *Arabidopsis* Seedling and Salt Stress Resistance

WANG Jing¹, CHEN Jian-hua¹, YI Li-qi¹, FENG Li-xia², QI Zhi¹, KANG Yan¹

(1. College of Life Sciences, Inner Mongolia University, Huhhot 010021, China;

2. Affiliated Middle School of Inner Mongolia Normal University, Huhhot 010021, China)

Abstract: We choose *Arabidopsis* as material. The research studies on the important physiology role of calcium in root development and resistance to salt stress. In this study, the fresh weight, primary root, lateral roots and root hairs of *Arabidopsis thaliana* were all inhibited on the calcium deprivation media. The plants grown on control media were evoked a transient rise of cytosolic Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$) by 50 mmol/L NaCl, while the plants grown on calcium deprivation media were evoked three. The peaks of signal were 0.325, 0.476 $\mu\text{mol/L}$, respectively. It is suggested the plants were more sensitive to salt stress under the calcium deprivation condition.

Key words: *Arabidopsis thaliana*; Calcium deprivation; Seedling; Salt stress

Ca 是植物生长发育必需的营养元素。植物体内, Ca 不仅是一种大量元素, 更重要的是偶联胞外信号与胞内生理生化反应的第二信使, 起调控植物代谢和发育的重要作用。Ca²⁺ 与果胶酸结合形成果胶酸钙, 稳定细胞壁。细胞质膜的磷脂在 Ca²⁺ 作用下联结, 使细胞质膜结构稳定^[1]。液泡、内质网是细胞重要的 Ca 库, Ca²⁺ 浓度为毫摩尔级, 对阴阳离子的平衡、细胞内渗透势的调节具有重要作用。细胞质内的 Ca²⁺ 为纳摩尔级, 是重要的第二信使, 调节植物生长, 如细胞分裂、细胞生长、发育, 如花粉管形成、受精过程及多种抗逆生理反应^[2]。

植物根从土壤中吸收可溶性的 Ca²⁺, 通过胞间连丝构成的共质体途径、细胞间隙形成的质外体途

径将 Ca²⁺ 运往木质部, 随着蒸腾作用运输到叶片等器官^[3]。Ca²⁺ 与 K⁺、Mg²⁺ 等不同, 它在植物体内不易移动, 在衰老过程或缺 Ca 时不能通过再分配或韧皮部回流缓解植物对 Ca 的需求。一旦土壤中可供植物吸收的 Ca²⁺ 发生显著改变, 就会对植物生长带来不利的影响。越来越多的研究表明, 由于酸雨频降, 酸雨中的 H⁺ 与土壤胶体表面上吸附的阳离子交换后, 吸附在土粒表面, 被交换下的阳离子则随渗透水淋失。当土壤 pH 值降至 4 左右时, 土壤中 Ca²⁺、Mg²⁺ 等阳离子基本消耗殆尽^[4]。野外样地的长期数据也证实, 酸雨导致森林土壤中 Ca 的大量流失。对挪威、加拿大、安大略的 Plastic 湖地区、我国南方等多个地区长期观测的数据显示, 可交换 Ca

收稿日期: 2013-08-12

基金项目: 国家青年自然科学基金项目(31201066)

作者简介: 王 静(1984-), 女, 内蒙古乌海人, 在读博士, 主要从事植物生化与分子生物学研究。

通讯作者: 亢 燕(1982-), 女, 山西孝义人, 助理研究员, 博士, 主要从事植物生化与分子生物学研究。

呈现不同程度的流失,且与酸雨沉降量成正比^[5-7]。全球土壤中 Ca 含量降低是一种趋势,应得到广泛重视。本研究在低 Ca 条件下探讨了 Ca 在拟南芥根生长发育及抵御盐胁迫过程中的重要作用。

1 材料和方法

1.1 试验材料与培养

拟南芥哥伦比亚野生型种子 Col-0,内蒙古牧草与特色作物生物技术实验室保存。含有组成型启动子 35S 驱动水母发光蛋白基因 *Aequorin* (*AEQ*) 表达的转基因种子 35S::*AEQ* 为本实验室保存^[8]。

将拟南芥成熟干燥的种子用 75% 乙醇消毒 30 min, 100% 乙醇消毒 10 min 后,于超净台中倒在无菌滤纸上晾干,播种到对照 (CK) 培养基,4 °C 春化 3 d,放入培养室竖直培养 (光强 75 ~ 100 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, 12 h 光照/12 h 黑暗, $(23 \pm 2)^\circ\text{C}$)。

1.2 CK 培养基及测 Ca 相关溶液配制

CK 培养基:MS 大量元素 (不含 CaCl_2) ($0.05 \times$)、MS 微量元素 ($0.5 \times$)、MS Fe 盐 ($0.5 \times$)、5 mmol/L MES、1 mmol/L CaCl_2 、1% 蔗糖、1,3-二(三(羟甲基)氨基)丙烷 (BTP) 调 pH 值至 5.8。使用 1.0% 琼脂糖,避免普通琼脂内高 Ca 的干扰。

测 Ca 缓冲液:1 mmol/L KCl、1 mmol/L CaCl_2 、5 mmol/L MES、pH 值 5.8 (盐胁迫处理时,另外加入 50 mmol/L NaCl)。

1.3 方法

1.3.1 不同浓度 Ca^{2+} 对拟南芥幼苗生长的影响

将 Col-0 播种于 CK 培养基上,乙二醇双(2-氨基乙基醚)四乙酸 (EGTA), Ca^{2+} 和 NaCl 浓度如图 1 所示。添加 EGTA 是为了进一步螯合琼脂糖中残留的 Ca^{2+} 。每皿 10 粒种子,每个处理重复 3 次,培养 10 d 后,直接统计幼苗鲜质量 (每 3 株幼苗称量一次)、主根长、侧根数、根毛长度和数量。或是移苗到含有不同 EGTA 和 Ca^{2+} 浓度的培养基上继续培养 2 d 观察根毛、10 d 观察主根和侧根长度和数量。图 1 中每个数据为平均数 \pm 方差,标记不同小写字母的数据之间在 $P < 0.05$ 水平上有显著差异。

1.3.2 NaCl 胁迫对低 Ca 培养植物 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 的影响 将 35S::*AEQ* 种子播种于 CK 培养基,培养 10 d,转移到 0 Ca 培养基,继续培养 2 d,测定幼苗 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 含量。取拟南芥幼苗放入含 100 μL 测钙缓冲液的 1.5 mL 离心管中,加入 1 μL 100 $\mu\text{mol/L}$ 腔肠荧光素 (Coelenterazine, CTZ), 黑暗静置 4 h 后放入荧光仪 (20/20D, Turner Applied Biosystem), 读取 100 s 背景值,迅速加入 100 μL NaCl 处理液,读

取 500 s 信号值,最后加入 200 μL 1 mmol/L CaCl_2 溶液,继续读取 150 s 信号值。计算幼苗 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 含量,方法见文献[8]。

2 结果与分析

2.1 不同浓度 Ca^{2+} 对拟南芥幼苗生长的影响

拟南芥的幼苗生长状况会随培养基中 Ca^{2+} 的浓度变化而变化,结果显示,随 Ca^{2+} 浓度增加,鲜质量、根长及侧根数 (Lateral root, LR) 都表现出先增加后抑制的现象。当培养基中加入 100 $\mu\text{mol/L}$ EGTA 进一步螯合琼脂糖中的 Ca^{2+} 时,幼苗表现出最差生长状况。随着培养基中 Ca^{2+} 浓度增加,幼苗鲜质量增加、根长增长、侧根数增多,当 CaCl_2 增至 0.5 mmol/L 时,鲜质量、侧根数分别达到最大值 6.59 mg、19 根/cm,主根 4.65 cm 与 0.1 mmol/L CaCl_2 时的主根长没有显著差异。随着 Ca^{2+} 浓度继续增大到 5 ~ 10 mmol/L 时,表现出抑制幼苗生长现象 (图 1)。可见,幼苗生长与培养基中 Ca^{2+} 浓度相关。

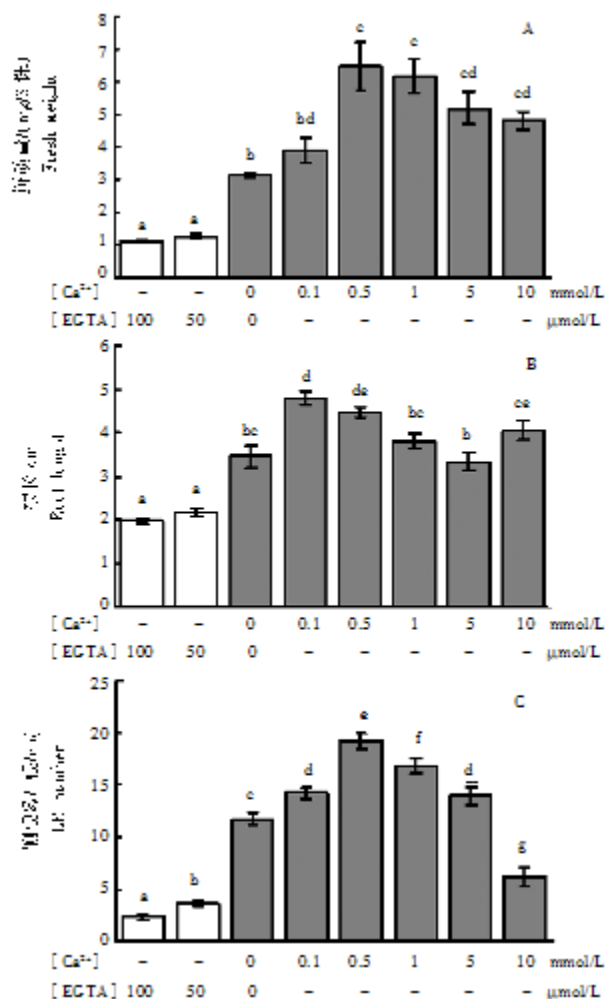


图 1 培养基 Ca^{2+} 含量对拟南芥幼苗生长影响

Fig. 1 Effects of calcium content on the growth of *Arabidopsis* seedlings

2.2 低 Ca 对拟南芥幼苗主根、侧根生长的影响

生长在 0 Ca 及 100 $\mu\text{mol/L}$ EGTA (100 E) 培养基上的幼苗主根生长率、侧根生长率显著低于 CK 培养基幼苗 (图 2-A, B); 但侧根数同 CK 无显著差异 (图 2-C)。以上表明, Ca^{2+} 对于拟南芥幼苗主根及侧根的生长具有调节作用, 低 Ca 抑制幼苗主根侧根生长。

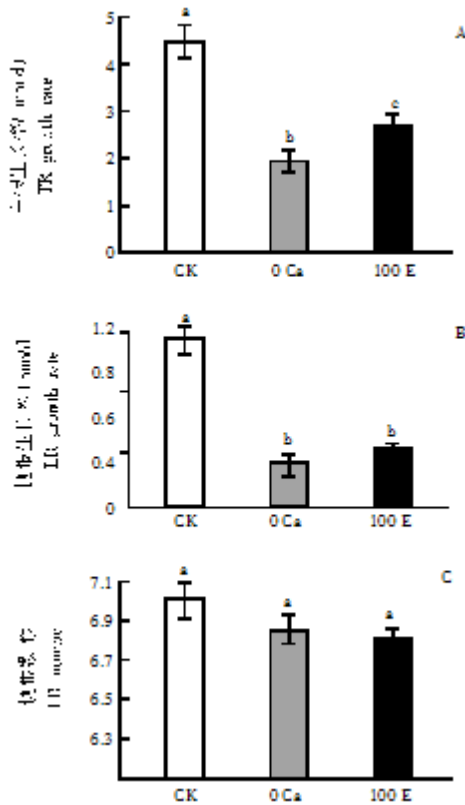


图 2 Ca^{2+} 含量对拟南芥幼苗主根、侧根生长影响
Fig. 2 Effects of calcium content on the growth of *Arabidopsis* primary roots and lateral roots

2.3 低 Ca 对拟南芥幼苗根毛生长的影响

直接将 Col-0 播种于 0 Ca 及 CK 培养基, 0 Ca

培养基上幼苗完全不长根毛 (Root hair, RH) (图 3-A, B)。当把拟南芥幼苗从 CK 培养基移至 0 Ca 培养基培养 2 d 后, 根毛数量及根毛长度明显低于 CK 培养基培养的幼苗, 具有显著差异 (图 3-C, D)。2 种试验结果一致, 低 Ca 显著抑制根毛生长和发育, 表明 Ca^{2+} 对于拟南芥幼苗根毛生长和发育也具有调节作用。

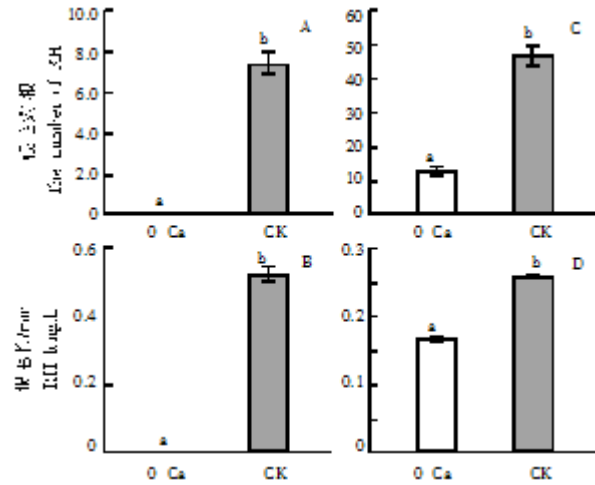
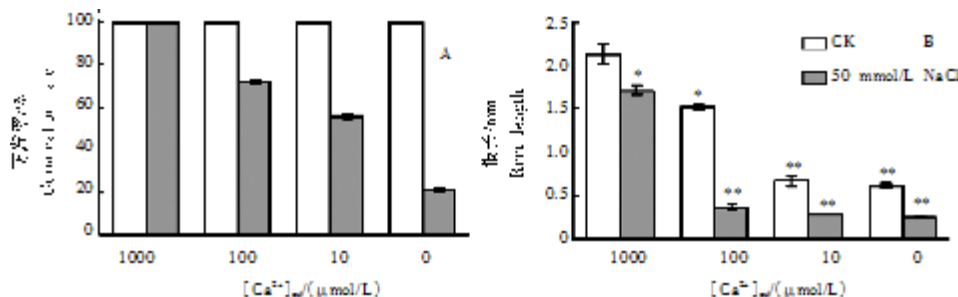


图 3 低 Ca 对拟南芥幼苗根毛生长的影响
Fig. 3 Effects of low content of calcium on the growth of *Arabidopsis* root hair

2.4 NaCl 胁迫下 Ca 对拟南芥幼苗生长的影响

NaCl 抑制拟南芥生长 (图 4)。当培养基中 Ca^{2+} 浓度 ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$) 为 1 mmol/L 时, 种子萌发率为 100%, 随 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ 降低, 种子萌发率逐渐降低, 当培养基中不含 Ca^{2+} 时, 种子萌发率仅为 20% (图 4-A)。与此同时, 根长随 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ 降低而变短, 且 0, 10, 100 $\mu\text{mol/L}$ Ca 根长与 1 mmol/L 根长具有显著差异 (图 4-B)。结果表明, 植物在低 Ca 条件, 对盐胁迫更敏感, Ca 含量适度增多可以缓解盐毒害, 减轻盐对植物生长的抑制。



*. 具有显著性差异, $P < 0.05$; *. 具有极显著差异, $P < 0.01$ 。

*. Asterisk was significant different at $P < 0.05$; *. Asterisk was significant different at $P < 0.01$.

图 4 NaCl 胁迫下 Ca 含量对拟南芥幼苗生长的影响
Fig. 4 Effects of calcium content on the growth of *Arabidopsis* seedlings under NaCl stress

2.5 NaCl 胁迫对低 Ca 培养拟南芥幼苗细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 的影响

50 mmol/L NaCl 胁迫会导致对照培养植物产生 1

个细胞质 Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$) 升高峰值, 为 0.325 $\mu\text{mol/L}$; 而低 Ca 培养植物产生 3 个 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 升高值, 升高频率明显增多, 最高达 0.467 $\mu\text{mol/L}$, 是对照的 1.40 倍。

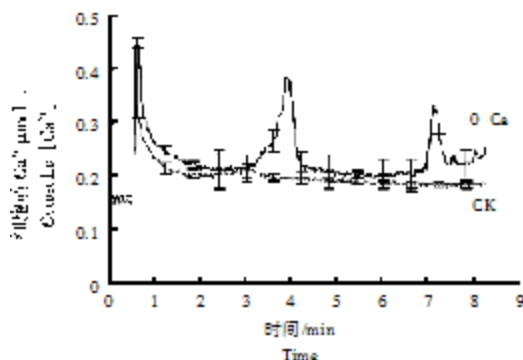


图5 NaCl胁迫对低Ca培养拟南芥幼苗 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 的影响

Fig. 5 Effects of NaCl stress on cytosolic Ca^{2+} of *Arabidopsis* seedlings grown on low calcium media

3 讨 论

Ca对拟南芥根的生长发育具有重要作用。研究发现,外力使根发生弯曲,根凸起一侧的中柱 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 会瞬时升高,同时形成侧根;抑制 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 升高后,则不会形成侧根^[9]。当根部根毛发育起始后,细胞质膜顶端的 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 会升高至 $1\mu\text{mol/L}$ 以上,并在根毛顶端具有最高的 $[Ca^{2+}]_{cyt}$,而其他细胞的 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 仍维持在 $100\sim 200\text{nmol/L}$ 。使用Ca通道抑制剂处理正在生长的根毛细胞 $[Ca^{2+}]_{cyt}$,使根毛顶端细胞 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 升高现象消失,根毛生长也受到抑制^[10]。可见,细胞内Ca浓度对侧根形成、根毛生长至关重要。当外界Ca浓度降低时,可能会破坏植物体内Ca稳态,从而影响了 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 浓度梯度形成,影响了根部正常的生命活动。

盐胁迫条件下,外向整流 K^+ 通道在 K^+ 和 Na^+ 运输上起重要作用, K^+ 通过外向整流 K^+ 通道流出细胞, Na^+ 流入细胞,导致细胞膜去极化。增加细胞外 Ca^{2+} 浓度会抑制外向整流 K^+ 通道活性,从而部分抑制了由于过量 Na^+ 流入细胞引起的抑制植物生长现象^[11]。相反,当外界 Ca^{2+} 降低时,对离子通道活性的抑制作用减弱,使植物表现出对盐胁迫更为敏感的表现。除此之外,植物细胞中,多种外界的刺激都会引起 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 的升高。刺激特异性 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 的动态改变,称为“ Ca^{2+} 标记”,这种由于细胞质内 Ca^{2+} 浓度升高产生的加密信息与多种Ca感知蛋白功能偶联,Ca感知蛋白把 Ca^{2+} 浓度信息传递到下游信号分子,以启动特异的信号响应。拟南芥中, Na^+/H^+ 反向转运体盐敏感基因(*SOS1*)是植物在盐胁迫下维持细胞内低 Na^+ 毒性必需的基因,其编码蛋白位于细胞质膜。*SOS2*是Ser/Thr蛋白激酶,可以与Ca感知蛋白CBL4(*SOS3*)作用,激活*SOS2-SOS3*复合体,磷酸化*SOS1*蛋白,启动其转运活性,

将多余的 Na^+ 排出细胞^[12]。当植物处于外界低Ca条件时,NaCl引起的 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 变化与正常Ca条件下显著不同,细胞内响应 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 升高的信号分子很有可能发生改变或者开启不同的信号通路,影响了植物正常的排 Na^+ 机制。

低Ca不仅抑制植物生长,还使植物面对外界胁迫时更敏感。在全球土壤中Ca含量逐年下降的情况下,深入研究低Ca与植物生命活动调节的分子机理对于培育适应低Ca环境的植物品种十分重要。

参考文献:

- [1] Philip J W, Martin R B. Calcium in plants[J]. Annals of Botany, 2003, 92(4): 487–511.
- [2] Jorg K, Oliver B, Kenji H. Calcium signal: the lead currency of plant information processing[J]. The Plant Cell, 2010, 22(3): 541–563.
- [3] Maclin D, Stephen D T, Roger A L, et al. Calcium storage in plants and the implications for calcium biofortification[J]. Protoplasma, 2010, 247(3–4): 215–231.
- [4] 吴飞华, 刘廷武, 裴真明, 等. 酸雨引起森林生态系统钙流失研究进展[J]. 生态学报, 2010, 30(4): 1081–1088.
- [5] Kirchner J W, Lydersen E. Base cation depletion and potential long-term acidification of Norwegian catchments[J]. Environmental Science and Technology, 1995, 29(8): 1953–1960.
- [6] Watmough S A, Dillon P J. Major element fluxes from a coniferous catchment in central Ontario, 1983–1999[J]. Biogeochemistry, 2004, 67(3): 369–398.
- [7] He Y G. Soil of Dinghushan nature reserve in Guangdong province[J]. Journal of South China Normal University (Nature Science Edition), 1983(1): 87–96.
- [8] Feng L, Jing W, Chunli M, et al. Glutamate receptor-like channel3.3 is involved in mediating glutathione-triggered cytosolic calcium transients, transcriptional changes, and innate immunity responses in *Arabidopsis*[J]. Plant physiology, 2013, 162(3): 1497–1509.
- [9] Gregory L R, Gabriele B M, Alexandra K, et al. Mechanical stimuli modulate lateral root organogenesis[J]. Plant physiology, 2009, 151(4): 1855–1866.
- [10] Carol L W, Tatiana N B, Simon G. Cytoplasmic free calcium distributions during the development of root hairs of *Arabidopsis thaliana*[J]. The plant journal, 1997, 12(2): 427–439.
- [11] Yoshiyuki M, Manabu Y, Ichiro O, et al. Ca^{2+} regulation of outward rectifying K^+ channel in the plasma membrane of tobacco cultured cells in suspension: a role of the K^+ channel in mitigation of salt-stress effects by external Ca^{2+} [J]. Plant Cell Physiology, 1998, 39(10): 1039–1044.
- [12] Rafael N R, Mria Jose S B, Irene V, et al. Structural insights on the plant salt-overly-sensitive 1 (*SOS1*) Na^+/H^+ antiporter[J]. Journal of Molecular Biology, 2012, 424(5): 283–294.