

钙对铜胁迫下大豆种子的解毒作用

陈金峰, 胡斌杰, 韩艳霞, 杨晓柯

(开封大学化学工程学院, 河南 开封 475004)

摘 要: 钙对铜胁迫下大豆种子解毒作用的研究, 对获得优良抗逆性状和提高大豆产量具有重要的意义。设置 0、0.4、0.8、2.4 和 4 mmol · L⁻¹ 铜离子浓度梯度, 同时在各浓度梯度中分别添加 4.5 和 9.0 mmol · L⁻¹ 的钙离子, 进行了种子萌发试验, 测定了相对电导率和保护酶活性。结果显示: 铜对大豆种子的发芽活性具有抑制作用, 且随胁迫浓度的增加这种抑制作用加强, 钙离子对 0.8 mmol · L⁻¹ 铜离子的解毒作用效果明显, 能够提高种子的活力指数和根长, 减少电解质渗透率。4.5 mmol · L⁻¹ 钙能够增加铜胁迫下大豆种子中 POD 活性, 而降低 CAT 活性, 两种酶存在着一种协调关系。说明钙对一定浓度的铜胁迫能够起到缓解作用, 其中保护酶参与了细胞膜完整性的维持。

关键词: 铜胁迫; 钙; 大豆; 保护酶

中图分类号: Q171.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-9841(2008)06-1072-04

Detoxification of Calcium on Soybean Seeds Under Copper Stress

CHEN Jin-feng, HU Bin-jie, HAN Yan-xia, YANG Xiao-ke

(College of Chemical Engineering Kaifeng University, Kaifeng 475004, Henan, China)

Abstract: To obtain soybean superior character with stress resistance and higher yield, the study of calcium on soybean seeds under copper stress is important. The seeds was soaked in different copper concentrations of 0, 0.4, 0.8, 4 mmol · L⁻¹, supplied with 4.5, 9.0 mmol · L⁻¹ calcium, and then the seeds germination, relative permeability and activities of protective enzymes were investigated. The results showed the seed vigor was decreased with the increasing of copper concentration. Addition of calcium could alleviate the toxicity of 0.8 mmol · L⁻¹ copper to soybean seeds, especially increasing seed activity index, improving root length, and reducing the relative permeability of cell membrane. Under different copper concentrations, 4.5 mol · L⁻¹ calcium could increase pod activity and decrease CAT activity. The results indicated that calcium alleviated copper toxicity on soybean seeds to a certain extent, and protective enzymes could maintain the integrity of cell membrane.

Key words: Copper stress; Calcium; soybean; Protective enzymes

近年来, 工业“三废”、城市垃圾等排放及其农用化学品应用的日趋广泛, 土壤环境污染日益严重, 植物的重金属毒害问题逐渐显现。过量的铜一方面能破坏膜通透性影响离子平衡, 进而造成代谢紊乱, 另一方面可以取代某些酶蛋白中维持功能所必需的特定元素或与酶蛋白中非活性基团结合导致变性, 对不同重金属所造成的毒害效应, 植物往往会有相应的保护机制来进行对抗, 其中钙离子对这些重金属的对抗作用尤为突出, 作为植物体内的钙, 不仅是一种大量营养元素, 更重要的是作为胞外信号与胞内生理生化反应的第二信使, 调节植物响应环境变化过程。例如钙可减少铜所造成的麦叶片和根系

的相对膜透性和 MDA 含量的增加, 提高小麦根系活力, 增加盐胁迫下小麦萌发过程胚乳内蛋白酶的活性^[1], 参与一氧化氮促进盐胁迫下玉米种子萌发^[2], 但钙对铜胁迫下大豆种子的作用研究未见报道, 为此探讨钙对铜离子毒害的缓解作用, 以及在此过程中过氧化物酶和过氧化氢酶的保护作用。

1 材料与方法

1.1 试验设计

开豆四号来自开封市种子公司, 取健壮饱满的大豆种子用 75% 的酒精消毒 5 min, 无菌水冲洗 3 次。各取 40 粒, 分别置于处理液中浸泡 6 h, 铜离子

收稿日期: 2008-11-02

基金项目: 开封大学 2007 年高等职业教育教改立项资助项目(2007-KDJG-11)。

作者简介: 陈金峰(1977-), 男, 硕士, 讲师, 现从事生物化学与分子生物学的教学及研究。E-mail: cjfchensman@163.com。

浓度梯度分别为 0、0.4、0.8、2.4、4 mmol · L⁻¹, 添加的钙离子浓度梯度分别为 0 mmol · L⁻¹ (Ca0) 4.5 mmol · L⁻¹ (Ca1) 和 9 mmol · L⁻¹ (Ca2), 每个处理 40 粒种子, 3 次重复。浸种后, 播种于加有 2 层纱布的培养皿中, 遮光, 25℃ 萌发, 每天用处理液使纱布保持湿润。

1.2 生理指标的测定方法

发芽期间, 统计发芽粒数, 计算发芽势 G_v, 发芽率 G, 发芽指数 GI, 活力指数 VI。

计算公式如下: G_v = 最高一天的发芽种子数/供试种子总数 × 100%

$G = G_a / G_n \times 100\%$ (G_a: 发芽终止时的全部发芽种子数; G_n: 供试种子总数)

$GI = \sum (G_t / D_t)$ (G_t: 在第 t 天的全部正常发芽数; D_t: 发芽天数)

$VI = GI \times W$ (W: 第 4 天发芽大豆的单株平均鲜重)

电导率测定用 DDS—IIA 型电导仪测定浸出液和煮沸后浸出液电导率的相对比率^[3], 过氧化物酶 (POD) 活性采用愈创木酚法, 用单位质量新鲜样品 1 min 的 A470 增加 0.01 酶量为 1 个酶活单位 (u)^[4]。过氧化氢酶活性采用以单位质量新鲜样品 1 min 内 A240 减少 0.1 的酶量为 1 个酶活单位 (u)^[5]。

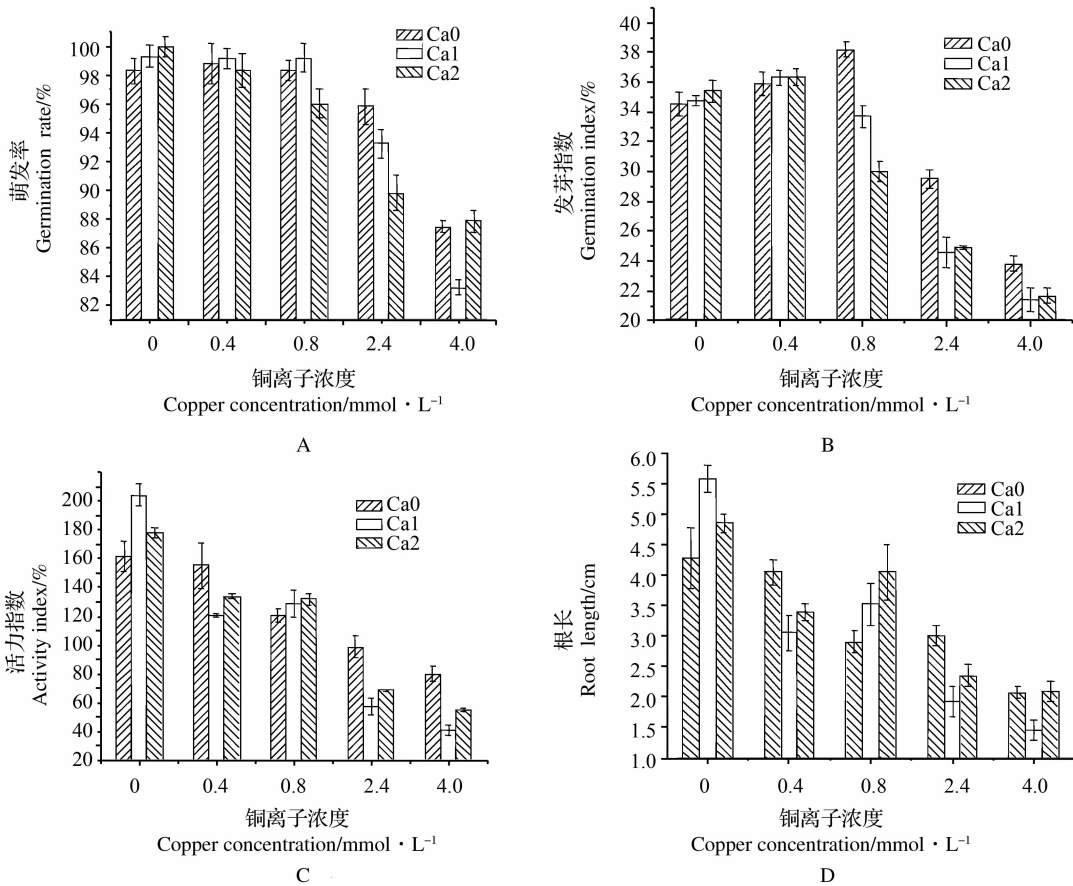
1.3 数据分析

采用 SPSS 软件对数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 钙对铜胁迫下大豆种子萌发的影响

从图 1-A 和 1-B 可以看出, 0 ~ 0.8 mmol · L⁻¹ 浓度的铜可以促进种子萌发, 提高发芽率和发芽指数, 特别是 0.8 mmol · L⁻¹ 铜对发芽指数的促进比较显著, 比对照提高了 7.9% (P < 0.05), 钙对铜胁迫下大豆种子的萌发率和发芽指数虽然有所增强, 但



Ca0, Ca1, Ca2 分别表示钙离子浓度是: 0, 4.5, 9.0 mmol · L⁻¹。下同。

Ca0, Ca1, Ca2 stand for 0, 4.5, 9.0 mmol · L⁻¹ calcium concentrations respectively. The same as below.

图1 钙对铜胁迫下大豆种子萌发的影响

Fig. 1 The effect of Ca on soybean seeds germinations under copper stress

并不显著($P>0.05$)。随着铜浓度增加,发芽率和发芽指数均显著下降,同时钙离子加重了这种趋势,表现出钙和铜的协同毒害效应。从图 1- C 和 1- D 来看,活力指数和根长对铜离子比较敏感,随铜离子浓度的增加而逐渐降低。当在溶液中添加 $4.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 钙时, $0.8\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 铜胁迫下种子的活力指数和根长比对照分别增加了 6.86% 和 2.06% ,钙离子达到 $9.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,这种趋势进一步增加,达到 10% 和 5.6% ($P<0.05$),钙离子对 0.4 、 2.4 和 $4.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 铜胁迫的大豆种子起不到缓解作用,且有协同毒害作用,但高钙对铜的协同作用趋势较缓。从以上结果可以推测:较低浓度铜离子可以促进种子的萌发,但萌发种子的活性较低,钙离子对一定浓度铜胁迫种子的活性起到缓解作用,且这种缓解作用在高钙时表现的更突出。

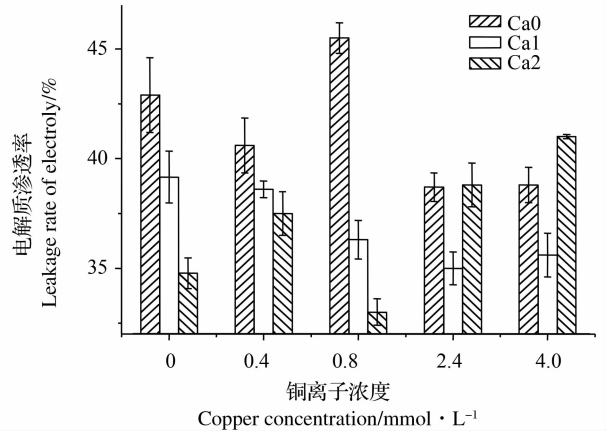


图2 钙对铜胁迫下大豆种子电解质渗透率的影响
Fig.2 The effect of Ca on relative permeability under copper stress

2.2 钙对铜胁迫下大豆种子电解质渗透率的影响

从图 2 可知,在 $0\sim0.8\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 铜胁迫下,大豆种子的电解质渗透率先下降后上升,在添加 4.5 和 $9.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 钙时,电解质渗透率普遍出现下降趋势,随添加钙离子浓度的增加,这种减小趋势进一步增强,表现出钙对铜毒害的缓解作用,尤其对 $0.8\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 铜毒害的缓解作用比较显著,差值分别是 9.2% 和 12.5% ($P<0.01$)。在高于 $0.8\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 铜胁迫下,种子的电解质渗透率也小于对照,可能是铜离子浓度过高导致胞内电解质的大量外泄,在添加 $4.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 钙时,这种减少趋势进一步增加,表现出铜和钙的协同毒害作用,但在添加 $9.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 钙时电解质渗透率又趋于上升,高于 2.4 和 $4.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 单一铜胁迫的 3.8 和 5.4% ,表现出

高钙对高铜毒害的一定缓解作用。所以钙离子在保护细胞膜的完整性方面起到了重要作用,特别是钙对低铜毒害的缓解作用较强,另外高钙对高铜毒害也表现出一定的缓解作用。

2.3 铜和钙离子对大豆种子保护酶活性的影响

2.3.1 钙对铜胁迫下大豆种子过氧化物酶活性的影响 从图 3 可知,在 $0.8\sim2.4\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 铜胁迫下,大豆种子过氧化物酶的活性都低于对照,在添加 $4.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 钙时,过氧化物酶的活性得到了一定的提高,但随钙离子浓度的增加活性又迅速降低,而在 0.4 和 $4.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 铜胁迫时,前者过氧化物酶活性随钙离子浓度的增加而增强,后者表现出相反的趋势。所以钙可以通过增加过氧化物酶活性而缓解低铜对大豆种子的毒害,而通过降低过氧化物酶活性来加重高铜对大豆种子的毒害。

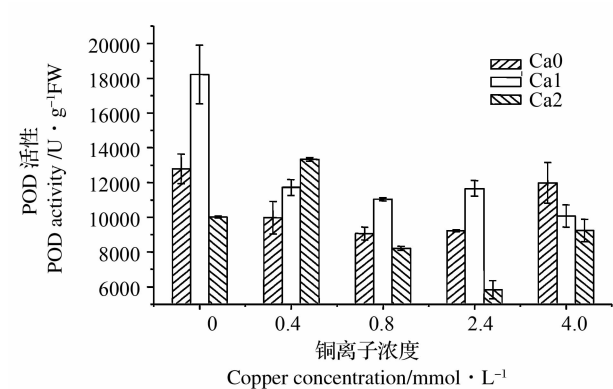


图3 钙对铜胁迫下大豆种子过氧化物酶活性的影响
Fig.3 The effect of Ca on POD activity under copper stress

2.3.2 钙对铜胁迫下大豆种子过氧化氢酶活性的影响

从图 4 可知,低铜可以促进过氧化氢酶活性

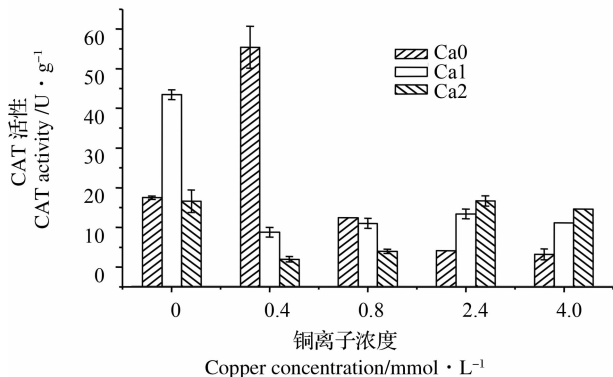


图4 钙对铜胁迫下大豆种子过氧化氢酶活性的影响
Fig.4 The effect of Ca on CAT activity under copper stress

的增加,随铜离子浓度的增加,酶活性迅速降低,添加钙离子时,加重这种趋势,特别是对高钙反应更为明显,但在 2.4 ~4 mmol · L⁻¹ 浓度范围内,随钙离子浓度的增加,过氧化氢酶的活性又开始上升,所以低铜可以促进过氧化氢酶活性增强,钙离子对高铜毒害的种子通过增加过氧化氢酶活性来起到部分缓解作用。

3 讨论

植物遭受生物和理化因子伤害时,膜上受体接受并传递胁迫信号,引发质膜和细胞器的氧化猝发,产生 ROS (reactive oxygen species, ROS), ROS 的增加会损害膜系统,导致电解质外渗,铜离子浓度达到 0.8 mmol · L⁻¹ 时,电解质渗透率最大,一定浓度钙离子降低了电解质的渗透率,起到保护膜系统作用,这种保护作用之一归因于钙离子可以增强抗氧化酶的活性来清除过量的 ROS,而且已有初步证据表明钙信使系统和抗氧化酶系统之间存在相互作用,例如氯化钙浸种能够提高玉米种子活力和谷胱甘肽还原酶(GR) 的活性^[6],而胞膜脂过氧化产物或 GSH 氧化产物可能参与了氯化铜诱导辣椒倍半萜环化酶基因表达的信号传递作用^[7],随铜离子浓度的增加,对大豆种子胁迫效应增强,过氧化物酶在一定浓度铜胁迫的范围内表现出增强的趋势,并且当铜离子浓度达到 4.0 mmol · L⁻¹ 时,其表达量达到最大,但 CAT 的活性当铜离子浓度大于 0.4 mmol · L⁻¹ 时,迅速下降,这和高浓度 Cd 对大豆种子 POD 和 CAT 的分别起到激活和致敏的效应是一致的^[8]。低浓度钙对铜离子起到了解毒作用,POD 酶起关键作用,其活性持续增加,但在高钙和铜离子浓度大于 0.4 mmol · L⁻¹ 时,两种离子的协同作用导致了 POD 酶活性的迅速降低,这与钙离子能增加一定浓度铜离子毒性是一致的^[9],但在 POD 酶活性下降的同时,CAT 酶活性却有所增强,这可能与钙离子对两种酶作用效应不一致和两种酶对过氧化氢的清除作用存在着一种协调关系有关。

参考文献

[1] 翟福勤,汪晓丽,华佳敏,等. 铜对小麦幼苗的毒害和钙的解毒作用[J]. 农业环境科学学报,2007,26(2):694-698. (Zhai F Q,Wang X L,Hua J M,et al. Copper toxicity on seedlings of wheat and the detoxification of calcium[J]. Journal of Agro- Environment Science,2007,26(2):694-698.)

[2] 唐静,韩宇,陈康. 钙离子参与一氧化氮促进盐胁迫下的玉米种子萌发[J]. 植物生理学通讯,2007,43(3):421-424. (Tang J, Han Y,Chen K. Ca²⁺ Involved in seed germination of maize (*Zea mays* L.) induced by nitric oxide under salt stress[J]. Plant Physiology Communications,2007,43(3):421-424.)

[3] 张志良. 植物生理学实验指导[M]. 北京:高等教育出版社,1993. (Zhan Z L. The Experimental guide for plant physiology[M]. Beijing:Higher Education Press,1993.)

[4] 邹琦. 植物生理学实验指导[M]. 北京:中国农业出版社,2000. (Zou Q. The experimental guide for plant physiology [M]. Beijing: Agricultural Press,2000.)

[5] 张治安,张美善,蔚荣海. 植物生理学实验指导[M]. 北京:中国农业科学技术出版社,2004. (Zhan Z A,Zhan M S,Wei R H. The experimental guide for plant physiology[M]. Beijing:China Agricultural Science and Technology Press,2004.)

[6] 郭丽红,陈善娜,龚明. 钙对玉米种子活力和萌发过程中谷胱甘肽还原酶活性的影响[J]. 昆明师范高等专科学校学报,2001,23(4):37-39. (Guo L H,Chen S N,Gong M. Effects of calcium on seed viability and glutathione reductase during germination in maize seedlings[J]. Journal of Kunming Teachers College,2001,23(4):37-39.)

[7] 何水林,陈如凯,郑金贵. Cu²⁺ 作用下辣椒膜脂过氧化及倍半萜环化酶基因转录[J]. 热带亚热带植物学报,2001,9(1):63-68. (He S L,Chen R K,Zheng J G. The expression of sesquiterpene cyclase gene and lipid peroxidation under the treatment of Cu²⁺ in detached leaves of capsicum annum[J]. Journal of Tropical and Subtropical Botany,2001,9(1):63-68.)

[8] 张治安,王振民,徐克章. Cd 胁迫对萌发大豆种子中活性氧代谢的影响[J]. 农业环境科学学报,2005,24(4):670-673. (Zhang Z A,Wang Z M,Xu K Z. Effect of cadmium stress on active oxygen metabolism in germinated soybean seeds[J]. Journal of Agro- Environment Science,2005,24(4):670-673.)

[9] 李伟强,毛任钊,刘小京. 胁迫时间与非毒性离子对重金属抑制拟南芥种子发芽及幼苗生长的影响[J]. 应用生态学报,2005,16(10):1943-1947. (Li W Q,Mao R Z,Liu X J. Effects of stress duration and non-toxic ions on heavy metals toxicity to Arabidopsis seed germination and seedling growth[J]. Chinese Journal of Applied Ecology,2005,16(10):1943-1947.)