

# 外源钙对根际低氧胁迫下黄瓜幼苗 ADH、LDH 活性和同工酶的影响<sup>\*</sup>

王长义 郭世荣<sup>\*\*</sup> 杜长霞 刘超杰

(南京农业大学园艺学院 农业部南方蔬菜遗传改良重点开放试验室, 南京 210095)

**摘 要** 以‘新泰密刺’黄瓜为材料, 采用营养液栽培, 外源使用  $\text{Ca}^{2+}$ 、钙离子通道抑制剂  $\text{La}^{3+}$  与钙调素拮抗剂三氟拉嗪(TFP), 研究了钙对根际低氧胁迫下黄瓜幼苗根系 ADH、LDH 活性和同工酶的影响。结果表明, 低氧胁迫诱导产生了新的 ADH 和 LDH 同工酶条带。低氧胁迫下, ADH、LDH 同工酶丰度和活性显著高于对照; 外源增施  $\text{Ca}^{2+}$  有利于  $\text{Ca}^{2+}$  信号的形成和逆境信号的传递, 营养液添加  $\text{CaCl}_2$  缓解了低氧胁迫对黄瓜植株的伤害, ADH、LDH 同工酶丰度和活性接近对照水平;  $\text{La}^{3+}$  抑制  $\text{Ca}^{2+}$  的吸收和体内运输, 营养液添加  $\text{LaCl}_3$  显著抑制了 ADH 和 LDH 同工酶丰度和酶活性, 黄瓜幼苗植株生长受到抑制, 生物量显著低于低氧处理, 表明  $\text{La}^{3+}$  加重了低氧胁迫对黄瓜幼苗植株的伤害; TFP 抑制了低氧逆境胁迫信号的传递, 营养液添加 TFP 抑制了 ADH 和 LDH 同工酶丰度和酶活性, ADH 和 LDH 同工酶丰度和酶活性显著低于低氧处理, 黄瓜幼苗植株生长受到抑制, 黄瓜植株的低氧耐性降低。暗示外源  $\text{Ca}^{2+}$  参与了低氧胁迫下黄瓜根系无氧呼吸代谢的调节, 增强了  $\text{Ca}^{2+}$  向植物体内的运输, 缓解了低氧胁迫对黄瓜幼苗植株的伤害, 增强了植物对低氧的耐性。

**关键词** 低氧胁迫; 钙; 黄瓜幼苗; 同工酶

**中图分类号** Q945 **文献标识码** A **文章编号** 1000-4890(2010)4-0662-07

**Effects of exogenous calcium on the abundance and activity of ADH and LDH isoenzymes in cucumber seedlings root under root-zone hypoxia stress.** WANG Chang-yi, GUO Shi-rong, DU Chang-xia, LIU Chao-jie (College of Horticulture, Nanjing Agricultural University/Key Laboratory of Southern Vegetable Crop Genetic Improvement, Ministry of Agriculture, Nanjing 210095, China). *Chinese Journal of Ecology*, 2010, 29(4): 662–668.

**Abstract:** A hydroponic experiment was conducted to study the effects of exogenous calcium,  $\text{LaCl}_3$ , and trifluoperazine (TFP) on the abundance and activity of alcohol dehydrogenase (ADH) and lactate dehydrogenase (LDH) isoenzymes in cucumber seedlings under hypoxia stress. Hypoxia induced the formation of new ADH and LDH isoenzyme bands. Under hypoxia stress, the abundance and activity of ADH and LDH isoenzymes were significantly higher than those of the control. Increasing exogenous  $\text{Ca}^{2+}$  concentration was conducive to the  $\text{Ca}^{2+}$  signal formation and the adversity signal transduction. The application of 4 mmol  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{L}^{-1}$  alleviated the hypoxia stress significantly, and made the abundance and activity of ADH and LDH isoenzymes closed to the control level.  $\text{La}^{3+}$  inhibited the  $\text{Ca}^{2+}$  uptake and its *in vivo* transport. Applying 50  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  of  $\text{LaCl}_3$  decreased the abundance and activity of ADH and LDH isoenzymes significantly, inhibited the growth of cucumber seedlings, and made the plant biomass be significantly lower than that under hypoxia, implying that  $\text{La}^{3+}$  increased the hypoxia injury of cucumber seedlings. TFP inhibited the hypoxia signal transduction. Applying 20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  of TFP made the abundance and activity of ADH and LDH isoenzymes be significantly lower than those under hypoxia, inhibited the growth of cucumber seedlings, and decreased the hypoxia tolerance of the seedlings, which implied that TFP also increased the hypoxia injury of cucumber seedlings. Our results suggested that exogenous  $\text{Ca}^{2+}$  could regulate the anaerobic respiration

<sup>\*</sup> 国家重点基础研究发展计划项目(2009CB119000)、国家自然科学基金项目(30871736)、现代农业产业技术体系建设专项、国家科技支撑计划项目(2008BADA6B07)和江苏省农业三项工程资助项目(SX(2008)026)。

<sup>\*\*</sup> 通讯作者 E-mail: srguo@njau.edu.cn

收稿日期: 2009-09-14 接受日期: 2009-12-18

process of cucumber roots under hypoxia stress. The exogenous  $\text{Ca}^{2+}$  increased the in vivo transport of  $\text{Ca}^{2+}$ , alleviated the hypoxia injury, and enhanced the plant tolerance against hypoxia stress.

**Key words:** hypoxia stress; calcium; cucumber seeding; isoenzyme.

氧是线粒体电子传递链的最终电子受体,有效氧的减少导致细胞线粒体电子传递受阻,呼吸代谢改变,降低了 ATP:ADP 和腺苷酸能荷 (Gibbs & Greenway, 2003)。细胞为应对能量危机通过糖酵解和发酵产生 ATP,并还原  $\text{NAD}^+$  (Bailey-Serres & Voesenek, 2008)。在植物转入氧不足的最初几分钟内,细胞依赖的外部氧受限,这个过程中能量被大量消耗,并改变代谢机制,通过糖酵解提高无氧代谢能力产生 ATP (Drew, 1997)。钙是植物信号传导中的第二信使 (Knight *et al.*, 1991; Evans *et al.*, 2005),当植物应对环境和发育刺激,胞质钙离子浓度的改变是一重要的网络信号。植物体应对生物和非生物胁迫时被观察到短暂的  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  升高,如冷 (Knight *et al.*, 1996)、盐与干旱 (Knight *et al.*, 1997)、氧应激 (Evans *et al.*, 2005)、光 (Shacklock *et al.*, 1992) 和植物激素 (Allen *et al.*, 2001) 等。氧不足对根系离子流动模式具有重要影响,并且该影响与品种耐性有关 (Pang *et al.*, 2006)。在玉米遭到水淹时,根系中钙离子作为信号分子导致 ADH 和糖酵解基因的激活,并且在涝害早期  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  短暂上升 (Subbiah *et al.*, 1994a)。研究表明,外源施用  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  可缓解细胞酸中毒,延长低氧玉米根尖的存活期 (Roberts *et al.*, 1985)。

低氧胁迫下,黄瓜植株生长受到抑制,鲜质量和干质量显著降低,根系中蛋白质含量降低,而根系中乳酸脱氢酶 (LDH)、丙酮酸脱羧酶 (PDC)、乙醇脱氢酶 (ADH) 活性则显著提高,并且低氧胁迫下 LDH、PDC 和 ADH 活性提高程度与幼苗的抗低氧性和  $\text{Ca}^{2+}$  浓度密切相关 (胡晓晖等, 2005)。然而,外源钙对低氧胁迫下无氧呼吸系统相关酶同工酶的影响鲜有报道,本文通过低氧胁迫下,外源增施钙和钙离子通道抑制剂  $\text{La}^{3+}$  与钙调素拮抗剂三氟拉嗪 (TFP) 对 ADH、LDH 活性和同工酶的影响,进一步探讨钙提高植物根际低氧抗性的机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

以黄瓜 (*Cucumis sativus* L.) 品种‘新泰密刺’为

材料。选取整齐饱满的种子,经消毒、浸种、催芽后,选取发芽一致的种子播于装有石英砂的塑料盘中,在昼/夜温度  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 27\text{ }^{\circ}\text{C} / 15\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 18\text{ }^{\circ}\text{C}$  的温室内育苗。子叶展平后每天浇灌一次  $1/4$  倍 Hoagland 营养液。当幼苗二叶一心时,选取整齐一致的幼苗定植于装有  $1/2$  倍 Hoagland 营养液 ( $\text{Ca}^{2+}$  浓度为  $2\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 的水箱,当幼苗三叶一心时进行低氧处理。

试验于 2009 年 1—6 月在南京农业大学现代化智能温室内进行,设 5 个处理:(A) 对照组 (CK): 用气泵通入正常空气 ( $40\text{ min} \cdot \text{h}^{-1}$ ), 维持营养液溶氧浓度 ( $\text{DO}$ )  $8.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  左右;(B) 低氧组 (H): 用溶氧浓度调节仪 (昆腾, 美国生产) 控制营养液  $\text{DO}$  值为  $0.9 \sim 1.1\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ;(C) 低氧+ $\text{CaCl}_2$  组 (C): 营养液中添加  $\text{CaCl}_2$  使  $\text{Ca}^{2+}$  浓度增至  $6\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;(D) 低氧+ $\text{LaCl}_3$  组 (L): 营养液中添加  $\text{LaCl}_3$ , 使  $\text{La}^{3+}$  浓度达到  $50\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;(E) 低氧+TFP 组 (T): 营养液添加 TFP, 使 TFP 浓度达到  $20\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。每个试验处理 20 株, 设 3 次重复。试验处理后于第 2、4 天和第 6 天分别取黄瓜幼苗根尖部位进行酶测定。

### 1.2 样品制备

同工酶样品用 Tris-HCl ( $0.1\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH 7.0)、15% 的蔗糖、0.2% 的  $\beta$ -巯基乙醇提取,精确称取样品  $0.2\text{ g}$ , 在冰浴中研磨后,加入提取液  $0.6\text{ mL}$ , 研磨充分后将样品转移到  $1.5\text{ mL}$  离心管中,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$   $12000\text{ g}$  离心  $20\text{ min}$ , 上清液直接用于点样。

酶活性样品用 Tris-HCl (pH 6.8) 提取液 (含  $5\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ 、 $5\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\beta$ -巯基乙醇、15% (v/v) 甘油、 $1\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  EDTA、 $1\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  EGTA 和  $0.1\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  苯甲基磺酰氟) 提取,精确称取样品  $0.5\text{ g}$  液氮研磨,加入预冷的提取液  $2.0\text{ mL}$ 。研磨充分后将样品转移到  $3.0\text{ mL}$  离心管中,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$   $12000\text{ g}$  离心  $30\text{ min}$ , 上清液即是粗酶液。

### 1.3 同工酶测定

**1.3.1 电泳方法** 采用 PAGE 垂直电泳,电极缓冲液用 Tris-Gly 缓冲液 (pH 值 8.3)。POD 分离胶  $T=7.5\%$ , 浓缩胶  $T=3.1\%$ 。SOD、ADH 和 LDH 分离胶  $T=7.5\%$ , 浓缩胶  $T=2.5\%$ 。POD 上样  $15\text{ }\mu\text{L}$ ,

SOD、ADH 和 LDH 上样 25  $\mu$ l。电泳置于 4  $^{\circ}$ C 冰箱中进行,起始电压 100 V,当样品进入分离胶后,升高电压至 200 V。当溴酚蓝染料距凝胶末端 1.5 cm 时,先调低电压,然后切断电源(何忠效和张树政,1999)。

**1.3.2 凝胶染色** ADH 电泳结束后,加入染色溶液:NAD 50 mg、3 g  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 的 NBT 10 ml、PMS 2 mg、95% 乙醇 3 ml、0.5 mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> Tris-HCl 缓冲液(1 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> EDTA pH=7.6) 15 ml、0.1 mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> NaCl 5 ml,加去离子水至 100 ml。凝胶在上述染色液中,37  $^{\circ}$ C 黑暗条件下保温 1.5 ~ 2 h,直到酶带被染成深蓝色(何忠效和张树政,1999)。

LDH 电泳结束后,加入染色溶液:NAD 50 mg、3 g  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 的 NBT 10 ml、PMS 2 mg、0.5 mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 乳酸钠 15 ml、0.5 mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> Tris-HCl 缓冲液(1 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> EDTA pH=7.6) 15 ml、0.1 mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> NaCl 5 ml,加去离子水至 100 ml。凝胶在上述染色液中,37  $^{\circ}$ C 黑暗条件下保温 2 ~ 3 h,直到酶带被染成深蓝色(何忠效和张树政,1999)。

**1.3.3 凝胶扫描与分析** 同工酶凝胶用 ImageScanner III 扫描仪扫描,凝胶图像通过 TotalLab TL100 软件进行分析。

**1.4 酶活性测定**

乳酸脱氢酶(LDH)参照 Bergmeyer 等(1974)的方法。2.5 ml Tris-NaCl-NADH 缓冲液(pH 7.5),150  $\mu$ l 酶提取液,用 0.5 ml Tris-NaCl-丙酮酸启动反应,测定 340 nm 波长吸光值的变化。

乙醇脱氢酶(ADH)参照 Waters 等(1991)的方法略作修改,2.76 ml 50 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> TES 缓冲液(pH 7.5)(内含 0.17 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> NADH),200  $\mu$ l 酶提取液,用 40  $\mu$ l 40% 乙醛启动反应,测定 340 nm 波长吸光值的变化。

蛋白质含量测定参照 Bradford(1976)的考马斯亮蓝 G-250 法。

以 OD<sub>340</sub> 每 1 min  $\Delta$ A 减少 0.1 为一个酶活性单位(U),酶活性以 U  $\cdot$  mg<sup>-1</sup> 蛋白表示。

**1.5 植株生物量的测定**

处理 6 d 时,每处理取 15 株幼苗,测定其鲜质量,然后 115  $^{\circ}$ C 杀青,75  $^{\circ}$ C 下烘干至恒量,测定其干质量。

**1.6 数据处理**

试验数据用 SAS 9.13 数据分析软件进行处理,方差分析采用单因素方差分析,多重比较以 Tukey

HSD 进行,显著性检验采用  $\alpha=0.05$ 。

**2 结果与分析**

**2.1 幼苗植株生长**

表 1 可以看出,低氧胁迫 6 d 时,黄瓜幼苗植株地上部和地下部干质量与鲜质量显著低于对照;低氧胁迫下提高营养液 Ca<sup>2+</sup> 浓度显著提高了黄瓜幼苗植株干质量,与低氧处理相比地上部和地下部干质量分别提高了 8.1% 和 10.1%;低氧胁迫下营养液中添加 LaCl<sub>3</sub> 显著抑制了黄瓜幼苗植株地上部鲜质量、干质量和地下部干质量,比低氧处理分别下降了 15.8%、9.3% 和 8.0%;低氧胁迫下营养液中添加 TFP 显著抑制了黄瓜幼苗植株生长,地上部鲜质量与干质量比低氧处理降低了 21.3%、24.5%,地下部鲜质量与干质量降低了 22.7%、31.3%。表明低氧胁迫下外源 Ca<sup>2+</sup> 可缓解低氧逆境对植株造成的伤害,提高植株的生物量,而营养液中添加钙离子通道抑制剂 LaCl<sub>3</sub> 和钙调素拮抗剂 TFP,显著降低了植株的干鲜质量,加重了低氧胁迫对植株的伤害。

**2.2 ADH 同工酶**

如图 1 所示,随着处理时间的延长,低氧胁迫导致许多新的 ADH 同工酶条带产生,整个处理期间,相对迁移率为 0.299 的同工酶条带均出现在各处理中,而在胁迫处理 4 d 后,低氧处理和低氧+CaCl<sub>2</sub> 处理出现新的 ADH 同工酶条带(Rf=0.227,0.252,0.330,0.445,0.485),表明低氧胁迫可诱导新的 ADH 同工酶表达;与对照相比,低氧+LaCl<sub>3</sub> 处理 4 d 仅诱导了 Rf 为 0.227 的同工酶条带,胁迫 6 d 仅诱导产生了 Rf 为 0.330 的同工酶条带,表明由于外界钙离子通道受到抑制导致部分低氧诱导的 ADH 同工酶表达受到抑制;在低氧+TFP 处理中没有新的同工酶条带出现,表明钙信号传递受阻导致低氧逆境信号传递受到限制,从而抑制了低氧诱导的 ADH 同工酶的表达。

表 1 低氧胁迫下 Ca<sup>2+</sup>、La<sup>3+</sup> 和 TFP 对黄瓜幼苗生长的影响  
Tab.1 Fresh and dry weight of cucumber seedlings at Ca<sup>2+</sup>, La<sup>3+</sup> and TFP (g)

处理	鲜质量		干质量	
	地上部	地下部	地上部	地下部
CK	13.23+0.43 a	3.84+0.20 a	1.11+0.01 a	0.18+0.00 a
低氧	7.22+0.01 b	1.71+0.04 b	0.73+0.00 c	0.11+0.00 c
低氧+CaCl <sub>2</sub>	8.40+0.38 b	1.96+0.15 b	0.82+0.01 b	0.12+0.01 b
低氧+LaCl <sub>3</sub>	5.13+0.07 c	1.60+0.08 b	0.62+0.01 d	0.09+0.00 d
低氧+TFP	4.40+0.03 c	0.84+0.13 c	0.45+0.00 e	0.05+0.00 e

同列不同字母表示差异显著(P<0.05)。



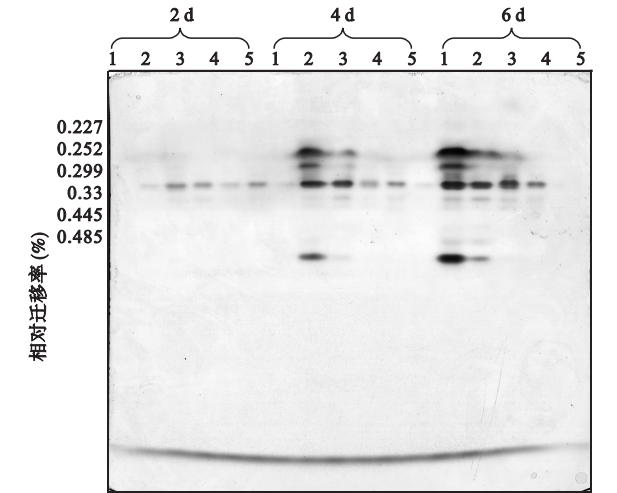


图1 低氧胁迫下  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{La}^{3+}$  和 TFP 对黄瓜根系 ADH 同工酶的影响

Fig.1 Effect of  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{La}^{3+}$  and TFP on ADH isozymes in roots of cucumber seedlings under hypoxic stress

1. 对照;2. 低氧;3. 低氧+  $\text{CaCl}_2$ ;4. 低氧+  $\text{LaCl}_3$ ;5. 低氧+TFP;下同。

如图2所示,对照 ADH 同工酶表达量较低,在胁迫处理初期(2 d),除低氧+ $\text{LaCl}_3$  处理外,其他各处理 ADH 同工酶表达量均显著高于对照;胁迫处理 4 d 后,与对照相比,低氧处理产生 3 条特异 ADH 同工酶条带 ( $\text{Rf} = 0.227, 0.252, 0.485$ ), ADH 同工酶总表达量显著高于对照和其他处理;与对照相比,低氧+ $\text{CaCl}_2$  处理产生 4 条特异 ADH 同工酶条带 ( $\text{Rf} = 0.227, 0.252, 0.330, 0.485$ ), ADH 同工酶总表达量

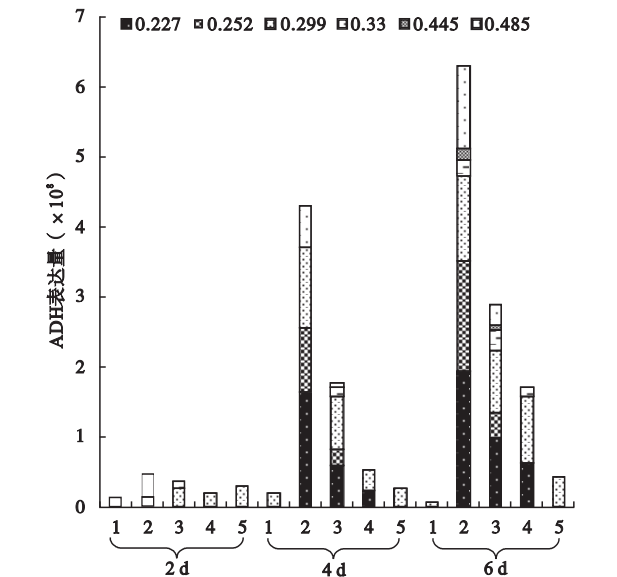


图2 低氧胁迫下  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{La}^{3+}$  和 TFP 对黄瓜根系 ADH 同工酶表达量的影响

Fig.2 Effect of  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{La}^{3+}$  and TFP on abundance of ADH isozymes in roots of cucumber seedlings under hypoxic stress

显著高于对照,并显著低于低氧处理;与对照相比,低氧+ $\text{LaCl}_3$  处理仅产生 1 条特异 ADH 同工酶条带 ( $\text{Rf} = 0.227$ ), ADH 同工酶表达量显著高于对照,并显著低于低氧处理;低氧+TFP 处理没有新的 ADH 同工酶条带产生,同工酶表达量与对照差异不显著,但显著低于其他处理。

2.3 LDH 同工酶

由图3可见,黄瓜幼苗随生育时间的不同会出现不同的 LDH 同工酶条带,处理 2 d 后,对照仅有 1 条 LDH 同工酶 ( $\text{Rf} = 0.405$ ),试验处理 4 d 后,对照同工酶条带数增加到 3 条 ( $\text{Rf} = 0.198, 0.261, 0.405$ )。与对照相比,胁迫处理 2 d,低氧胁迫诱导产生了 1~2 条新 LDH 同工酶条带;胁迫处理 4 d,低氧处理间无新的 LDH 同工酶条带产生,并且除低氧处理外,其他处理较对照减少了 1 条 LDH 同工酶条带;胁迫处理 6 d,低氧处理诱导产生了 2 条 LDH 同工酶条带 ( $\text{Rf} = 0.290, 0.462$ );低氧+ $\text{CaCl}_2$  处理诱导产生了 1 条 LDH 同工酶条带 ( $\text{Rf} = 0.290$ );在低氧+ $\text{LaCl}_3$  处理中  $\text{Rf}$  为 0.198 的同工酶条带消失;在低氧+TFP 处理中仅有 1 条 LDH 同工酶表达。低氧处理期间 LDH 同工酶条带数的变化表明钙对植物体内 LDH 同工酶表达具有重要影响。

由图4可见,与对照相比,低氧处理 LDH 同工酶活性均显著高于对照;低氧+ $\text{CaCl}_2$  处理 LDH 同工酶表达量在胁迫处理 2 和 6 d 显著高于对照,而在胁迫处理的 4 d 与对照差异不显著,与低氧相比,胁迫初期 LDH 同工酶表达量差异不显著,随着处理

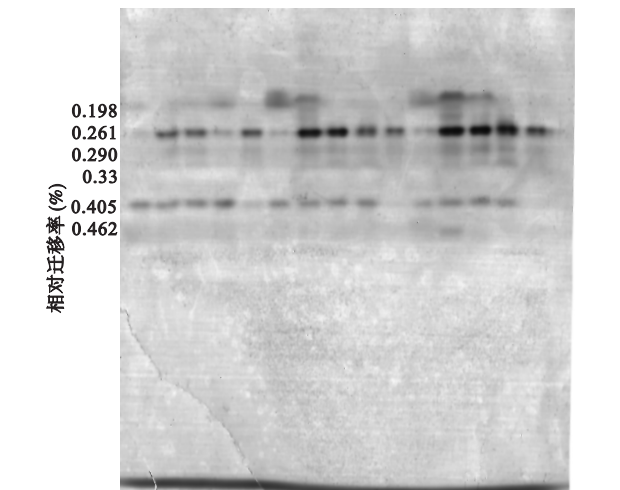


图3 低氧胁迫下  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{La}^{3+}$  和 TFP 对黄瓜根系 LDH 同工酶的影响

Fig.3 Effect of  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{La}^{3+}$  and TFP on LDH isozymes in roots of cucumber seedlings under hypoxic stress

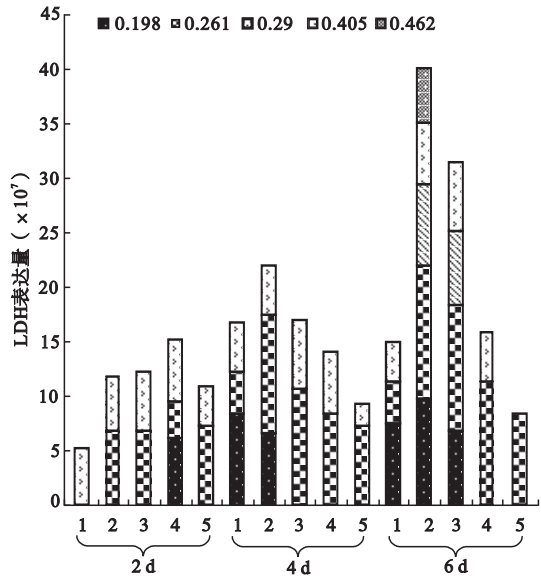


图 4 低氧胁迫下  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{La}^{3+}$  和 TFP 对黄瓜根系 LDH 同工酶表达量的影响  
Fig. 4 Effect of  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{La}^{3+}$  and TFP on abundance of LDH isozymes in roots of cucumber seedlings under hypoxic stress

时间的延长 LDH 同工酶表达量显著低于低氧处理;低氧+ $\text{LaCl}_3$  处理整个处理期间 LDH 同工酶表达量变化不大,胁迫初期,LDH 同工酶表达量显著高于对照和其他处理,胁迫处理 4 d 显著低于对照和低氧处理,而在胁迫处理 6 d 与对照差异不显著,并且显著低于低氧处理;低氧+TFP 处理在胁迫初期显著高于对照,但显著低于其他处理,胁迫处理 4 d 显著低于对照和其他处理。处理期间 LDH 同工酶表达量的变化表明,钙对低氧胁迫下 LDH 同工酶丰度具有显著影响。

2.4 ADH 活性

如图 5 所示,处理期间,低氧处理 ADH 活性显著高于对照;营养液增施外源钙缓解的 ADH 活性的升高,处理期间,低氧+ $\text{CaCl}_2$  处理胁迫 2 d ADH 活性与对照差异不显著,并且显著低于低氧处理,胁迫 4 和 6 d,ADH 活性显著高于对照,并低于低氧处理;低氧+ $\text{LaCl}_3$  处理胁迫 2 d ADH 活性与对照差异不显著,并且显著低于低氧处理,胁迫 4 和 6 d,ADH 活性显著高于对照,并低于低氧和低氧+ $\text{CaCl}_2$  处理;低氧+TFP 处理胁迫 2 d,ADH 活性与对照差异不显著,胁迫 4 d,ADH 活性显著低于对照和其他处理,胁迫处理 6 d 植株出现严重萎蔫,ADH 活性与对照差异不显著,而显著低于其他处理。

2.5 LDH 活性

如图 6 所示,处理期间,低氧处理根系 LDH 活

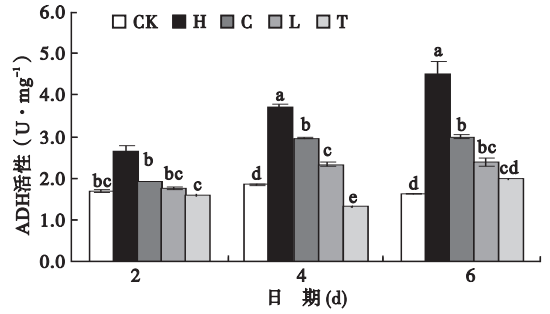


图 5 低氧胁迫下  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{La}^{3+}$  和 TFP 对黄瓜根系 ADH 活性的影响  
Fig. 5 Effect of hypoxia stress on ADH activity in roots of cucumber seedlings  
不同字母表示不同处理间差异显著 ( $P < 0.05$ )。

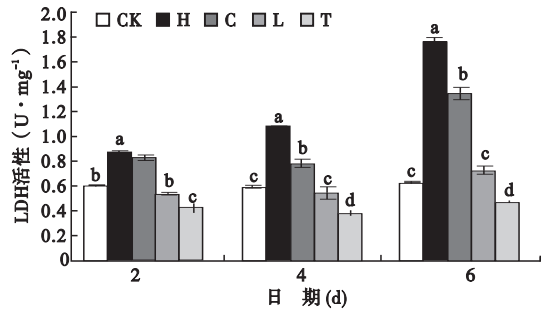


图 6 低氧胁迫下  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{La}^{3+}$  和 TFP 对黄瓜根系 LDH 活性的影响  
Fig. 6 Effect of hypoxia stress on LDH activity in roots of cucumber seedlings  
不同字母表示不同处理间差异显著 ( $P < 0.05$ )。

性显著高于对照;低氧+ $\text{CaCl}_2$  处理在胁迫 2 d 显著高于对照,与低氧处理差异不显著,胁迫处理 4 和 6 d,LDH 活性显著高于对照,并显著低于低氧处理;低氧+ $\text{LaCl}_3$  处理 LDH 活性显著低于低氧和低氧+ $\text{CaCl}_2$  处理,与对照差异不显著;低氧+TFP 处理胁迫期间根系生长受到严重抑制,LDH 活性显著低于对照和其他处理,试验处理后黄瓜幼苗根系发生粘着,并出现部分萎蔫,表明钙调素拮抗剂加重了植物低氧胁迫伤害。

3 讨论

低氧是植物生长过程中遇到的重要非生物胁迫之一,植物根系氧缺乏导致 ATP 合成受到抑制,养分吸收下降 (Steffens *et al.*, 2005)。氧不足导致玉米幼苗植株体内  $\text{Ca}^{2+}$  含量降低, $\text{Ca}^{2+}$  不能从老叶向幼叶运输,同时影响到 N、P、K 的吸收,植物生长发育受到影响 (Atwell & Steer, 1990)。本试验表明,低氧胁迫显著抑制了黄瓜植株的生长,鲜质量和干质

量显著降低(表1),与前人的研究结果一致(胡晓辉等,2005)。低氧胁迫下,提高营养液  $\text{Ca}^{2+}$  浓度,可促进植株生长,植株的鲜质量和干质量均显著高于低氧处理植株(表1);而营养液添加钙通道抑制剂  $\text{LaCl}_3$  和钙调素拮抗剂 TFP 抑制了  $\text{Ca}^{2+}$  的吸收和逆境信号的传递,使植株鲜质量和干质量均显著低于对照和低氧处理植株。由于  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的降低和缺乏使低氧胁迫下植株生长受到严重抑制,鲜质量和干质量显著降低,而高钙促进植株生长,表明  $\text{Ca}^{2+}$  可显著缓解了低氧胁迫对植株的伤害。

低氧胁迫下,植物体内无氧呼吸代谢的增强,ADH 活性的增加可以提高植物对低氧胁迫的耐性(Ismond *et al.*, 2003)。然而,长期低氧胁迫下,黄瓜幼苗根系 LDH、ADH 活性显著上升,乳酸和乙醇含量的大量积累会对植物细胞造成伤害,使植物根系生长受到抑制(胡晓辉等,2007)。本试验结果表明,低氧胁迫下幼苗根系 LDH 和 ADH 活性均显著增加,植株生物量显著降低,与前人在其他作物上的研究结果一致(Hoffman *et al.*, 1986; Drew, 1997; Ismond *et al.*, 2003)。 $\text{Ca}^{2+}$  对低氧胁迫下 ADH 的诱导是必需的(Bailey-Serres & Chang, 2005)。Nie 等(2006)研究表明,厌氧诱导大麦 Hb 和 Adh 基因上调,并且外源增加  $\text{Ca}^{2+}$  可恢复钙拮抗物抑制的 Hb 和 Adh 基因表达上调,暗示  $\text{Ca}^{2+}$  参与了 Hb 和 Adh 基因表达的调节。在玉米幼苗淹水试验中,淹水诱导了 Adh 基因表达,与淹水处理相比  $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{CaCl}_2$  降低了淹水玉米 Adh 基因表达量,并显著缓解了淹水对 Adh 基因表达的抑制作用(Subbaiah *et al.*, 1994b),淹水处理 24 h 时,添加  $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{CaCl}_2$  的淹水处理 ADH 活性为单纯淹水处理的 90%(Subbaiah *et al.*, 1994a),暗示淹水时添加  $\text{CaCl}_2$  降低了 ADH 的基因表达和 ADH 活性。本试验中,低氧胁迫下外源增施  $\text{Ca}^{2+}$ , ADH 同工酶表达量和活性均显著低于低氧处理,与水淹玉米中 Adh 基因表达和 ADH 活性测定结果一致(Subbaiah *et al.*, 1994a, 1994b),并且黄瓜幼苗植株的生物量显著高于低氧处理,表明外源  $\text{Ca}^{2+}$  可缓解植物体的低氧伤害。 $\text{La}$  作为钙离子通道抑制剂阻碍了  $\text{Ca}^{2+}$  由质外体向细胞质的转运(Xie *et al.*, 2002),  $0.1 \sim 1.0 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $\text{La}^{3+}$  就能显著抑制 ADH 活性(Subbaiah *et al.*, 1994b),并且添加  $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{LaCl}_3$  的淹水处理 ADH 活性为单纯淹水处理的 75%(Subbaiah *et al.*, 1994a),与本试验结果一致(表1)。TFP 为 CaM 拮抗剂,可导致  $\text{Ca}^{2+} \cdot \text{CaM}$  信使系统功能发生

障碍,抑制  $\text{Ca}^{2+} \cdot \text{CaM}$  信使作用的发挥。本试验中,低氧胁迫下营养液添加钙通道抑制剂  $\text{LaCl}_3$  和钙调素拮抗剂 TFP,抑制了某些 ADH 和 LDH 同工酶条带的表达,ADH 和 LDH 同工酶表达量和酶活性显著低于低氧处理,这可能是因为植物体内  $\text{Ca}^{2+}$  含量的降低影响了钙信号的形成和钙信号的体内传递,进而造成植物体代谢紊乱,ADH 和 LDH 合成受阻,黄瓜幼苗植株生长受到抑制,植株干鲜质量降低,低氧胁迫伤害加重。

$\text{Ca}^{2+}$  作为植物体内的第二信使,对逆境信号传导起关键作用(Bush, 1995)。植物细胞受到外界刺激时,引起质膜  $\text{Ca}^{2+}$  通道开放,导致胞外  $\text{Ca}^{2+}$  内流。同时,也引起细胞内钙库中  $\text{Ca}^{2+}$  的释放,结果造成细胞质基质和线粒体中  $\text{Ca}^{2+}$  水平的迅速升高,从而形成  $\text{Ca}^{2+}$  信号(简令成和王红,2008)。植物体内增加的  $\text{Ca}_2$  起信使作用,它通过与钙调蛋白结合,形成活化的  $\text{Ca}^{2+} \cdot \text{CaM}$  复合体,引起细胞体内的一系列级联反应,引发一系列生理生化过程(简令成和王红,2008)。低氧胁迫下植物体从有氧呼吸向无氧呼吸转变导致植物体内能荷降低,ATP 合成减少(Drew, 1997),进而影响植物体对矿质元素的吸收(Morard & Silvestre, 1996),造成细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度降低(Trought & Drew, 1980),影响了  $\text{Ca}^{2+}$  信号形成,并抑制了低氧逆境信号的传递。胞质  $\text{Ca}^{2+}$  与植物根毛生长和根系向性有关,钙离子通道抑制剂处理后根尖形态发生改变,侧根生长停滞(Chung & Ferl, 1999)。营养液添加  $\text{Ca}^{2+}$ ,改变了胞内外  $\text{Ca}^{2+}$  浓度梯度,胞外  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的升高有利于  $\text{Ca}^{2+}$  由质外体向共质体运输(Anil & Rao, 2000),培养基添加钙螯合剂 EGTA 的试验表明,钙离子通量的变化必需由外源钙发起并通过质膜进入细胞质(Anil & Rao, 2000)。低氧胁迫下,维持胞质钙浓度和通量有利于玉米根系通气组织的形成(He *et al.*, 1996),并且较高的  $\text{Ca}^{2+}$  进入细胞质在导致细胞程序性死亡过程中是必需的一步,在 EGTA、钌红(Ruthenium)和 W7 [ $\text{N} (6\text{-aminohexyl})\text{-5-chloro-1-naphthalene sulfonamide}$ ] 处理中较低的  $\text{Ca}^{2+}$  抑制了细胞的溶解,这些代谢中间物阻止了通气组织的形成(Visser & Voesenek, 2005)。表明外源增施  $\text{Ca}^{2+}$  可通过通气组织将茎部氧运输到根部,有效缓解根际低氧胁迫下植物体的能量危机,有氧呼吸增强,植物体对矿质元素的吸收增加,促进了植株的逆境生长,增加植物体的低氧耐性。本试验表明,营养液添加  $\text{Ca}^{2+}$  改善了胞内  $\text{Ca}^{2+}$  信号形成的条件,有利于逆境信号向胞内



传递,促进植物体通过一系列生理生化过程的改变来适应环境,植物体内逆境条件的改变影响了无氧呼吸代谢,ADH 和 LDH 同工酶表达量和酶活性的降低,表明植物生长得到改善,减少了大量乙醇和乳酸等代谢有毒的过量积累,缓解低氧胁迫对植株产生的伤害,促进了植株生长。营养液添加  $\text{La}^{3+}$  阻碍了胞外  $\text{Ca}^{2+}$  向植物体内的流动,ADH 和 LDH 同工酶表达量和酶活性显著降低,植物产生严重能量危机,影响植物体内的生物合成,从而加重了植物体的低氧伤害,降低了植物体的低氧耐性。营养液添加 TFP 抑制了  $\text{Ca}^{2+} \cdot \text{CaM}$  复合体的形成,影响逆境信号向体内的传递,进而影响了植物体对逆境的适应性变化,对植株造成严重伤害。

## 参考文献

- 何忠效, 张树政. 1999. 电泳. 北京: 科学出版社.
- 胡晓辉, 郭世荣, 李璟, 等. 2007. 低氧胁迫下钙调素拮抗剂对黄瓜幼苗根系多胺含量和呼吸代谢的影响. 应用与环境生物学报, **13**(4): 475-480.
- 胡晓辉, 李璟, 郭世荣, 等. 2005.  $\text{Ca}^{2+}$  对低氧胁迫下黄瓜幼苗生长和根系无氧呼吸酶的影响. 西北植物学报, **25**(10): 1997-2002.
- 简令成, 王红. 2008.  $\text{Ca}^{2+}$  在植物细胞对逆境反应和适应中的调节作用. 植物学通报, **25**(3): 255-267.
- Allen GJ, Chu SP, Harrington CL, et al. 2001. A defined range of guard cell calcium oscillation parameters encodes stomatal movements. *Nature*, **411**: 1053-1057.
- Anil V, Rao K. 2000. Calcium-mediated signaling during sandalwood somatic embryogenesis: Role for exogenous calcium as second messenger. *Plant Physiology*, **123**: 1301-1312.
- Atwell BJ, Steer BT. 1990. The effect of oxygen deficiency on uptake and distribution of nutrients in maize plants. *Plant and Soil*, **122**: 1-8.
- Bailey-Serres J, Chang R. 2005. Sensing and signalling in response to oxygen deprivation in plants and other organisms. *Annals of Botany*, **96**: 507-518.
- Bailey-Serres J, Voesenek L. 2008. Flooding stress: Acclimations and genetic diversity. *Annual Review of Biochemistry*, **59**: 313-339.
- Bergmeyer H, Bernt E, Hess B. 1974. Lactate dehydrogenase. *Methods of Enzymatic Analysis*, **2**: 574-579.
- Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**: 248-254.
- Bush DS. 1995. Calcium regulation in plant cells and its role in signaling. *Annual Review of Plant Biology*, **46**: 95-122.
- Chung HJ, Ferl RJ. 1999. Arabidopsis alcohol dehydrogenase expression in both shoots and roots is conditioned by root growth environment. *Plant Physiology*, **121**: 429-436.
- Drew MC. 1997. Oxygen deficiency and root metabolism: injury and acclimation under hypoxia and anoxia. *Annual Review of Plant Biology*, **48**: 223-250.
- Evans NH, McAinsh MR, Hetherington AM, et al. 2005. ROS perception in Arabidopsis thaliana: The ozone-induced calcium response. *The Plant Journal*, **41**: 615-626.
- Gibbs J, Greenway H. 2003. Mechanisms of anoxia tolerance in plants. I. Growth, survival and anaerobic catabolism. *Functional Plant Biology*, **30**: 1-47.
- He C, Morgan P, Drew M. 1996. Transduction of an ethylene signal is required for cell death and lysis in the root cortex of maize during aerenchyma formation induced by hypoxia. *American Society of Plant Biologists*, **112**: 463-472.
- Hoffman NE, Bent AF, Hanson AD. 1986. Induction of lactate dehydrogenase isozymes by oxygen deficit in barley root tissue. *Plant Physiology*, **82**: 658-663.
- Ismond KP, Dolferus RJ, de Pauw M, et al. 2003. Enhanced low oxygen survival in Arabidopsis through increased metabolic flux in the fermentative pathway. *American Society of Plant Biologists*, **132**: 1292-1302.
- Knight H, Trewavas AJ, Knight MR. 1996. Cold calcium signaling in Arabidopsis involves two cellular pools and a change in calcium signature after acclimation. *American Society of Plant Biologists*, **8**: 489-503.
- Knight H, Trewavas AJ, Knight MR. 1997. Calcium signalling in Arabidopsis thaliana responding to drought and salinity. *The Plant Journal*, **12**: 1067.
- Knight MR, Campbell AK, Smith SM, et al. 1991. Transgenic plant aequorin reports the effects of touch and cold-shock and elicitors on cytoplasmic calcium. *Nature*, **352**: 524-526.
- Morard P, Silvestre J. 1996. Plant injury due to oxygen deficiency in the root environment of soilless culture: A review. *Plant and Soil*, **184**: 243-254.
- Nie X, Durnin D, Igamberdiev A, et al. 2006. Cytosolic calcium is involved in the regulation of barley hemoglobin gene expression. *Planta*, **223**: 542-549.
- Pang JY, Newman I, Mendham N, et al. 2006. Microelectrode ion and  $\text{O}_2$  fluxes measurements reveal differential sensitivity of barley root tissues to hypoxia. *Plant, Cell and Environment*, **29**: 1107-1121.
- Roberts JKM, Andrade FH, Anderson IC. 1985. Further evidence that cytoplasmic acidosis is a determinant of flooding intolerance in plants. *American Society of Plant Biologists*, **77**: 492-494.
- Shacklock PS, Read ND, Trewavas AJ. 1992. Cytosolic free calcium mediates red light-induced photomorphogenesis. *Nature*, **358**: 753-755.
- Steffens D, Hutsch BW, Eschholz T, et al. 2005. Water logging may inhibit plant growth primarily by nutrient deficiency rather than nutrient toxicity. *Plant Soil and Environment*, **51**: 545.
- Subbaiah CC, Bush DS, Sachs MM. 1994a. Elevation of cytosolic calcium precedes anoxic gene expression in maize suspension-cultured cells. *American Society of Plant Biologists*, **6**: 1747-1762.
- Subbaiah CC, Zhang J, Sachs MM. 1994b. Involvement of intracellular calcium in anaerobic gene expression and survival of maize seedlings. *Plant Physiology*, **105**: 369-376.
- Trought MCT, Drew MC. 1980. The development of waterlogging damage in wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.). *Plant and Soil*, **54**: 77-94.
- Visser E, Voesenek L. 2005. Acclimation to soil flooding-sensing and signal-transduction. *Plant and Soil*, **274**: 197-214.
- Waters I, Morrell S, Greenway H, et al. 1991. Effects of anoxia on wheat seedlings. II. Influence of  $\text{O}_2$  supply prior to anoxia on tolerance to anoxia, alcoholic fermentation, and sugar levels. *Journal of Experimental Botany*, **42**: 1437-1447.
- Xie Z, Zhu J, Chu H, et al. 2002. Effect of lanthanum on rice production, nutrient uptake, and distribution. *Journal of Plant Nutrition*, **25**: 2315-2331.

作者简介 王长义,男,1975年生,博士,助理研究员。主要从事设施园艺与无土栽培研究。E-mail: wangch2008@sohu.com

责任编辑 魏中青