

Ca²⁺ 提高白花苜蓿抗冷性的研究

刘美艳¹, 张健¹, 张伟²

(1. 徐州师范大学生物系, 江苏徐州 221116; 2. 贵阳市苗圃所, 贵州贵阳 550003)

摘要: Ca²⁺ 处理能缓解冷胁迫时白花苜蓿叶片叶绿素的降解速度, 提高叶片中可溶性糖、脯氨酸和 Vc 的含量; 还能保持冷胁迫时细胞膜透性的稳定, 减少 O₂⁻ 和 MDA 的积累; 维持较高的 SOD 和 POD 的活性。

关键词: Ca²⁺; 白花苜蓿; 冷胁迫; 细胞膜透性

中图分类号: Q945 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2004)02-0174-04

Study on enhancement of cold resistance of *Trifolium* by Ca²⁺

LIU Mei-yan¹, ZHANG Jian¹, ZHANG Wei²

(1. Department of Biology, Xuzhou Normal University, Xuzhou 221116, China; 2. Guiyang Nursery Institute, Guiyang 550003, China)

Abstract: The effect of Ca²⁺ on cold resistance of *Trifolium* was studied. The results showed that Ca²⁺ could retard the degradation of chlorophyll in *Trifolium* leaves under cold stress and increase the contents of soluble sugar, proline and vitamin C; Ca²⁺ could also maintain the stability of plasmalemma and decrease the accumulation of O₂⁻ and MDA; keep high activity of SOD and POD.

Key words: Ca²⁺; *Trifolium*; cold stress; plasmalemma permeability

白花苜蓿 (*Trifolium repens* L.) 既是一种优良的豆科牧草, 同时又可以作为绿化用草种植。近年来, 它被广泛用于城市广场、公园、居民小区、人行道的绿化栽培中。在冬季比较寒冷的北方地区, 低温往往对白花苜蓿的生长产生不利的影 响, 严重的会造成白花苜蓿由于受冻死亡而不能安全越冬, 从而影响了白花苜蓿作为草坪草在北方地区的种植与推广, 因此能否提高白花苜蓿的抗冷性直接关系到白花苜蓿作为草坪草的利用前景。Ca²⁺ 作为植物体必需的营养元素, 更作为偶联胞外信号与胞内生理生化反应的第二信使, 能提高植物对逆境的抵抗能力(陈立松等, 1998; 赵可夫等, 1993)。本文以白花苜蓿为材料, 研究了叶面喷施 Ca²⁺ 对白花苜蓿抗冷性的影响, 以期改善白花苜蓿的越冬性提供理

论依据。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

2002年8月将白花苜蓿种子播种于塑料盆中, 盆高35cm、直径40cm, 培养用土为粘壤土, pH6.8, 土壤有机质含量为12g/kg, 全氮为0.8g/kg、速效磷为0.03g/kg、速效钾为0.05g/kg。于室外自然温度、光照下培养。2002年12月30日将白花苜蓿分为两组作如下处理:(1)对照组: 每天分早、晚两次用蒸馏水喷洒叶片, 连续喷洒4d;(2)处理组: 按张宗申等(2000)的方法, 每天分早、晚两次用10mmol/L CaCl₂ (pH6.5)喷洒叶片, 连续喷洒4d; 喷

收稿日期: 2003-01-28 修订日期: 2003-04-22

基金项目: 徐州师范大学科研基金资助项目(01BXL010)

作者简介: 刘美艳(1969-), 女, 江苏丰县人, 讲师, 硕士, 主要从事生物化学的教学与研究工作。

洒时以叶片湿润而没有滴水为度。2003 年 1 月 3 日开始,由于受强冷空气的影响,徐州地区最低气温为 $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$,最高气温为 $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。取叶片测定 Ca^{2+} 对低温下白花苜蓿生理指标的影响。重复取样 3 次,对每次取样的每个指标重复测定 3 次。

1.2 测定项目与方法

叶绿素含量按 Arnon(1949)法测定;可溶性糖含量用蒽酮比色法测定(张志良,1999a);脯氨酸含量按张志良(1999b)的方法测定;质膜相对透性(RPMP)按刘鸿先等(1985)的方法测定;超氧阴离子自由基(O_2^-)含量按王爱国等(1990)的方法测定;丙二醛(MDA)含量按 Heath 等(1968)的硫代巴比妥酸(TBA)比色法测定;Vc 含量用二氯酚靛酚法测定(李广茹等,1995);超氧化物歧化酶(SOD)活性按王爱国等(1983)的方法测定;过氧化物酶(POD)活性按张志良(1999c)的方法测定。

表 1 Ca^{2+} 对冷胁迫下白花苜蓿叶片叶绿素、可溶性糖和脯氨酸含量的影响

Table 1 Effect of Ca^{2+} on chlorophyll, soluble sugar and proline contents of *Trifolium* leaves under cold stress

胁迫时间 Stress time (d)	叶绿素含量 Chlorophyll content($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}\text{FW}$)			可溶性糖含量 Soluble sugar content(% FW)			脯氨酸含量 Proline content($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}\text{FW}$)		
	对照组 CK	处理组 Treatment	显著性测验 Significance analyses	对照组 CK	处理组 Treatment	显著性测验 Significance analyses	对照组 CK	处理组 Treatment	显著性测验 Significance analyses
0	2.12	2.16	—	0.62	0.64	—	36.8	39.4	—
1	2.08	2.15	—	0.66	0.85	a	60.1	86.4	a
2	1.82	1.96	a	0.86	1.22	A	105.2	135.9	a
3	1.54	1.88	A	1.02	1.34	A	84.5	185.2	A
4	1.08	1.67	A	1.18	1.46	a	49.1	123.8	A

注: a, A 分别表示与对照组的差异显著性达 5%、1% 的水平。下同。

Note: a, A represent significant difference at 5% and 1% level, respectively. The same as below.

冷胁迫下叶片中的脯氨酸的含量“先升后降”。但处理组和对照组叶片中脯氨酸含量的变化趋势不完全相同,在冷胁迫过程中,处理组叶片中的脯氨酸含量在胁迫的第三天达到最大值,而对照组叶片中的脯氨酸含量在胁迫的第二天达到最大值,并且在整个胁迫过程中,处理组叶片中脯氨酸含量高于对照组。

SSR(新复极差)测验表明,冷胁迫发生前,处理组和对照组叶片的叶绿素、可溶性糖和脯氨酸含量没有明显差异;随着冷胁迫时间的延长,处理组和对照组叶片的叶绿素、可溶性糖和脯氨酸含量的差异达到了显著和极显著水平。

2.2 Ca^{2+} 对冷胁迫下白花苜蓿叶片 RPMP、 O_2^- 和 MDA 含量的影响

冷胁迫使叶片的质膜相对透性(RPMP)、 O_2^- 和

2 结果与分析

2.1 Ca^{2+} 对冷胁迫下白花苜蓿叶片叶绿素、可溶性糖和脯氨酸含量的影响

从表 1 可以看出,冷害使叶片的叶绿素含量下降。处理组叶片叶绿素的降解速度慢于对照组,提示 Ca^{2+} 能缓解冷胁迫对叶绿素的破坏。如:冷胁迫 2 d 时,处理组和对照组叶片叶绿素含量分别下降了 9.3% 和 14.2%;冷胁迫 4 d 时,处理组和对照组叶片叶绿素含量分别下降了 22.7% 和 49.1%。

冷胁迫使叶片中的可溶性糖含量增加,在冷胁迫期间,处理组叶片可溶性糖含量均高于对照组叶片。胁迫 2 d 时,处理组叶片可溶性糖含量为对照组叶片的 141.9%,胁迫 4 d 时,处理组叶片可溶性糖含量为对照组叶片的 123.7%。

MDA 含量增加,但处理组叶片的含量低于对照组(表 2)。如渗透胁迫 2 d 时,处理组叶片质膜相对透性、 O_2^- 和 MDA 含量分别是对照组的 65.0%、49.7% 和 76.2%;渗透胁迫 4 d 时,处理组叶片质膜相对透性、 O_2^- 和 MDA 含量分别是对照组的 62.6%、39.2% 和 70.0%。SSR 测验表明,未发生冷胁迫时,处理组和对照组叶片的质膜相对透性、 O_2^- 和 MDA 含量没有差异,随着冷胁迫时间的延长,处理组和对照组叶片的质膜相对透性、 O_2^- 和 MDA 含量差异达到显著和极显著水平。

2.3 Ca^{2+} 对冷胁迫下白花苜蓿叶片 Vc 含量、SOD 活性和 POD 活性的影响

冷胁迫时,白花苜蓿叶片的 Vc 含量、SOD 活性和 POD 活性的变化见表 3。可以看出,处理组叶片 Vc 含量在冷胁迫期间一直上升,只是随着冷胁迫的

进行,增加的幅度趋于平缓,而对照组叶片 Vc 含量在胁迫的第二天达到最大值,之后开始下降,处理组叶片 Vc 含量的最大值是对照组叶片的 1.37 倍。

冷胁迫下,对照组叶片 SOD 活性在冷胁迫的第二天达到最大值,而处理组 SOD 活性则继续升高,于第三天达到最大值,处理组叶片 SOD 活性的最大值是对照组叶片最大值的 1.92 倍。冷胁迫使叶片

POD 活性呈下降趋势,但处理组 POD 活性高于对照组。

3 讨论

本试验表明, Ca^{2+} 能有效地缓解冷胁迫下白花苜蓿叶片叶绿素含量的下降,从而可使叶片在冷胁迫

表 2 Ca^{2+} 对冷胁迫下白花苜蓿叶片质膜相对透性、 O_2^- 和 MDA 含量的影响

Table 2 Effect of Ca^{2+} on RPMP, O_2^- and MDA contents of *Trifolium* leaves under cold stress

胁迫时间 Stress time (d)	质膜相对透性 RPMP(%)			O_2^- 含量 O_2^- content(nmol · g ⁻¹ FW)			MDA 含量 MDA content(nmol · g ⁻¹ FW)		
	对照组 CK	处理组 Treatment	显著性测验 Significance analyses	对照组 CK	处理组 Treatment	显著性测验 Significance analyses	对照组 CK	处理组 Treatment	显著性测验 Significance analyses
0	16.5	16.2	—	6.3	6.0	—	47.2	45.7	—
1	23.9	17.5	a	10.5	6.9	a	66.7	55.6	a
2	31.1	20.2	a	18.5	9.2	a	91.2	69.5	A
3	42.5	28.6	A	26.3	11.5	A	112.4	80.6	A
4	55.6	34.8	A	35.2	13.8	A	131.9	91.8	A

表 3 Ca^{2+} 对冷胁迫下白花苜蓿叶片 Vc 含量、SOD 活性和 POD 活性的影响

Table 3 Effect of Ca^{2+} on Vc content, SOD activity and POD activity of *Trifolium* leaves under cold stress

胁迫时间 Stress time (d)	Vc 含量 Vc content(μ mol · g ⁻¹ FW)			SOD 活性 SOD activity(U · g ⁻¹ FW)			POD 活性 POD activity(ΔA_{470} · g ⁻¹ FW · min ⁻¹)		
	对照组 CK	处理组 Treatment	显著性测验 Significance analyses	对照组 CK	处理组 Treatment	显著性测验 Significance analyses	对照组 CK	处理组 Treatment	显著性测验 Significance analyses
0	124.6	132.8	—	51.9	53.6	—	66.5	71.2	—
1	155.2	185.6	a	74.6	94.6	A	57.8	67.9	a
2	168.4	212.7	A	110.8	148.7	A	42.6	60.3	A
3	112.6	223.6	A	90.2	212.5	A	31.4	55.2	A
4	85.2	231.6	A	41.6	178.4	A	18.6	42.3	A

胁迫结束后能迅速恢复较高的光合速率;可溶性糖和脯氨酸作为低温下植物体内重要的渗透调节物质,它们可以降低细胞水势,保护蛋白质分子,增加蛋白质分子的水合度(王娟等,2001),为抵抗逆境提供了物质基础。

细胞膜受到伤害是逆境下植物的一个共同表现。本研究表明,冷胁迫使白花苜蓿叶片质膜相对透性增大,膜脂过氧化作用加剧,从而造成 O_2^- 和 MDA 的积累。 Ca^{2+} 处理可以有效地降低冷胁迫对细胞膜的伤害,维持膜透性和结构的稳定。宋纯鹏等(1992)认为,作为膜的稳定剂,高浓度 Ca^{2+} 可以抑制叶绿体中 O_2^- 的产生,使膜的伤害减轻,为抵抗逆境提供了结构基础。

正常条件下,植物细胞内活性氧的产生和清除

之间保持一个动态平衡,可以保证细胞免受活性氧的伤害;环境胁迫,使植物细胞内活性氧的产生速度加快,而使细胞中积累大量的活性氧(杜秀敏等,2001),使膜脂的过氧化作用加剧,导致 MDA 的大量积累。Vc 是细胞内重要的非酶自由基清除剂,SOD 和 POD 是细胞内重要的酶自由基清除剂。本试验表明, Ca^{2+} 处理能增加冷胁迫时白花苜蓿叶片中 Vc 含量,使 SOD 活性保持在较高的水平上,缓解 POD 活性的下降速度,从而增加了冷胁迫时白花苜蓿叶片清除活性氧的能力,有效地减轻了活性氧对细胞的伤害。

参考文献:

李广茹,王春霞.1995.果蔬中还原抗坏血酸的定量测定

- [J]. 食品研究与开发, 16 (1): 43-46.
- 张志良. 1999a. 植物生理学实验指导 (第3版) [M]. 北京: 高等教育出版社, 160-162.
- 张志良. 1999b. 植物生理学实验指导 (第3版) [M]. 北京: 高等教育出版社, 259-260.
- 张志良. 1999c. 植物生理学实验指导 (第3版) [M]. 北京: 高等教育出版社, 154-155.
- Arnon DI. 1949. Coper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris* [J]. *Plant Physiology*, 24: 10-15.
- Chen LS (陈立松), Liu XH (刘星辉). 1998. Effects of Ca^{2+} on photosynthetic pigments and lipid peroxidation of longan leaves under osmotic stress (渗透胁迫下 Ca^{2+} 离子对龙眼叶片光合色素及膜脂过氧化的影响) [J]. *Acta Horticulturae Sinica* (园艺学报), 25 (1): 87-88.
- Du XM (杜秀敏), Yin WX (殷文璇), Zhao YX (赵彦修), et al. 2001. The production and scavenging of reactive oxygen species in plants (植物中活性氧的产生及清除机制) [J]. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 17 (2): 121-125.
- Heath RL, Parker L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation [J]. *Arch Biochem Biophys*, 25: 189-198.
- Liu HX (刘鸿先), Zeng SX (曾韶西), Wang YR (王以柔), et al. 1985. The effect of low temperature on superoxide dismutase in various organelles of Cucumber seedling cotyledon with different cold tolerance (低温对不同耐寒力的黄瓜 (*Cucumis sativus*) 幼苗子叶各细胞器中超氧化物歧化酶 (SOD) 的影响) [J]. *Acta Phytophysiological Sinica* (植物生理学报), 11 (1): 48-57.
- Song CP (宋纯鹏), Mei HS (梅慧生), Chu ZX (储钟稀), et al. 1992. Effects of calcium on the generation of superoxide free radical and the conversion of ACC to ethylene by wheat chloroplasts (Ca^{2+} 对叶绿体中超氧化物自由基产生以及由 ACC 形成乙烯的影响) [J]. *Acta Phytophysiological Sinica* (植物生理学报), 18 (1): 55-62.
- Wang J (王娟), Li DQ (李德全). 2001. The accumulation of plant osmoticum and activated oxygen metabolism under stress (逆境条件下植物体内渗透调节物质的积累与活性氧代谢) [J]. *Chinese Bulletin of Botany* (植物学通报), 18 (4): 459-465.
- Wang AG (王爱国), Luo GH (罗广华), Shao CB (邵从本), et al. 1983. A study on the superoxide dismutase of soybean seeds (大豆种子超氧化物歧化酶的研究) [J]. *Acta Phytophysiological Sinica* (植物生理学报), 9 (1): 77-84.
- Wang AG (王爱国), Luo GH (罗广华). 1990. Quantitative relation between the reaction of hydroxylamine and superoxide anion radicals in plants (植物的超氧化物自由基与羟胺反应的定量关系) [J]. *Plant Physiology Communications* (植物生理学通讯), 6: 55-57.
- Zhang ZS (张宗申), Li RQ (利容千), Wang JB (王建波). 2000. Effects of Ca^{2+} , La^{3+} and EGTA treatments on the responses of pepper leaves to heat stress (外源 Ca^{2+} 、 La^{3+} EGTA 处理对辣椒叶片热激反应的影响) [J]. *Journal of Wuhan University* (武汉大学学报), 2: 253-256.
- Zhao KF (赵可夫), Lu YF (卢元芳), Yi JL (衣建龙), et al. 1993. Influence of calcium on alleviating NaCl-induced injury effects in wheat seedlings (Ca^{2+} 对小麦幼苗降低盐害效应的研究) [J]. *Acta Botanica Sinica* (植物学报), 35 (1): 51-56.