

NaCl 胁迫对玉米根质膜 H⁺ 分泌和 氧化还原系统的影响*

王宝山 赵可夫

(山东师范大学生物系, 济南 250014)

摘要 玉米 (*Zea mays* L.) 根相对伸长速率 (RER)、质膜 H⁺ 分泌速率和 Fe(CN)₆³⁻ 还原速率均随 NaCl 浓度的增加而下降。随着胁迫时间的延长, H⁺ 分泌速率又有不同程度恢复, Fe(CN)₆³⁻ 还原速率则随胁迫时间的延长而下降。NaCl 胁迫时间在 12 h 前, 随着 NaCl 浓度的增加 NADH 的氧化速率也增加, 超过 12 h 明显下降。在同一 NaCl 浓度下, NADH 氧化速率随胁迫时间的延长而下降。统计结果表明, 盐胁迫下 RER 与 H⁺ 分泌速率的相关系数为 0.999 8。所以, 盐胁迫对根伸长生长的抑制可能与质膜 H⁺-ATPase 和氧化还原系统等 H⁺ 分泌过程的抑制有关。

关键词 胁迫, 玉米根, H⁺ 分泌, 氧化还原系统

EFFECT OF NaCl STRESS ON THE H⁺-EXTRUSION AND REDOX SYSTEM OF THE PLASMA MEMBRANE OF CORN ROOTS

Wang Bao-shan and Zhao Ke-fu

(Biology Department, Shandong Teachers' University, Jinan 250014)

Abstract Four-day-old corn (*Zea mays* L.) seedlings, which had grown in aerated 0.5 × Hoagland solution (pH 5.7) in dark were stressed by 50, 100 and 150 mmol/L NaCl solution for 6, 12 and 24 h respectively. The root segments (0 to 20 mm from the tip) were sampled for study. The results showed that the relative elongation rate (RER), H⁺-extrusion rate and Fe(CN)₆³⁻ reduction rate of the roots declined with the increase of NaCl concentration, but H⁺-extrusion rate restored somewhat with the time course. NADH oxidation rate increased up to 12 h with the increase of NaCl concentration and then decreased significantly, while under the same concentration of NaCl NADH oxidation rate decreased with the time course. The relative coefficient (r) of RER and H⁺-extrusion rate under NaCl stress was 0.999 8. Therefore, it is suggested that the inhibition of the elongation growth by NaCl stress is closely related to the inhibition of redox system and H⁺-ATPase activity of plasma membrane.

Key words NaCl stress, Corn roots, H⁺-extrusion, Redox system

植物细胞质膜上普遍存在着氧化还原系统^[1-3]。质膜氧化还原系统和质膜 H⁺-ATPase 共同参与跨质膜质子电化学势的建立^[4,5]。植物细胞对矿质元素的吸收、运输

收稿日期: 1995-03-16 接受日期: 1995-08-12

* 山东省自然科学基金资助项目。

等都与质膜氧化还原系统有关^[4,6]。植物盐害的原因之一是盐胁迫影响矿质元素的吸收和运输,从而导致细胞内元素平衡紊乱^[7]。植物细胞的伸长生长可能与细胞质膜 H^+ 分泌有关^[8,9]。因此,植物细胞质膜 H^+ 分泌和氧化还原系统在植物抗盐性方面可能起一定作用。植物质膜 H^+ -ATPase 对盐胁迫的响应已有报道^[10~13]。100 mmol/L NaCl 胁迫 7 d 使胡萝卜悬浮培养细胞质膜 NADH 氧化速率 100% 受到抑制, H^+ 分泌速率抑制 30%, 干重下降 56%^[14]。而 NaCl 适应的烟草悬浮培养细胞在加入 100 mmol/L NaCl 后 H^+ 分泌速率成倍增加^[15]。本文以玉米为材料,研究 NaCl 胁迫下玉米根伸长生长、质膜氧化还原系统和 H^+ 分泌速率的变化。以期进一步了解植物细胞质膜氧化还原系统活性和 H^+ 分泌对盐胁迫的响应,并探讨根伸长生长与质膜氧化还原系统活性及质子分泌之间的关系。

1 材 料 和 方 法

1.1 材料的培养

玉米(*Zea mays* L.)品种为盐敏感的“掖单 12 号”,种子经 0.1% $HgCl_2$ 消毒 5 min, 冲洗数次,于自来水中浸泡 12 h,然后在 25 °C 温箱中培养 24 h,露白后置于不锈钢网上,以 0.5 倍 Hoagland (pH 5.7) 营养液于暗下通气培养。第四天转到 0.5 倍 Hoagland 营养液配制的 50、100 和 150 mmol/L NaCl 溶液中继续黑暗通气培养。在 0、6、12 和 24 h 取 0~20 mm 根尖部分进行有关生理指标测定。

1.2 H^+ 分泌速率的测定

参考焦新之等^[16]的方法进行。

1.3 NADH 氧化速率和 $Fe(CN)_6^{3-}$ 还原速率的测定

参考 Rubinstein 等^[17]介绍的方法。在 10 mL 5 mmol/L Tris/Mes (pH 6.0 含 2 mmol/L NADH 或 1 mmol/L $Fe(CN)_6^{3-}$) 中,通气 5 min 后加入 1 g 实验材料,于 (28 ± 1) °C 黑暗中保温 30 min。NADH 氧化速率是测定溶液在波长 340 nm 处的光吸收,按毫克分子消光系数为 6.23 计算。 $Fe(CN)_6^{3-}$ 还原速率是测定溶液在 420 nm 处的光吸收,按 1 mmol/L $Fe(CN)_6^{3-}$ 的消光系数为 1.00 计算^[16]。

1.4 K^+ 吸收速率的测定

在 10 mL 5 mmol/L Tris/Mes (pH 6.0, 含 2 mmol/L KCl) 中,通气 5 min 后,放入 1 g 实验材料,于 (28 ± 1) °C 黑暗环境中保温 30 min,取出材料,用日立 Z-8000 原子吸收分光光度计测溶液 K^+ 浓度,同时测定对照溶液的 K^+ 浓度,以对照与处理溶液 K^+ 浓度差表示 K^+ 吸收或渗漏速率。正值表示吸收,负值表示渗漏。为了避免根组织表面可能吸附或残留的 K^+ 造成误差,实验材料加入前或取出后均用 2~4 °C 冷蒸馏水迅速冲洗根表面 2 次。

1.5 相对伸长速率(RER)的测定

测定根长度,每个处理测定 25 株,取其平均值,计算: $RER = (L_2 - L_1) / (T_2 - T_1)$ 。 L_2 和 L_1 分别表示第二次和第一次测量的根长度(mm), T_2 和 T_1 分别表示两次测定的时间(h)。

2 实 验 结 果

2.1 玉米根质膜 H^+ 分泌和氧化还原系统的特性

4 d 龄玉米黄化幼苗根组织细胞具有 H^+ 分泌能力,外源 NADH 和 $Fe(CN)_6^{3-}$ 对 H^+ 分

泌都有明显促进作用,而且当 NADH 和 Fe(CN)₆³⁻ 同时存在时,对 H⁺ 分泌有协同促进作用(表 1)。质膜 H⁺-ATPase 专一性抑制剂钒酸钠强烈抑制 H⁺ 分泌,抑制作用达 83%,而 NADH 和 Fe(CN)₆³⁻ 同时存在时,钒酸钠的抑制作用明显减小(47%)。

反应介质(Tris/Mes 缓冲液) pH 对玉米黄化幼苗根组织 H⁺ 分泌有很大影响(图 1)。随着介质 pH 的增加, H⁺ 分泌速率也增加,介质中的 NADH 对 H⁺ 分泌速率有明显刺激作用,这种刺激作用随着介质 pH 增加而加强。

表 1 NADH、Fe(CN)₆³⁻ 和 VO₄³⁻ 对玉米根组织 H⁺ 分泌速率的影响

Table 1 Effect of NADH, Fe(CN)₆³⁻ and VO₄³⁻ on the H⁺-extrusion rate of root tissues of corn seedlings

介质 Medium (mmol/L)	H ⁺ 分泌速率 H ⁺ -extrusion rate (μmol·g ⁻¹)
5 Tris/Mes (pH 6.0)	4.05 ± 0.42 (100.00)
+ 2 NADH	5.45 ± 0.38 (134.57)
+ 1 K ₃ Fe(CN) ₆	6.18 ± 0.54 (152.59)
+ 2 NADH + 1 K ₃ Fe(CN) ₆	14.59 ± 1.80 (360.25)
+ 0.1 Na ₃ VO ₄	0.68 ± 0.07 (16.79)
+ 0.1 Na ₃ VO ₄ + 2 NADH + 1 K ₃ Fe(CN) ₆	2.13 ± 0.12 (52.59)

2.2 NaCl 胁迫对质膜 H⁺ 分泌和氧化还原系统的影响

NaCl 胁迫严重影响玉米根组织质膜 H⁺ 分泌、氧化还原系统活性、根的伸长生长和对 K⁺ 的吸收(表 2)。NaCl 抑制 H⁺ 分泌。随着 NaCl 浓度的增加, H⁺ 分泌速率明显下降, 150 mmol/L NaCl 胁迫 6 h 使 H⁺ 分泌速率下降 98.8%。除去 50 mmol/L NaCl 外, 随着胁迫时间的延长, H⁺ 分泌速率有不同程度的恢复。50 mmol/L NaCl 胁迫 6 h 对 Fe(CN)₆³⁻ 还原速率略有刺激, 但随着 NaCl 浓度的增加和胁迫时间的延长, Fe(CN)₆³⁻

还原速率不断下降, 150 mmol/L NaCl 胁迫 24 h, Fe(CN)₆³⁻ 还原速率被抑制 45%。

NaCl 胁迫 6 h 和 12 h 时, 随着 NaCl 浓度的增加, NADH 氧化速率也随之增加。与此相反, 胁迫 24 h, 随着 NaCl 浓度的增加 NADH 氧化速率则随之下降。50 mmol/L NaCl 胁迫 24 h, NADH 氧化速率抑制了 42.4%。在同一 NaCl 浓度胁迫下, NADH 氧化速率随胁迫时间的延长而下降, NaCl 浓度越高下降越明显, 无以胁迫 12 h 后的下降更快。

玉米根 RER 除了 50 mmol/L NaCl 胁迫 6 h 外, 其余均随着 NaCl 浓度的增加或胁迫的延长而下降。

NaCl 胁迫可强烈抑制玉米根对 K⁺ 的吸收。50 mmol/L NaCl 胁迫 12 h 就使 K⁺ 吸收几乎停止, 24 h 时根不但不吸收 K⁺ 反而从根组织中外渗到保温介质中, 随着 NaCl 浓度的增加和胁迫时间的延长, K⁺ 的外渗量也明显增加。

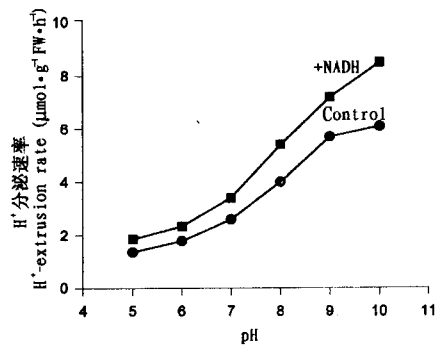


图 1 介质 pH 对玉米根组织 H⁺ 分泌速率的影响
Fig. 1 Effect of medium pH on the H⁺-extrusion rate of the root tissues of corn seedlings

2.3 NaCl胁迫下质膜 H⁺分泌、K⁺吸收及氧化还原系统与 RER 之间的关系

随着 NaCl 浓度的增加,玉米根的 RER、H⁺分泌速率、氧化还原系统活性和 K⁺吸收速率均下降。胁迫 24 h, RER 与 H⁺分泌速率的相关系数 (r) 为 0.999 8, RER 与 Fe(CN)₆³⁻还原速率、NADH 氧化速率及 K⁺吸收速率之间的 r 值分别为 0.985 9、0.961 9和 0.974 5。这说明不同浓度 NaCl 在胁迫 24 h 情况下,根的 RER 与 H⁺分泌速率和质膜氧化还原系统活性及质膜完整性之间存在着很好的正相关,尤其是 RER 与 H⁺分泌速率的 r 值接近 1。但是, RER、H⁺分泌速率、Fe(CN)₆³⁻还原速率和氧化还原系统活性对同一 NaCl 浓度的不同胁迫时间响应不同(图 2)。100 mmol/L NaCl 胁迫下, RER 随胁迫时间的延长而下降,特别是 6 h 后急剧下降,而 H⁺分泌速率 6 h 前急剧下降,尔后又有所上升。NADH 氧化速率在 6 h 前逐渐增加,尔后下降,12 h 后急剧下降。Fe(CN)₆³⁻还原速率则随时间逐渐下降。

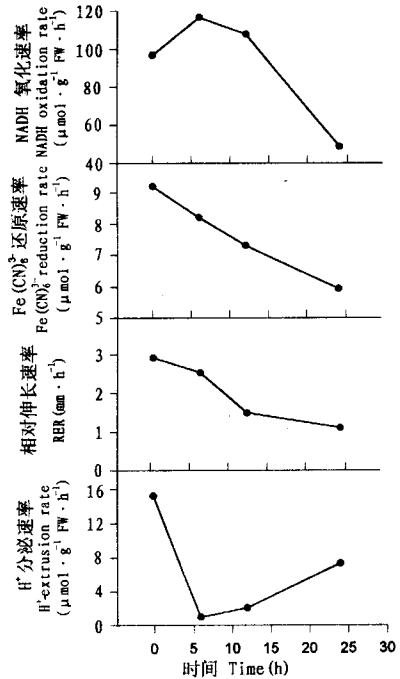


图 2 NaCl(100 mmol/L)胁迫下玉米根相对伸长速率(RER)、质膜 H⁺分泌速率和氧化还原系统活性的变化

Fig. 2 Changes in the relative elongation rate (RER), H⁺-extrusion rate and redox system activity of plasma membrane of corn roots under NaCl (100 mmol/L) stress

3 讨 论

本文结果证明,玉米根组织细胞质膜存在着氧化还原系统,而且,该氧化还原系统参与了 H⁺分泌过程。这和焦新之等^[16]在花生下胚轴中的研究结果是一致的。

在一定胁迫范围内, H⁺分泌速率和氧化还原系统活性对 NaCl 胁迫的响应是不同的。NADH 氧化速率在胁迫 12 h 前,随 NaCl 浓度增加而增加,而 24 h 时,则随 NaCl 浓度增加而急剧下降。H⁺分泌和 Fe(CN)₆³⁻还原速率在 6、12 和 24 h 时均随 NaCl 浓度增加而下降。有趣的是 H⁺分泌在 6 h 前随 NaCl 浓度增加而急剧下降,胁迫时间再延长则有所恢复。以上结果说明:玉米黄化幼苗根组织细胞 H⁺分泌还受到质膜氧化还原系统以外分泌 H⁺组分的控制,而且这个组分对 NaCl 胁迫更为敏感。质膜 H⁺-ATPase 是一种普遍存在于植物细胞中的质子泵,在植物的生长发育中起重要作用^[18],但其在植物耐盐性方面的作用尚未取得一致意见^[10, 11, 13, 19]。因此,盐胁迫与植物质膜 H⁺-ATPase 之间的关系有待深入研究。

NADH 和 Fe(CN)₆³⁻都不能透过质膜而进入细胞内。所以,无论是 NADH 氧化还是 Fe(CN)₆³⁻还原都发生在质膜外侧。由于 NADH 氧化速率在胁迫 12 h 前随 NaCl 浓度增加而增加,而 Fe(CN)₆³⁻还原速率则在 12 h 前随 NaCl 增加而下降。说明 NaCl 胁迫开始的一

表 2 NaCl 胁迫对玉米根组织 H⁺ 分泌速率、氧化还原系统活性、
相对伸长速率 (RER) 和 K⁺ 交换速率的影响

Table 2 Effect of NaCl stress on the H⁺-extrusion rate and redox system activity, relative elongation rate (RER) and K⁺ exchange rate of root tissues of corn seedlings

项目 Item	处理时间 Time (h)	NaCl (mmol/L)			
		0	50	100	150
H ⁺ -extrusion rate ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}\cdot\text{h}^{-1}$)	6	16.0±1.9	12.0±1.3	0.6±0.1	0.2±0.0
	12	14.0±0.8	10.0±0.7	2.0±0.2	1.0±0.1
	24	15.0±0.6	10.0±0.8	7.0±0.5	3.0±0.2
NADH 氧化速率 NADH oxidation rate ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}\cdot\text{h}^{-1}$)	6	9.1±1.1	10.0±1.2	8.2±0.7	6.8±0.2
	12	9.2±0.8	9.0±1.0	7.3±0.8	6.3±0.3
	24	9.3±0.9	7.0±0.8	6.0±0.7	5.1±0.5
Fe(CN) ₆ ³⁻ 还原速率 Fe(CN) ₆ ³⁻ reduction rate ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}\cdot\text{h}^{-1}$)	6	95.4±4.5	100.2±3.5	117.0±3.2	141.9±4.5
	12	96.4±3.4	97.1±2.5	106.4±3.8	117.4±4.0
	24	95.5±4.5	55.0±2.0	48.7±1.5	35.0±1.8
RER(mm·h ⁻¹)	6	3.1±0.1	3.2±0.2	2.3±0.2	1.3±0.1
	12	2.9±0.2	2.7±0.1	1.5±0.1	0.7±0.1
	24	2.8±0.2	1.7±0.1	1.1±0.1	0.2±0.0
K ⁺ 交换速率 K ⁺ exchange rate ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}\cdot\text{h}^{-1}$)	6	+4.1±0.3	+1.8±0.2	-3.5±0.4	-9.1±0.6
	12	+4.1±0.4	+0.1±0.0	-8.8±0.5	-13.5±1.2
	24	+3.8±0.3	-4.7±0.5	-15.7±1.9	-33.4±4.0

段时间, NADH 的电子不仅传递给 Fe(CN)₆³⁻, 而且也传递给其它电子受体。质膜氧化还原系统的天然电子受体是 O₂^[3]。因此, 这一阶段 O₂ 的还原及活性氧的产生与盐胁迫之间的关系值得深入研究。

盐胁迫下, 根的 RER 与 H⁺ 分泌速率、K⁺ 吸收速率及氧化还原系统活性之间存在着很好的相关性。50 mmol/L NaCl 胁迫 24 h, K⁺ 就由细胞内渗漏到细胞外, 说明质膜的完整性已破坏。但是, 就对盐胁迫的敏感性和下降幅度而言, H⁺ 分泌和 RER 对盐胁迫最敏感, 下降幅度也最大, 而且两者之间的 *r* 值接近 1。说明盐胁迫对细胞伸长生长的抑制可能是通过损伤质膜氧化还原系统及 H⁺-ATPase 等与 H⁺ 分泌有关的过程而引起的。本文结果证明: 盐胁迫使玉米幼苗根组织细胞质膜氧化还原系统活性明显受到抑制。Barr^[14] 在一综述中引用其未发表的结果也证明: NaCl 胁迫 7 d, 使胡萝卜培养细胞质膜氧化还原系统活性几乎 100% 受到抑制。至于盐胁迫下, 植物细胞质膜氧化还原系统的天然电子供体和受体如何变化? 这些变化又如何导致 H⁺ 分泌下降及抑制伸长生长等, 尚待进一步研究。

参 考 文 献

- 1 陈珈. 植物细胞质膜氧化还原系统. 植物学通报, 1994. 11:1~10
- 2 Crane F L, Moller I M. Plasmalemma redox functions in plants. *Physiol Plant*, 1988. 73:161~200
- 3 Rubinstein B. Plasma membrane redox activity: Components and role in plant processes. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1993. 44:131~155
- 4 Poole R J. Energy coupling for membrane transport. *Ann Rev Physiol*, 1978. 29:437~460
- 5 Kochain L V, Locus W J. Potassium transport in corn roots, perturbation by exogenous NADH and ferricyanide. *Plant Physiol*, 1985. 77:429~436
- 6 Oren-Shamir M, Pick U, Avron M. Involvement of plasma membrane ATPase in the osmoregulatory mechanism of the alga *D. salina*. *Plant Physiol*, 1989. 89:1258~1264
- 7 Lauchli A. Calcium, salinity and the plasma membrane. In: Leonard R T, Hepler R K eds., *Plant Growth and Development*. The American Society of Plant Physiologists Symposium Series. Rokville MD, 1990.26~35

- 8 Briskin D P, Hanson J B. How does the plant membrane H^+ -ATPase pump protons? *J Exp Bot*, 1992. **43**:269 ~ 289
- 9 Clemand R E. The capacity of acid-induced wall loosening as a factor in the control of *Avena* coleoptile cell elongation. *J Exp Bot*, 1983. **34**:676 ~ 688
- 10 Bruggemann W, Janiesch P. Properties of native and solubilized plasma membrane ATPase from the halophyte *Plantago crassifolia*, grown under saline and nonsaline conditions. *Physiol Plant*, 1988. **74**:615 ~ 622
- 11 Bruggemann W, Janiesch P. Comparison of plasma membrane ATPase from salt-treated and salt-free grown *Plantago maritima* L. *J Plant Physiol*, 1989. **134**:20 ~ 25
- 12 Gabbay-Azaria R, Pick U, Ben-Hayyim G *et al.* The involvement of a vanadate-sensitive ATPase in plasma membranes of a salt tolerant. *Cyanobacterium*. *Physiol Plant*, 1994. **90**:692 ~ 698
- 13 Niu X M, Zhu J K, Narasimhan M L *et al.* Plasma-membrane H^+ -ATPase gene expression is regulated by NaCl in cells of the halophyte *Atriplex nummularia* L. *Planta*, 1993. **190**:433 ~ 438
- 14 Barr R. The possible role of redox-associated protons in growth of plant cells. *J Bioenerg Biomembr*, 1991. **23**:433 ~ 467
- 15 Watad A E A, Pesci P A, Reinhold L *et al.* Proton fluxes as a response to external salinity in wild type and NaCl-adapted *Nicotiana* cell lines. *Plant Physiol*, 1986. **81**:454 ~ 459
- 16 焦新之, 李琳, 黄丽萍等. 花生下胚轴组织 H^+ 分泌和质膜氧化还原系统的某些特性. *植物生理学报*, 1991. **17**:49 ~ 55
- 17 Rubinstein B, Stern A I, Chalmers J D C. Measurements of redox activity at the plasmalemma. *Physiol Plant*, 1990. **80**:479 ~ 486
- 18 Serrano R. Structure and function of plasma membrane H^+ -ATPase. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1989. **40**:61 ~ 94
- 19 Braun Y, Hassidim M, Lerner H R *et al.* Studies on H^+ -translocating ATPase in plants of varying resistance to salinity. *Plant Physiol*, 1986. **81**:1050 ~ 1056