Ca²⁺ 缓解 NaCl 胁迫引起的玉米光合能力下降的作用

张乃华 高辉远* 邹琦

(山东农业大学生命科学学院, 泰安 271018)

摘要 以‘鲁玉 14 号玉米’(‘*Zea mays* cv. Luyu 14’)为材料,研究了 Ca²⁺ 对 NaCl 胁迫下玉米叶片的气孔导度、净光合速率、Mehler 反应及其对超氧化物歧化酶 SOD 和抗坏血酸过氧化物酶 APX 活性的影响,探讨了 Ca²⁺ 在盐胁迫中的可能作用及其作用机制。正常生长条件下外施 2~16 mmol·L⁻¹ Ca²⁺ 造成气孔导度下降,但在盐胁迫条件下外施 2~8 mmol·L⁻¹ Ca²⁺ 却能降低盐胁迫造成的气孔导度下降。另外,无论正常生长条件下还是盐胁迫下,依赖 Mehler 反应的电子传递都会因 Ca²⁺ 的加入而增强,但后者的增强程度较大。对照植株经 2~8 mmol·L⁻¹ Ca²⁺ 处理后总电子传递明显降低,而外施 2~8 mmol·L⁻¹ Ca²⁺ 对盐胁迫植株的总电子传递却有明显的促进作用。8 mmol·L⁻¹ Ca²⁺ 显著地提高了盐胁迫下 SOD 和 APX 的活性,相比之下, Ca²⁺ 对 APX 活性的促进作用更加显著。Ca²⁺ 的加入明显减轻了盐胁迫对玉米的抑制作用,这主要归因于 Ca²⁺ 降低了盐胁迫造成的气孔关闭,改善了光合作用,并通过促进 Mehler 反应一方面直接耗散过剩的激发电子避免了电子传递链的过度还原,另一方面建立跨膜的 pH 梯度刺激依赖叶黄素循环的热耗散来耗散过剩光能,从而缓解了盐胁迫下过剩光能对玉米造成的伤害。而 Mehler 反应产生的活性氧可以被活性提高的抗氧化酶所清除。

关键词 玉米 盐胁迫 光合能力 Mehler 反应 Ca²⁺

EFFECT OF CALCIUM ON ALLEVIATION OF DECREASED PHOTOSYNTHETIC ABILITY IN SALT-STRESSED MAIZE LEAVES

ZHANG Nai-Hua GAO Hui-Yuan* and ZOU Qi

(College of Life Science, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China)

Abstract ‘*Zea mays* cv. Luyu 14’ was used to study the effects of Ca²⁺ on stomatal conductance, net photosynthetic rates, Mehler reactions and the activities of the antioxidant enzymes, SOD and APX, under NaCl stress. Additions of 2-16 mmol·L⁻¹ Ca²⁺ suppressed stomatal conductance of maize leaves under normal growing conditions but significantly increased stomatal conductance under NaCl stress. Mehler reaction dependent electron transport rate was increased by the addition of 2–8 mmol·L⁻¹ Ca²⁺ both in controls and in the NaCl stressed maize leaves; however, the extent of the increase was greater in salt stressed maize leaves. The total electron transport rate was reduced in controls but increased in NaCl stressed maize leaves by the addition of 2–8 mmol·L⁻¹ Ca²⁺. The addition of 8 mmol·L⁻¹ Ca²⁺ significantly increased the activities of SOD and APX with the extent of the increase greater in APX than SOD. In conclusion, addition of Ca²⁺ alleviated inhibition induced by NaCl stress in maize leaves, which was associated with the promotion of photosynthesis, the enhancement of Mehler reaction, and the activities of antioxidant enzymes. The enhanced Mehler reaction could not only consume excess excitation energy to avoid over reduction of the electron chain of photosynthesis but also promoted xanthophyll cycle dependent thermal dissipation by forming a transthylakoid membrane pH gradient (Δ pH) to efficiently protect maize leaves against photodamage under salt stress. Also, the active oxygen produced via the Mehler reaction was scavenged by the enhanced anti-oxidative enzymes.

Key words Maize, Salt stress, Photosynthesis, Mehler reaction, Ca²⁺

Ca²⁺ 除能作为细胞壁的结构物质外,还可作为第二信使参与植物体内的许多生理过程(Dieter, 1984),如激活 NAD 激酶、膜结合蛋白激酶及 Ca-AT-

Pase 等许多酶的活性(Simon *et al.*, 1984),还可通过调节保卫细胞内膨压的变化影响气孔的开放(Willmer & Mansfield, 1969)。近些年来, Ca²⁺ 与植物

耐盐性的关系引起广泛的关注(Greenway & Munns, 1980; Kent & Läuchli, 1985)。人们把 Ca^{2+} 对盐胁迫的缓解作用主要归因于 Ca^{2+} 能稳定膜的结构(Cramer *et al.*, 1985)、降低植物对 Na^+ 的吸收、维持植物体内一定的 K^+ 浓度(Nakamura *et al.*, 1990), 并对某些酶类起保护作用。大量研究表明, 在逆境胁迫下, 由于气孔和非气孔的原因, 植物光合碳同化受到抑制, 植物叶片更易产生过剩光能, 进而加重光抑制(Lu & Zhang, 1998; Muranaka *et al.*, 2002)。然而, 盐胁迫下 Ca^{2+} 对植物的光破坏防御机制影响的研究鲜见报道。研究表明, Mehler 反应在促进植物对过剩光能的耗散, 减轻光抑制过程中行使重要功能(Xu & Shen, 1999)。那么, 盐胁迫下随着过剩光能的增多 Mehler 反应是否能有效启动, 参与过剩光能的耗散? Ca^{2+} 是否能调控盐胁迫下 Mehler 反应在光破坏防御中所起的作用? 此外, Mehler 反应作为一种重要的活性氧产生途径, 其在盐胁迫下产生的活性氧是否能被抗氧化酶类有效清除? Ca^{2+} 是否参与盐胁迫下抗氧化酶活性的调节? 对这些问题的阐明, 将有助于我们深入了解 Ca^{2+} 与植物耐盐性的关系。本实验的目的就是探讨盐胁迫条件下 Ca^{2+} 对玉米叶片的光破坏防御和抗氧化酶活性的影响, 以及 Mehler 反应在光破坏防御中的作用。

1 材料和方法

1.1 实验材料及其处理

实验材料为‘鲁玉 14 号玉米’(‘*Zea mays* cv. Luyu 14’)。种子经精选后进行消毒催芽, 之后播于具有纱网的搪瓷盘, 水培至一叶一心期, 换用 Hoagland 营养液在温室中培养幼苗, 白天的光强为 $800 \sim 1\,000 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 左右(所用光源为生物效应灯)。待玉米长到三叶一心后, 用 $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaCl 对一组幼苗进行胁迫处理, 3 d 后, 分别用 2、8 和 $16 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 CaCl_2 (在培养液中的总浓度) 处理正常生长的玉米幼苗和 NaCl 胁迫的玉米幼苗。在用 CaCl_2 处理玉米幼苗的同时, 用 $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Ca^{2+} 的螯合剂 EGTA (在培养液中的总浓度) 处理另一组 CaCl_2 处理玉米幼苗。3 d 后测定各处理组玉米倒数第一片展开叶的气体交换参数、叶绿素荧光参数、Mehler 反应以及超氧化物歧化酶 SOD 和抗坏血酸过氧化物酶 APX 的活性。

1.2 实验方法

1.2.1 气孔导度、净光合速率的测定

气孔导度 (G_s)、净光合速率 (P_n) 用 CIRAS-2 型

便携式光合系统 (PP-systems, 英国) 测定。用 CIRAS-2 的自动控光、控气及控温装置将测定时的光强控制为 $PAR = 1\,000 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 叶温 25°C , 氧气含量 21%, CO_2 浓度 $360 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。

1.2.2 Mehler 反应的测定

用饱和 CO_2 浓度 ($2\,000 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$), 20% O_2 条件下的光合电子传递速率与饱和 CO_2 浓度, 2% O_2 条件下的光合电子传递速率的差值来表示该条件下由 Mehler 反应所引起的电子传递速率。各种电子传递速率 (ETR) 按以下公式计算: 依赖 Mehler 反应的电子传递速率 (ETR)_m = ($\Phi\text{PS II}$ 饱和 CO_2 , 20% O_2 - $\Phi\text{PS II}$ 饱和 CO_2 , 2% O_2) $\times 0.5 \times \text{PFD}$; 依赖光合碳同化的电子传递速率 (ETR)_P = 光合速率 $\times 4$; PSII 总电子传递 (ETR)_t = $\Phi\text{PS II}$ 饱和 CO_2 , 20% $\text{O}_2 \times 0.5 \times \text{PFD}$ (Björkman & Demmig-Adams, 1987)(注: 该计算没有考虑叶片对光的反射和透射损失, 并且假定玉米叶片的光呼吸速率为零)。

1.2.3 荧光参数的测定

F_o 、 F_m 、 F_m' 、 F_s 等荧光参数用 FMS-2 脉冲调制式荧光仪 (Hansatech, 英国) 测定。将叶片暗适应 30 min 后, 测定最大荧光 F_m 及 PSII 最大光化学效率 F_v/F_m 。非辐射能耗散 (Non-photochemical fluorescence quenching) NPQ 按 $F_m/F_m' - 1$ 计算 (Demmig-Adams, 1990), 光适应下 PSII 实际光化学效率 $\Phi\text{PS II}$ 按 $(F_m' - F_s)/F_m'$ 计算, 光适应下荧光参数 F_m' 和 F_s 的测定参见文献 (Demmig-Adams & Adams III, 1992)。

1.2.4 抗氧化酶 SOD、APX 活性的测定

超氧化物歧化酶 (SOD) 活性的测定: 取 1 g 叶片, 加入 5 ml $65 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 7.8 的 PBS (磷酸缓冲液) (内含 1% PVP (聚乙烯吡咯烷酮)) 于冰浴研磨, 在 4°C 下 $1\,500 \times g$ 离心 20 min, 上清液为酶液, 按 Giannopolitis 和 Ries (1977) 的方法检测酶活性, 以单位时间抑制光还原 50% 的氮蓝四唑 (NBT) 为一个酶活性单位 (U)。

抗坏血酸过氧化物酶 (APX) 活性的测定: 取 1 g 叶片, 加入 5 ml $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 7.8 的 PBS (内含 1% PVP, $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ AsA (抗坏血酸), $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA (乙二胺四乙酸)), 冰浴研磨, 经冷冻离心 ($1\,000 \times g$, 20 min) 后上清为酶液, 按 Nakano 和 Asada (1981) 的方法进行测定。比色均用 UV-1601 型分光光度计 (日本岛津)。

1.2.5 数据处理

以上所有指标每次重复测定 4~5 次。用 F 检

验判断处理与对照叶片之间各项测定指标差异的显著性。当 $F > F_{0.05}$ 时, 处理与对照之间的差异为显著性差异, 当 $F > F_{0.01}$ 时, 处理与对照之间的差异为极显著性差异。当 $F < F_{0.05}$ 时, 处理与对照之间的差异不显著。

2 结果与分析

2.1 NaCl 胁迫对 F_v/F_m 的影响

F_v/F_m 为暗适应下 PS II 最大光化学效率, 反映了光合机构对光能吸收转化的状态。由图 1 可见, 盐胁迫使得 F_v/F_m 明显下降, 如处理 4 d 后, 盐处理的 F_v/F_m 下降到原来的 70%, F_v/F_m 的持续下降说明盐胁迫下的玉米叶片的光合机构受到一定程度的伤害, 因而对光能吸收和转化效率明显下降。对照叶片经 $2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{Ca}^{2+}$ 或 $8\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{Ca}^{2+}$ 处理后, 其 F_v/F_m 较对照叶片变化不大, 而 NaCl 胁迫后的叶片经 $2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{Ca}^{2+}$ 或 $8\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{Ca}^{2+}$ 处理后, 其 F_v/F_m 比 NaCl 胁迫的叶片显著升高。说明 Ca^{2+} 能够显著地缓解 NaCl 胁迫对光合机构的伤害。

图 1 $2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $8\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{CaCl}_2$ 对对照玉米和 $150\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 胁迫 3 d 后玉米叶片 F_v/F_m 的影响(测定在室温进行, 每个点为 4 次重复的平均值)

Fig.1 Effect of $2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ and $8\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{CaCl}_2$ on F_v/F_m in control and $150\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl stressed maize leaves (Data are means $\pm$ SE of four independent measurements at room temperature ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$))
A: CK B: $150\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl C: $2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{Ca}^{2+}$ D: $150\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl + $2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{Ca}^{2+}$ E: $8\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{Ca}^{2+}$ F: $150\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl + $8\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{Ca}^{2+}$

2.2 Ca^{2+} 对玉米叶片气孔导度 (G_s) 和净光合速率 (P_n) 的影响

正常生长条件下, 玉米叶片的气孔导度受外施 Ca^{2+} 的影响, 外施 Ca^{2+} 可抑制气孔导度, $2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{Ca}^{2+}$ 对气孔导度的抑制程度最大, 随着 Ca^{2+} 浓度的增大 ($8\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 抑制程度减弱, 但 $16\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{Ca}^{2+}$ 对气孔导度的抑制程度与 $8\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{Ca}^{2+}$ 相近(图 2a)。为确定施加 Ca^{2+} 后气孔导度的变化是否是由 Ca^{2+} 直接引起的, 用 $3\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Ca^{2+} 的整合剂 EGTA 处理材料, 结果发现 EGTA 的加入基本抵消了 Ca^{2+} 对气孔导度的抑制作用(图 2a), 虽然

Ca^{2+} 对正常生长玉米叶片的气孔导度有抑制作用, 但是在盐胁迫下, 外施 Ca^{2+} 却没有降低玉米叶片的气孔导度, 反而促进了盐胁迫玉米叶片的气孔导度, $8\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{Ca}^{2+}$ 对气孔导度的促进程度最大(图 2b), 这种作用是 Ca^{2+} 直接引起的, 因为加入 EGTA 后可抵消 Ca^{2+} 的作用。净光合速率 (P_n) 的变化与气孔导度的变化基本一致, 外施 Ca^{2+} 促进了盐胁迫玉米叶片的光合作用而对正常玉米叶片的光合则有抑制作用, Ca^{2+} 对净光合速率的影响也是 Ca^{2+} 对气孔直接作用的结果(图 2c、d)。

2.3 Ca^{2+} 对玉米叶片 Mehler 反应的影响

正常生长的玉米依赖 Mehler 反应的电子传递速率 (ETR)_m 随 Ca^{2+} 浓度的增大而提高, 但提高不显著(图 3a), 总的电子传递速率 (ETR)_t 则随 Ca^{2+} 的加入而显著下降(图 3c), 因此加入 Ca^{2+} 后, 尽管 (ETR)_m 有所提高但玉米仍会因 (ETR)_t 的大幅度下降而导致过剩光能增加。为验证 Mehler 反应是否促进热耗散, 用 2% 的氧抑制 Mehler 反应, 如果 Mehler 反应能促进热耗散, 那么当 Mehler 反应被抑制后, NPQ 应该下降。实验结果表明, Mehler 反应被抑制后, NPQ 几乎没有变化(图 4a), 说明尽管外施 Ca^{2+} 促进了 Mehler 反应(图 3a), 但是正常生长玉米的 Mehler 反应并不能有效地促进热耗散。在盐胁迫下, 外施 Ca^{2+} 能使盐胁迫玉米叶片的依赖 Mehler 反应的电子传递速率 (ETR)_m 和总的电子传递速率 (ETR)_t 都显著提高(图 4b、d)。显然这有利于过剩光合电子的消耗, 从而避免电子传递链的过度还原。与上面的方法相同, 用低氧抑制 Mehler 反应后, NPQ 显著降低(图 4b), 说明在 NaCl 胁迫条件下, 外施 Ca^{2+} 后 Mehler 反应的加强可以促进热耗散。

2.4 Ca^{2+} 对玉米叶片活性氧清除酶 SOD 和 APX 活性的影响

Mehler 反应虽然能通过促进电子传递和提高热耗散来减少过剩光能对植物的伤害, 然而 Mehler 反应也是活性氧产生的重要途径。如果 Mehler 反应产生的活性氧不能被有效地清除, 那么过量的活性氧就会破坏光合机构, 此时 Mehler 反应对光破坏的防御作用就无从谈起。为此, 我们测定了外施 Ca^{2+} 对活性氧清除酶类 SOD 和 APX 活性的影响。结果如图 5 所示, $8\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{Ca}^{2+}$ 显著地提高了盐胁迫下 SOD ($F > F_{0.05}$) 和 APX ($F > F_{0.01}$) 的活性(图 5a、b), 相比之下, Ca^{2+} 对 APX 活性的促进作用更加显著。经 $8\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{Ca}^{2+}$ 处理后, APX 的活性比 NaCl

图2 不同浓度 Ca^{2+} (0、2、8 和 16 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 对对照玉米的 G_s (a) 和 P_n (c) 以及对 150 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaCl 胁迫 3 d 后玉米叶片的 G_s (b) 和 P_n (d) 的影响

Fig.2 Effects of different CaCl_2 concentration on stomatal conductance (G_s) and net photosynthetic rate (P_n) in control (a, c) and 150 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl stressed (b, d) maize leaves
测定在 1 000 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 光照、360 $\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ CO_2 和 25 $^{\circ}\text{C}$ 下进行, 每个点为 4 次重复的平均值 Measurements were made in 1 000 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ PFD、360 $\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ CO_2 和 25 $^{\circ}\text{C}$. Data are means $\pm$ SE of four independent measurements

图3 不同 Ca^{2+} 浓度(2 和 8 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 对对照玉米的 $(ETR)_m$ (a) 和 $(ETR)_t$ (c) 以及对 150 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaCl 胁迫 3 d 后玉米叶片的 $(ETR)_m$ (b) 和 $(ETR)_t$ (d) 的影响

Fig.3 Effect of different CaCl_2 concentration on $(ETR)_m$ (Mehler reaction dependent electron transport rate) and $(ETR)_t$ (the total electron transport rate) in control (a, c) and 150 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl stressed (b, d) maize leaves
测定在 1 000 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 光照、360 $\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ CO_2 和 25 $^{\circ}\text{C}$ 下进行, 每个点为 4 次重复的平均值 Measurements were made in 1 000 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ PFD、360 $\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ CO_2 和 25 $^{\circ}\text{C}$. Data are means $\pm$ SE of four independent measurements
A: CK B: 2 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Ca^{2+} C: 8 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Ca^{2+} D: 150 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl E: 150 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl + 2 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Ca^{2+} F: 150 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl + 8 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Ca^{2+}

图4 在 $2000 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1} \text{CO}_2$, 20% O_2 (◆)和 $2000 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1} \text{CO}_2$, 2% O_2 (□)条件下,不同 Ca^{2+} 浓度(0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、2 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、8 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、16 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)对对照玉米(a)和 150 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaCl 胁迫 3 d 后玉米(b)叶片的 NPQ 的影响

Fig.4 Effect of different CaCl_2 concentration on NPQ in control(a) and 150 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl stressed maize leaves under $2000 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1} \text{CO}_2$, 20% O_2 (◆) and $2000 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1} \text{CO}_2$, 2% O_2 (□)

测定在 25 $^{\circ}\text{C}$ 下进行,每个点为 4 次重复的平均值 Data are means $\pm$ SE of four independent measurements at room temperature (25 $^{\circ}\text{C}$)

图5 8 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ CaCl_2 处理对 150 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaCl 胁迫 3 d 后玉米叶片的 SOD(a)和 APX(b)活性的影响

Fig.5 Effect of calcium on SOD activity (a) and APX activity (b) in 150 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl stressed maize leaves

测定在 25 $^{\circ}\text{C}$ 下进行,每个点为 4 次重复的平均值 Data are means $\pm$ SE of four independent measurements at room temperature (25 $^{\circ}\text{C}$)

A: CK B: 150 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl C: 150 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl + 8 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Ca^{2+}

胁迫植株 APX 的活性增加了 26%(图 5a、b)。

3 讨论

气孔导度的大小与植物的光合速率密切相关,在大多数情况下,气孔导度的下降会造成 CO_2 供应受阻进而造成光合速率的下降。正常生长的玉米气孔导度在外施 Ca^{2+} 后受到抑制(图 2a)。但对于盐胁迫下的玉米,加入 Ca^{2+} 却提高了气孔导度(图 2b)、净光合速率(图 2d)、光化学效率 F_v/F_m (图 1)和电子传递的速率(图 3b、d)。我们认为,非盐胁迫下,植物正常生长所需的钙量,在盐胁迫下会变得不足,即盐胁迫下体内首先发生 Ca^{2+} 亏缺(Francois *et al.*, 1991), Ca^{2+} 亏缺再通过直接和间接的作用引起一系列盐胁迫症状(Ehret *et al.*, 1990),包括气孔的关闭和光合作用速率的下降。 Ca^{2+} 除了通过影响气孔导度来影响光合碳同化外,还可能与 Ca^{2+} 对光合

系统本身的影响有关,但 Ca 是否直接参与 CO_2 固定酶系的调节还不十分清楚。外施 Ca^{2+} 弥补了盐胁迫造成的 Ca^{2+} 亏缺而部分抵消了盐胁迫的危害。

由于盐胁迫导致玉米光合碳同化受阻(图 2),造成过剩光能的增多,进而会加重对玉米光合机构的抑制(图 1)。玉米体内增多的过剩激发能如果不能被安全耗散掉还会进一步导致玉米光合机构的不可逆破坏。我们的研究表明,外施 Ca^{2+} 能够有效地促进盐胁迫玉米叶片对激发电子的利用而减缓盐胁迫的伤害(图 3)。一是因为 Ca^{2+} 改善了光合作用对激发电子的利用,其次是 Ca^{2+} 促进了依赖 Mehler 反应的电子传递(ETR)_m(图 3b、d)。Mehler 反应是一条依赖氧的耗能途径。研究表明,Mehler 反应在促进植物对过剩光能的耗散,减轻光抑制过程中行使重要功能(Xu & Shen, 1999)。在盐渍、干旱等逆境条件下,由于 CO_2 供应受阻,通过光合电子传递所消

耗的光能下降, 依赖氧的电子传递增加, 这能避免因电子传递链过度还原对植物所造成的伤害。如干旱条件下, Mehler 反应的增强可减缓过剩光能对小麦的破坏 (Biechler & Fock, 1996)。此外, 考虑到 Mehler 反应不消耗 ATP, 使光合电子传递给 O_2 后能加大跨类囊体膜质子梯度, 利于类囊体腔的酸化, Mehler 反应可通过影响叶黄素循环而促进过剩光能的热耗散 (Demmig-Adams & Adams III, 1992)。但 Weise 等 (1998) 等认为, 正常条件下, Mehler 反应耗散的过剩光能是有限的, 单独的米尔反应不能使植物免受光破坏。研究表明, 对正常生长的玉米加入 Ca^{2+} 后, 尽管依赖 Mehler 反应的电子传递增强但玉米仍会因总电子传递速率的大幅度下降而导致过剩光能增加 (图 3a, c), 抑制正常玉米叶片的美赫勒反应后 NPQ 变化不大也说明正常玉米 Mehler 反应的增强未能形成足够的跨膜质子梯度以启动依赖于叶黄素的热耗散 (图 4a), 因此正常条件下 Mehler 反应的耗能作用非常有限。但是在盐胁迫条件下, 外施 Ca^{2+} 能使盐胁迫玉米叶片的依赖 Mehler 反应的电子传递和总的电子传递都显著增强 (图 3b, d), 抑制 Mehler 反应后 NPQ 的降低也说明, 盐胁迫条件下 Mehler 反应能促进跨膜质子梯度的建立, 从而有效地启动依赖叶黄素循环的热耗散功能 (图 4b)。因此, 可以认为, 盐胁迫条件下的 Mehler 反应是玉米的一条重要的耗能途径。Mehler 反应可通过两种方式保护玉米免受光破坏, 一种是通过直接耗散过剩激发电子避免电子传递链的过度还原, 另一种是通过建立跨膜的 pH 梯度刺激依赖叶黄素循环的热耗散来耗散过剩光能。

叶绿体是植物叶片中活性氧产生的主要细胞器, 与其相关的 Mehler 反应是叶片活性氧产生的重要途径 (Asada, 1994)。正常生长的植物能通过本身的酶促和非酶促系统安全清除 Mehler 反应产生的活性氧。但是在盐胁迫条件下激发能的积累使得活性氧的产生大量增加 (Allen, 1995)。Mehler 反应虽然可以调节光合过程中某些酶的基因表达及光合电子传递等代谢过程 (Foyer & Noctor, 2000), 还在促进植物对过剩光能的耗散减轻光抑制过程中行使重要功能 (Xu & Shen, 1999), 但是如果产生的活性氧不能及时清除, 那么它的保护功能也无从谈起。在盐胁迫下, 由于 Mehler 反应的增强, 必然产生更多的活性氧, 这就需要植物的抗氧化系统有更高的活性才能有效地清除活性氧。与活性氧清除相关的酶有 SOD、APX 等, 已有报道指出 Ca^{2+} 、钙调素等物质在

热激条件下可提高这些酶的活性 (Gong *et al.*, 1997)。但至今未见盐胁迫条件下 Ca^{2+} 与 SOD 和 APX 的活性变化的关系的报道。本文的研究结果表明, SOD 和 APX 的活性在加入 Ca^{2+} 后均有明显的升高 (图 5)。这意味着由于 Mehler 反应增强所产生的过量活性氧可以被活性增强的 SOD 和 APX 所消耗。因此加入 Ca^{2+} 所增强的 Mehler 反应, 在盐胁迫的玉米叶片中可以起到保护功能。

既然 Ca 可以缓解盐胁迫, 那么它的作用机理何在呢? 我们认为至少要归因于两点, 一是, 正常生长条件下植物体内的离子处于平衡状态, 植物受到盐胁迫后离子平衡被打破, 首先发生的是 Ca^{2+} 亏缺。外施 Ca^{2+} 可以一定程度上弥补 Ca^{2+} 亏缺造成的离子失衡, 使植物维持较正常的生理活动; 二是, 正常生长条件下植物体内的激发能可以被植物通过光合等过程安全地利用。但是盐胁迫条件下, 碳同化受阻导致过剩激发能增多, 这时植物依靠本身的清除系统不能完全耗散掉这些过剩的激发能, 激发能的大量增多会造成植物光合机构的破坏。外施 Ca^{2+} 增强了依赖 Mehler 反应的耗能功能, 后者可以直接耗散过剩电子也可以通过建立跨膜 pH 梯度激活依赖叶黄素循环的热耗散。

Ca^{2+} 是通过什么途径激活 Mehler 反应和活性氧清除酶活性的? 为什么在 NaCl 胁迫下 Ca^{2+} 对 Mehler 反应和活性氧清除酶活性的促进作用更加明显? 对这些问题, 我们将做进一步的研究。

参 考 文 献

- Allen R (1995). Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. *Plant Physiology*, 107, 1049–1054.
- Asada K (1994). Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues. In: Foyer CH, Mullineau PM eds. *Causes of Photooxidative Stress in Plants and Amelioration of Defence System*. CRC Press, Florida, 77–104.
- Biechler K, Fock H (1996). Evidence for the contribution of the Mehler-peroxidase reaction in dissipating excess electrons in drought-stressed wheat. *Plant Physiology*, 112, 265–272.
- Björkman O, Demmig-Adams B (1987). Photon yield of O_2 evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77K among vascular plants of diverse origins. *Planta*, 170, 489–504.
- Cramer GR, Läuchli A, Polito VS (1985). Displacement of Ca^{2+} by Na^+ from the plasmalemma of root cells. A primary response to salt stress? *Plant Physiology*, 79, 207–211.
- Demmig-Adams B, Adam III WW (1992). Photoprotection and other response of plant to high light stress. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 43, 599–626.
- Dieter P (1984). Calmodulin and calmodulin-mediated progress in plants. *Plant, Cell and Environment*, 7, 371–380.
- Ehret DL, Redmann RE, Harvey BL, Cipynynk A (1990). Salinity-induced calcium deficiencies in wheat and barley. *Plant and*

- Soil*, 128, 143 – 151.
- Foyer CH, Noctor G (2000). Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signaling. *The New Phytologist*, 146, 359 – 388.
- Francois LE, Donovan TJ, Maas EV (1991). Calcium deficiency of artichoke buds in relation to salinity. *HortScience*, 26, 549 – 553.
- Giannopolitis GN, Ries SK (1977). Superoxide dismutase I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiology*, 59, 309 – 315.
- Greenway H, Munns R (1980). Mechanisms of salt tolerance in non-halophytes. *Annual Review of Plant Physiology*, 31, 149 – 190.
- Gong M, Chen SN, Song YQ, Li ZG (1997). Effects of calcium and calmodulin on intrinsic heat tolerance in relation to antioxidant systems in maize seedlings. *Australian Journal of Plant Physiology*, 24, 371 – 379.
- Kent LM, Läuchli A (1985). Germination and seedling growth of cotton: salinity-calcium interactions. *Plant, Cell and Environment*, 8, 155 – 159.
- Lu CM, Zhang JH (1998). Effects of water stress on photosynthesis, chlorophyll fluorescence and photoinhibition in wheat plants. *Australian Journal of Plant Physiology*, 25, 883 – 892.
- Muranaka S, Shimizu K, Kato M (2002). Ionic and osmotic effects of salinity on single-leaf photosynthesis in two wheat cultivars with different drought tolerance. *Photosynthetica*, 40, 201 – 207.
- Nakamura YK, Tanaka E, Ohta, Sakata M (1990). Protective effects of external Ca^{2+} on elongation and intracellular concentration of K^{+} in intact mung bean roots under high NaCl stress. *Plant and Cell Physiology*, 31, 815 – 821.
- Nakano Y, Asada K (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, 22, 867 – 880.
- Simon PM, Bonzon HG, Marme D (1984). Subchloroplastic localization of NAN kinase activity: evidence for a Ca^{2+} , calmodulin-dependent activity at the envelope and for a Ca^{2+} , calmodulin-dependent activity in the stroma of pea chloroplasts. *FEBS Letters*, 159, 332 – 338.
- Weise C, Shi LB, Heber U (1998). Oxygen reduction in the Mehler reaction is insufficient to protect photosystems I and II of leaves against photoinactivation. *Physiologia Plantarum*, 102, 437 – 446.
- Willmer CM, Mansfield TA (1969). A critical examination of the use of detached epidermis in studies of stomatal physiology. *The New Phytologist*, 68, 363 – 375.
- Xu DQ, Shen YK (1999). Light stress: photoinhibition of photosynthesis in plants under natural conditions. In: Pessarakli M ed. *Handbook of Plant and Crop Stress* 2nd edn. Marcel Dekker, New York, 483 – 497.

责任编辑: 蒋高明 责任编辑: 张丽赫