

土壤施钙诱导水稻幼苗抗低温和抗病生理机制研究*

刘峰¹ 张军² 张文吉² 王洪刚^{1**}

(¹ 山东农业大学, 泰安 271018; ² 中国农业大学, 北京 100094)

【摘要】 试验发现,以干土重1%的CaO混土处理培育水稻秧苗,能显著提高幼苗的抗低温和抗立枯病能力。对其生理机制研究表明,该处理对水稻幼苗体内活性氧清除酶系统具有显著影响。与空白对照处理相比,施钙处理的水稻幼苗根部和地上部SOD活性增强;根部POD活性显著增强,地上部POD活性下降;根部和地上部CAT活性则先下降,后上升;根部和地上部的可溶性蛋白含量均有所上升。POD同工酶PAGE电泳结果表明,CaO处理的水稻幼苗地上部POD同工酶谱带明显减弱和减少,而根部POD同工酶谱带增强和增多。这些结果揭示了土壤施加CaO可提高水稻幼苗抗低温和抗病能力的部分原因。

关键词 水稻 活性氧清除酶系 钙 抗逆性

文章编号 1001-9332(2004)05-0763-04 **中图分类号** S311 **文献标识码** A

Physiological mechanism of rice seedlings in low temperature and damping-off disease resistance induced by calcium application into soil. LIU Feng¹, ZHANG Jun², ZHANG Wenji², WANG Honggang¹ (¹ Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China; ² China Agricultural University Beijing 100094, China). - *Chin. J. Appl. Ecol.*, 2004, 15(5):763~766.

Applying calcium oxide into soil could improve the ability of rice seedlings in low temperature and damping-off disease resistance. After treated with calcium, the active oxygen eliminating enzyme activities of rice seedlings increased significantly. Compared with control, the SOD activity in seedling's root and shoot increased. The POD activity in rice seedling's root also increased, but decreased in shoot. The CAT activities decreased at the early stage, but increased at late stage. The soluble protein content in seedling's root and shoot was higher than that of the control. In the PAGE pattern of isoperoxidase, the band number of shoot increased, but that of root decreased. All these changes were part of reasons that applying calcium oxide into soil improved the resistance of rice seedlings to cold and damping-off disease.

Key words Rice, Active oxygen eliminating enzyme system, Calcium, Stress resistance.

1 引言

钙是植物的必需营养元素,具有稳定细胞膜和细胞壁的作用^[1]。缺钙可以引起多种果蔬生理性病害^[1]。近年来许多研究表明,钙与植物抗逆能力关系密切,外源施用Ca²⁺处理能提高植物的抗旱性^[3,8]、抗盐性^[13]和抗冷性^[6],还能缓解铝毒^[10]。我们曾报道了钙对水稻幼苗生长的影响^[7]。本文报道了施用钙对水稻旱育秧苗抗低温和抗病能力的影响,并通过测定活性氧清除酶系统活性及过氧化物同工酶的变化,旨在揭示CaO调节秧苗抗低温和抗病能力的生理机制。

2 材料与方法

2.1 供试材料

供试水稻品种为越富(*Oryza sativa* L. sub. *japonica*

Yuefu),属粳稻。稻种事先用22%的NaCl水溶液选取,25℃浸泡4d,35℃催芽1d,露白后备播。

2.2 试验方法

2.2.1 土壤处理 将过筛的稻田土,混匀后分成2份,分别装入10cm×10cm×4cm的木盘中,其中1份按土重的1%拌入CaO粉,每盘浇水量为80ml,待水完全渗下后,播种催芽的稻种,密度为每盘10g。播后用平整的木块拍入土中,盖土0.5cm,覆膜,置于20~30℃温室中培养,2d后揭膜。

2.2.2 CaO对水稻旱育秧立枯病控制作用的测定 将上述处理秧苗于播种后第10d开始进行变温处理,昼温最高32℃左右,夜温最低15℃,并适当遮荫,同时保持盘土湿润,诱导立枯病发生。计算病苗率和防治效果。

2.2.3 CaO影响水稻幼苗抗低温胁迫能力测定 将2.2.1中处理的水稻秧苗,15d后分成两批,一批置于2~4℃温度

* 国家自然科学基金项目(39670429)、山东农业大学博士基金和博士后基金资助项目。

** 通讯联系人。

2002-10-12收稿,2003-02-28接受。

下处理 3 d, 另一批不处理, 第 20 d 取样, 参照张宪政^[9]方法测定 MDA 含量. 电解质渗出率测定^[14]选用 15 d 叶片, 在 4 °C 低温下, 设 1.5、4 和 32 h 三种处理.

2.2.4 酶液提取 分别于播种后的 5、7、9、11、12、15 和 17 d 取样测定. 取样方法: 拔出秧苗, 冲去根部土壤, 用吸水纸吸去多余水分, 剪取根部及地上部(茎叶), 分别称重记录后, 用液氮速冻, 保存在 -40 °C 冰箱中待测. 样品在冰浴研钵中加入 5 倍体积的 0.1 mol·L⁻¹、pH 7.0 磷酸缓冲液研磨, 4 °C 提取 24 h, 15 000 g 离心 20 min, 取上清液测定酶活性.

2.2.5 活性氧清除酶活性测定 酶液用 pH 5.0 缓冲液稀释 10 倍使用, 反应体系由 1 ml pH 5.0 醋酸缓冲液、1 ml 0.1% 愈创木酚、1 ml 稀释的粗酶液和 1 ml 0.08% H₂O₂ 组成, 反应 2 min 后测定 POD 活性.

SOD 活性测定采用硝基蓝四唑(NBT)法, 在 3 ml 反应体系中含有核黄素 80 μmol·L⁻¹、NBT 77 μmol·L⁻¹、甲硫氨酸 13 mmol·L⁻¹、EDTA 0.1 mmol·L⁻¹ 和 20 μl 酶液, 4 000 Lux 光强度下照光 5 min 后, 遮光停止反应, 测定 OD₅₆₀, 以 NBT 被抑制 50% 为一个活性单位(U), 酶活性以 U·g⁻¹·h⁻¹(FW) 表示.

CAT 活性测定: 反应体系为 2 ml pH 7.0 磷酸缓冲液、0.1 ml 粗酶液、1 ml 0.08% H₂O₂. 测定 OD₂₄₀ 值, 每 0.5 min 记数 1 次, 以 OD₂₄₀ 每变化 0.01 为一个活力单位(U), 酶活性以 U·g⁻¹·min⁻¹(FW) 表示.

2.2.6 POD 同工酶 PAGE 电泳 将秧苗分为茎叶和根两部分, 称重后, 分别加入 5 倍体积预冷的 0.02 mol·L⁻¹ KH₂PO₄, 冰浴研磨, 于 4 °C 提取 1 h, 15 000 g 离心 10 min, 取上清液进行电泳. 使用 4% 浓缩胶、7.5% 分离胶、电极缓冲液 0.5 mol·L⁻¹ Tris-Gly、pH 8.3 联苯胺染色.

2.2.7 可溶性蛋白质含量测定 采用 Bradford 考马斯亮蓝 G-250 法. 以牛血清白蛋白(BSA)为标准蛋白绘制标准曲线, 测定体系根为 4 ml 考马斯亮蓝 G-250 蛋白质试剂, 0.5 ml 酶粗提液; 茎为 4 ml 考马斯亮蓝 G-250 蛋白质试剂, 0.1 ml 粗酶液. 测定 OD₅₉₅ 值, 以 mg·g⁻¹(FW) 表示.

2.2.8 可溶性蛋白 SDS-PAGE 电泳 分离胶贮备液 1.5 mol·L⁻¹、pH 8.8 Tris-HCl; 浓缩胶贮备液 0.5 mol·L⁻¹、pH 6.8 Tris-HCl, 其中均含有 0.4% SDS. 电泳时分离胶浓度 10%, 染色液由 0.4% 考马斯亮蓝 R-250、50% 甲醇和 7% 醋酸组成, 脱色液由 20% 甲醇、7% 醋酸组成. 样品浓度 1~2 mg·ml⁻¹, 上样量 20 μl.

3 结果与分析

3.1 对水稻幼苗抗病力和抗低温胁迫能力的影响

水稻立枯病是水稻早育秧的毁灭性病害, 一般在秧苗的 1 叶 1 心期至 2 叶 1 心期发病, 可造成死苗, 在我国南北方稻区均有发生. 从表 1 可以看出, 1% CaO 处理土壤后, 可使水稻早育秧立枯病的发生率降低 50% 左右.

表 1 CaO 处理土壤对水稻秧苗立枯病的控制作用

Table 1 Controlling effect of CaO on damping-off of rice seedling by soil treatment

处理 Treatment	浓度 Concentration (%)	土壤 pH pH of soil	播种后天数及病苗率 Days after sowing and rate of infected seedling (%)		
			11 d	13 d	15 d
CaO	1.0	11.73	13.4 ^a	24.3 ^a	42.5 ^a
CK	-	7.85	25.3 ^b	53.1 ^b	80.7 ^b

数字为 4 次重复平均值 Data are the mean of four replicates. 不同字母表示 0.05 水平上差异极显著 Different letter means significant difference between different treatments at P<0.05.

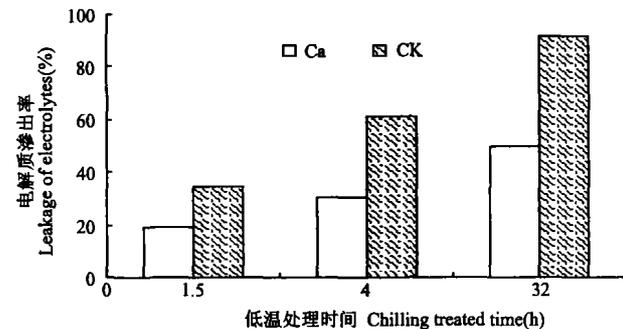


图 1 土壤添加钙对水稻秧苗电解质渗出率的影响

Fig. 1 Effect of calcium on leakage of electrolytes of rice seedling.

表 2 CaO 处理土壤对水稻秧苗丙二醛(MDA)含量的影响

Table 2 Effect of calcium on MDA content of rice seedling

处理 Treatment	丙二醛含量 MDA content (μmol·g ⁻¹)			
	23 °C		4 °C	
	根 Root	茎叶 Shoot	根 Root	茎叶 Shoot
1% CaO	2.02	1.90	2.10	2.12
CK	2.09	1.55	2.24	5.19

电解质渗出率可以间接反映植物细胞膜受破坏的程度. 从图 1 低温处理秧苗后电解质渗出率的变化可见, 空白对照细胞电解质渗出率随低温处理时间的延长而逐渐上升, CaO 处理也有同样的趋势, 但低温处理 1.5、4 和 32 h 的幼苗电解质渗出率均显著低于空白对照. 丙二醛含量反映细胞膜受活性氧伤害的程度. 从表 2 可以看出, 低温处理显著增加了对照丙二醛含量, 但 1% CaO 混土处理丙二醛含量增加的幅度显著小于对照. 由此可见, 土壤添加 1% CaO 能显著提高水稻幼苗抗立枯病和抗低温胁迫的能力.

3.2 对水稻幼苗活性氧清除酶活性的影响

从图 2 可以看出, 播种后 7~11 d 对照秧苗地上部 SOD 活性较低, 其后上升, 至 17 d 又下降, 存在起伏变化; 根部也有类似的趋势, 播种 11 d 后 SOD 活性水平较低. 1% CaO 混土处理的水稻幼苗 SOD 活性变化趋势与对照相似, 但地上部和根部 SOD 活性均相应地高于对照处理.

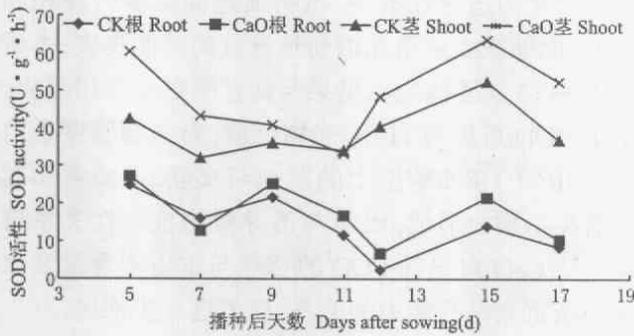


图2 土壤添加钙对水稻幼苗 SOD 活性的影响
Fig.2 Change of activity of SOD by calcium in rice seedling with days after sowing.

苗期水稻根部 POD 活力变化较大(图 3). 播种后第 5、7、11、12 和 17 d 的秧苗根部 POD 活力较低;地上部变化不如根部显著,第 7、9 d 活力较低. 1% CaO 处理的秧苗根部 POD 活力变化与对照基本一致,地上部则明显比对照处理缓和.从图 3 还可以看出,CaO 处理的秧苗根部 POD 活力明显高于对照处理,而地上部则相反.

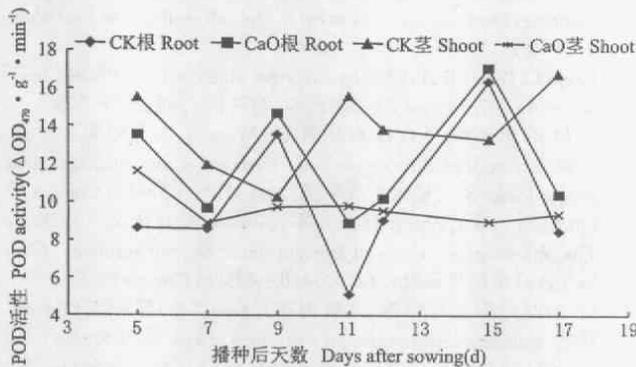


图3 土壤添加钙对水稻幼苗 POD 活性的影响
Fig.3 Change of activity of POD by calcium in rice seedling with days after sowing.

CaO 处理水稻根部, CAT 活性 7~9 d 略低于清水处理,从 11 d 开始略高于对照.地上部第 5 d CAT 活力较高,随后下降,7~12 d 活性比清水处理略低或持平,15 d 后再次上升,后下降(图 4).

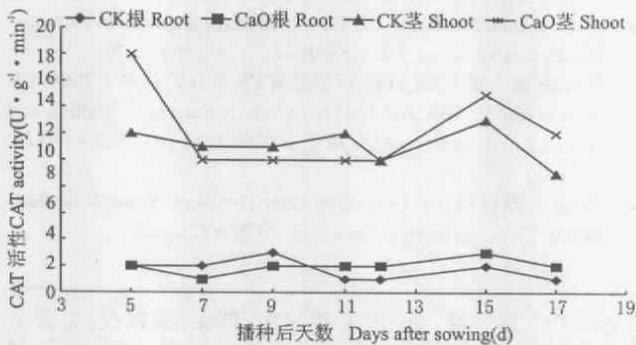


图4 土壤添加钙对水稻幼苗 CAT 活性的影响
Fig.4 Change of activity of CAT by calcium in rice seedling with days after sowing.

3.3 可溶性蛋白含量的动态变化

从图 5 可以看出,CaO 处理的稻苗根部和地上部可溶性蛋白的含量都略高于清水对照,其变化幅度也比清水处理小.

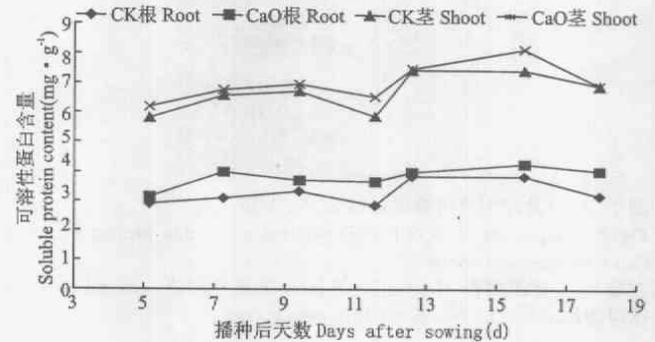


图5 土壤添加钙对水稻幼苗可溶性蛋白含量的影响
Fig.5 Change of activity of content of soluble protein in rice seedling with days after sowing.

3.4 CaO 对水稻幼苗 POD 同工酶的影响

CaO 处理与清水对照 POD 同工酶在根部至少存在 4 条差异带(图 6),其中 CaO 处理根部迁移率较低处有 2 条带活性增强,迁移率 0.5 处有 1 条新带,迁移率 0.7 处缺失 1 条带,总体看 POD 活性增强;地上部存在 4~5 条差异带,CaO 处理各差异带颜色均比对照处理浅,表明 POD 活性受到抑制.同工酶测定结果与前面 POD 活性测定结果一致.



图6 CaO 对水稻幼苗 POD 同工酶的影响
Fig.6 Effect of CaO on POD enzyme of rice seedling.
1、3)CaO 根 CaO root, 2、4)CK 根 CK root, 5、7)CaO 茎叶 CaO shoot, 6、8)CK 茎叶 CK shoot.

3.5 CaO 处理水稻蛋白 SDS-PAGE

CaO 处理水稻叶片蛋白 SDS-PAGE 结果见图 7. CaO 处理的水稻地上部有一蛋白条带缺失,经测定其分子量为 3.74KD,另外 16.4KD 蛋白带明显增强,其性质需要进一步确定.从图 7 可以看出,CaO 处理的稻苗根部可溶性蛋白谱带明显比对照处理增多,而且某些条带颜色也明显加深.



图7 CaO处理水稻苗可溶性蛋白 SDS-PAGE

Fig. 7 Comparison of SDS-PAGE patterns of soluble protein between CaO treatment and control.

左数2~5泳道为根 The No. 2~5 lanes from the left were roots; 6~9泳道为地上部 The No. 6~9 lane were shoots.

4 讨 论

研究表明,土壤添加钙对水稻幼苗活性氧清除酶的活性影响非常显著,这种影响是由于钙含量增加而不是土壤 pH 的变化引起的.尽管 CaO 混土可引起土壤 pH 大幅度升高(达到 12 左右),但随着秧苗根系的呼吸作用以及有机酸的分泌,由 CaO 引起的高 pH 不会维持多久,土壤很快会被酸化到 pH5 左右(数据另文发表),而土壤钙含量的增加则是确定的. CaO 用量与其对水稻幼苗活性氧清除酶活性影响程度的关系需要继续研究.

目前,植物的活性氧清除酶系统与植物的抗逆性的关系已经研究得比较深入. CaO 能使秧苗整体 SOD 活性和根部 POD 活性提高,并使地上部 POD 活性下降,同时 CaO 处理也诱导了秧苗体内某些可溶性蛋白的表达,这些变化必然会对水稻幼苗的抗逆力产生影响.据报道,POD-H₂O₂ 分解系统参与叶绿素的降解^[9,12,13].因此,POD 活性与叶绿素的含量成负相关,随着植物的衰老,POD 活性总是显著增加^[2]. CaO 处理土壤后,秧苗地上部 POD 活性下降,对减少叶绿素的分解有利,因此能增加叶片叶绿素含量^[8],延缓叶片衰老. CaO 处理的秧苗抗低温胁迫和抗水稻旱育秧立枯病能力都有所提高的原因,是由于 CaO 混土处理调节了 SOD、POD 活性,提高了秧苗的活性氧清除能力,进而增强了抵御随后到来的低温和病原逆境的能力.此外我们利用 mRNA 差异显示方法也证明, CaO 可能还调节其他一些与抗逆相关的蛋白的表达(另文发表),有待进一步确定其性质.

同工酶是植物细胞代谢的重要成分.它的存在与植物体内生化反应过程的多样性、可变性以及

环境变化的适应性有关.植物通过同工酶的存在和改变,能够减少或避免因胁迫导致的功能丧失.本研究中 POD 同工酶电泳结果与活性测定结果相呼应.由于 POD 可以与 H₂O₂ 底物反应,参与细胞壁蛋白(如 HRGP)在细胞壁上的沉积与交联,木质素和其它酚类物质的形成,因而与诱导植物抗病性关系密切^[4,5]. CaO 对根部 POD 的诱导与木质素含量及水稻秧苗抗立枯病能力的关系,值得进一步探讨.

参考文献

- Bangerth F. 1979. Calcium related physiological disorders of plants. *Ann Rev Phyto-Pathol*, 17:97~122
- Ding W-M(丁文明), Zhao Y-J(赵毓楠). 1995. Effect of epi-BR on activity of peroxides and soluble protein content of cucumber cotyledon. *Acta Phytophysiol Sin* (植物生理学报), 21(3):259~264(in Chinese)
- Gong M(龚明), Du C-Q(杜朝昆), Xu W-Z(许文忠). 1996. Involvement of calcium and calmodulin in the regulation of drought resistance in *Zea mays* seedling. *Acta Bot Boreal-Occident Sin* (西北植物学报), 16(3):214~220(in Chinese)
- Ishida A, Ono K, Matsusaka T. 1985. Cell wall-associated peroxides in cultured cells of liverwort, *Marchantia polymorpha* L. changes of peroxides level and its localization in the cell wall. *Plant Cell Rep*, 4:54~61
- Lamb C, Dixon R. 1997. The oxidative burst in plant disease resistance. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 48:251~275
- Li M-R(李美如), Liu H-X(刘鸿先), Wang Y-R(王以柔), et al. 1996. Effect of calcium on the cold-resistance of rice seedlings. *Acta Phytophysiol Sin* (植物生理学报), 22(4):379~384(in Chinese)
- Liu F(刘峰), Zhang J(张军), Zhang W-J(张文吉). 2001. The physiological effects of calcium oxide on rice seedlings. *Chin Bull Bot* (植物学通报), 18(4):490~495(in Chinese)
- Lu S-Y(卢少云), Li Y-C(黎用朝), Guo Z-F(郭振飞), et al. 1999. Enhancement of drought resistance of rice seedlings by calcium. *Chin J Rice Sci* (中国水稻科学), 23(3):161~164(in Chinese)
- Misako K, Shimizu S. 1985. Chlorophyll metabolism in higher plants VI. Involvement of peroxides in chlorophyll degradation. *Plant Cell Physiol*, 26:1291~1296
- Rengel Z. 1992. Role of calcium in aluminum toxicity. *New Phytol*, 121:499~513
- Shen Q-Y(沈其荣), Zhu Y-Y(朱毅勇), Xie X-D(谢学东), et al. 2000. The role of Ca²⁺ in the systemic resistance of cucumber young leaf induced by phosphate nutrition. *Plant Nutr Fert Sci* (植物营养与肥料学报), 6(3):280~286(in Chinese)
- Yamouchi N, Minamide T. 1985. Chlorophyll degradation by peroxides in parsley leaves. *J Jap Soc Hort Sci*, 54:265~270
- Yan H(颜宏), Shi D-C(石德成), Yin S-J(尹尚军). 2000. Effects of Ca²⁺, ABA and H₃PO₄ on relaxing stress of Na₂CO₃ and NaCl. *Chin J Appl Ecol* (应用生态学报), 11(6):889~892(in Chinese)
- Zhang X-Z(张宪政). 1992. *Crop Plant Physiology Research Method*. Beijing:China Agricultural Press. 195~200(in Chinese)

作者简介 刘峰,男,1970年出生,博士,副教授,主要从事农药毒理、诱导植物抗病生理方面的研究,发表论文14篇. E-mail: fliu@sdau.edu.cn