

# 小麦根细胞质膜氧化还原系统对干旱胁迫反应与 $K^+$ 累积的关系\*

曹翠玲 高俊凤 曹 薇

(西北农业大学基础科学系, 陕西杨陵 712100)

**摘 要** 小麦根细胞质膜上存在  $NADH-K_3Fe(CN)_6$  氧化还原酶, KCN, SHAM 及  $Na_2VO_4$  对其活性无影响, DCCD 对其有轻微抑制作用。干旱胁迫下, 抗旱性不同的两品种小麦根质膜  $NADH-K_3Fe(CN)_6$  氧化还原酶变化趋势相似。小麦根存在跨膜  $K_3Fe(CN)_6$  还原系统。干旱胁迫下,  $K_3Fe(CN)_6$  还原活力下降, 但能促进陕合 6 号小麦根的  $H^+$  分泌和  $K^+$  累积。

**关键词** 小麦, 氧化还原系统, 干旱胁迫,  $K^+$  累积

中图分类号

植物细胞质膜上存在氧化还原系统<sup>[1-10]</sup>。此系统具有还原外源电子受体如  $Fe(CN)_6^{3-}$ 、 $EDTA-Fe^{3+}$  的能力, 其内源电子供体可能是  $NAD(P)H^{[4,6]}$ 。此系统可能与  $H^+-ATPase$  共同参与了跨膜质子梯度的建立<sup>[1]</sup>, 而跨膜质子梯度与离子运输如  $K^+$ 、 $Ca^{2+}$  等密切相关。Barra 和 Crane<sup>[5]</sup> 首先发现萝卜细胞质膜氧化还原系统对盐胁迫敏感, 质膜  $NADH$  氧化、 $Fe(CN)_6^{3-}$  还原、 $H^+$  分泌等受到抑制, 同时细胞生长也受到影响。邱全胜<sup>[3]</sup> 等报道: 水分胁迫使小麦根质膜  $NADH$  和  $NADPH$  的氧化速率及  $Fe(CN)_6^{3-}$  和  $EDTAFe^{3+}$  的还原速率明显降低。关于不同干旱胁迫时间对质膜氧化还原活性的影响及其与  $K^+$  累积关系的研究国内尚未见报道。本研究初步探讨了不同干旱胁迫时间对小麦根质膜  $NADH-K_3Fe(CN)_6$  氧化还原酶活性的影响及  $K_3Fe(CN)_6$  还原对小麦根  $K^+$  累积的影响。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料培养及处理

精选小麦品种陕合 6 号(抗旱性强)与郑引 1 号(抗旱性弱)种籽, 0.2%  $HgCl_2$  消毒。籽粒吸胀后置  $25^{\circ}C$  温箱中催芽; 完全露白后, 移置于绷在塑料盒(内盛自来水)上的纱布上,  $25^{\circ}C$  暗培养 4 d, 用  $-1.0 MPa$  PEG6000 溶液进行根际胁迫。分别胁迫 24 h、48 h 和 72 h, 以不加 PEG 的为对照。取根系进行各指标测定, 重复 3 次。质膜制备参照文献 [3] 之方法, 质膜蛋白质含量测定按照文献 [2] 之方法。

### 1.2 质膜还原 $K_3Fe(CN)_6$ 速率测定

参照焦新之<sup>[4]</sup>方法并略加改变。加反应液 ( $KCl$  50 mmol/L;  $MgSO_4$  5 mmol/L;  $CaCl_2$  4 mmol/L;  $Tris/HCl$  50 mmol/L, pH7.5) 于 4 mL 石英比色杯中, 依次加入  $NADH$  0.25

\* 农业部“八五”应用基础研究资助项目。

mmol/L,  $K_3Fe(CN)_6$  1.0 mmol/L, 加  $10\mu g$  蛋白开始反应; 以不加膜蛋白的为空白, 于  $\mu V-120$  型分光光度计记录 420 nm 处消光系数的变化, 按  $K_3Fe(CN)_6$  1 mmol/L 消光系统为 1.00 计算被还原的  $K_3Fe(CN)_6$  量, 质膜蛋白质含量按文献 [2] 介绍之方法进行测定。

### 1.3 质膜氧化 NADH 速率测定

操作同 1.2. 在 340 nm 处记录消光系数的变化, 按 NADH 1 mmol/L 消光系数为 6.23 计算被氧化的 NADH 量。

### 1.4 小麦根还原 $K_3Fe(CN)_6$ 速率测定

参照 Marre<sup>[8]</sup> 之方法并加以改变, 将新鲜根系放入反应液 (组成同 1.2) 中, 使其在  $30^\circ C$  水浴中反应 60 min, 测定反应液在 420 nm 处消光系数的变化, 按照 1 mmol/L  $K_3Fe(CN)_6$  吸光系数为 1 计算被还原的  $K_3Fe(CN)_6$  量。

### 1.5 $K_3Fe(CN)_6$ 还原对 $K^+$ 累积影响测定

参照 Marre<sup>[10]</sup> 之方法并略加改变, 将新鲜根系放入含 1 mmol/L Mes, 1 mmol/L  $K_3Fe(CN)_6$  (有或无), 50 mmol/L KCl, 5 mmol/L  $MgSO_4$  及 4 mmol/L  $CaCl_2$  溶液 (pH 7.5) 反应在  $30^\circ C$  水浴中进行 60 min. 经反应的根系, 用去离子水迅速冲洗 3~4 遍, 置烘箱中烘干, 用日立 180-80 型原子吸收分光光度计测定根系  $K^+$  含量。

### 1.6 $K_3Fe(CN)_6$ 还原对小麦根系 H 分泌影响测定

方法同 1.5. 测定反应液反应前后 pH 值 (用 Bachman  $\Phi$  61 型 pH 计测定), 计算其 H 分泌速率。

## 2 结果

### 2.1 小麦根质膜上的 NADH- $K_3Fe(CN)_6$ 氧化还原酶

冬小麦陕合 6 号和郑引 1 号, 其根细胞质膜 (ROV) 存在 NADH- $K_3Fe(CN)_6$  氧化还原酶 (表 1)。两品种相比, 前者的  $K_3Fe(CN)_6$  还原酶活性是后者的 2.1 倍, NADH 氧化酶活性是后者的 1.9 倍。品种间差异达极显著水平 ( $P=0.01$ )。加入 Triton X-100 后, 还原酶和氧化酶活性均增大, 两品种间酶活性几乎相等。从酶活性和相对潜在活性<sup>[1]</sup> 看, 陕合 6 号根细胞质膜外表面氧化还原活性高于内表面, 而郑引 1 号则相反。

表 1 两种小麦根细胞质膜氧化还原酶活性

品种	酶比活 ( $\mu mol/mg$ 蛋白 $\cdot min$ )				相对潜在活性 (%)	
	NADH 氧化酶		$K_3Fe(CN)_6$ 还原酶		NADH 氧化酶	$K_3Fe(CN)_6$ 还原酶
	- Triton	+ Triton	- Triton	+ Triton		
陕合 6 号	1.14 $\pm$ 0.010	1.44 $\pm$ 0.030	1.97 $\pm$ 0.000	2.36 $\pm$ 0.010	21%	17%
郑引 1 号	0.61 $\pm$ 0.016	1.54 $\pm$ 0.013	0.92 $\pm$ 0.010	2.31 $\pm$ 0.030	60%	60%

平均值  $\pm s. d$  ( $n=3$ )

为了明确质膜氧化还原系统电子传递链组分与线粒体呼吸链的差异, 作者检测了 KCN、SHAM 对质膜氧化还原活性的影响, 同时测定了 H<sup>-</sup>-ATPase 专一抑制剂  $Na_3VO_4$ 、质子通道堵塞剂 DCCD 对质膜氧化还原活性的影响 (表 2)。结果表明, KCN、SHAM 对质

膜氧化还原活性无影响,说明质膜氧化还原系统电子传递链性质不同于线粒体电子传递链。  $Na_2VO_4$ 对质膜氧化还原活性无明显影响,但 DCCD对其有轻微抑制作用,说明  $H^+$ -ATPase与质膜氧化还原系统可能是两个独立的系统

## 2.2 干旱胁迫对小麦根质膜氧化还原活性的影响

图 1 表明干旱胁迫下,外源 NADH 存在时,两种小麦根细胞质膜氧化还原活性变化趋势相似,即干旱胁迫 24 h,质膜氧化还原活性上升,随胁迫时间延长,其活性呈下降趋势,72 h 降至对照以下。干旱胁迫 24 h 质膜 NADH- $K_3Fe(CN)_6$  氧化还原活性上升,胁迫时间延长,其活性下降。

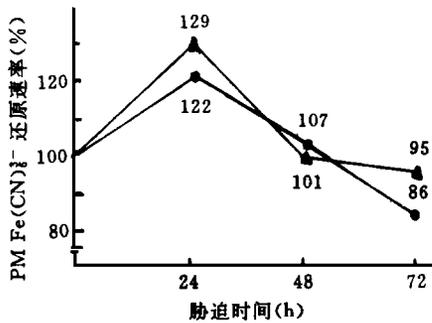


图 1 干旱胁迫对质膜  $K_3Fe(CN)_6$  还原活性的影响  
▲郑引 1号;○陕合 6号

表 2 抑制剂对质膜氧化还原活性的影响

抑制剂 (mmol/L)	质膜氧化还原活性 ( $\mu\text{mol}/\text{mg}\text{蛋白}\cdot\text{min}$ )	
	NADH 氧化酶	$K_3Fe(CN)_6$ 还原酶
对照	1.14 $\pm$ 0.010(100)	1.97 $\pm$ 0.002(100)
KCN(0.1)	1.14 $\pm$ 0.014(100)	1.99 $\pm$ 0.004(101)
SHAM(0.01)	1.10 $\pm$ 0.010(96)	1.93 $\pm$ 0.003(98)
DCCD(0.01)	1.06 $\pm$ 0.011(93)	1.79 $\pm$ 0.002(91)
$Na_3VO_4$ (0.05)	1.16 $\pm$ 0.00(102)	2.04 $\pm$ 0.007(104)

平均值 $\pm$ s. d (n=3)

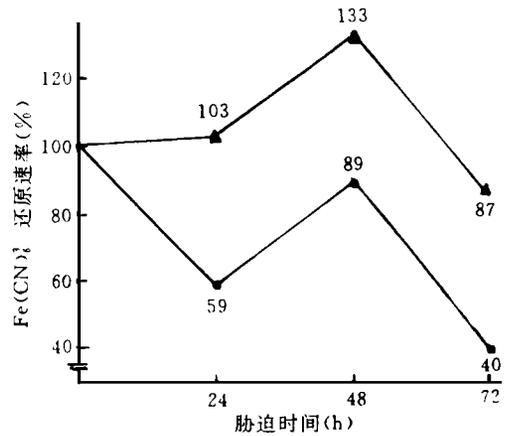


图 2 干旱胁迫对小麦根  $K_3Fe(CN)_6$  还原活力及  $K^+$  含量影响  
▲ $K^+$  含量;○ $Fe(CN)_6^{3-}$  还原速率

## 2.3 干旱胁迫对小麦根氧化还原活力和 $K^+$ 累积的影响

在无外源 NADH 存在时,干旱胁迫下小麦(陕合 6号)根  $K_3Fe(CN)_6$  还原活力变化如图 2 示。干旱胁迫 24 h,其还原活力降幅为 4%;48 h 其还原活力上升为对照的 98%;72 h 其还原活力降幅为 6%。此结果表明干旱胁迫影响了膜功能;还表明小麦根细胞质膜上存在跨膜的氧化还原电子传递链。

干旱胁迫条件下,陕合 6号具有累积  $K^+$  能力。干旱胁迫 24 h,其  $K^+$  含量与对照相同;48 h 上升为对照的 133%;72 h 降为对照的 87% (见图 2)。由此看出,干旱胁迫下,根系  $K_3Fe(CN)_6$  还原活力强时,根系累积  $K^+$  较多。

## 2.4 $K_3Fe(CN)_6$ 对干旱胁迫下小麦根 $H^+$ 分泌和 $K^+$ 含量的影响

2.4.1  $K_3Fe(CN)_6$  对小麦(陕合 6号)根  $H^+$  分泌影响 实验结果表明,4 d 苗龄的小麦根具有  $H^+$  分泌能力。干旱胁迫下,小麦根  $H^+$  分泌能力增强。正常水分和干旱胁迫条件下, $K_3Fe(CN)_6$  还原促进小麦根  $H^+$  分泌。干旱胁迫 24 h,小麦根净  $H^+$  (由  $K_3Fe(CN)_6$  诱导的)分泌高于对照,干旱胁迫时间延长,其  $H^+$  分泌速率下降。此结果表明了质膜氧化还

## 原系统参与了跨膜质子梯度的建立

表 3  $K_3Fe(CN)_6$ 对小麦根 H 分泌的影响

时间 (h)	H <sup>+</sup> 分泌速率 (nmol/g wf <sup>2</sup> h)				$\Delta H$	
	对照		处理		对照	处理
	- $K_3Fe(CN)_6$	+ $K_3Fe(CN)_6$	- $K_3Fe(CN)_6$	+ $K_3Fe(CN)_6$		
24	47± 0.021 (100)	54± 0.000 (113)	489± 0.032 (100)	614± 0.000 (126)	64	125
48	51± 0.045 (100)	57± 0.007 (112)	47± 0.015 (100)	58± 0.006 (123)	64	110
72	51± 0.045 (100)	57± 0.007 (112)	54± 0.032 (100)	63± 0.010 (117)	64	91

平均值± s. d (n= 3)

2.4.2  $K_3Fe(CN)_6$ 对小麦根部  $K^+$  含量影响 图 3表明,在正常水分和干旱胁迫条件下, $K_3Fe(CN)_6$ 还原促进陕合 6号根累积  $K^+$ 。正常水分条件下, $K_3Fe(CN)_6$ 存在使小麦根部  $K^+$  含量升高为对照的 142% (24 h)和 221% (48 h, 72 h);干旱胁迫条件下, $K_3Fe(CN)_6$ 的促进作用减弱,小麦根部  $K^+$  含量分别降为对照的 103% (24 h), 157% (48 h)和 145% (72 h) 此结果暗示,跨质膜氧化还原电子传递链可能与  $K^+$  累积有关

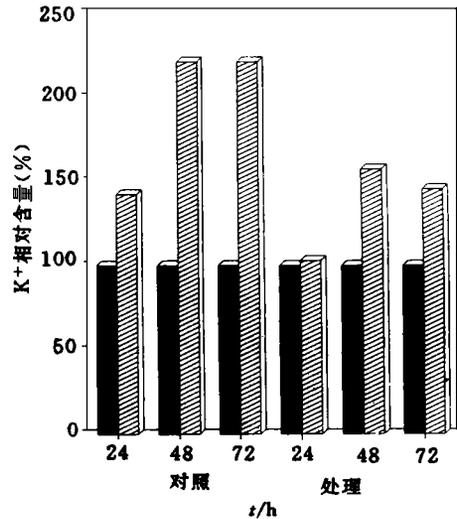
## 3 讨论

本实验用小麦根细胞正向质膜囊泡,在不加任何去垢剂时观察到了 NADH- $K_3Fe(CN)_6$ 氧化还原酶活性。由于  $K_3Fe(CN)_6$ 和 NADH都是质膜非透过性试剂,因此,质膜氧化还原系统对底物的结合与催化就只能发生在质膜外侧 TritonX-100使质膜 NADH- $K_3Fe(CN)_6$ 氧化还原活性提高,说明加入去垢剂后,膜透性增加,底物与酶的专一性结合增加,从而加速了催化反应<sup>[1]</sup>。所以质膜外侧与内侧均存在 NADH- $K_3Fe(CN)_6$ 氧化还原系统

逆境对植物质膜结构、功能与组成都有一定影响<sup>[11]</sup>。逆境也影响质膜氧化还原系统的运转。

Barri和 Crane<sup>[5]</sup>首先发现萝卜细胞质膜氧化还原系统对盐胁迫极其敏感。邱全胜等<sup>[3]</sup>观察到:20% PEG 6000胁迫小麦根部 10 h,质膜氧化还原速率大幅度降低。本文结果表明:干旱胁迫 24 h,质膜 NADH- $K_3Fe(CN)_6$ 氧化还原活性上升,可能是植物对干旱的一种适应;胁迫时间延长,其活性下降,可能是质膜受损伤的表现。

逆境条件下,植物能够累积  $K^+$ 、Pro甜菜碱等渗透调节物质<sup>[11]</sup>。目前,关于质膜氧化还原系统与  $K^+$  转运的关系尚无定论。Lin<sup>[10]</sup>以玉米根为材料发现:外源 NADH氧化,使氧消耗增加,同时  $K^+$  内流增加,并且显著促进 H 分泌,使膜过极化。Misra和 Crane<sup>[9]</sup>也

图 3  $K_3Fe(CN)_6$ 对小麦根部  $K^+$  含量的影响

□ 无  $K_3Fe(CN)_6$ 时  $K^+$  含量;  
▨  $K_3Fe(CN)_6$ 存在时  $K^+$  含量

观察到,外源 NADH氧化的同时,有大量  $K^+$  被吸收。本文以陕合 6号为材料所得实验结果与上述结论相似。 $K_3Fe(CN)_6$ 还原促进了陕合 6号根累积  $K^+$ ,促进其  $H^+$  分泌。干旱胁迫下,跨质膜  $K_3Fe(CN)_6$ 还原活力变化与净  $K^+$  累积量(由  $K_3Fe(CN)_6$ 引起的  $K^+$  增加量)变化趋势一致(图 2) 暗示  $K^+$  运转与跨膜氧化还原系统有关。实际上,质膜上不止一条氧化还原链,该系统运转影响或调节许多转运功能和其它的细胞内反应过程<sup>[7]</sup>。对质膜氧化还原系统的生理功能应做进一步的研究

### 参 考 文 献

- 1 陈珈,王建华.玉米根细胞膜铁氰化钾还原酶.植物生理学报.1994,20(1): 69~ 76
- 2 邱泽生,张力,杨志伟.植物细胞质膜氧化还原系统.植物生理学通讯,1993,29(4): 306~ 314
- 3 邱全胜,李琳,梁厚果等.水分胁迫对小麦根细胞质膜氧化还原系统的影响.植物生理学报,1994,20(2): 145~ 151
- 4 焦新之,李琳,倪晋山.花生下胚轴质膜氧化还原系统.植物生理学报,1992,18(1): 63~ 70
- 5 Barr R. The possible role of redox-associated protons in growth of plant cells. J. Bioenerg Biomembr. 1991, 23 443
- 6 Craig T A, Crane F L. Evidence for a trans-plasma membrane electron transport system in plant cells. Proc. Indiana Acad Sci. 1981, 90 150~ 155
- 7 Koehain L V, Lucus W J. Potassium transport in crown roots. plant physiol. 1985, 77 429~ 436
- 8 Marre M T, Moroni A, Francesco G, *et al.* Plasmalemma Redox Activity and  $H^+$  Extrusion plant physiol. 1988, 87 25~ 29
- 9 Misra P C, Craig T A, Crane F L. A link between transport and plasma membrane redox system(s) in carrot cells. J. Bioenergy Biomembr. 1985, 16 143~ 152
- 10 Lin W. Isolation of NADH oxidation system from the plasmalemma of crown root protoplast. Plant physiol. 1982, 70 326~ 328
- 11 王洪春.生物膜结构.功能和渗透调节.上海:上海科技出版社,1987
- 12 李琳,焦新之.应用蛋白质染色剂考马斯蓝 G-250测定蛋白质的方法.植物生理学通讯.1980(6): 52~ 55

## The Responses of Wheat Root Plasma Membrane Redox System to Water Stress and its Relationship to $K^+$ Accumulation

Cao Cuiling Gao Junfeng Cao Wei

( Department of Basic Science, Northwestern Agricultural University, Yangling, Shaanxi, 712100)

**Abstract** Marked activity of NADH-ferricyanide oxidoreductase has been found in plasma membrane from wheat roots. KCN, SHAM and  $Na_2VO_4$  have no influence on the activities of this redox system, but  $10\mu\text{mol/L}$  DCCD inhibits the activity of this system slightly. The NADH-ferricyanide activity of two winter wheat cultivars with different drought resistance shows similar changing trends under water stress. The activity of ferricyanide reductase is declined under the water stress. But, accompanying ferricyanide reductase activity exists an apparent excretion of  $H^+$  and a stimulation of  $K^+$  influx.

**Key words** wheat, oxidoreductase system, water stress