

干旱胁迫下甘蓝型油菜叶片碳酸酐酶活性的变化

邓秋红¹, 罗刘明², 罗丽丹¹, 张秀花¹, 陈舒丽^{1*}

¹湖北科技学院基础医学院, 湖北 咸宁

²宝武集团武汉钢铁有限公司, 条材厂, 湖北 武汉

收稿日期: 2024年1月17日; 录用日期: 2024年3月1日; 发布日期: 2024年3月11日

摘要

本文研究了盆栽条件下叶面喷锌对抽薹期甘蓝型油菜叶片的碳酸酐酶活性和抗旱性的影响。用不同浓度的 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 喷洒抽薹期油菜叶片1周后, 进行干旱处理及复水处理。结果显示: 在干旱渐进以及复水过程中喷锌组油菜叶片碳酸酐酶活性、净光合速率和脯氨酸含量均高于未喷锌组, 而丙二醛含量则低于未喷锌组。说明叶面喷锌可以使甘蓝型油菜碳酸酐酶活性增加, 进而可增加甘蓝型油菜的抗旱性。

关键词

甘蓝型油菜, 碳酸酐酶, 干旱诱导, 净光合速率, 叶面喷锌

Changes of Carbonic Anhydrase Activities in *Brassica napus* Leaves under Drought Stress

QiuHong Deng¹, Liuming Luo², Lidan Luo¹, Xiuhua Zhang¹, Shuli Chen^{1*}

¹School of Basic Medical Sciences, Hubei University of Science and Technology, Xianning Hubei

²General Wire Rod Mill, Wuhan Iron and Steel Co., Ltd., Baowu Group, Wuhan Hubei

Received: Jan. 17th, 2024; accepted: Mar. 1st, 2024; published: Mar. 11th, 2024

Abstract

This paper studied the effects of foliar zinc spraying on the carbonic anhydrase activity and drought resistance of *Brassica napus* leaves during the bolting stage under potted conditions. The rapeseed leaves at the bolting stage were sprayed with different concentrations of $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ for 1 week, followed by drought treatment and rehydration treatment. The results showed that the

*通讯作者。

文章引用: 邓秋红, 罗刘明, 罗丽丹, 张秀花, 陈舒丽. 干旱胁迫下甘蓝型油菜叶片碳酸酐酶活性的变化[J]. 植物学研究, 2024, 13(2): 103-109. DOI: 10.12677/br.2024.132012

carbonic anhydrase activity, net photosynthetic rate and proline content of rapeseed leaves in the zinc-sprayed group were higher than those in the non-zinc-sprayed group, while the malondialdehyde content was lower than that in the non-zinc-sprayed group during the gradual drought and rewatering process. This shows that foliar zinc spraying can increase carbonic anhydrase activities in *Brassica napus*, which in turn can increase the drought resistance of *Brassica napus*.

Keywords

Brassica napus, Carbonic Anhydrase, Drought Stress, Net Photosynthesis Rate, Foliar Zinc Spraying

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

碳酸酐酶(Carbonic Anhydrase, CA, EC 4.2.1.1)是一族含锌金属酶, 其活性中心有一个催化所必需的 Zn^{2+} , 催化 CO_2 和 HCO_3^- 之间的相互转化($H_2O + CO_2 \leftrightarrow H^+ + HCO_3^- \leftrightarrow CO_3^{2-} + 2H^+$), 转化常数高达 10^6 [1] [2]。催化反应受 pH 的影响, pH < 6.4 时 CO_2 占优势, pH 介于 6.4~10.3 时 HCO_3^- 占优势, pH > 10.3 时 CO_3^{2-} 占优势。没有碳酸酐酶的时候, CO_2 水合反应速率很慢, 碳酸酐酶的加入几乎将反应速率提高了 7 个数量级, 碳酸酐酶是迄今为止已知的催化速率最高的酶之一。碳酸酐酶目前的研究主要集中在碳酸酐酶的空间结构、酶学特性、生理功能、进化分类、参与植物和藻类等光合生物的光合作用的机制以及在人类医学领域的应用。

碳酸酐酶是一种与光合作用密切相关的酶, 碳酸酐酶在所有利用 CO_2 进行光合作用的绿色植物中都存在, 从藻类, 蕨类到高等被子植物都含有碳酸酐酶, 而且含量还相当可观。碳酸酐酶在高等植物光合碳代谢中的生理功能可能是加速无机碳向 RubisCO (核酮糖-1, 5-二磷酸羧化酶/加氧酶)活性部位的扩散, 保持 RubisCO 处在较高的无机碳浓度的微环境中, 从而提高 CO_2 的固定效率[3]。

对植物碳酸酐酶的研究仅限于少数几种植物, 主要是拟南芥、豆类[4] [5]、玉米[6]、菠菜[7]、胡萝卜[8]等, 对其 CA 的酶学特性包括动力学等都有较多研究。近年来研究表明, 植物碳酸酐酶与环境逆境之间存在一定的应答关系。张悦扬等人研究发现烟草 CA7 基因(属于 α -CA 家族)在根、茎、叶、花中均有表达, 在叶中表达量最高。同时, 烟草 CA7 基因响应高盐、干旱、低钾、ABA、低温及 H_2O_2 的诱导表达, 表明 CA7 基因可能在烟草非生物胁迫生理响应过程中发挥作用[9]。本文研究了干旱胁迫对甘蓝型油菜碳酸酐酶活性及相关生理指标的影响, 旨在为碳酸酐酶活性与植物抗旱性之间的关系研究提供一定的研究基础。

2. 材料与方法

2.1. 材料

以甘蓝型油菜为实验材料, 采用的 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 处理浓度为 0.05% (W/V)和 0.1% (W/V)。具体做法如下: 将试验田中生长一致处于抽薹期的植株 90 株移栽到花盆中分成 3 组, 每组 30 株。恢复培养一周后对第 1 组的叶片连续喷洒 0.05% $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 一周, 每个单株喷洒 10 mL, 喷洒时力求每个叶片表面喷洒均匀, 第 2 组喷洒浓度为 0.1% $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 第 3 组喷洒等体积的双蒸水。在此期间每天浇 1 次水, 每次每盆浇水 100 mL, 以保证油菜正常生长所需的水分。 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 处理一周后, 对材料进行持续干旱

处理。在干旱的第 13 天开始恢复正常供水。在干旱的第 1 天、第 6 天、第 12 天、第 15 天、第 17 天测定各项生理指标。

2.2. 取样方法

上午 9:00 采集新鲜叶片, 供试植物均取自第一片完全展开叶下数第 2~4 片功能叶。取第 2 片叶测定碳酸酐酶活性和光合作用, 第 3 片叶测定丙二醛含量, 第 4 片叶测定脯氨酸含量。

2.3. 测定方法

2.3.1. 植物碳酸酐酶的提取和测定方法

油菜叶片碳酸酐酶的提取方法参照 Hatch 等人[10]的方法略作修饰。取田间的新鲜油菜叶片 0.5 g, 立即液氮研磨, 加 5 mL 提取缓冲液(50 mM Hepes-KOH 含 10 mM DTT, pH = 8.2)。12, 000 rpm, 离心 10 min, 上清液储存在 0℃待测。

碳酸酐酶活性的测定参照 Brownell 等[11]方法略作改进, 在一个 4℃的冷冻反应室中, 加入 5 mL 测定缓冲液(20 mM 巴比妥-KOH, pH = 8.3)和 0.5 mL 煮沸或未煮沸的样品液, 打开磁力搅拌器持续地搅拌使混合均匀, 再用注射器注入 4.5 mL 冰冷的 CO₂ 饱和水(蒸馏水在 0℃冰水混合物中充 CO₂ 气体 1 h 获得的, 浓度大约为 70 mM)时反应开始, 测定 H₂O + CO₂ → HCO₃⁻ + H⁺过程导致的 pH 下降, 用梅特勒 pHs-320S 酸度计监测 pH 从 8.3 下降到 7.3 所需的时间。碳酸酐酶的酶活单位(U)的计算公式为: $U = 10 \times (T_0/T - 1)$, 其中 T₀、T 分别为煮沸杀死的样品液和未煮沸的样品液测得的 pH 变化所需的时间。碳酸酐酶活性以每克新鲜叶片(或根、茎)含有的酶活单位数表示(U·g⁻¹ (FW))。所有数据均为 3 次测量的平均值。

2.3.2. 脯氨酸含量及丙二醛含量测定

参照李合生等介绍的方法进行[12]。

1) 脯氨酸含量的测定

绘制标准曲线, 然后是油菜叶片脯氨酸含量的测定。步骤如下:

① 准确称取不同处理的待测植物叶片各 0.5 g, 分别置大管中, 然后向各管分别加入 5 mL 3%的磺基水杨酸溶液, 在沸水浴中提取 10 min, 冷却后过滤于干净的试管中, 滤液即为脯氨酸的提取液。

② 吸取 2 mL 提取液于另一干净的带玻塞试管中, 加入 2 mL 冰醋酸及 2 mL 酸性茚三酮试剂, 在沸水浴中加热 30 min, 溶液即呈红色。

③ 冷却后加入 4 mL 甲苯, 摇荡 30 s, 静置片刻, 取上层液 10 mL 至离心管中, 在 3000 r/min 下离心 5 min。

④ 用吸管轻轻吸取上层脯氨酸红色甲苯溶液于比色杯中, 以甲苯为空白对照, 在 722 型分光光度计上 520 nm 波长处比色, 求得吸光度值。

根据回归方程计算出(或从标准曲线上查出) 2 mL 测定液中脯氨酸浓度 x (μg/mL), 然后计算叶片中脯氨酸含量。计算公式如下:

$$\text{每克鲜重叶片的脯氨酸含量} = \frac{x * 2.5}{\text{样重} * 103} * 100\% (\text{mg} / \text{g})$$

2) 丙二醛含量的测定

① 取 0.5 g 植物叶片, 加 5%三氯乙酸 5 mL, 研磨后所得匀浆在 3000 r/rpm 下离心 10 min。

② 取上清液 2 mL, 加 0.67%硫代巴比妥酸 2 mL, 混合后在 100℃水浴上煮沸 30 min, 冷却后再离心一次。

③ 分别测定上清液在 450 nm、532 nm 和 600 nm 处的吸光度值, 并按下列公式算出 MDA 浓度 C

($\mu\text{mol/L}$), 再算出单位鲜组织中的 MDA 含量(nmol/g)。

$$C (\mu\text{mol/L}) = 6.45 (A_{532} - A_{600}) - 0.56A_{450}$$

2.3.3. 光合作用指标的测量

用英国 ppsystem 公司生产的 TPS-1 便携式光合作用测定仪测定净光合速率(P_n)。净光合速率测定与碳酸酐酶活性测定同步进行, 于上午 9:00 取油菜第 2 片叶测定净光合速率。

2.3.4. 数据分析

用 Origin 软件作图。

3. 结果与分析

3.1. 干旱过程中甘蓝型油菜叶片脯氨酸含量的变化

脯氨酸是植物蛋白质的组分之一, 以游离态广泛地存在植物体中。正常条件下, 植物体中游离脯氨酸的含量不多, 约在 $0.2\sim 0.7 \text{ mg/g}$ 干重范围内, 占总游离氨基酸的百分之几, 但在逆境条件下(干旱、盐渍、冷冻等)植物体内游离脯氨酸可增加 $10\sim 100$ 倍, 达到游离氨基酸的 40% 以上, 尤其干旱胁迫下脯氨酸积累最多[13]。植物体内的脯氨酸含量在一定程度上反映了植物的抗逆性, 抗旱性强的品种往往积累较多的脯氨酸, 因此测定脯氨酸含量可以作为抗旱育种的生理指标。

从总体上讲, 无论是锌预处理还是水预处理的油菜叶片, 在干旱及复水后的脯氨酸变化都是呈现先升后降的趋势(图 1), 但经过锌预处理的甘蓝型油菜的脯氨酸含量在整个过程都高于水预处理(对照组)的油菜叶片, 这说明锌预处理对于诱导脯氨酸的产生有一定的作用。进一步分析发现, 预处理用 $0.1\% \text{ ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的效果比 $0.05\% \text{ ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 好, 产生了更多的脯氨酸以对抗干旱胁迫。 $0.05\% \text{ ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 预处理的效果不是很明显。

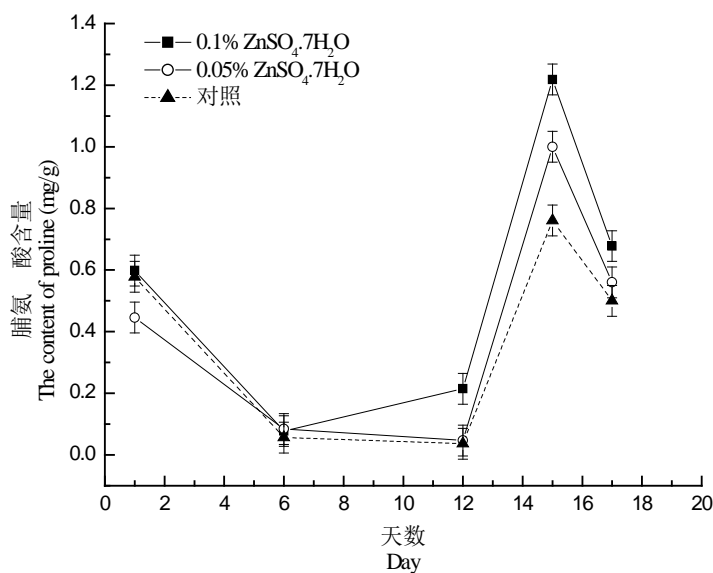


Figure 1. The change of proline content in drought and rewatering process

图 1. 干旱诱导及复水过程中叶片脯氨酸含量的变化

3.2. 干旱过程中甘蓝型油菜叶片丙二醛含量的变化

植物器官在遭受伤害时往往发生膜脂过氧化作用, 丙二醛(malondialdehyde, MDA)是膜脂氧化的最

终分解产物。MDA 可与细胞内的蛋白质、核酸等大分子发生反应，使蛋白质和核酸变性，还可使纤维素分子间的共价键松弛，对细胞进一步造成伤害。因此，MDA 含量的多少，代表着植物细胞遭受逆境伤害的程度和膜脂过氧化程度[14]。

测定结果表明：在干旱过程中经不同处理的叶片 MDA 含量都出现不同程度的上升，复水后有下降的趋势。锌预处理的叶片中的 MDA 含量明显低于对照组的叶片 MDA 含量(图 2)。特别是 0.1% $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 处理后的叶片，MDA 含量在整个过程一直是三组中最低的，说明油菜器官受损害的程度最小。

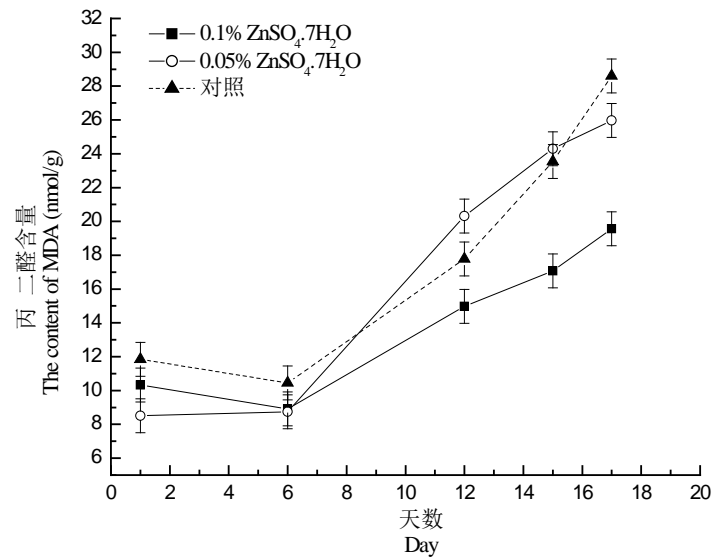


Figure 2. The change of MDA content in drought and rewatering process
图 2. 干旱诱导及复水过程中叶片丙二醛含量的变化

3.3. 干旱过程中甘蓝型油菜叶片碳酸酐酶活性的变化

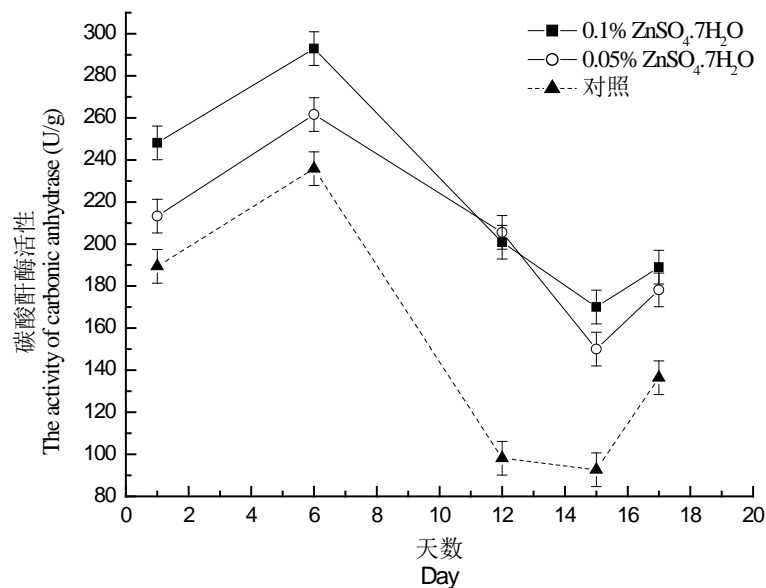


Figure 3. The change of carbonic anhydrase activity in drought and rewatering process
图 3. 干旱诱导及复水过程中叶片碳酸酐酶活性的变化

从图 3 可以看出, 总体上讲, 在轻度干旱胁迫阶段, 碳酸酐酶活性有不同程度的上升, 随着干旱的加剧, 碳酸酐酶活性出现不同程度的下降, 其中对照组的下降幅度最大。复水后碳酸酐酶活性出现了不同程度的上升。在轻度干旱胁迫下, 碳酸酐酶活性由于逆境诱导而有较大幅度上升, 这促使 CO_2 有效供给的增加, 可在一定程度上补偿由于气孔关闭而导致的光合速率的下降。但是较强的干旱胁迫却导致碳酸酐酶活性的大幅度下降, 说明植物的生理结构受到一定程度的破坏。锌预处理的油菜的碳酸酐酶活性均高于对照组, 说明前期的喷锌处理明显提高了油菜叶片的碳酸酐酶活性, 从而提高了油菜的抗旱性。

3.4. 干旱过程中甘蓝型油菜叶片净光合速率的变化

为研究不同处理油菜在干旱渐进以及复水过程中的光合速率特征, 本文还连续观测了不同实验组油菜在上午 9:00 的净光合速率, 进而了解植物对干旱胁迫在光合速率上作出的响应机制。通过图 4 可以看出在干旱渐进过程中净光合速率呈下降趋势, 复水后净光合速率开始上升。当受轻度干旱胁迫时, 净光合速率缓慢下降, 随着干旱的加剧, 净光合速率出现较大幅度的下降, 下降的幅度随干旱程度的增加而增大。锌预处理的油菜叶片净光合速率始终最大, 说明锌预处理油菜叶片的碳酸酐酶活性升高, 从而使净光合速率不至于降得太低。而且前面已经提到在整个过程中 0.1% $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 处理后的油菜叶片中积累的丙二醛最少, 说明油菜受到的损害较小; 脯氨酸含量最多, 这些渗透调节物质的大量积累有利于提高油菜的抗旱性。受损程度较小的植物复水后的恢复能力较强, 从图 4 可以看出 0.1% $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 处理后的油菜叶片在复水后净光合速率上升较快。

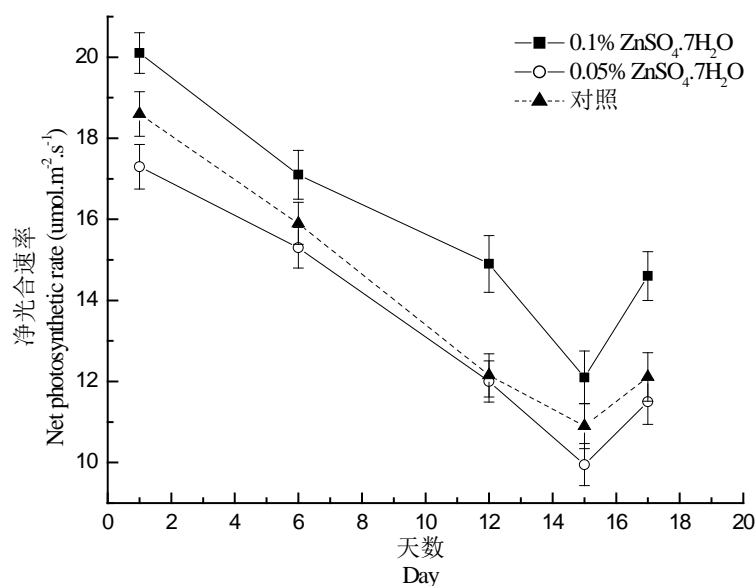


Figure 4. The change of net photosynthetic rate in drought and rewatering process

图 4. 干旱诱导及复水过程中叶片净光合速率的变化

4. 讨论

从总体上讲, 干旱胁迫时甘蓝型油菜叶片的脯氨酸含量和丙二醛含量升高, 净光合速率降低, 而碳酸酐酶活性则是先升高后降低。植物在适应干旱环境时经常会积累一些渗透调节物质, 如脯氨酸、可溶性糖等。大量研究证明, 在干旱时一般会出现植物的脯氨酸、可溶性糖以及丙二醛等含量随着干旱胁迫的加剧而增加的现象。本研究也验证了油菜叶片的脯氨酸含量和丙二醛含量在干旱胁迫时显著增加。当

植物遭受轻度或中度干旱时,叶片气孔导度下降,造成叶内细胞间隙 CO₂ 浓度降低而导致光合速率下降。干旱胁迫对植物光合作用的影响比较复杂,它不仅使光合速率降低,而且还会抑制光合作用光反应中原初光能转换电子传递光合磷酸化和光合作用暗反应过程,最终导致光合作用下降[15]。本研究也验证了在渐进干旱的过程中净光合速率明显下降。

适当浓度的喷锌预处理可以提高油菜在干旱处理前的碳酸酐酶活性。在进行干旱诱导过程中,锌预处理组油菜与对照组(未喷锌组)油菜相比,碳酸酐酶活性始终较高,脯氨酸积累较多,丙二醛积累较少,油菜受到的伤害较小。这表明叶面喷锌有助于提高甘蓝型油菜的抗旱性。从图 1 至图 4 可以看出,锌处理的两组油菜的抗旱性比对照组的抗旱性强,特别是 0.1% ZnSO₄·7H₂O 预处理的效果最明显。

王力敏等研究发现干旱胁迫期间油菜 βCA1 的 Tyr207 磷酸化水平下调,干旱胁迫抑制油菜碳酸酐酶活性[16]。孙卫红研究发现,在干旱胁迫诱导下番茄碳酸酐酶基因表达量随时间呈现先升后降的趋势[17]。本研究发现干旱诱导过程中油菜叶片碳酸酐酶活性同样出现了先升后降的趋势,与孙卫红的研究结果一致。作者在以前的研究中发现,叶面喷锌可以提高油菜的碳酸酐酶活性。本文研究了油菜碳酸酐酶活性与抗旱性的关系,结果表明:叶面喷锌提高了油菜碳酸酐酶活性,进而提高了油菜的抗旱性,进一步说明高碳酸酐酶活性的油菜具有较强的抗旱性。

参考文献

- [1] Tripp, B.C., Smith, K. and Ferry, J.G. (2001) Carbonic Anhydrase: New Insights for an Ancient Enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 48615-48618. <https://doi.org/10.1074/jbc.R100045200>
- [2] Smith, K.S. and Ferry, J.G. (2000) Prokaryotic Carbonic Anhydrases. *FEMS Microbiology Reviews*, **24**, 335-366. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00546.x>
- [3] 张震林, 高煜珠. 碳酸酐酶在高等植物光合碳代谢中的作用[J]. 江苏农业学报, 1992, 8(2): 7-12.
- [4] Johansson, I.M. and Forsman, C. (1993) Kinetic Studies of Pea Carbonic Anhydrase. *European Journal of Biochemistry*, **218**, 439-446. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb18394.x>
- [5] Moskvina, O.V., Ivanov, B.N., Ignatova, L.K., et al. (2000) Light-Induced Stimulation of Carbonic Anhydrase Activity in Pea Thylakoids. *FEBS Letters*, **470**, 375-377. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01328-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01328-4)
- [6] Lu, Y.K. and Stemler, A.J. (2002) Extrinsic Photosystem II Carbonic Anhydrase in Maize Mesophyll Chloroplasts. *Plant Physiology*, **128**, 643-649. <https://doi.org/10.1104/pp.010643>
- [7] Rowlett, R.S., Chance, M.R., Wirt, M.D., et al. (1994) Kinetic and Structural Characterization of Spinach Carbonic anhydrase. *Biochemistry*, **33**, 13967-13976.
- [8] Demir, N., Demir, Y. and Yildirim, A. (1997) Carbonic Anhydrases from Leaves and Roots of *Daucus carota*. *Phytochemistry*, **44**, 1247-1250. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(96\)00628-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(96)00628-0)
- [9] 张悦扬, 赵希胜, 等. 烟草(*Nicotiana tabacum*)碳酸酐酶基因 *NtCA7* 的克隆及表达模式分析[J]. 分子植物育种, 2019, 17(14): 4567-4574.
- [10] Hatch, M.D. and Burnell, J.N. (1990) Carbonic Anhydrase Activity in Leaves and Its Role in the First Step of C₄ Photosynthesis. *Plant Physiology*, **93**, 825-828. <https://doi.org/10.1104/pp.93.2.825>
- [11] Brownell, P.F., Bielig, L.M. and Grof, C.P.L. (1991) Increased Carbonic Anhydrase Activity in Leaves of Sodium-Deficient C₄ Plants. *Australian Journal of Plant Physiology*, **18**, 589-592. <https://doi.org/10.1071/PP9910589>
- [12] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.
- [13] Stewart, G.R. and Lee, J.A. (1974) The Role of Proline Accumulation in Halophytes. *Planta*, **120**, 279-289. <https://doi.org/10.1007/BF00390296>
- [14] 武玉叶, 李德全. 土壤水分胁迫对冬小麦叶片渗透调节及叶绿体超微结构的影响[J]. 华北农学报, 2001, 16(2): 87-93.
- [15] 姚庆群, 谢贵水. 干旱胁迫下光合作用的气孔与非气孔限制[J]. 热带农业科学, 2005, 25(4): 80-85.
- [16] 孙卫红, 吴秋霞, 等. 干旱胁迫下番茄叶片碳酸酐酶活性的变化[J]. 植物生理学报, 2015, 51(4): 424-428.
- [17] Wang, L.M., Jin, X., Li, Q.B., et al. (2016) Comparative Proteomics Reveals Phosphorylation of β Carbonic Anhydrase1 Might Be Important for Adaptation to Drought Stress in *Brassica napus*. *Scientific Reports*, **6**, Article No. 39024. <https://doi.org/10.1038/srep39024>