

NaCl 胁迫对骆驼蓬幼苗叶片多胺水平的影响

刘建新¹, 胡浩斌², 赵国林¹

(1. 陇东学院生命科学系, 甘肃 庆阳 745000; 2. 陇东学院化学与化工学院, 甘肃 庆阳 745000)

摘要: 研究了 NaCl 胁迫对骆驼蓬幼苗叶片多胺组分、多胺氧化酶(PAO)活性及 H₂O₂ 和丙二醛(MDA)含量的影响。结果表明,不同浓度 NaCl (0、50、100、200 和 400 mmol/L)胁迫 8 d 后骆驼蓬幼苗叶片游离态多胺含量随 NaCl 浓度增大明显下降,高氯酸不溶性结合态多胺下降较小,高氯酸可溶性结合态多胺无显著变化;不同形态多胺中腐胺(Put)含量随 NaCl 浓度提高显著降低,游离态和高氯酸可溶性结合态精胺(Spm)和亚精胺(Spd)含量先升后降,200 mmol/L NaCl 时出现最大值,400 mmol/L 时开始下降,但仍高于对照;高氯酸不溶性结合态 Spm 含量无显著变化而 Spd 则降低;游离态和细胞壁结合态 PAO 活性呈先升后降变化趋势;H₂O₂ 和 MDA 含量不断上升。

关键词: 骆驼蓬;盐胁迫;多胺;多胺氧化酶;H₂O₂;丙二醛

中图分类号: Q945.78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7601(2008)01-0209-04

盐胁迫是植物遭受的主要逆境之一。多胺(Polyamines, PAs)为生物代谢过程中产生的一类低分子量脂肪族含氮碱,在植物体内以游离态、高氯酸可溶性结合态和高氯酸不溶性结合态三种形式存在。游离态包括呈多聚阳离子状态存在的和与高分子物质如蛋白、核酸及细胞膜等以氢键及离子键结合的多胺;高氯酸可溶性结合态多胺主要是与一些小分子物质如肉桂酸、阿魏酸及香豆酸等以共价键结合的多胺;而高氯酸不溶性结合态多胺主要是与蛋白质以及细胞壁上的酚酸等共价键结合的多胺^[1]。有研究表明,游离多胺可以掺入到蛋白、核酸及细胞膜等大分子中去,改变后者的极性及荷电状态,影响空间结构或活性修饰从而对其生理功能产生影响^[2,3]。高氯酸可溶性结合态多胺在植物生殖生长过程,特别是成花过程中有着重要的作用^[4,5]。刘俊和刘友良^[6]的研究表明,大麦幼苗通过多胺氧化酶(Polyamine oxidase, PAO)调节 3 种形态多胺组成对盐胁迫作出应答。Dondini 等^[7]研究发现多胺在谷氨酰胺转移酶催化下可与类囊体膜蛋白共价结合,并在植物盐适应过程中起重要作用。骆驼蓬为骆驼蓬属多年生草本植物,在我国西北地区的盐碱化荒地广泛分布^[8],具有耐盐碱的生物学特性。马骥等^[9~11]曾对其形态特征、化学组成及其生态学与分类学意义作过系统研究,但骆驼蓬适应荒漠盐碱的生理机制研究少见报道。本文研究了盐胁迫下骆驼蓬幼苗不同形态多胺含量和 PAO 活性的变化,旨在了解多胺在骆驼蓬耐盐机制中的作用,

以期探讨其耐盐生理提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料培养与处理

骆驼蓬(*Peganum harmala* L.)种子(2003 年 8 月采自宁夏中卫县)目选、洗净后,用 0.1% HgCl₂ 消毒 10 min,在 25℃ 催芽后播于装有珍珠岩的塑料盆中,置玻璃温室萌发生长。萌发后用 1/2 Hoagland 营养液培养至 6 片真叶时疏苗,每盆保留生长一致的 10~12 株幼苗,待具 8 片真叶时用含有 0、50、100、200 和 400 mmol/L NaCl 的 1/2 Hoagland 营养液进行处理,NaCl 浓度每天递增 50 mmol/L,各处理于同一天达到预定浓度,以后每天定时定量按预定盐浓度浇灌,在各处理达到预定盐浓度后的第 8 天随机取幼苗叶片立即进行 PAs 含量和 PAO 活性及丙二醛(MDA)、H₂O₂ 含量的测定。每组实验重复 4 次,每个样品测定 3 次重复。

1.2 多胺含量的测定

游离态多胺参照刘俊等^[12]的方法将叶片中多胺甲酰化,并用甲醇溶解。取 10 μL 用岛津 LC-6A 型高效液相色谱分析仪进行检测。测定时流动相为 64% 的甲醇,层析柱为 ODS-1 反相 C18 柱(4.6 mm×150 mm),流速 0.5 mL/min,柱温 25℃,检测波长 254 nm。以腐胺(Put)、精胺(Spm)、亚精胺(Spd)作标准曲线,进行样品 Put、Spm 和 Spd 含量的定量分析。高氯酸可溶性结合态和高氯酸不溶性结合态多胺含量采用 Kotzabasis 等^[13]的方法测定。

收稿日期:2006-12-11

基金项目:甘肃省教育厅科研基金资助项目(JY0510-07)

作者简介:刘建新(1964-),男,甘肃通渭人,副教授,主要从事生物化学与植物生理生态的教学和研究。E-mail:liujx1964@163.com。

1.3 PAO 活性的测定

游离态 PAO 活性采用赵福庚等^[14]的方法测定;细胞壁结合态 PAO 活性按刘俊和刘友良^[6]的方法测定。

1.4 MDA 和 H₂O₂ 含量的测定

MDA 含量测定采用林植芳^[15]的方法;H₂O₂ 含量按 Akio 等^[16]的方法测定。

数据处理采用 SAS 软件进行方差分析及 SSR 法多重比较。

2 结果与分析

2.1 NaCl 胁迫下骆驼蓬幼苗叶片游离态多胺含量的变化

从表 1 可见,不同浓度 NaCl 胁迫 8 d 后骆驼蓬

幼苗叶片中 Put 含量随 NaCl 浓度增加明显下降,而 Spm 和 Spd 含量则呈先升后降变化趋势,在 200 mmol/L NaCl 时,Spm 和 Spd 含量出现最大值。多胺总量随 NaCl 浓度增加而降低,(Spm + Spd)/Put 呈现升高趋势。

2.2 NaCl 胁迫下骆驼蓬幼苗叶片高氯酸可溶性结合态(PSC)和不溶性结合态多胺(PIC)含量的变化

如表 2 所示,骆驼蓬幼苗叶片中高氯酸可溶性结合态 Put 含量随 NaCl 浓度增大显著下降,Spm 和 Spd 含量在 0~200 mmol/L NaCl 范围随浓度增大显著提高,400 mmol/L 时则降低,但仍高于对照;高氯酸不溶性结合态 Put 和 Spd 含量随 NaCl 浓度增加呈下降趋势,而 Spm 含量则无显著变化。

表 1 不同浓度 NaCl 对骆驼蓬幼苗叶片游离多胺含量的影响

Table 1 Effect of different concentrations of NaCl on free polyamines content in leaves of *p. harmala* seedling (nmol/g FW)

游离态多胺类型 Free polyamine type	NaCl 浓度 NaCl concentration (mmol/L)				
	0	50	100	200	400
腐胺 Put	316.32 _a	278.96 _b	231.29 _c	186.15 _d	171.81 _d
精胺 Spm	48.55 _c	51.77 _{bc}	53.09 _b	58.15 _a	54.31 _{ab}
亚精胺 Spd	91.57 _c	108.44 _b	125.71 _a	132.16 _a	128.27 _a
总量 Total	456.44 _a	439.17 _a	410.09 _b	376.46 _c	354.39 _c
(Spm + Spd)/Put	0.44 _d	0.57 _c	0.77 _b	1.02 _a	1.06 _a

注:同行不同字母代表在 $\alpha=0.05$ 水平差异显著,下同。

Note: Different letters showed significant difference at 0.05 level among different concentrations, and the same as below.

表 2 不同浓度 NaCl 对骆驼蓬幼苗叶片高氯酸可溶性结合态(PSC)和高氯酸不溶性结合态(PIC)多胺含量的影响

Table 2 Effect of different concentrations of NaCl on contents of perchloric acid soluble and insoluble conjugated polyamines in leaves of *p. harmala* seedling (nmol/g FW)

结合态多胺 Conjugated polyamines	NaCl 浓度 NaCl concentration (mmol/L)									
	0		50		100		200		400	
	PSC	PIC	PSC	PIC	PSC	PIC	PSC	PIC	PSC	PIC
腐胺 Put	113.73 _a	48.39 _a	89.22 _b	47.66 _a	76.21 _c	45.93 _{ab}	61.18 _d	41.85 _b	60.36 _d	40.16 _b
精胺 Spm	10.51 _d	7.85 _a	22.68 _c	7.94 _a	29.96 _b	8.78 _a	35.11 _a	10.34 _a	31.05 _b	9.51 _a
亚精胺 Spd	28.66 _d	37.56 _a	37.29 _c	35.18 _{ab}	49.48 _b	31.68 _{bc}	57.86 _a	28.46 _{bc}	52.76 _b	27.02 _c
总量 Total	152.90 _a	93.80 _a	149.19 _a	90.78 _a	155.65 _a	86.39 _{ab}	154.15 _a	80.65 _b	144.17 _a	76.69 _b
(Spm + Spd)/Put	0.34 _c	0.94 _a	0.67 _{bc}	0.90 _a	1.04 _b	0.88 _a	1.52 _a	0.93 _a	1.39 _{ab}	0.91 _a

2.3 NaCl 胁迫下骆驼蓬幼苗叶片 PAO 活性的变化

由图 1A 可见,NaCl 胁迫下骆驼蓬幼苗叶片游离态 PAO 和细胞壁结合态 PAO 活性变化趋势相似,均随 NaCl 浓度增加开始升高,100 mmol/L Na-

Cl 时出现最高活性,并显著高于对照 ($P < 0.05$),然后下降,400 mmol/L NaCl 时已低于对照 ($P < 0.05$)。另外,细胞壁结合态 PAO 活性高于游离态 PAO。

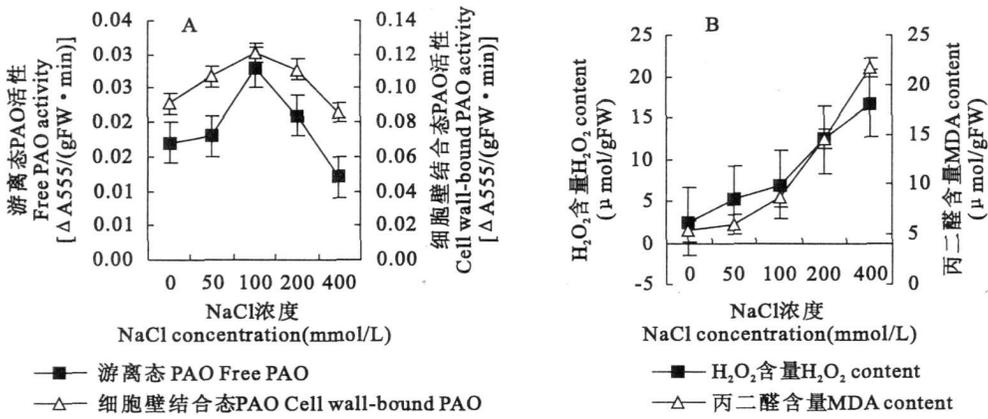


图 1 不同浓度 NaCl 胁迫对骆驼蓬幼苗叶片 PAO 活性(A)及 H₂O₂ 和 MDA 含量(B)的影响

Fig.1 Effects of different concentration of NaCl on PAO activity(A) and H₂O₂ and MDA contents(B) in the leaves of *P. harmala* seedling

2.4 NaCl 胁迫对骆驼蓬幼苗叶片 MDA 和 H₂O₂ 含量的影响

MDA 是膜脂过氧化的产物,其含量反映膜脂过氧化的程度。H₂O₂ 既是信号分子又是强氧化剂,可通过 Haber-weiss 反应产生攻击力更强的 ·OH,启动膜脂过氧化。NaCl 胁迫下骆驼蓬幼苗叶片 MDA 和 H₂O₂ 含量显著升高 ($P < 0.05$),并随 NaCl 浓度增加而增大(图 1B)。

3 讨论

耐盐及抗盐性强的植物在盐胁迫下一般能够积累较高含量的多胺^[17],可见多胺对增强植物的抗盐性具有重要作用。赵福庚等^[1]指出,细胞膜微囊与液胞膜上共价和非共价结合态多胺对大麦幼苗在盐胁迫下的适应具有调节作用。Maiale 等^[18]认为盐胁迫下植物体内能否维持高含量的 Spd 与 Spm 是衡量其耐盐性强弱的一个重要指标。骆驼蓬幼苗在 NaCl 胁迫 8 d 后,叶片中多胺以游离态存在为主。随着 NaCl 胁迫浓度的增大,游离态多胺总量及占总多胺的比例呈下降趋势;高氯酸可溶性结合态多胺总量变化不明显,但占总多胺的比例呈先升后降趋势;高氯酸不溶性结合态多胺总量下降,而占总多胺的比例却变化不大(统计数据未列)。不同形态多胺中的 Put 含量均随 NaCl 浓度提高明显下降,游离态和高氯酸可溶性结合态 Spm 和 Spd 含量呈先升后降;高氯酸不溶性结合态 Spd 含量则下降,而 Put 含量无显著变化。由此说明游离态多胺对骆驼蓬在盐胁迫下适应的调节具有更重要的作用,并通过向高氯酸结合态的转化影响共价结合多胺的含量对其生理功能进行调节,尤其是游离态和可溶性结合态 Spd 含量的升高及 Put 含量的降低则是反映骆驼蓬

对盐胁迫抗性的一个重要因素。

PAO 是多胺代谢中的关键酶,催化 PAs 的氧化降解,从而部分地调节植物体内的 PAs 水平。随着盐胁迫强度的增加,骆驼蓬幼苗叶片中游离态和细胞壁结合态 PAO 活性开始显著提高,这可能是 Put 含量迅速降低的重要原因,当然 Put 含量的下降也包括向 Spd 与 Spm 的转化及合成过程受阻。盐胁迫下 Spm 和 Spd 含量增加可能是盐胁迫诱导的结果,维持高含量的 Spm 与 Spd 对增强骆驼蓬的抗盐性无疑是必需的。随着 NaCl 胁迫浓度的增加,游离态及可溶性结合多胺的(Spm + Spd)/Put 比值显著升高,表明较高水平的(Spm + Spd)/Put 比值是骆驼蓬对盐逆境的响应。Drolet 等^[19]研究指出,多胺可以清除自由基,并且 Spd 和 Spm 的清除能力要大于 Put。因此,盐胁迫下骆驼蓬叶片高含量的 Spd 和 Spm 可有效清除胁迫产生的自由基而免受伤害。但随着盐胁迫强度的增大,PAO 活性尤其是主要活性形式的细胞壁结合态 PAO 活性的升高,催化 Put 氧化降解的同时,会产生大量的氨基醛、H₂O₂ 和自由基^[20],造成 H₂O₂ 等活性氧的积累,从而导致膜脂过氧化产物 MDA 增大(图 1B),质膜损伤以致最终死亡。此外,H₂O₂ 除作为活性氧损伤质膜外,还具有感受环境胁迫和信号转导的作用^[22]。关于盐胁迫下骆驼蓬体内多胺代谢和 H₂O₂ 信号转导与其耐盐性的关系,有待进一步研究。

参考文献:

[1] 赵福庚,孙 诚,刘友良.盐胁迫对大麦幼苗质膜、液胞膜上共价和非共价结合多胺含量的影响[J].植物学报,2000,42(9): 920-926.
 [2] 白春礼,王 琛,林 瑾.阳离子诱导 DNA 有序凝聚体的精细结

- 构的研究[J]. 中国科学基金, 1999, 5: 309—312.
- [3] Datta N R, Hardison L K, Roux S J. Polyamine stimulation of protein phosphorylation in isolated pea nuclei[J]. *Plant Physiol*, 1986, 82, 681—684.
- [4] Shizaki S, Ogata T, Horiuchi S. Endogenous polyamines in the pericarp and seed of the grape berry during development and ripening[J]. *Sci Hort*, 2000, 83, 33—41.
- [5] Tarengi E, Martin-Tanguy J. Polyamines, floral induction and floral development of strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.) [J]. *Plant Growth Regul*, 1995, 17, 157—165.
- [6] 刘俊, 刘友良. 盐胁迫下大麦幼苗多胺种类和状态与多胺氧化酶活性的关系[J]. *植物生理与分子生物学报*, 2004, 30(2): 141—146.
- [7] Dondini L S, Bonazzi S, Del-Duca A M, et al. Acclimation of chloroplast transglutaminase to high NaCl concentration in a polyamine-deficient variant strain of *Dunaliella Salina* and in its wild type[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2001, 158, 185—197.
- [8] 马骥, 王勋陵. 中国荒漠地区骆驼蓬属植物种类与分布[J]. *中国沙漠*, 1998, 18(2): 131—136.
- [9] 马骥, 王勋陵, 李俊祯, 等. 骆驼蓬属叶表皮特征的研究[J]. *草业学报*, 1997, 6(4): 49—51.
- [10] 马骥, 王勋陵, 赵松岭. 骆驼蓬属叶中氨基酸组成与抗逆性的关系[J]. *中国沙漠*, 1997, 17(1): 44—48.
- [11] 马骥, 王勋陵, 赵松岭. 骆驼蓬属种子氨基酸组成及其系统学意义[J]. *中国沙漠*, 1998, 15(4): 399—403.
- [12] 刘俊, 吉晓佳, 刘友良. 检测植物组织中多胺含量的高效液相色谱法[J]. *植物生理学通讯*, 2002, 38(6): 596—598.
- [13] Kotzabasis K, Christakis-Hampsas M D, Ronbelakis-Ange-lakis K A. A narrow-bore HPLC method for the identification and quantitation of free conjugated and bound polyamines[J]. *Analytical Biochem*, 1993, 214, 484—489.
- [14] 赵福庚, 张国珍, 张正钊, 等. 花生叶片衰老中多胺代谢酶活性及游离多胺含量变化[J]. *植物生理学通讯*, 1996, 32(5): 351—353.
- [15] 林植芳, 李双顺, 林桂株. 水稻叶片的衰老与超氧化物歧化酶活性及脂质过氧化作用的关系[J]. *植物学报*, 1984, 26(6): 605—615.
- [16] Akio Uchida, Andre T, Jagendorf, Takashi Hibino. Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice[J]. *Plant Science*, 2002, 163, 515—523.
- [17] Sawarath J, Pirkko M, Paula M, et al. Content and biosynthesis of polyamines in salt and osmotically stressed cells of *Synechocystis* sp. [J]. *Fems Microbio letters*, 2003, 228(1): 129—135.
- [18] Maiale S, Sánchez D H, Guirado A, et al. Spermine accumulation under salt stress[J]. *J Plant Physiol*, 2004, 161(1): 35—42.
- [19] Drolet G, Dumbroff E B, Legge R L, et al. Radical scavenging properties of polyamines[J]. *Phytochem*, 1986, 25(2): 367—371.
- [20] Di Tomaso M J, Shaff J E, Kochian L V. Putrescine-induced wounding and its effects on membrane integrity and ion transport process in roots of intact corn seedlings [J]. *Plant Physiol*, 1989, 90, 988—995.
- [21] Lum H K, Butt Y K C, Lo S C L. Hydrogen peroxide induces a rapid production of nitric oxide in mung bean (*Phaseolus aureus*) [J]. *Biol Chem*, 2002, 6(2): 205—213.

Effect of NaCl stress on polyamines level in *Peganum harmala* seedling leaves

LIU Jian-xin¹, HU Hao-bin², ZHAO Guo-lin¹

(1. Department of Life Sciences, Qingyang, Gansu 745000, China;

2. College of Chemistry & Chemical Engineering, Longdong University, Qingyang, Gansu 745000, China)

Abstract: Three polyamines (Put, Spm and Spd) and their different forms (free, perchloric acid soluble and insoluble conjugated) together with polyamine oxidase (PAO) activities and the contents of H₂O₂ and malondialdehyde (MDA) in *peganum harmala* seedling leaves were investigated under NaCl stress. The results showed that with NaCl concentration (0, 50, 100, 200 and 400 mmol/L) increased, the total content of the free polyamines and the Put of three different forms of polyamines decreased dramatically, the insoluble conjugated ones decreased little and the soluble ones was significantly unchanged, the contents of free and soluble Spm and Spd were increased first and then decreased, while the insoluble Spm was not changed dramatically but Spd were decreased dramatically. The activities of free and cell wall-bound PAO were increased first and then decreased, and the contents of H₂O₂ and MDA were increased continuously.

Key words: *Peganum harmala*; salt stress; polyamine; polyamine oxidase; H₂O₂; MDA