

干旱对苜蓿叶片葫芦巴碱含量和渗透调节能力的影响

刘晓东, 孙广玉, 李 威

(东北林业大学植物生理实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘 要: 以 3 个抗旱性不同的苜蓿品种(肇东、准葛尔和 CW200)为研究材料, 研究了干旱胁迫下苜蓿叶片葫芦巴碱含量的变化和渗透调节能力。结果表明: 干旱胁迫下 3 个苜蓿品种叶片水势降低, 脯氨酸含量增加, 渗透调节能力(OA)提高。在干旱胁迫下, 准葛尔和肇东两个品种叶片中葫芦巴碱含量明显增加, 而 CW200 叶片中葫芦巴碱含量增加不明显; 肇东和 CW200 在干旱 4 天后, 准葛尔在干旱 8 天后, 叶片中葫芦巴碱含量下降。因此, 葫芦巴碱在轻度干旱下可能起到渗透调节物质的作用, 严重干旱下该作用减弱。

关键词: 干旱胁迫; 渗透调节; 葫芦巴碱; 苜蓿

中图分类号: S551⁺.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7601(2009)04-0121-04

植物渗透调节是植物在低水势状态下适应逆境的一种重要方式, 是指在渗透胁迫下植物细胞中主动积累有活性的、无毒害作用的溶质, 降低渗透势, 便于植物在低渗透势生境中吸收水分, 保持一定膨压^[1,2], 维持一定的叶片生长率^[3]。目前, 研究较多的有机小分子渗透调节物质主要集中在脯氨酸、游离氨基酸和甘氨酸甜菜碱等^[4]。葫芦巴碱(Trigonelline)是一种嘧啶甜菜碱, 为烟碱的代谢产物^[5], 位于植物细胞质中^[6]。植物在逆境条件下, 葫芦巴碱含量增加, 但葫芦巴碱能否作为渗透调节物质一直为人们所争议。盐胁迫下葫芦巴碱增加两倍以上^[7], 同脯氨酸和甘氨酸甜菜碱一样被认为是渗透调节物质; 但是, 在干旱胁迫下大豆叶片中的葫芦巴碱含量增加, 却没有起到渗透调节物质的作用, 而是作为细胞周期的调节物质, 延长细胞周期中的 G2 期^[8]。本文以 3 个苜蓿品种为材料, 在逐渐干旱情况下研究葫芦巴碱含量的变化, 探讨葫芦巴碱与植物渗透调节之间的关系, 揭示葫芦巴碱在植物抗旱生理学中的作用。

1 材料与方法

1.1 试验材料和处理

供试材料为 3 个苜蓿品种: 准葛尔、肇东和 CW200, 其中准葛尔抗旱性较强, CW200 抗旱性较弱, 肇东抗旱性中等。试验在东北林业大学自动控

制降雨的防雨棚内进行, 5 月 2 日将 3 个苜蓿品种播种于水泥池子中, 池子长 3 m, 宽 1.5 m, 四周用水泥预制板围起, 深度 1.5 m。施肥水平 150 kg/hm² 磷酸二铵, 人工除草。在苜蓿生长到第四片叶时进行干旱处理: 其中一组为正常浇水, 设置为对照(CK); 另一组为干旱处理, 不浇水, 持续干旱 16 天后, 土壤含水量为 12.52%, 苜蓿叶片开始萎蔫。在干旱处理的第 4、8、12 和 16 天, 取苜蓿最上部的 2 个完全展开叶进行测定。

1.2 渗透调节能力的测定

取叶片置蒸馏水中 8 h 吸水饱和, 取出吸干表面水分, 放入塑料袋中密封, 在液氮中冷冻, 测定前将样品取出融冰, 剪碎, 榨取汁液。利用美国 WESCOR 公司生产的 5520 型蒸汽压渗透压计测定细胞汁液的 iC , 按下式计算饱和渗透势(Ψ_s^{100}): $\Psi_s^{100} = -0.1013 R \times T \times iC$, 式中 R 为气体常数, 取 0.08314; T 为凯氏温度, $T = 273 + t$, t 为测定时的摄氏室温; iC 为仪器显示的渗摩尔浓度(Osm/kg)。按下式计算渗透调节能力(OA):

$$OA = \Psi_s^{100} \text{ 对照} - \Psi_s^{100} \text{ 处理}, \text{取 3 个重复的平均值。}$$

1.3 叶片水势(Ψ_w)的测定

利用美国 WESCOR 公司生产的 PSYPRO 型水势仪测定, 测定干旱叶片时平衡时间在原来 30 min 的基础上延长到 1 h 左右, 使测定室中的水分达到稳定平衡。

收稿日期: 2008-10-18

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(40771034); 黑龙江省重点项目(GB07B306)

作者简介: 刘晓东(1983—), 男, 山东牟平县人, 硕士研究生, 主要从事逆境生理研究。

通信作者: 孙广玉(1963—), 男, 黑龙江巴彦人, 教授, 主要从事逆境生理研究。E-mail: sungy@vip.sina.com。

1.4 叶片脯氨酸含量的测定

脯氨酸含量测定采用酸性茚三酮比色法^[9]。

1.5 叶片葫芦巴碱含量的测定

称取叶片鲜样约 0.5 g 保存在暗中低温(4℃)下待测,以 80:20 (V/V)的乙腈和水为流动相,在高效液相色谱仪(Waters, USA)上按照孙广玉等^[10]方法进行测定。葫芦巴碱的纯化样品由中国药品生物制品检定所提供(纯度为 99.9%)。

1.6 数据处理

运用 Excel 和 SPSS 软件对试验数据进行统计分析,图中数据为 3 次重复的平均值 ± 标准差(SE),并采用单因素方差分析(One-way ANOVA)和最小显著差异法(LSD)比较不同数据组间的差异。

2 结果与分析

2.1 叶片水势和渗透调节能力

叶片水势与渗透调节能力是反映干旱胁迫下植物叶片水分状况、适应逆境胁迫的重要指标。图 1 表明:随着干旱天数的增加,3 个苜蓿品种的叶片水势(Ψ_w)逐渐降低。CW200 比肇东和准葛尔的 Ψ_w 低,但没有达到显著差异水平($P > 0.05$)。3 个品种在干旱情况下表现出一定的渗透调节能力(图 2),随着干旱天数的延长,OA 值逐渐增大,干旱 12 d 后,OA 开始降低。3 个品种的渗透调节能力为:准葛尔 > 肇东 > CW200。在干旱的 8 d 内,准葛尔和肇东的渗透调节能力相差不大,没有达到显著差异水平,干旱第 12 天时,准葛尔的 OA 值显著($P < 0.05$)高于肇东。在干旱的第 4~16 天中,准葛尔和肇东的 OA 值明显高于 CW200($P < 0.05$)。说明准葛尔和肇东具有较高的渗透调节能力,表现出明显的抗旱能力。

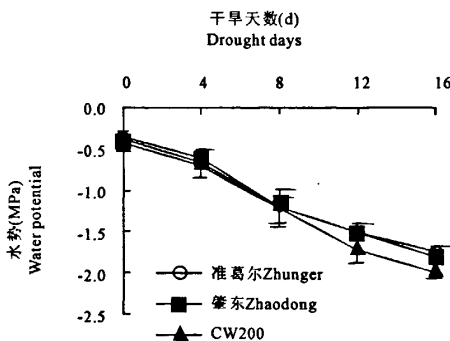


图 1 干旱对不同苜蓿品种叶片水势的影响
Fig.1 Effects of drought on water potential in leaves of three alfalfa varieties

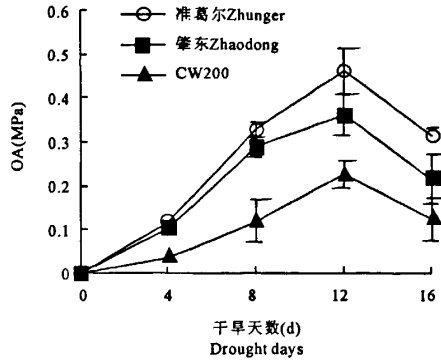


图 2 干旱对不同苜蓿品种叶片渗透调节能力(OA)的影响
Fig.2 Effects of drought on osmotic adjustment (OA) in leaves of three alfalfa varieties

2.2 叶片葫芦巴碱含量的变化

利用高效液相色谱(HPLC)法测定苜蓿叶片的葫芦巴碱含量,图 3 表明:在未干旱处理的情况下,3 个品种的葫芦巴碱含量明显不同,准葛尔为 91.5 $\mu\text{g/g}$ FW,肇东 71.5 $\mu\text{g/g}$ FW, CW200 含量最低,为 37.6 $\mu\text{g/g}$ FW,三者之间达到显著差异水平($P < 0.01$),与 3 个品种的抗旱性有关。干旱处理第 4 天, CW200 的葫芦巴碱含量由对照 37.6 $\mu\text{g/g}$ FW 增加到 69.47 $\mu\text{g/g}$ FW,二者之间达到显著差异水平;肇东在干旱第 4 天时,葫芦巴碱含量增加,为对照的 2.6 倍,继续实施干旱处理,葫芦巴碱的含量开始下降,干旱处理第 16 天时下降到对照水平;准葛尔在干旱 8 天时,葫芦巴碱含量最高,为 301.78 $\mu\text{g/g}$ FW,为对照的 3.3 倍,之后葫芦巴碱含量逐渐降低。

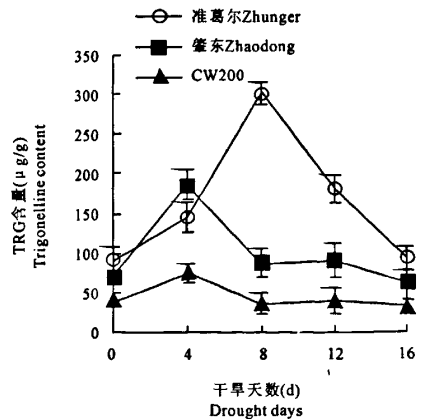


图 3 干旱对不同苜蓿品种叶片葫芦巴碱含量的影响
Fig.3 Effects of drought on trigonelline content in leaves of three alfalfa varieties

2.3 叶片中脯氨酸含量的变化

脯氨酸是一种公认的重要的渗透调节物质,在

盐胁迫和干旱逆境胁迫下,植物体内会大量积累脯氨酸^[11]。图4表明:干旱胁迫均使3个苜蓿品种脯氨酸含量增加,这与其他研究者的结果相同^[12]。

随着干旱天数的增加,尤其是干旱16 d时,抗旱性强的准葛尔脯氨酸含量为75.5 $\mu\text{g/g}$ FW,高于对照56倍,其次为肇东,高于对照21倍;抗旱性较弱的品种CW200脯氨酸含量高于对照17倍。脯氨酸含量的增加,提高了细胞溶质的浓度,表现出一定的渗透调节能力。

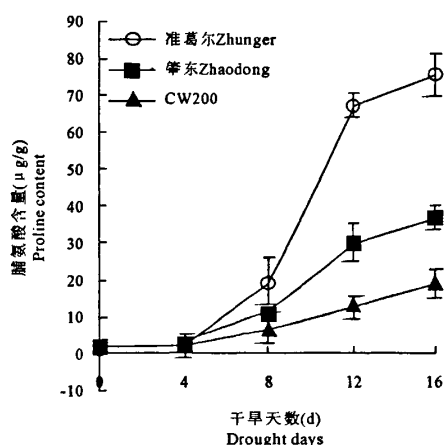


图4 干旱对不同苜蓿品种叶片脯氨酸含量的影响

Fig.4 Effects of drought on proline content in leaves of three alfalfa varieties

3 讨论

植物在干旱胁迫下,保持正常生长或维持植物体内的正常代谢,通过渗透调节可以维持植物的膨压。植物可以降低体内的水分,或细胞体积变小,或增加体内的溶质含量,实现渗透调节,也可以同时利用这3个途径来抵御干旱胁迫^[11]。植物受到干旱时,植物体内的水分含量降低,这已经在多数植物上得到证实。本试验结果表明(图1):干旱发生后苜蓿叶片水势下降,渗透调节能力增强(图2),这说明干旱发生后苜蓿叶片通过体内水分的降低,相对增加细胞内部的溶质浓度,使渗透势下降,提高渗透调节能力。本试验选择了脯氨酸作为指标,结果(图4)与大多数研究者相似^[14],干旱促进了脯氨酸在苜蓿叶片内的积累。这说明苜蓿植株在受到干旱胁迫的情况下,叶片的水势降低,并积累脯氨酸等小分子有机渗透调节物质,维持膨压。

Evans等^[15]提出葫芦巴碱具有植物激素的特点之后,在逆境条件下,葫芦巴碱积累和代谢的研究已经成为国际上研究的热点问题。根据现有的资料,

葫芦巴碱在植物体内积累,具有三方面的生理作用^[16]:(1)作为渗透调节物质保护细胞免受逆境(干旱、盐渍化等)的危害;(2)作为细胞周期的调节物质,延长G2期;(3)作为烟酸的储藏物质。Tramontano和Jouve^[17]认为:在盐胁迫下豆科植物体内葫芦巴碱的积累,渗透势下降,葫芦巴碱可作为渗透调节物质。Cho等^[8]在17个大豆品种上进行盐胁迫处理,得到同样的结果,但是,品种之间存在较大差异,11个品种葫芦巴碱含量在盐胁迫时增加。本试验结果:干旱处理的苜蓿品种间存在明显差异,而且在干旱的前期(第4天)葫芦巴碱与脯氨酸一样在细胞中积累明显,葫芦巴碱同脯氨酸一样起到渗透调节物质的作用。但是,肇东和CW200在干旱4天之后,准葛尔在干旱8天后,葫芦巴碱的含量下降,而渗透调节能力仍然增加(图2),说明葫芦巴碱在较为严重的干旱胁迫下作为渗透调节物质的作用减弱。Evans等^[15]认为葫芦巴碱在豌豆的根系和幼苗分生组织中增加细胞周期中G2期的滞留时间,延缓细胞的扩大。Mazzuca等^[6]发现,在细胞周期的S期,葫芦巴碱处理的莴苣,茎间分生组织中DNA大小是对照的2.5倍,避免了DNA细胞周期中S期的缠绕。本试验结果表明,葫芦巴碱在苜蓿干旱过程中,首先积累,然后下降。利用沙培的方法使苜蓿种子萌发,加入3 mmol/L的葫芦巴碱后,与没有葫芦巴碱处理相比,根系分生组织的伸长减慢(另文发表)。因此,在轻度水分胁迫下,葫芦巴碱在苜蓿叶片中积累可作为渗透调节物质,如同脯氨酸和甘氨酸甜菜碱等一样,提高细胞体内的浓度,渗透势下降,但是在严重水分胁迫下作为渗透调节物质的能力减弱。另一方面,葫芦巴碱可作为细胞生长的调节因子,在水分胁迫下延长植物细胞周期的长度,抑制细胞生长,细胞体积缩小,使细胞体内的溶质浓度相对增加,从而实现渗透调节。

参考文献:

- [1] Turner L B, Stewart G R. Factors affecting polyamine accumulation in barley (*Hordeum vulgare* L.) leaf sections during osmotic stress[J]. J Exp Bot, 1998, 39:311—316.
- [2] Munns R. Comparative physiology of salt and water stress[J]. Plant, Cell and Environ, 2002, 25:239—250.
- [3] Neumann P M. Rapid and reversible modifications of extension capacity of cell walls in elongating maize leaf tissues responding to root addition and removal of NaCl[J]. Plant, Cell and Environ, 1993, 16: 1107—1114.
- [4] Jone M M, Osmnd C B, Turner N C. Accumulation of solutes in leaves of sorghum and sunflower in response to water deficit[J]. Aust J Plant Physiol, 1980, 7:193—205.

- [5] Ashihara H, Stasolla C, Yin Y L, et al. De novo and salvage biosynthetic pathways of pyridine nucleotides and nicotinic acid conjugates in cultured plant cells[J]. *Plant Science*, 2005,169:107—114.
- [6] Mazzucal S, Bitontil M B, Innocentil A M, et al. Inactivation of DNA replication origins by the cell cycle regulator, trigonelline, in root meristems of *Lactuca sativa*[J]. *Planta*, 2000, 211:127—132.
- [7] Shomerilan A, Jones G P, Paleg L G. In vitro thermal and salt stability of pyruvate-kinase are increased by proline analogs and trigonelline [J]. *Aust J Plant Physiol*, 1991,18:279—286.
- [8] Cho Y, Njiti V N, Chen X, et al. Trigonelline concentration in field-grown soybean in response to irrigation [J]. *Bio Plant*, 2003, 46: 405—410.
- [9] Bates L S, Waldren R P, Tear G D. Rapid determination of free proline for water stress studies[J]. *Plant Physiol*, 1973,39:205—207.
- [10] 孙广玉,李 威,姜丽娜,等.大豆和苜蓿种子中葫芦巴碱含量的测定[J]. *植物生理学通讯*,2006,42:1153—1155.
- [11] Bohnert H J, Nelson D E, Jensen R G. Adaptations to environmental stresses[J]. *Plant Cell*, 1995,7:1099—1011.
- [12] Sanchez F J, Manzanares M, de Andres E F. Turgor maintenance, osmotic adjustment and soluble sugar and proline accumulation in 49 pea cultivars in response to water stress[J]. *Field Crop Res*, 1998, 59:225—235.
- [13] Folkert A, Hoekstra E A, Golovina J B. Mechanisms of plant desiccation tolerance[J]. *Trends in Plant Science*, 2001,6:431—438.
- [14] Yamada M, Morishita H, Urano K, et al. Effects of free proline accumulation in petunias under drought stress[J]. *J Exp Bot*, 2005, 56:1975—1981.
- [15] Evans L S, Almeida M S, Lynn D G, et al. Chemical characterization of a hormone that promotes cell arrest in G2 in complete tissues [J]. *Science*, 1979,203:1122—1123.
- [16] Minorsky P V. The hot and the classic: Trigonelline: A diverse regulator in plants[J]. *Plant Physiol*, 2002,128:7—8.
- [17] Tramontano W A, Jouve D. Trigonelline accumulation in salt-stressed legumes and the role of other osmoregulators as cell cycle control agents[J]. *Phytochem*, 1997,44:1037—1040.

Effects of drought on trigonelline content and osmotic adjustment in leaves of three alfalfa (*Medicago sativa* L.) varieties

LIU Xiao-dong, SUN Guang-yu, Li Wei

(Lab of Plant Physiology, Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang 150040, China)

Abstract: Taking three alfalfa varieties Zhunger, Zhaodong and CW200 as test materials, this paper studied the changes of trigonelline content and osmotic adjustment under drought stress. The results showed that leaf water potential (Ψ_w) decreased. Proline in leaves of three varieties was accumulated, and osmotic adjustment (OA) increased for 16 days. Trigonelline content in leaves of Zhunger and Zhaodong increased significantly within 8-day drought, but not significantly in leaves of CW200, trigonelline content in leaves of Zhaodong and CW200 after 4 – day drought and Zhunger after 8 – day drought declined. It was suggested that trigonelline increasing as the osmolyte could achieve osmotic adjustment significantly under moderate drought, but not significantly under severe drought.

Key words: drought; osmotic adjustment; trigonelline; alfalfa(*Medicago sativa* L.)