

外源亚精胺对盐胁迫下黄瓜 (*Cucumis sativus* L.) 叶绿体活性氧清除系统和结合态多胺含量的影响

段九菊^{1,2}, 郭世荣^{1,*}, 康云艳¹, 周国贤¹, 刘香娥¹

(1. 南京农业大学园艺学院, 南京 210095; 2. 山西省农业科学院园艺研究所, 太原 030031)

摘要: 采用营养液水培, 研究了外源亚精胺 (Spd) 对 NaCl 胁迫下抗盐能力不同的两个黄瓜品种幼苗生长、叶绿体中活性氧清除系统、转谷酰胺酶 (TGase) 活性、结合态多胺含量及植株光合速率的影响。结果表明, 外源 Spd 能提高 NaCl 胁迫下叶绿体中 TGase 活性、叶绿体结合态腐胺 (Put)、Spd、精胺 (Spm) 及总多胺含量; 提高超氧化物歧化酶 (SOD)、抗坏血酸过氧化物酶 (APX) 和谷胱甘肽还原酶 (GR) 活性, 提高抗坏血酸 (AsA)、类胡萝卜素 (Car)、还原型谷胱甘肽 (GSH) 含量及还原型谷胱甘肽/氧化型谷胱甘肽 (GSH/GSSG) 比值, 降低脱氢抗坏血酸/抗坏血酸 (DAsA/AsA) 比值; 同时显著降低叶绿体过氧化氢 (H_2O_2) 和丙二醛 (MDA) 含量, 提高植株净光合速率, 缓解 NaCl 胁迫对幼苗生长的抑制。表明 Spd 对黄瓜盐害的缓解作用之一可能是通过提高叶绿体结合态多胺含量和叶绿体活性氧清除能力, 从而缓解盐胁迫对叶绿体膜的伤害。

关键词: 黄瓜; 盐胁迫; 叶绿体; 活性氧清除系统; 多胺

文章编号: 1000-0933(2009)02-0653-09 中图分类号: Q142, Q945, S642.2 文献标识码: A

Effects of exogenous spermidine on active oxygen scavenging system and bound polyamine contents in chloroplasts of cucumber under salt stress

DUAN Jiu-Ju^{1,2}, GUO Shi-Rong^{1,*}, KANG Yun-Yan¹, ZHOU Guo-Xian¹, LIU Xiang-E¹

¹ College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

² Institute of Horticulture, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Taiyuan 030031, China

Acta Ecologica Sinica, 2009, 29(2): 0653 ~ 0661.

Abstract: The objective of this study was to investigate the effects of exogenous application of spermidine on the growth, active oxygen scavenging system and bound polyamine contents in chloroplasts of cucumber under salt stress. The results showed that under salt stress, exogenous spermidine increased TGase activity and bound putrescine, spermidine, spermine and total polyamine contents in chloroplasts. The activities of SOD, APX and GR, the contents of AsA, Car and GSH, and the ratios of GSH/GSSG in chloroplasts were increased, while the ratios of DAsA/AsA and the contents of H_2O_2 and MDA decreased. Furthermore, exogenous spermidine increased net photosynthetic rates, as well as alleviated the salt-induced plant growth inhibition. These results suggest that exogenous application of spermidine could alleviate salt-induced membrane injury of chloroplast by increasing the active oxygen scavenging ability and the bound polyamine contents in chloroplast.

Key Words: cucumber (*Cucumis sativus* L.); salt stress; chloroplast; active oxygen scavenging system; polyamines

土壤盐渍化是影响植物生产的主要环境因素之一, 全世界盐渍土约有 10 亿 hm^2 , 约占陆地总面积的

基金项目: 国家科技支撑计划资助项目 (2006BAD07B04); 国家农业部行业公益性资助项目 (nyhyzx07-007); 江苏省农业三项工程资助项目 (SX(2008)026); 高校博士点基金科研资助项目 (20050307031)

收稿日期: 2007-09-12; **修订日期:** 2008-01-14

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: srguo@njau.edu.cn

10%,我国约有盐渍土 2600 万 hm^2 ^[1]。目前,随着设施栽培面积的日益扩大,温室土壤的次生盐渍化也已成为国内外设施栽培中普遍存在的问题。盐胁迫下,植物细胞由于代谢受阻使得活性氧产生与清除的动态平衡被破坏,大量产生的活性氧导致膜系统损伤和细胞伤害^[2]。叶绿体不仅是植物光合作用的场所,还是植物体产生活性氧的一个重要细胞器,也是细胞中对盐最敏感的细胞器^[3]。已有报道表明,盐胁迫下植物叶绿体 H_2O_2 含量增加,膜脂过氧化作用增强^[4],叶绿体膜结构破坏,叶肉细胞死亡^[5]。但有关盐胁迫对设施蔬菜作物叶绿体活性氧清除系统的影响报道尚少。

多胺是一类广泛存在于生物体内具有强烈生物活性的低分子量脂肪族含氮碱,环境胁迫可诱导植物体内大量积累多胺,其在稳定细胞膜、核酸及蛋白质等大分子物质构象、清除活性氧、调节细胞阴阳离子平衡等方面均起着重要作用^[6]。植物体内常见的多胺包括腐胺(Put)、亚精胺(Spd)和精胺(Spm)等,其中 Spd 与逆境胁迫抗性关系更为密切,在植物抗逆性中不仅作为直接的胁迫保护物质,而且在胁迫信号转导中作为信号分子,有利于胁迫抗性机制的构建^[7],外施 Spd 可以提高水稻^[8]、玉米^[9]、黄瓜^[10,11]等植物的抗盐性。最近研究表明,Spd 与植物叶绿体抗逆境胁迫密切相关,低温胁迫下,菠菜叶绿体结合态 Spd 含量的降低引起类囊体电子传递及碳代谢酶活性降低,类囊体膜脂过氧化程度增加,光抑制增加^[12],外源 Spd 可以阻止盐胁迫下水稻叶片叶绿素的降解,抑制光合作用光化反应及叶绿体编码基因 *psbA*、*psbB*、*psbE*、*rbcL* 等的负调^[8],外源 Spd 可以提高盐胁迫下水稻叶绿体结合态多胺含量,提高植株光合能力^[13]。

前文^[10]研究表明,外源 Spd 可显著提高盐胁迫下黄瓜叶片和根系中 SOD、POD 和 CAT 活性,降低 O_2^- 产生速率、 H_2O_2 和 MDA 含量,缓解盐胁迫对黄瓜的伤害。但有关 Spd 与黄瓜叶绿体抗盐胁迫关系的研究鲜见报道,研究外源 Spd 对盐胁迫下黄瓜叶绿体活性氧清除系统及结合态多胺含量的影响,有助于从细胞水平上深入揭示 Spd 提高黄瓜抗盐性的生理机制。为此,本试验以抗盐能力具有明显差异的两个黄瓜品种为试材,进一步探讨 Spd 缓解黄瓜叶绿体盐胁迫伤害的机理。

1 材料与方法

1.1 试材与处理

以抗盐能力较强的‘长春密刺(Changchun mici)’和抗盐能力较弱的‘津春 2 号(Jinchun No. 2)’黄瓜(*Cucumis sativus* L.)品种^[14]为试材。种子发芽后播于装有石英砂的育苗盘中育苗,温室昼温 25~30℃、夜温 15~18℃。幼苗二叶一心时,挑选整齐一致的植株定植于装有 1 个剂量日本山崎黄瓜配方营养液的水槽内进行预培养,调节营养液 pH 为 6.5 ± 0.1 、EC 为 2.2~2.5 $\text{mS} \cdot \text{cm}^{-1}$,气泵通气(40 $\text{min} \cdot \text{h}^{-1}$)。幼苗三叶一心时,将两个品种幼苗各分成 4 部分进行如下处理:(A) CK,营养液栽培;(B) CK + Spd 处理,营养液添加 Spd (Sigma 公司产品)至终浓度为 0.1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$;(C) NaCl 处理,营养液添加 NaCl (分析纯)至终浓度为 50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$;(D) NaCl + Spd 处理,营养液同时添加 NaCl 和 Spd,使终浓度分别为 50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 0.1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。同时于每天 18:00 时向 B 和 D 处理叶面喷施 0.1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Spd, A 和 C 处理喷施同样体积的蒸馏水,所有喷施液均含体积分数为 0.01% 的表面活性剂 Tween-20。为了保证处理浓度的稳定,处理期间每 2 d 更换 1 次营养液。处理 7 d 后测定幼苗净光合速率,并取植株顶部向下第二片完全展开功能叶提取叶绿体,进行叶绿体结合态多胺含量和活性氧清除系统的测定,每处理 3 次重复;处理 8 d 时进行叶片生长分析以及整株干鲜重测定。

1.2 测定项目

干鲜重测定:分别取 15 株幼苗,用蒸馏水冲洗干净,吸干表面水分称鲜重,然后 115℃ 杀青 15 min,75℃ 烘至恒重,称干重。

叶片生长扫描分析:用台式扫描仪(EPSON EXPERSION 1680)将幼苗叶片图像扫描存入电脑,再用图像分析软件 WinRHIZO(加拿大 Regent Instruments 公司)分析叶长、叶宽、叶面积。每项指标测定为 15 次重复,取平均值。

叶绿体的制备:取叶片 10 g,参照 Takeda 等^[15]的方法提取叶绿体。用缓冲液(pH 7.8,内含 0.05

mol·L⁻¹的 PBS, 5 mmol·L⁻¹的 EDTA) 悬浮叶绿体, 用于测定超氧化物歧化酶(SOD)、抗坏血酸过氧化物酶(APX)、谷胱甘肽还原酶(GR)、脱氢抗坏血酸还原酶(DHAR)、单脱氢抗坏血酸还原酶(MDAR)、转谷酰胺酶(TGase)活性和抗坏血酸(AsA)、脱氢抗坏血酸(DAsA)、氧化型谷胱甘肽(GSSG)、还原型谷胱甘肽(GSH)和丙二醛(MDA)含量;用丙酮悬浮叶绿体,用于测定过氧化氢(H₂O₂)、叶绿素(Chl)、类胡萝卜素(Car)含量;向提取的叶绿体悬浮液中加入高氯酸(PCA)至终浓度为5%,沉淀蛋白和酸不溶物,离心后的沉淀用6 N HCl于110℃酸解18 h,过滤去除碳化物后70℃蒸干,用5%PCA溶解残留物,离心取上清用于测定叶绿体结合态多胺含量。

采用 Zhao 等^[16]方法测定 TGase 活性,以 1 nmol Put·mg⁻¹ protein·h⁻¹ 为一个酶活力单位(U)。参照刘俊等^[17]方法测定多胺含量,取 10 μl 甲醇溶解物用 Dionex P680 型高压液相色谱分析仪检测,流动相为 64% 的甲醇(超纯水配制),Kromasil 反相 C18 柱(250 mm × 4.6 mm),流速 0.8 ml·min⁻¹,柱温 25℃,Dionex UVD170U 紫外检测,检测波长 254 nm。

抗氧化酶活性测定:SOD 活性采用氮蓝四唑(NBT)光还原法^[18],以抑制 NBT 光化还原的 50% 为一个酶活力单位(U);APX 参照 Nakano 和 Asada^[19]的方法测定;GR 参照 Foyer 和 Halliwell^[20]的方法测定;DHAR 参照 Hossain 和 Asada^[21]的方法测定;MDAR 参照 Miyake 和 Asada^[22]的方法测定;蛋白含量采用考马斯亮蓝 G-250 法^[23]测定。

抗氧化物质含量测定:AsA 和 DAsA 参照 Arakawa 等^[24]的方法测定;GSH 和 GSSG 参照 Griffiths^[25]的方法测定。

H₂O₂ 含量参照林植芳等^[26]的方法测定,MDA 含量采用 Hodges 等^[27]的方法测定。

采用便携式光合测定仪(LI-6400 型,美国 LI-Cor 公司)测定生长点下第 2 片展开叶的净光合速率(Pn),测定时采用开放气路,光照强度为 800 μmol·m⁻²·s⁻¹,叶温为 25℃。

试验数据采用 SAS 软件 Duncan's 多重比较法进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 外源 Spd 对植株生长的影响

从表 1 可以看出,对照条件下,外源 Spd 对黄瓜植株生长无明显影响;NaCl 胁迫处理显著抑制了两品种幼苗生长,‘津春 2 号’各指标的降低幅度大于‘长春密刺’;外源 Spd 缓解了 NaCl 胁迫对植株生长的抑制,且对‘津春 2 号’的缓解作用大于‘长春密刺’。

表 1 外源 Spd 对盐胁迫下黄瓜幼苗生长的影响

Table 1 Effects of exogenous Spd on the growth of cucumber seedlings under salt stress

品种 Cultivar	处理 Treatment	单株鲜重 Fresh weight (g·plant ⁻¹)	单株干重 Dry weight (g·plant ⁻¹)	平均叶长 Average leaf length (cm)	平均叶宽 Average leaf width (cm)	总叶面积 Total leaf area (cm ² ·plant ⁻¹)
长春密刺 Changchun mici	CK	39.22 ± 1.82a	2.49 ± 0.22a	11.72 ± 0.21a	11.19 ± 0.15a	558.33 ± 26.83a
	CK + Spd	39.54 ± 1.53a	2.55 ± 0.11a	11.69 ± 0.17a	11.21 ± 0.15a	572.03 ± 16.82a
	NaCl	28.37 ± 1.76c	1.80 ± 0.15b	10.06 ± 0.48b	9.66 ± 0.10b	346.77 ± 24.14c
	NaCl + Spd	34.83 ± 1.55b	2.31 ± 0.15a	11.04 ± 0.25ab	10.73 ± 0.17a	447.66 ± 39.10b
津春 2 号 Jinchun No. 2	CK	43.96 ± 1.87a	2.88 ± 0.16a	10.43 ± 0.20a	10.52 ± 0.21a	463.45 ± 9.96a
	CK + Spd	44.63 ± 2.72a	2.94 ± 0.17a	10.45 ± 0.16a	10.55 ± 0.15a	487.82 ± 2.38a
	NaCl	25.11 ± 1.41c	1.50 ± 0.07c	8.53 ± 0.33b	8.84 ± 0.41b	261.05 ± 8.10c
	NaCl + Spd	37.80 ± 1.34b	2.42 ± 0.11b	10.21 ± 0.08a	10.32 ± 0.14a	389.73 ± 23.75b

同一列中相同字母表示在 $p < 0.05$ 水平下差异不显著,下同 Values within a column followed by the same letters show no significant difference ($p < 0.05$); the same below

2.2 外源 Spd 对叶绿体 SOD、APX、GR、DHAR 和 MDAR 活性的影响

如图 1 所示,对照条件下,外源 Spd 对 SOD、APX、GR、DHAR 和 MDAR 活性无显著影响;NaCl 胁迫下,‘长春密刺’叶绿体内 SOD、APX、GR 和 DHAR 活性均显著升高,‘津春 2 号’叶绿体内 GR、DHAR 活性显著升高,

SOD、APX 活性无显著变化,2 品种 MDAR 活性均无显著变化;NaCl 胁迫下,外源 Spd 对 DHAR 和 MDAR 活性无影响,但显著提高了 SOD、APX、GR 活性,且对‘津春 2 号’提高幅度大于‘长春密刺’。

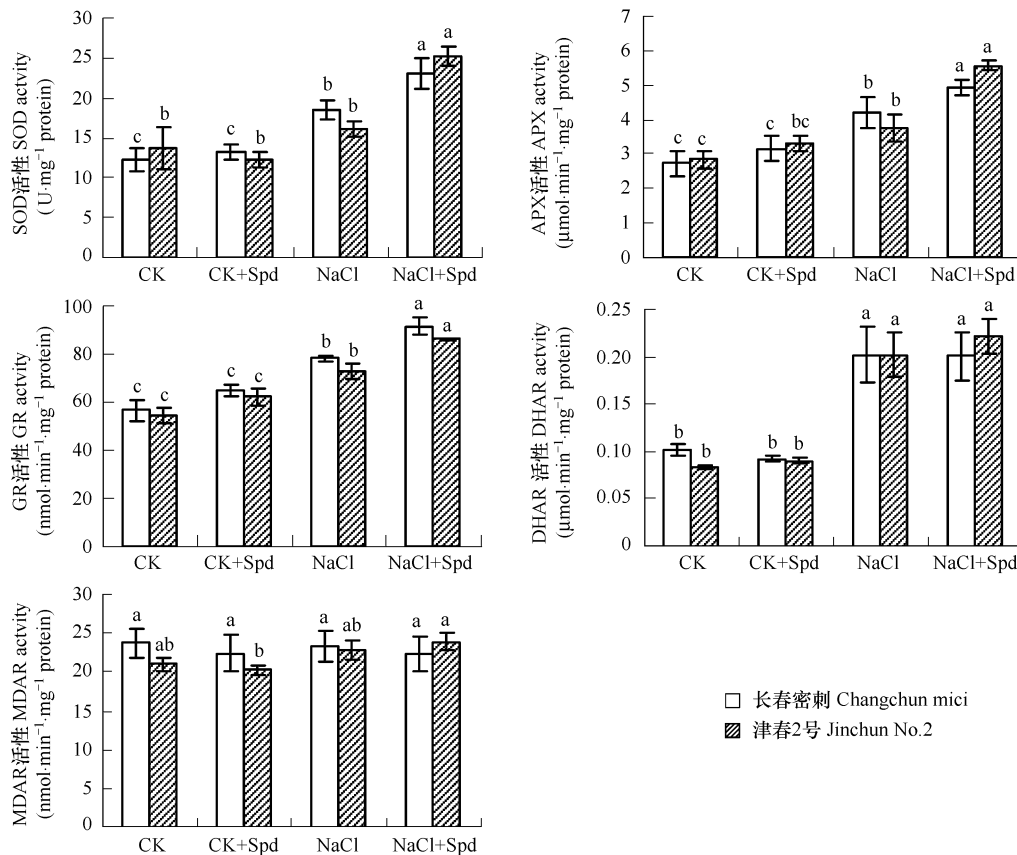


图 1 外源 Spd 对盐胁迫下黄瓜叶绿体 SOD、APX、GR、DHAR 和 MDAR 活性的影响

Fig. 1 Effects of exogenous Spd on SOD, APX, GR, DHAR and MDAR activities in chloroplast of cucumber under salt stress

2.3 外源 Spd 对叶绿体 AsA、DAsA、GSH、GSSG、Car 含量及 DAsA/AsA、GSH/GSSG 的影响

如图 2 所示,对照条件下,外源 Spd 对黄瓜叶绿体内 AsA、DAsA、GSH、GSSG、Car 含量及 DAsA/AsA、GSH/GSSG 均无显著影响;NaCl 胁迫下,黄瓜叶绿体内 AsA、Car、GSH 含量显著降低,DAsA、GSSG 含量升高,引起 DAsA/AsA 升高,GSH/GSSG 降低;NaCl 胁迫下,外源 Spd 除对 2 品种 DAsA 和 GSSG 含量无显著影响外,不同程度地提高了 AsA、GSH、Car 含量及 GSH/GSSG 比值,降低了 DAsA/AsA,且对‘津春 2 号’的影响大于‘长春密刺’。

2.4 外源 Spd 对叶绿体 H₂O₂ 和 MDA 含量的影响

图 3 表明 NaCl 胁迫使黄瓜叶绿体 H₂O₂ 和 MDA 含量显著增加,‘津春 2 号’增加幅度明显大于‘长春密刺’;对照条件下,外源 Spd 对 H₂O₂ 和 MDA 含量无显著影响;NaCl 胁迫下,外源 Spd 显著降低了‘津春 2 号’ H₂O₂ 含量及 2 品种 MDA 含量,且对‘津春 2 号’的降低幅度明显大于‘长春密刺’。

2.5 外源 Spd 对叶绿体转谷酰胺酶活性及结合态多胺含量的影响

如表 2 所示,对照条件下,外源 Spd 显著提高了‘津春 2 号’叶绿体 TGase 活性,对‘长春密刺’TGase 活性也有提高,但未达到显著差异;NaCl 胁迫下,‘长春密刺’TGase 活性显著提高,而‘津春 2 号’无显著变化;NaCl 胁迫下,外源 Spd 显著提高了 2 品种 TGase 活性,且对‘津春 2 号’的提高幅度大于‘长春密刺’。

对照条件下,外源 Spd 对 2 品种叶绿体结合态 Put、Spd、Spm 及总多胺含量均无显著影响;NaCl 胁迫显著提高了‘长春密刺’叶绿体结合态 Put、Spd 及总多胺含量,而对‘长春密刺’叶绿体结合态 Spm 含量及‘津春 2

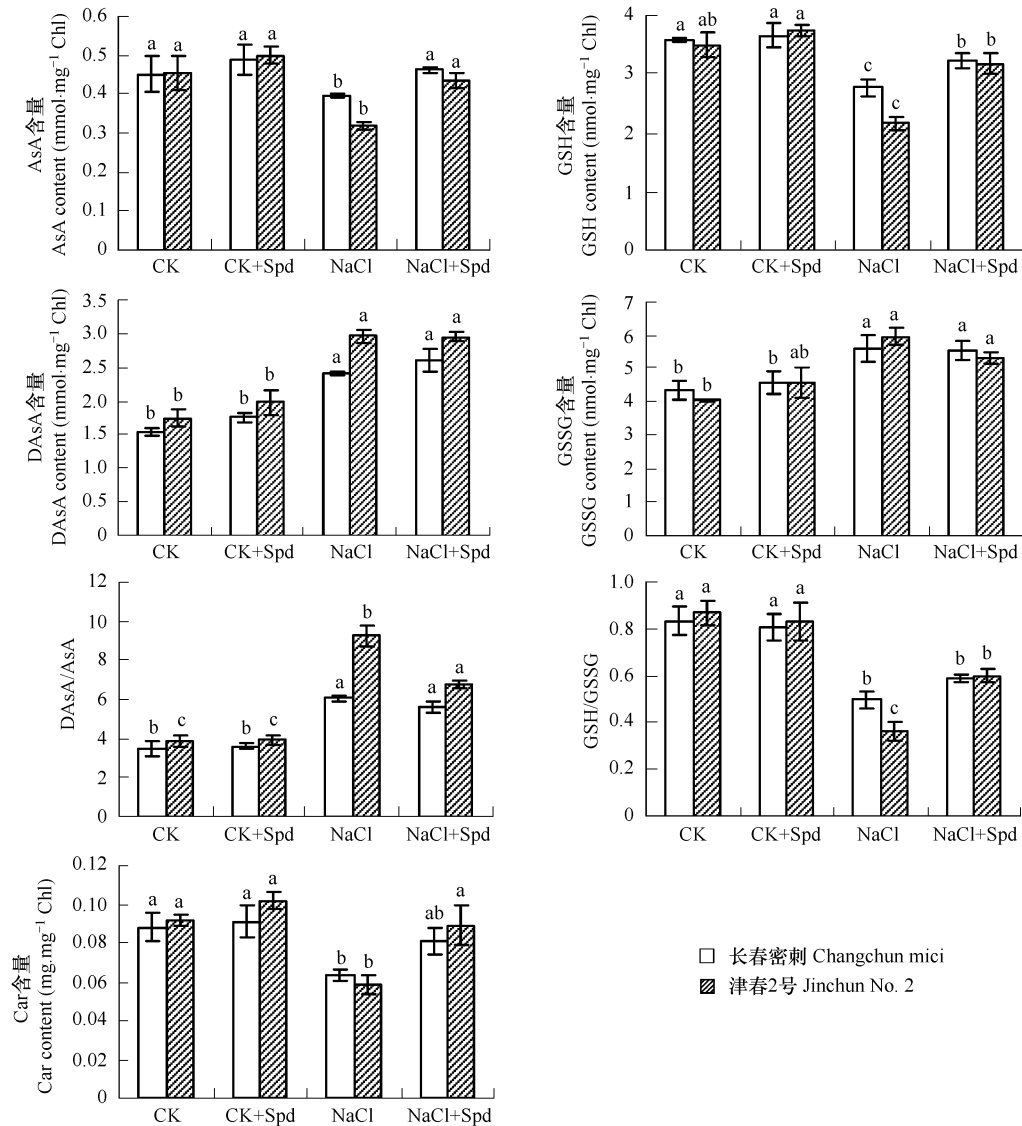


图2 外源 Spd 对盐胁迫下黄瓜叶绿体内 AsA、DAsA、GSH、GSSG、Car 含量及 DAsA/AsA、GSH/GSSG 的影响

Fig. 2 Effects of exogenous Spd on the contents of AsA, DAsA, GSH, GSSG and Car and the ratios of DAsA/AsA, GSH/GSSG in chloroplast of cucumber under salt stress

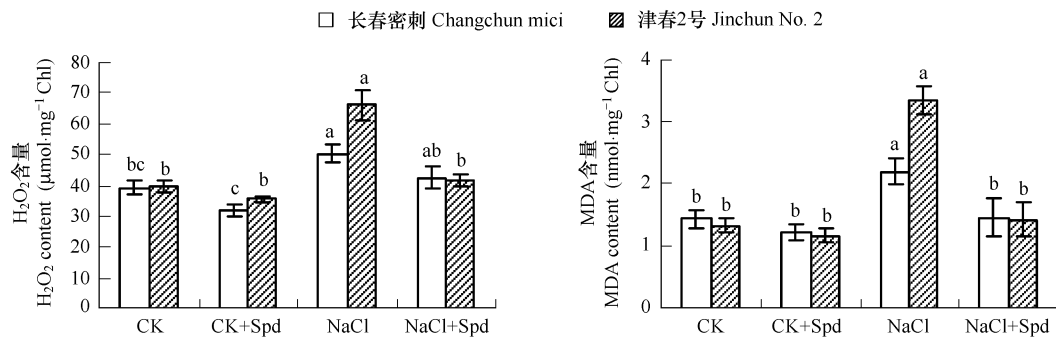


图3 外源 Spd 对盐胁迫下黄瓜幼苗叶绿体 H₂O₂ 和 MDA 含量的影响

Fig. 3 Effects of exogenous Spd on H₂O₂ and MDA contents in chloroplast of cucumber under salt stress

号’各种多胺含量均无显著影响;外源 Spd 显著提高了 NaCl 胁迫下 2 品种叶绿体结合态 Put、Spd、Spm 及总多胺含量。统计分析表明, TGase 活性与叶绿体结合态 Put、Spd 及总多胺含量间呈显著正相关,其相关系数分别为 0.938、0.969、0.969。

表 2 外源 Spd 对盐胁迫下黄瓜叶绿体转谷酰胺酶活性及结合态多胺含量的影响

Table 2 Effects of exogenous Spd on TGase activity and bound polyamine contents in chloroplast of cucumber under salt stress

品种 Cultivar	处理 Treatment	转谷酰胺酶 TGase (U)	腐胺 Put (nmol·mg ⁻¹ Protein)	亚精胺 Spd (nmol·mg ⁻¹ Protein)	精胺 Spm (nmol·mg ⁻¹ Protein)	总多胺 Total PAs (nmol·mg ⁻¹ Protein)
长春密刺	CK	0.25 ± 0.04c	3.20 ± 0.09c	22.91 ± 4.24c	2.34 ± 0.16b	33.44 ± 4.40c
Changchun mici	CK + Spd	0.45 ± 0.07bc	3.64 ± 0.18c	39.73 ± 5.38c	2.46 ± 0.15b	45.83 ± 5.35c
	NaCl	0.91 ± 0.04b	6.28 ± 0.50b	54.90 ± 2.87b	2.52 ± 0.34b	63.71 ± 2.35b
	NaCl + Spd	1.22 ± 0.11a	8.71 ± 0.19a	70.55 ± 4.08a	3.83 ± 0.19a	83.09 ± 4.08a
津春 2 号	CK	0.29 ± 0.08c	2.64 ± 0.21c	22.75 ± 0.35b	2.25 ± 0.12b	27.64 ± 0.26b
Jinchun No. 2	CK + Spd	0.52 ± 0.04b	2.98 ± 0.35c	35.20 ± 3.15b	2.03 ± 0.23b	40.22 ± 6.27b
	NaCl	0.39 ± 0.06bc	4.21 ± 0.79bc	31.71 ± 5.99b	2.60 ± 0.41b	38.51 ± 6.25b
	NaCl + Spd	1.14 ± 0.10a	6.47 ± 0.28a	56.18 ± 6.76a	4.12 ± 0.30a	66.77 ± 6.32a

2.6 外源 Spd 对幼苗净光合速率的影响

如图 4 所示,对照条件下,外源 Spd 对 2 品种 P_n 无显著影响;NaCl 胁迫引起 2 品种 P_n 的显著降低,‘长春密刺’与对照相比降低了 26.3%,‘津春 2 号’降低了 34.7%;NaCl 胁迫下,外源 Spd 显著增加 2 品种 P_n ,与纯 NaCl 胁迫相比,‘津春 2 号’提高了 37.8%,‘长春密刺’提高了 27.4%。

3 讨论

叶绿体是植物光合作用的场所,也是细胞中对盐最敏感的细胞器^[3]。NaCl 胁迫下,黄瓜叶片气孔导度降低,光合作用所需的 CO₂ 向叶绿体细胞的运输受阻,从而使叶绿体内 CO₂ 同化受抑制^[28],而光合电子传递受影响相对较小^[29],因而更多电子传递到 O₂,导致 O₂⁻ 形成,进一步产生 H₂O₂,叶绿体 H₂O₂ 是强氧化剂,通过 Haber-Weiss 反应产生攻击力更强的·OH,启动膜脂过氧化,从而破坏叶绿体膜结构,伤害光合作用的功能。为防御这些活性氧的毒害作用,植物叶绿体内存在着抗氧化酶和抗氧化剂防御系统,对叶绿体起保护作用。叶绿体内的 SOD 可催化 O₂⁻ 歧化为 H₂O₂,此后 H₂O₂ 的清除主要依赖于 AsA-GSH 循环系统完成,APX 以 AsA 为电子供体催化 H₂O₂ 还原,同时氧化为单脱氢抗坏血酸(MDA),MDA 可自发歧化生成 DAsA, DHAR 利用 GSH 提供的电子,将 DAsA 还原为 AsA, GSH 同时被氧化成 GSSG, GSSG 又在 GR 催化下被光合作用产生的 NADPH 还原为 GSH,最终使 H₂O₂ 分解为 H₂O,因此, APX、GR、DHAR、MDAR 是这一循环系统中的重要酶组分, AsA 和 GSH 是非酶促系统的重要抗氧化剂^[30]。此外, Car 在光合作用中除具有辅助吸收光能的作用外,又是内源抗氧化剂,在细胞内可吸收剩余光能、淬灭活性氧,从而防止膜脂过氧化^[31]。本试验中, 50 mmol·L⁻¹ NaCl 胁迫下,黄瓜叶绿体中 SOD、APX、GR、DHAR 等抗氧化酶活性虽有明显升高(图 1),但 AsA、Car、GSH 等抗氧化剂含量降低, DAsA、GSSG 含量增加,引起 DAsA/AsA 升高, GSH/GSSG 降低(图 2), AsA-GSH 活性氧清除系统受到破坏。活性氧的过量产生超过了防御系统的清除能力,来不及清除的 H₂O₂ 显著积累(图 3),引起膜脂过氧化加剧,MDA 含量显著增加(图 3),最终引起植株光合速率下降(图 4),植株生长显著抑制(表 1)。多胺提高植物逆境胁迫抗性的主要功能之一就是通过直接或间接清除活性氧自由基,从而稳定生物膜^[6];外源 Spd 处理可不同程度提高植物体活性氧清除能力,降低活性氧对植物体的氧化伤害^[10,13]。

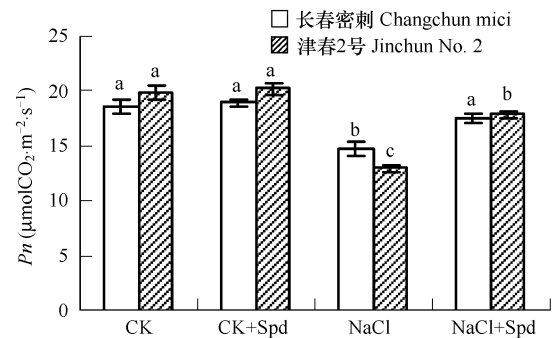


图 4 外源 Spd 对盐胁迫下黄瓜幼苗净光合速率的影响

Fig. 4 Effects of exogenous Spd on net photosynthetic rates of cucumber under salt stress

本试验结果表明,外源 Spd 可以显著促进 NaCl 胁迫下黄瓜叶绿体 SOD、APX、GR 活性增加(图 1),保护 AsA、Car、GSH 免于氧化,使 AsA、Car 和 GSH 含量增加,DAAs/AsA 降低,GSH/GSSG 升高(图 2),从而提高盐胁迫下叶绿体内 AsA-GSH 的循环能力,这些抗氧化酶和抗氧化剂协调作用,使得叶绿体内活性氧清除能力增强,减轻盐胁迫引起的叶绿体 H_2O_2 和 MDA 含量增加(图 3),缓解盐胁迫对叶绿体膜的伤害,从而提高叶片光合速率(图 4),缓解植株生长抑制(表 1)。

盐胁迫下,植物器官和细胞中多胺含量均会迅速发生变化,并且不同种类和不同形态的多胺可以相互转化^[16]。TGase 是催化游离态多胺向高分子结合态多胺转化的关键酶,多胺在 TGase 催化下与蛋白质共价结合,形成蛋白质-谷氨酰-多胺或蛋白质-谷氨酰-多胺-谷氨酰-蛋白质,对细胞成分的稳定具有重要作用^[32]。研究表明,TGase 对叶绿体中 LHCII 进行翻译后修饰,不仅增加肽链间的交联,还增加 LHCII 的正电荷数量,从而有利于激活能在光系统中的转移,此外,由于 TGase 对叶绿体的共价修饰,多胺可稳定类囊体膜上的 D1、D2、Cyt_f 和 Rubisco 大亚基,进而提高抵抗不良环境的能力^[33]。前人研究表明,生物和非生物胁迫均会不同程度诱导植物叶绿体积累结合态多胺,这些多胺含量的增加有助于稳定光合器官结构和功能,从而增强植物生物和非生物胁迫抗性。但植物细胞积累不同种类的多胺是非常复杂的,随植物种类不同和胁迫处理的不同而不同:以低等植物绿藻为材料进行臭氧污染^[34]和盐胁迫^[35]以及以茄科植物烟草为材料进行 UV-B 辐射处理^[36]的研究表明类囊体结合态 Put 在这类植物抗逆境胁迫中发挥重要作用;而以藜科植物菠菜为材料进行低温胁迫^[12]、以禾本科植物玉米为材料进行盐胁迫^[13]以及在感染黄锈病的禾本科植物小麦^[37]中研究发现叶绿体结合态 Spd 在这类植物抗逆境胁迫中发挥重要作用。本试验以葫芦科植物黄瓜为材料研究表明,盐胁迫下抗盐能力较强的‘长春密刺’叶绿体 TGase 活性显著升高,促进游离态多胺向结合态多胺转化,引起叶绿体结合态 Put、Spd 和总多胺含量显著增加(表 2),有助于促进叶绿体结构和功能的稳定,这可能正是‘长春密刺’抗盐性强于‘津春 2 号’的主要原因之一,但其多胺含量增加引起的促进效应尚不足以抵消盐胁迫下叶绿体活性氧代谢失衡引起的氧化伤害,植株生长仍显著抑制(表 1)。外源 Spd 可以显著提高叶绿体 TGase 活性,进而引起叶绿体结合态 Put、Spd、Spm 和总多胺含量的进一步增强(表 2),这与刘俊等在玉米上的研究结果相一致^[13]。表明外源 Spd 可以通过提高叶绿体结合态多胺含量来增强植物抗盐性。

NaCl 胁迫下,‘津春 2 号’叶绿体 TGase 活性、叶绿体结合态多胺含量、抗氧化酶活性和抗氧化剂含量升高幅度明显小于‘长春密刺’,而 H_2O_2 和 MDA 含量增加幅度明显大于‘长春密刺’,这进一步说明抗盐性较强的黄瓜品种在 NaCl 胁迫下其叶绿体活性氧清除系统受到的伤害小于抗盐性弱的品种。外源 Spd 对盐敏感品种‘津春 2 号’叶绿体中上述指标的增加或减少幅度均比耐盐品种‘长春密刺’的大,可能是不同基因型黄瓜对外源 Spd 反应的差异。

综上所述,盐胁迫下,外源 Spd 可以显著提高黄瓜叶绿体内 TGase 活性和叶绿体结合态多胺含量,提高叶绿体 SOD、APX、GR 等抗氧化酶活性以及 AsA、Car、GSH 等抗氧化剂含量,从而降低 H_2O_2 含量及膜脂过氧化,维持盐胁迫下叶绿体结构和功能的稳定性,从而有利于光合能力提高和增加干物重,提高植株抗盐性。

References:

- [1] Shao G H, Chang R Z, Chen Y W. The study of soybean salinity tolerance. *Soybean Sci*, 1993, 12(3): 244 – 248.
- [2] Liao Y, Peng Y G, Chen G Z. Research advances in plant salt-tolerance mechanism. *Acta Ecologica Sinica*, 2007, 27(5): 2077 – 2089.
- [3] Cheeseman J M. Mechanism of salinity tolerance in plants. *Plant Physiol*, 1988, 87: 547 – 550.
- [4] Hua C, Wang R L, Liu Y L. Effect of exogenous ascorbic acid on active oxygen scavenging system in chloroplasts of rice under salt stress. *Acta Agronomica Sinica*, 2004, 30(7): 692 – 696.
- [5] Wei C X, Wang J J, Wang J, *et al.* Effects of Na_2CO_3 stress on the ultrastructure of mesophyll cells in *Puccinelli tenuiflora*. *Acta Ecologica Sinica*, 2006, 26(1): 108 – 114.
- [6] Bouchereau A, Aziz A, Larher F, *et al.* Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Sci*, 1999, 140: 103 – 125.
- [7] Kasukabe Y, He L X, Nada K, *et al.* Overexpression of spermidine synthase enhances tolerance to multiple environmental stresses and up-regulates the expression of various stress-regulated genes in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, 2004, 45: 712 – 722.

- [8] Chattopadhyay M K, Tiwari B S, Chattopadhyay G, *et al.* Protective role of exogenous polyamines on salinity-stressed rice (*Oryza sativa*) plants. *Physiol Plant*, 2002, 116: 192 – 199.
- [9] Jiang X Y, Song J, Fan H, *et al.* Regulation of exogenous calcium and spermidine on ion balance and polyamine levels in maize seedlings under NaCl stress. *Acta Phytobiologica Sinica*, 2000, 26(6): 539 – 544.
- [10] Duan J J, Guo S R, Kang Y Y. Effects of exogenous spermidine on reactive oxygen species leaves and antioxidant enzymes activities of cucumber seedlings under salt stress. *Acta Horticulturae Sinica*, 2006, 33(3): 639 – 641.
- [11] Wang S P, Jia Y X, Guo S R, *et al.* Effect of polyamines on K^+ , Na^+ and Cl^- contents and distribution in different organs of cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings under NaCl stress. *Acta Ecologica Sinica*, 2007, 27(3): 1122 – 1129.
- [12] He L X, Nada K, Kasukabe Y, *et al.* Enhanced susceptibility of photosynthesis to low-temperature photoinhibition due to interruption of chill-induced increase of S-adenosylmethionine decarboxylase activity in leaves of spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Plant Cell Physiol*, 2002, 43: 196 – 206.
- [13] Liu J, Zhou Y F, Zhang W H, *et al.* Effects of exogenous polyamines on chloroplast-bound polyamine content and photosynthesis of corn suffering salt stress. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 2006, 26(2): 0254 – 0258.
- [14] Wang S P, Guo S R, Li J, *et al.* Effect of salinity stress on growth of cucumber seedlings with different genotypes. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2006(2): 76 – 79.
- [15] Takeda K, Otaubo T, Kondu N. Participation of hydrogen peroxide in the inactivation of Calvin-cycle SH enzyme in SO_2^- fumigated spinach leaves. *Plant Cell Physiol*, 1982, 23: 1009 – 1018.
- [16] Zhao F G, Sun C, Liu Y L, *et al.* Effects of salinity stress on the levels of covalently and noncovalently conjugated polyamines in plasma membrane and tonoplast isolated from barley seedlings. *Acta Bot Sin*, 2000, 42(9): 920 – 926.
- [17] Liu J, Ji X J, Liu Y L. High performance liquid chromatography method for measuring polyamine content in plant tissue. *Plant Physiol Commun*, 2002, 38: 596 – 598.
- [18] Dhindsa R S, Plumb-Dhindsa P, Thorpe T A. Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *J Exp Bot*, 1981, 32: 93 – 101.
- [19] Nakano Y, Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol*, 1981, 22: 867 – 880.
- [20] Foyer C H, Halliwell B. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta*, 1976, 133: 21 – 25.
- [21] Hossain M A, Asada K. Purification of dehydroascorbate reductase from spinach and its characterization as a thiol enzyme. *Plant Cell Physiol*, 1984, 25: 85 – 92.
- [22] Miyake C, Asada K. Thylakoid-bound ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts and photoreduction of its primary oxidation product of monodehydroascorbate radicals in thylakoids. *Plant Cell Physiol*, 1992, 33: 541 – 553.
- [23] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248 – 254.
- [24] Arakawa N, Tsutsumi K, Sanceda N G, *et al.* A rapid and sensitive method for the determination of ascorbic acid using 4, 7-diphenyl-1, 10-phenanthroline. *Agric Biol Chem*, 1981, 45: 1289 – 1290.
- [25] Griffiths O W. Determination of glutathione and glutathione disulphide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal Biochem*, 1980, 106: 207 – 212.
- [26] Lin Z F, Li S S, Lin G Z, *et al.* The accumulation of hydrogen peroxide in senescing leaves and chloroplasts in relation to lipid peroxidation. *Acta Phytobiologica Sinica*, 1988, 14(1): 16 – 22.
- [27] Hodges D M, Delong J M, Forney C F, *et al.* Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*, 1999, 207: 604 – 611.
- [28] Wang S P, Li J, Guo S R, *et al.* Effect of NaCl stress on growth and photosynthetic characteristics of cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 2006, 26(3): 0455 – 0461.
- [29] Wei G Q, Zhu Z J, Fang X Z, *et al.* The effects of NaCl stress on plant growth, chlorophyll fluorescence characteristics and active oxygen metabolism in seedlings of two cucumber cultivars. *Scientia Agricultura Sinica*, 2004, 37(11): 1754 – 1759.
- [30] Asada K. Ascorbate peroxidase—a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plant. *Physiol. Plant*, 1995, 85: 235 – 246.
- [31] Willekens H, Vancamp W, Lnze D. Ozone, sulfur dioxide, and ozone ultraviolet-B have similar effect on mRNA accumulation of antioxidant genes in *Nicotianaplum baginifolia* L. *Plant Physiol*, 1984, 224: 569 – 573.
- [32] Serafini-Fracassini D, Del-Duca S. Plant transglutaminase. *Phytochemistry*, 1995, 40: 355 – 365.

- [33] Mullet J E. The amino acid sequence of the polypeptide segment which regulates membrane adhesion in chloroplasts. *J Bio Chem*, 1983, 258: 9941 – 9953.
- [34] Navakoudis E, Lutz C, Langebartels C, *et al.* Ozone impact on the photosynthetic apparatus and the protective role of polyamines. *BBA-Bioenergetics*, 2003, 1621: 160 – 169.
- [35] Demetriou G, Neonaki C, Navakoudis E, *et al.* Salt stress impact on the molecular structure and function of the photosynthetic apparatus-the protective role of polyamines. *BBA-Bioenergetics*, 2007, 1767: 272 – 280.
- [36] Lutz C, Navakoudis E, Seidlitz H K, *et al.* Simulated solar irradiation with enhanced UV-B adjust plastid- and thylakoid-associated polyamine changes for UV-B protection. *BBA-Bioenergetics*, 2005, 1710: 24 – 33.
- [37] Aldesuquy H S, Abdel-Fattah G M, Baka Z A. Changes in chlorophyll, polyamines and chloroplast ultrastructure of *Puccinia striiformis* induced 'green islands' on detached leaves of *Triticum aestivum*. *Plant Physiol Biochem*, 2000, 38: 613 – 620.

参考文献:

- [1] 邵桂花, 常汝镇, 陈一舞. 大豆耐盐性研究进展. *大豆科学*, 1993, 12(3): 244 ~ 248.
- [2] 廖岩, 彭友贵, 陈桂珠. 植物耐盐性机理研究进展. *生态学报*, 2007, 27(5): 2077 ~ 2089.
- [4] 华春, 王仁雷, 刘友良. 外源 AsA 对盐胁迫下水稻叶绿体活性氧清除系统的影响. *作物学报*, 2004, 30(7): 692 ~ 696.
- [5] 韦存虚, 王建军, 王建, 等. Na₂CO₃ 胁迫对星星草叶肉细胞超微结构的影响. *生态学报*, 2006, 26(1): 108 ~ 114.
- [10] 段九菊, 郭世荣, 康云艳. 外源亚精胺对盐胁迫下黄瓜幼苗活性氧水平和抗氧化酶活性的影响. *园艺学报*, 2006, 33(3): 639 ~ 641.
- [11] 王素平, 贾永霞, 郭世荣, 等. 多胺对盐胁迫下黄瓜 (*Cucumis sativus* L.) 幼苗体内 K⁺、Na⁺ 和 Cl⁻ 含量及器官间分布的影响. *生态学报*, 2007, 27(3): 1122 ~ 1129.
- [13] 刘俊, 周一峰, 章文华, 等. 外源多胺对盐胁迫下玉米叶绿体结合态多胺水平和光合作用的影响. *西北植物学报*, 2006, 26(2): 0254 ~ 0258.
- [14] 王素平, 郭世荣, 李璟, 等. 盐胁迫对不同基因型黄瓜幼苗生长的影响. *江苏农业科学*, 2006(2): 76 ~ 79.
- [17] 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. *植物生理学通讯*, 2002, 38: 596 ~ 598.
- [26] 林植芳, 李双顺, 林桂珠, 等. 衰老叶片和叶绿体中 H₂O₂ 的累积与膜脂过氧化的关系. *植物生理学报*, 1988, 14(1): 16 ~ 22.
- [28] 王素平, 李娟, 郭世荣, 等. NaCl 胁迫对黄瓜幼苗植株生长和光合特性的影响. *西北植物学报*, 2006, 26(3): 0455 ~ 0461.
- [29] 魏国强, 朱祝军, 方学智, 等. NaCl 胁迫对不同品种黄瓜幼苗生长、叶绿素荧光特性和活性氧代谢的影响. *中国农业科学*, 2004, 37(11): 1754 ~ 1759.