

外源多胺对铜胁迫下水鳖叶片多胺代谢、抗氧化系统和矿质营养元素的影响

王红霞¹, 胡金朝², 施国新^{1,*}, 杨海燕¹, 李 阳¹, 赵 娟¹, 许 晔¹

(1. 南京师范大学生命科学学院, 南京 210046; 2. 商丘师范学院生命科学系, 商丘 476000)

摘要: 采用营养液水培的方法, 研究了外源亚精胺(Spd)和精胺(Spm)对Cu胁迫下水鳖叶片3种形态多胺(PAs)、抗氧化系统及营养元素的影响。结果表明:(1)Cu胁迫使水鳖叶片腐胺(Put)急剧积累, Spd和Spm明显下降, 从而使(Spd+Spm)/Put比值也随之下降。外源Spd和Spm显著或极显著逆转Cu诱导的PAs变化, 抑制Put的积累, 缓解Spd和Spm的下降, 从而提高了(Spd+Spm)/Put比值。(2)外源Spd和Spm抑制了Cu胁迫诱导的多胺氧化酶(PAO)的增加, 缓解了二胺氧化酶(DAO)的下降。(3)与单一Cu胁迫相比, Spd和Spm显著或极显著提高了超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)、抗坏血酸过氧化物酶(APX)和谷胱甘肽还原酶(GR)活性和抗坏血酸(AsA)、谷胱甘肽(GSH)、游离脯氨酸(Pro)含量, 从而降低了超氧阴离子(O₂⁻)产生速率和过氧化氢(H₂O₂)含量, 极显著降低了丙二醛(MDA)含量, 缓解了Cu诱导的氧化胁迫。(4)外源Spd和Spm显著或极显著缓解了Cu胁迫下矿质营养元素吸收平衡的紊乱。以上结果均说明了外施Spd和Spm可增加水鳖对Cu胁迫的耐受性。

关键词: 水鳖; Cu胁迫; 亚精胺; 精胺; 腐胺; 抗氧化系统

Effects of exogenous polyamines on polyamines metabolism, antioxidative systems and mineral nutrition responses of *Hydrocharis dubia* (Bl.) Backer under Cu stress

WANG Hongxia¹, HU Jinzhao², SHI Guoxin^{1,*}, YANG Haiyan¹, LI Yang¹, ZHAO Juan¹, XU Ye¹

College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China; Department of Life Science, Shangqiu Normal University, Shangqiu 476000, China

Abstract: The effects of exogenous spermidine(Spd) and spermine(Spm) on the leaves of *Hydrocharis dubia* under copper toxicity were investigated. The results showed that the content of putrescine (Put) increased and the contents of Spd and Spm decreased under copper stress in leaves, thereby the ratio of (Spd+Spm)/Put decreased significantly, which was concerned with the antioxidant ability in plants. Exogenous Spd or Spm markedly reversed these Cu-induced effects for partially enhanced the ratio of (Spd+Spm)/Put in leaves, which may be caused by decrease of polyamine oxidase (PAO) activity and increase of diamine oxidase (DAO) activity. It also markedly or highly significantly enhanced the activities of superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD), catalase (CAT), ascorbate specific peroxidase (APX) and glutathione reductase (GR), increased the contents of ascorbic acid (AsA), glutathione (GSH) and free proline (Pro), which was possibly the reason of decline of the generation rate of superoxide anion (O₂⁻) and hydrogen peroxide (H₂O₂). So exogenous Spd and Spm restrained Cu-induced lipid peroxidation showed by decline of malondialdehyde (MDA) and soluble protein. Furthermore, exogenous Spd and Spm markedly reduced the accumulation of Cu and effectively maintained the balance of nutrient elements in *Hydrocharis dubia* leaves under Cu stress. These results suggested that exogenous Spd or Spm can enhance the tolerance of *Hydrocharis dubia* to copper by increasing the levels of endogenous Spd and Spm as well

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30670121, 30870139)

收稿日期: 2009-03-19; **修订日期:** 2009-06-24

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: gxshi@njnu.edu.cn

as the (Spd + Spm)/Put ratio.

Key Words: *Hydrocharis dubia*; Cu stress; spermidine; spermine; putrescine; antioxidative systems

随着现代化工农业的迅速发展,水体中重金属污染日趋严重。由于重金属在环境中具有相对稳定性和难降解性,只能发生各种形式之间的转化,重金属在植物根、茎、叶及籽粒中的大量累积,不仅严重影响其生长和发育,而且会进入食物链,危及动物和人类的健康^[1]。国内外学者对重金属污染已经引起高度重视,并在缓解重金属污染方面做了比较系统的研究^[2-10]。铜是植物的必需微量元素,在植物体内可以作为多酚氧化酶、抗坏血酸氧化酶、细胞色素氧化酶等氧化酶的辅基及存在于叶绿体的质体蓝素而参与植物的光合作用等许多过程,在植物的正常生长发育过程中起着重要作用^[2]。但铜浓度过高时也会对植物产生严重的毒害作用,过量的铜可以破坏植物的形态结构,降低植物叶片中叶绿素含量,影响抗氧化酶活性、活性氧(ROS)水平和矿质营养元素吸收平衡等生理代谢和细胞超微结构^[3-4]。

多胺(polyamines, PAs)作为一种生物活性物质,被认为在生物体内信号传递中起“第二信使”的作用,与植物的生长、形态建成和对胁迫的反应密切相关^[5]。研究表明,外源 Spd 和(或) Spm 通过提高重金属胁迫下槐叶萍^[6]、苻菜^[7,9]、向日葵^[8]和湖北海棠^[10]部分抗氧化酶活性,提高可溶性蛋白含量,降低 ROS 水平和 MDA 含量,调节细胞阴阳离子平衡等而提高植物对重金属胁迫的抵抗能力。目前的研究多侧重于单一 PAs 在植物耐重金属中的作用^[6-7],对于不同种类 PAs 与植物耐重金属关系的比较研究报道尚少,尤其是对水生植物^[9-10]。本文以水鳖为实验材料,研究外施 PAs 对 Cu 胁迫下水鳖叶片内源 PAs 含量、抗氧化系统和矿质营养元素吸收的影响,为验证 PAs 在缓解水生植物重金属胁迫中的作用提供了理论依据。

1 材料和方法

1.1 供试材料

水鳖(*Hydrocharis dubia* (Bl.) Backer)属水鳖科水鳖属植物,为多年生水生经济植物,在我国南北均有分布。实验材料于 2008 年 6 月中旬采自江苏太湖水域,后移植于南京师范大学水生植物培育池。7 月初在无底泥玻璃缸中用 10% Hoagland 营养液进行驯化培养。选取生长状况较一致的植株作为实验材料。

1.2 试验方法

1.2.1 试验设计

试验设 4 个处理:A, 10% Hoagland 营养液(CK); B, 2 mg/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (以纯 Cu 计); C, 2 mg/L Cu + 0.1 mmol/L Spd; D, 2 mg/L Cu + 0.1 mmol/L Spm。此后于每天 07:00 和 19:00 向 C、D 处理的水鳖叶面均匀喷施不同种类 PAs, A、B 喷等量的蒸馏水。全部培养缸置于 Forma 3744 型(英国产)全封闭光照培养箱中培养,光暗温度为 25℃:18℃,光周期为 12h:12h,光照强度 3500 lx。每组设 3 个重复,每个重复或每个处理选 4 株生长状况较一致的植株,培养第 5 天取相同部位的叶片 1 g 或 2 g,去离子水洗净、揩干,测定生理生化指标。

1.2.2 多胺含量及多胺氧化酶活性的测定

PAs 含量采用刘俊等^[11]方法,以 nmol/g 表示。PAO 和 DAO 活性测定参照汪天等^[12]方法。以 0.001 $\Delta_{\text{OD}_{550}}/\text{min}$ 为一个酶活单位(U)表示 PAO 和 DAO 活性。

1.2.3 其他生理生化指标的测定

可溶性蛋白含量测定采用考马斯亮蓝法^[13],用 mg/g 表示;SOD 活性测定采用 NBT 法^[14],用 UN/g 表示;POD 活性测定采用愈创木酚法^[15],用 $\text{E}\Delta_{470\text{nm}}/\text{min}/\text{g}$ 表示;CAT 活性测定采用钼酸胺法^[16]测定,用 U/g 表示; O_2^- 产生速率和 H_2O_2 含量采用从南京建成生物工程研究所购买的试剂盒测定,分别用 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ 和 mmol/g 表示。ASP、GR 活性和 AsA、GSH 含量测定采用陈建勋^[17]的方法,分别用 U/g 和 $\mu\text{mol}/\text{g}$ 表示;MDA 含量测定采用硫代巴比妥酸(TBA)法^[18],用 nmol/g 表示;Pro 含量测定采用酸性茚三酮法^[19],用 $\mu\text{mol}/\text{g}$ 表

示。水螅体内营养元素含量用电感耦合等离子体原子发射光谱仪(ICP-AES)(美国 Leeman 公司产)测定。

1.3 统计分析

实验结果均为3次实验的平均值±标准差。采用 Excel 和 STATISTICA 6.0 统计软件完成原始数据处理和制图,并对平均数用 Duncan's 新复极差法进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 外源 PAs 对 Cu 胁迫下水螅叶片游离 PAs (fPAs)、高氯酸可溶性结合态多胺 (PSC-PAs)、高氯酸不溶性结合态多胺 (PISC-PAs) 含量及 (Spd + Spm)/Put 的影响

如图1(A),与对照相比,2 mg/L Cu 使 fPut、PSC-Put、PISC-Put 含量分别极显著提高至对照的 4.57、2.11、3.27 倍,fSpd、PSC-Spd、PISC-Spd 含量分别下降了 21.98% ($P < 0.01$)、37.13% ($P < 0.01$)、15.58%,fSpm、PSC-Spm、PISC-Spm 含量分别降低了 17.12% ($P < 0.05$)、53.85% ($P < 0.01$)、33.36% ($P < 0.05$),导致3种形态 (Spd + Spm)/Put 均极显著降低。与单一 Cu 处理相比,喷施 Spd 和 Spm 都有效的抑制了这3种形态 PAs 含量的变化。喷施 Spd 和 Spm 分别使 fPut 极显著降低了 48.67% 和 31.85%,除外施 Spd 使 PISC-Put 显著下降 14.77% 外,对 PSC-Put 和 PISC-Put 均无显著影响;喷施 Spd 均极显著提高了 fSpd、PSC-Spd、PISC-Spd 和 PISC-Spm 含量,显著提高了 fSpm,而对 PSC-Spm 含量无显著影响;喷施 Spm 极显著提高了 fSpm、PSC-Spm、PISC-Spm 和 fSpd 含量,而对 PSC-Spd 和 PISC-Spd 含量无显著影响。从而导致喷施 Spd 和 Spm 后3种形态 (Spd + Spm)/Put 的明显提高。由此可见,外源 Spd 和 Spm 均不同程度缓解了 Cu 胁迫对3种形态 PAs 稳态的破坏,有效抑制了 Put 的增加,缓解 Spd 和 Spm 的下降。

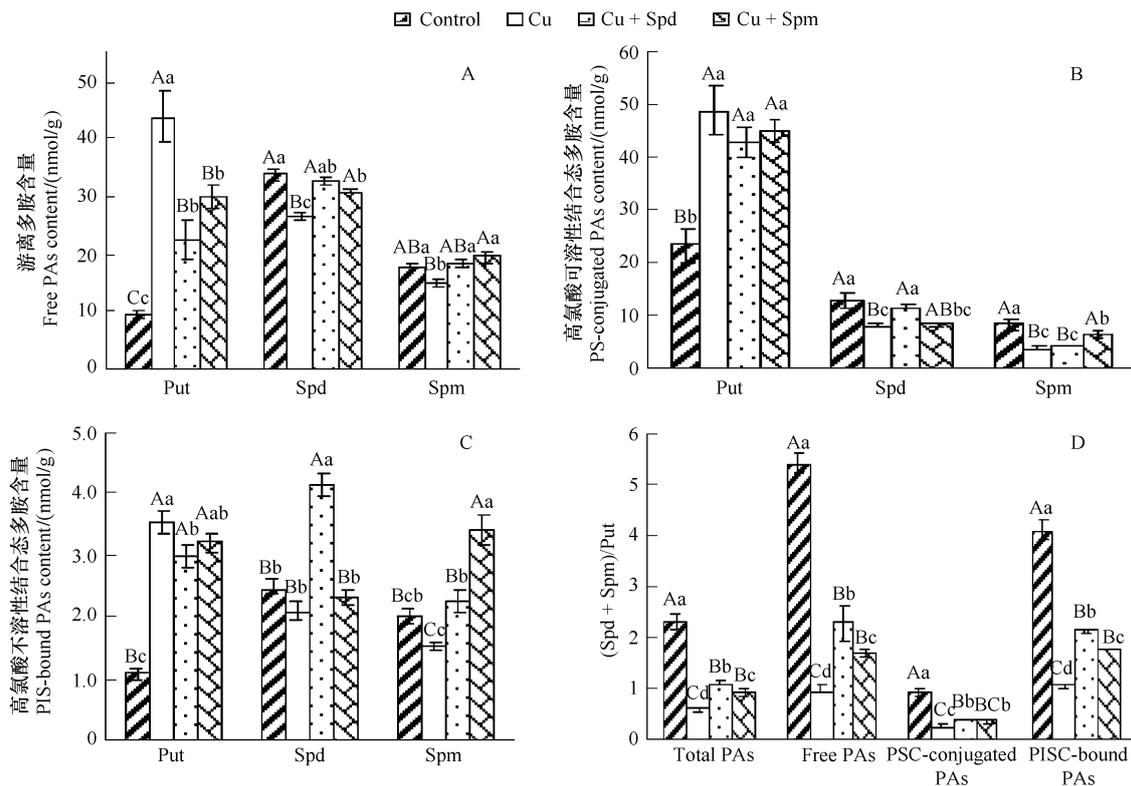


图1 外源 PAs 对 Cu 胁迫下水螅叶内 fPAs 含量 PAs 和 (Spd + Spm)/Put 比值的影响

Fig. 1 Effects of exogenous PAs on the levels of free PAs and (Spd + Spm)/Put in leaves of *Hydrocharis dubia* under Cu stress

不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$), 不同大写字母表示处理间差异极显著 ($P < 0.01$)

2.2 外源 PAs 对 Cu 胁迫下水螅叶片 PAO 和 DAO 活性的影响

由图2(A)可见,与对照植物相比,Cu 处理使 PAO 活性极显著提高了 87.04%。外施 Spd 使 PAO 活性极

显著降低至单一 Cu 处理下的 72.28%, 而 Spm 对其无显著影响。如图 2 (B), Cu 胁迫使 DAO 活性极显著降低为对照的 70.33%, 外源 Spd 和 Spm 均极显著提高了单一 Cu 处理下的 DAO 活性, 使其分别增加至 1.78 倍和 2.17 倍。

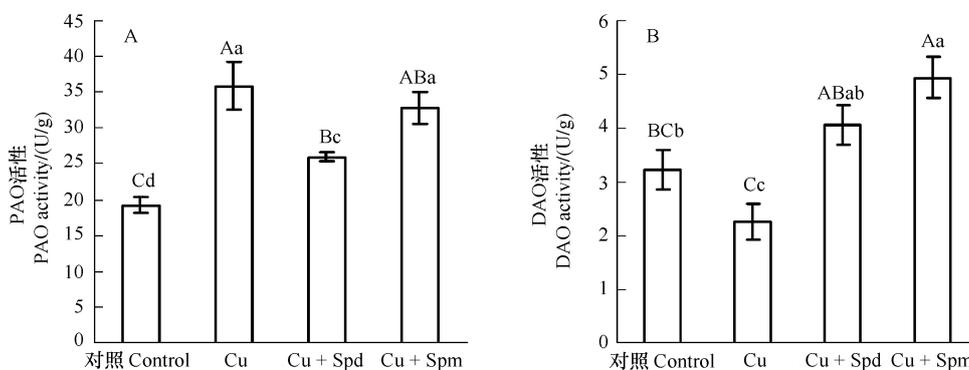


图 2 外源 PAs 对 Cu 胁迫下水鳖叶片 PAO 和 DAO 活性的影响

Fig. 2 Effects of exogenous PAs on the activities of PAO and DAO in leaves of *Hydrocharis dubia* under Cu stress

2.3 外源 PAs 对 Cu 胁迫下水鳖叶片 SOD、POD、CAT、APX 和 GR 活性的影响

由表 1 可见, 2 mg/L Cu 处理 5d 后, 水鳖叶片的 SOD、POD、CAT、APX 和 GR 活性分别降低了 24.44%、29.40%、53.13%、31.58% 和 50%, 并达到极显著水平, 这表明水鳖体内清除 ROS 的能力大大下降。除外施 Spm 对 SOD、APX、GR 活性及外施 Spd 对 GR 无显著影响外, 外施 Spd 和 Spm 极显著或极显著提高了单一 Cu 胁迫下三者活性, 分别提高了 16.29%、5.71% (SOD)、16.87%、14.93% (POD)、70%、46.67% (CAT) 和 23.08%、15.38% (APX)。可见, 外源 Spd 的缓解效果要优于 Spm。

表 1 外源 PAs 对 Cu 胁迫下水鳖叶片 SOD、POD、CAT、APX 和 GR 活性的影响

Table 1 Effects of exogenous PAs on the activities of SOD, POD, CAT, APX and GR in leaves of *Hydrocharis dubia* under Cu stress

处理 Treatment	SOD 活性 SOD activity /(NU/g)	POD 活性 POD activity /($\Delta 470\text{nm}/(\text{min}\cdot\text{g})$)	CAT 活性 CAT activity /(U/g)	APX 活性 APX activity /(U/g)	GR 活性 GR activity /(U/g)
对照 Control	105.4 \pm 1.58 Aa	9490.0 \pm 175.21 Aa	429.97 \pm 23.27 Aa	136.8 \pm 6.24 Aa	18.0 \pm 2.59 Aa
Cu	79.64 \pm 2.85 Cc	6700.0 \pm 70 Cc	201.55 \pm 40.31 Cc	93.6 \pm 7.2 Bc	9.0 \pm 0.86 Bb
Cu + Spd	92.61 \pm 3.49 Bb	7830.0 \pm 95.39 Bb	342.64 \pm 20.16 ABb	115.2 \pm 8.49 ABb	12.0 \pm 0.9 Bb
Cu + Spm	84.19 \pm 1.89 BCc	7700.0 \pm 34.64 Bb	295.61 \pm 11.64 Bb	108.0 \pm 6.28 Bbc	10.5 \pm 0.79 Bb

2.4 外源 PAs 对 Cu 胁迫下水鳖叶片 AsA 和 GSH 含量的影响

AsA 和 GSH 是细胞中的小分子抗氧化剂。由图 3 可见, 2 mg/L Cu 胁迫使 AsA 和 GSH 含量分别极显著降低了 58.06% 和 5.07%。与单一 Cu 处理相比, 外施 Spd 使 GSH 含量提高了 2.23%, 并达到显著水平, 而外施 Spm 使其仅提高 1.34%, 无显著影响; 外施 Spd 和 Spm 对 AsA 含量均无显著影响。可见, 外施 Spd 和 Spm 可以通过增加 AsA 和 GSH 含量在一定程度上增加对 Cu 胁迫下 ROS 的清除。

2.5 外源 PAs 对 Cu 胁迫下水鳖叶片 O_2^- 产生速率、 H_2O_2 和 MDA 含量的影响

如图 4(A、B), 在本实验中, 2 mg/L 的 Cu 处理使水鳖叶片的 O_2^- 产生速率和 H_2O_2 含量分别提高至对照的 2.45 倍和 2.16 倍, 并达到极显著水平。外施 Spd 和 Spm 明显抑制了 ROS (O_2^- 和 H_2O_2) 的积累。与 Cu 处理相比较, 外施 Spd 使 O_2^- 和 H_2O_2 分别显著或极显著降低了 28.15% 和 36.08%, 而外施 Spm 使两者极显著或显著极降低了 33.33% 和 28.86%。如图 4(C) 所示, Cu 处理使 MDA 含量极显著增加至对照的 2.19 倍, 增加了膜脂过氧化程度, 而外施 Spd 和 Spm 均有效缓解了这一变化, 使其极显著降低了 28.6% 和 25.81%。且外施 Spd 对 ROS 水平和 MDA 含量的抑制效果优于 Spm。

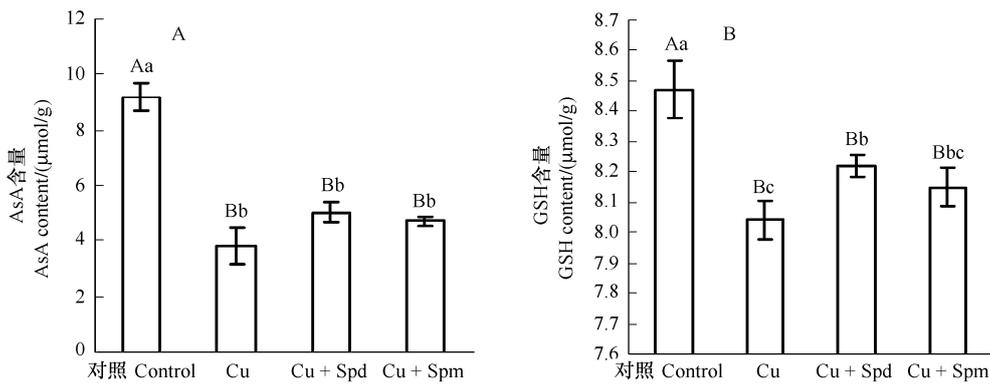
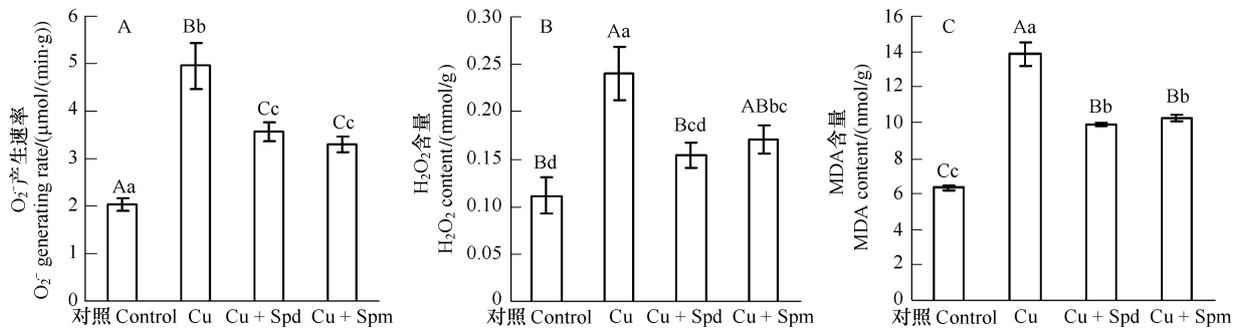


图3 外源 PAs 对 Cu 胁迫下水鳖叶片 AsA 和 GSH 含量的影响

Fig. 3 Effects of exogenous PAs on the contents of AsA and GSH in leaves of *Hydrocharis dubia* under Cu stress图4 外源 PAs 对 Cu 胁迫下水鳖叶片 O₂⁻ 产生速率、H₂O₂ 和 MDA 含量的影响Fig. 4 Effects of exogenous PAs on the generation rate of O₂⁻, H₂O₂ and MDA contents in leaves of *Hydrocharis dubia* under Cu stress

2.6 外源 PAs 对 Cu 胁迫下水鳖叶片 Pro 和可溶性蛋白含量的影响

如图 5(A), 与对照相比, Cu 处理并没有显著改变 Pro 含量, 仅提高了 6.85%, 而外施 Spd 和 Spm 均极显著提高了 Cu 胁迫下 Pro 含量, 分别提高至 1.57 倍和 1.26 倍。可溶性蛋白含量的减少是植物对重金属胁迫最明显的特征之一^[3]。如图 5(B), 在本实验中, Cu 胁迫使可溶性蛋白含量极显著降低至对照的 71.10%, 而外施 Spd 和 Spm 可部分逆转这一变化, 外施 Spd 使其极显著提高了 34.33%, 但外施 Spm 对其无显著影响, 仅提高了 13.51%。

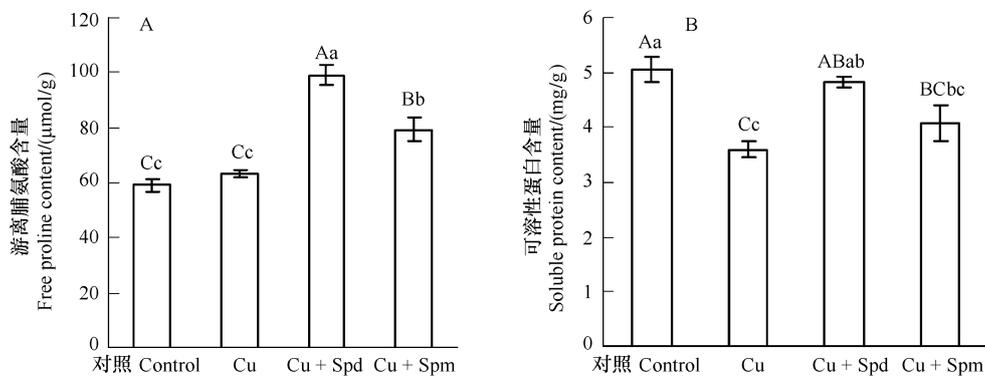


图5 外源 PAs 对 Cu 胁迫下水鳖叶片 Pro 和可溶性蛋白含量的影响

Fig. 5 Effects of exogenous PAs on the contents of free proline and soluble protein in leaves of *Hydrocharis dubia* under Cu stress

2.7 外源 PAs 对 Cu 胁迫下水鳖叶片矿质营养元素吸收的影响

由表 2 可见,不同矿质元素受 Cu 胁迫的影响不同,可分成 2 类不同情形:①显著或极显著促进水鳖叶片对 Cu、Na、Ca、Mn、Fe、Zn、Ni、Si 的吸收。而外施 Spd 和 Spm 不同程度抑制了 Cu 胁迫下水鳖对 Cu、Na、Ca、Mn、Fe、Zn、Ni、Si 的吸收。②显著或极显著抑制水鳖叶片对 P、K、Mg、B 的吸收。而外施 Spd 和 Spm 不同程度缓解了其对 P、K、Mg、B 吸收的抑制效果。

表 2 外源 PAs 对 Cu 胁迫下水鳖叶片矿质营养元素吸收的影响/($\mu\text{g/g}$)

Table 2 Effects of exogenous PAs on the nutrient contents in leaves of *Hydrocharis dubia* under Cu stress

元素 Element	对照 Control	Cu	Cu + Spd	Cu + Spm
Cu	2.16 \pm 0.13 Bc	222 \pm 15.3Aa	187 \pm 12.9Ab	213 \pm 16.1 Aa
P	668 \pm 34.8 Aa	129 \pm 10.1Cd	299 \pm 16.8 Bb	229 \pm 13.8 Bc
K	3580 \pm 189 Aa	2188 \pm 116 Bc	3349 \pm 179 Ab	3301 \pm 151 Ab
Na	420 \pm 24.6 Bb	674 \pm 30.1 Aa	491 \pm 32.7 Bc	526 \pm 29.4 Bb
Mg	329 \pm 14.5 Aa	259 \pm 16.1 Ac	297 \pm 13.9 Aab	289 \pm 12.1 Ab
Ca	685 \pm 40.8 Cd	885 \pm 74.1 Aa	819 \pm 50.1 Bc	847 \pm 40.5 Abc
Fe	12.8 \pm 0.45 Bb	16.8 \pm 0.91 Aa	14.8 \pm 0.68 Aab	15.1 \pm 0.87 Aa
Mn	10.9 \pm 0.63 Cc	26.3 \pm 1.5 Aa	15.9 \pm 0.68 Bb	20.9 \pm 0.98 Aab
Zn	8.34 \pm 0.32 Ab	10.4 \pm 0.48 Aa	10.2 \pm 0.51 Aa	9.33 \pm 0.45 Aa
B	1.96 \pm 0.91 Aa	1.47 \pm 0.56 Ab	1.64 \pm 0.73 Aab	1.66 \pm 0.81 Aab
Si	0.23 \pm 0.01 Bc	1.09 \pm 0.06 Aa	0.51 \pm 0.02 Bb	0.59 \pm 0.03 Bb
Ni	0.26 \pm 0.01 Ab	0.58 \pm 0.02 Aa	0.4 \pm 0.01 Ab	0.38 \pm 0.02 Ab

3 讨论

PAs 代谢的特征之一是植物体受到非生物胁迫时,体内 PAs 含量迅速发生变化,并且不同种类和不同形态 PAs 可以相互转化^[9,20]。在植物体内氧化 PAs 的酶主要是 PAO 和 DAO,它们的底物分别为 Spd + Spm 和 Put,其氧化产物为吡咯琳、H₂O 等,通过调节细胞内 PAs 水平和生成物浓度来参与植物体对多种逆境胁迫的反应和生长发育过程^[21]。

本研究中,Cu 胁迫打破了 PAs 代谢的稳态,而外施 Spd 和 Spm 抑制了 Cu 胁迫下 PAO 活性增加,缓解了 DAO 活性下降,抑制了 Put 的积累,缓解了 Spd、Spm 含量及 Spd + Spm/Put 比值降低,表明水鳖体内较高 Spd、Spm 含量和较低 Put 含量可能有利于抗 Cu 胁迫能力的提高。fPut 下降的原因可能是外施 Spd 和 Spm 导致 Put 合成的关键酶鸟氨酸脱羧酶(ODC)活性的下降^[22]。逆境胁迫下 Pro 合成代谢对 PAs 代谢起着直接或间接的调节,Pro 和 Put 代谢之间竞争共同的合成前体谷氨酸^[23],因此,本实验中外源 Spd 和 Spm 诱导 Cu 胁迫下 Pro 含量大量积累可能导致 Put 含量的降低。此外,外施 Spd 和 Spm 诱导 DAO 活性增加也加速了 fPut 的下降。

外施 Spd 和 Spm 诱导 fSpd 和 fSpm 的增加可能是从外界培养液的吸收或 fPut 向 Spd 和 Spm 转化,外施 Spd 和 Spm 抑制 PAO 活性增加也缓解了 fSpd 和 fSpm 的降解。同时,fSpd 和 fSpm 的增加也负反馈抑制了其合成前体 fPut 的形成。fPAs 与肉桂酸、蛋白质、膜脂等结合转变为 PSC-PAs 和 PISC-PAs,通过维持线粒体膜、质膜、原生质膜等生物膜的完整性而提高抗胁迫能力。因此,fPAs 含量的变化将在很大程度上影响 PSC-PAs 和 PISC-PAs 含量的变化^[22],从而导致 PSC-PAs 和 PISC-PAs 含量的增加或降低。

虽然有研究证明 Put 有清除 ROS 的功能,但过量积累 Put 可导致膜的去极化,增加 K⁺ 的渗漏,使植物出现形态学的伤害^[24],而且在清除氧自由基方面,Spd 和 Spm 的作用也大于 Put^[9]。本研究中,Cu 胁迫在导致 Put 急剧积累的同时伴随着 ROS 的大量产生,这说明水鳖叶内 Put 的大量积累不利于水鳖抵抗 Cu 胁迫。而外施 Spd 和 Spm 逆转了内源 PAs 的改变,并伴随着 ROS 的明显下降,这说明内源 Spd 和 Spm 的增加或 Put 向 Spd 和 Spm 的转化提高了水鳖抗 Cu 胁迫的能力,即(Spd + Spm)/Put 比值的升高更有利于提高抗逆性,这与

Wang X^[9] 和 Zhao H Z^[10] 等研究结果一致。

研究表明,重金属能直接或者间接地通过形成 ROS 使植物体内产生氧化胁迫,导致细胞膜脂质的过氧化^[3]。过量的 Cu²⁺ 和 Fe²⁺ 不仅可以通过 Fenton 和 Haber-Weiss 反应直接产生 ·OH 和 H₂O₂, 而且还是多不饱和脂肪酸“自动”氧化的启动因子^[25]。在本实验中,外施 Spd 和 Spm 显著或极显著抑制了 Cu 胁迫下 O₂⁻、H₂O₂ 和 MDA 含量的积累,降低了 ROS 水平及膜脂过氧化程度。研究证明,植物对逆境的生理响应与体内的抗氧化防御系统密切相关^[3-7]。外施 PAs 极有可能是通过增强抗氧化系统的抗氧化能力增加水鳖对 Cu 的耐受性。为此,本实验又进行了进一步验证,Cu 胁迫下 SOD、POD、CAT、APX、GR 活性和 AsA、GSH 含量均极显著下降,而外施 Spd 和 Spm 不但保持了上述几种酶较高的活性,还有有效的逆转了 AsA 和 GSH 含量的降低,从而提高细胞的抗氧化功能。这可能是一方面 PAs 可与带负电的核酸、蛋白质结合,刺激一些酶蛋白质合成的各个中间步骤,通过增加酶的数量而提高总酶活性;另一方面,PAs 可以直接与酶分子结合,从而稳定蛋白结构和功能,阻止蛋白降解,从而提高单位酶的活性^[26]。Spd 和 Spm 能明显提高镉胁迫下湖北海棠的 SOD 和 GR 的活性^[10],Spd 和 Spm 能缓解 Cu 和 Cd 诱导的向日葵 GR 和 SOD 活性的下降^[8]。此外,PAs 在生理 pH 下以多聚阳离子存在可以直接或间接地清除植物组织中的 ROS^[27];外源 PAs 通过与带负电荷的核酸、磷脂、酶蛋白等结合,调节膜的生化特性以及核酸的结构和功能^[27],从而在一定程度上保护生物膜的结构和功能。Pro 不仅可作为渗透调节物质,还可以清除 ROS,提高抗氧化能力,稳定生物大分子的结构,降低细胞酸性以及解除氨毒等^[28]。外源 PAs 能促进 Cu 胁迫下苜蓿 Pro 的积累^[9],提高抗重金属能力。本实验结果也表明外源 PAs 能促进 Cu 胁迫下水鳖体内 Pro 的积累。因此,外源 PAs 促进 Pro 的积累可能是缓解 Cu 胁迫下水鳖伤害的另一重要原因。

破坏矿质营养元素的吸收平衡是重金属植物毒理学效应的一个重要方面^[29]。结果显示,外施 Spd 和 Spm 有效的抑制了 Cu 胁迫下 Cu、Na、Ca、Mn、Fe、Zn、Ni、Si 含量的增加,缓解了这些元素过量吸收对水鳖造成的不良影响。如 Fe、Mn、Zn、Ni 等本身就是重金属元素。Na⁺ 过量积累会与 K⁺ 相互竞争吸收位点及活性位点,导致 K⁺ 的吸收减少,使依赖 K⁺ 的酶活性及代谢过程受抑制,从而抑制植株生长和发育^[30]。同时,外施 Spd 和 Spm 缓解了水鳖对大量元素 P、K、Mg 和微量元素 B 吸收量的减少。P、K、Mg 在植物体内蛋白质、核酸等重要物质的合成和代谢中都是必不可少的,它们在植物体内含量降低必将会导致体内物质组成和代谢紊乱^[31]。这与 Spd 和 Spm 减轻了 Cu 对细胞膜结构的损伤有关。

综上所述,Cu 胁迫下喷施外源 Spd 和 Spm 降低 PAO 活性,提高 DAO 活性,降低 Put 含量,增加 Spd、Spm 含量和(Spd + Spm)/Put 比值,从而使植物体内高含量的内源 Spd 和 Spm 可直接清除 ROS,也有利于保持植物体内抗氧化系统的较高活性或含量,从而增强清除 ROS 的能力,降低膜脂过氧化的伤害,并且也在一定程度上恢复了植物对矿质营养吸收的动态平衡,缓解了植物的营养缺乏或离子毒害症状。总之,本文进一步验证 PAs 在水生植物重金属污染中的抗性机制,以期抗性生理增添素材,为水体中重金属污染的防治提供科学参考。

References:

- [1] Cui X H, Pu Y H, Xiong B H, Li W, Chen J K. The growth and reproduction response of *Potamogeton malaianus* Miq. to water depth gradient. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1999, 23(3): 269-272.
- [2] Solomon E I, Lowery M D. Electronic structure contributions to function in bioinorganic chemistry. *Science*, 1993, 259: 1575-1581.
- [3] Ji W D, Shi G X, Yang H Y, Xu Q S, Xu Y, Zhang H. Effects of Cu²⁺ stress on leaf physiological indice and ultrastructure of *Potamogeton malaianus*. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2007, 18 (12): 2727-2732.
- [4] Chamseddine M, Wided B A, Guy H, Marie-Edith C, Fatma J. Cadmium and copper induction of oxidative stress and antioxidative response in tomato (*Solanum lycopersicon*) leaves. *Plant Growth Regulation*, 2009, 57: 89-99.
- [5] Bouchereau A, Aziz A, Larher F, Martin-Tanguy J. Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Science*, 1999, 140: 103-125.
- [6] Xu Q S, Shi G X, Wang H X, Yang H Y, Zhao J, Xu Y. Roles of exogenous spermidine in improving *Salvinia natans* tolerance towards cadmium

- stres. Chinese Journal of Applied Ecology, 2008, 19(11): 2521-2526.
- [7] Wang X, Shi G X, Ma G Y, Xu Q S, Khaled R, Hu J Z. Effects of exogenous spermidine on resistance of *Nymphoides peltatum* to Hg^{2+} stress. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology, 2004, 30(1): 69-74.
- [8] Groppa M D, Tomaro M L, Benavides M P. Polyamines as protectors against cadmium or copper-induced oxidative damage in sunflower leaf discs. Plant Science, 2001, 161: 481-488.
- [9] Wang X, Shi G X, Xu Q S, Hu J Z. Exogenous polyamines enhance copper tolerance of *Nymphoides peltatum*. Journal of Plant Physiology, 2007, 164: 1062-1070.
- [10] Zhao H Z, Yang H Q. Exogenous polyamines alleviate the lipid peroxidation induced by cadmium chloride stress in *Malus hupehensis* Rehd. Scientia Horticulturae, 2008, 116: 442-447.
- [11] Liu J, Ji X J, Liu Y L. High performance liquid chromatography method for measuring polyamine content in plant tissue. Plant Physiology Communication, 2002, 38(6): 596-598.
- [12] Wang T, Guo S R, Liu J, Gao H B. An improved method for measuring polyamine oxidase and its application to the study of cucumber root under hypoxia stress. Plant Physiology Communication, 2004, 40: 358-360.
- [13] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Analytical Biochemistry, 1976, 72: 248-254.
- [14] Beyer W F, Fridovich I. Assaying for superoxide dismutase activity: Some large consequences of changes in conditions. Analytical Biochemistry, 1987, 161: 559-566.
- [15] Maehly A C. Plant peroxidase. Methods in Enzymology, 1955, 2: 801-813.
- [16] Karsten U. Natural ultraviolet radiation and photosynthetically active radiation induce formation of mycosporine-like amino acids in the marine macroalga *Chondrus crispus* (Rhodophyta). Planta, 1998, 205: 257-262.
- [17] Chen J X, Wang X F. The instructions of plant physiological experiment. Guangdong: South China University of Technology Press, 2002: 122-127.
- [18] Heath R L, Parker L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Archives Biochemistry Biophysics, 1968, 125: 189-198.
- [19] Li H S. The principles and techniques of plant physiological biochemical experiment. Beijing: Higher Education Press, 2000: 258-260.
- [20] Alexis N, Stanley L. Do exogenous polyamines have an impact on the response of a salt-sensitive rice cultivar to NaCl. Journal of Plant Physiology, 2006, 163: 506-516.
- [21] Santa-Gruz A, Bolarin C. Changes in free polyamine levels induced by salt stress in leaves of cultivated and wild tomato species. Physiology Plantarum, 1997, 101: 341-346.
- [22] Theiss C, Bohley P, Bisswanger H, Voigt J. Uptake of polyamines by the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* and their effect on ornithine decarboxylase activity. Journal of Plant Physiology, 2004, 161: 3-14.
- [23] Aziz A, Larher F. Changes in polyamine titers associated with the proline response and osmotic adjustment of rape leaf discs submitted to osmotic stresses. Plant Science, 1995, 112: 175-186.
- [24] Takao K, Rickhag M, Hegardt C, Oredsson S, Preson L. Induction of apoptotic cell death by putrescine. The International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 2006, 38: 621-628.
- [25] Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt K V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. Annals of Botany, 2003, 91: 179-194.
- [26] Verma S, Mishra S N. Putrescine alleviation of growth in salt stressed *Brassica juncea* by inducing antioxidative defense system. Journal of Plant Physiology, 2005, 162: 669-677.
- [27] Walters D R. Resistance to plant pathogens: possible roles for free polyamines and polyamine catabolism. New Phytologist, 2003, 159: 109-115.
- [28] Thakur M, Sharma D. Salt-stress-induced proline accumulation in germinating embryos: Evidence suggesting a role of proline in seed germination. Journal of Arid Environments, 2005, 62: 517-523.
- [29] Ji W D, Shi G X, Zhang H, Xu Q S, Xu Y, Du K H. Physiological and ultrastructural responses of *Potamogeton crispus* to Hg^{2+} stress. Acta Ecologica Sinica, 2007, 27(7): 2856-2863.
- [30] Wang S P, Jia Y X, Guo S R, Zhou G X. Effects 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.
- [31] Wang C, Zhang S H, Wang P F, Hou J, Zhang W J, Li W, Lin Z P. The effect of excess Zn on mineral nutrition and antioxidative response in rapeseed seedlings. Chemosphere, 2009, 75, 1468-1476.

参考文献:

- [1] 崔心红, 蒲云海, 熊秉红, 李伟, 陈家宽. 水深梯度对竹叶眼子菜生长和繁殖的影响. 水生生物学报, 1999, 23(3): 269-272.
- [3] 计汪栋, 施国新, 杨海燕, 徐勤松, 许晔, 张慧. 铜胁迫对竹叶眼子菜叶片生理指标和超微结构的影响. 应用生态学报, 2007, 18(12): 2727-2732.
- [6] 徐勤松, 施国新, 王红霞, 杨海燕, 赵娟, 许晔. 外源亚精胺对槐叶苹耐镉胁迫的增强效应. 应用生态学报, 2008, 19(11): 2521-2526.
- [7] 王学, 施国新, 马广岳, 徐勤松, Rafeek Khaled, 胡金朝. 外源亚精胺对苕菜抗 Hg^{2+} 胁迫能力的影响. 植物生理与分子生物学报, 2004, 30(1): 69-74.
- [11] 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(6): 596-598.
- [12] 汪天, 郭世荣, 刘俊, 高洪波. 多胺氧化酶检测方法的改进及其在低氧水培黄瓜根系中的应用. 植物生理学通讯, 2004, 40: 358-360.
- [17] 陈建勋, 王晓峰. 植物生理学实验指导. 广州: 华南理工大学出版社, 2002: 122-127.
- [19] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术. 北京: 高等教育出版社, 2000: 258-260.
- [29] 计汪栋, 施国新, 张慧, 徐勤松, 许晔, 杜开和. 菹草对 Hg^{2+} 胁迫的生理和结构应答反应. 生态学报, 2007, 27(7): 2856-2863.
- [30] 王素平, 贾永霞, 郭世荣, 周国贤. 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.