

渗透胁迫对玉米幼苗类囊体膜上 结合态多胺含量的影响

刘怀攀^{1,2}, 胡炳义², 刘天学^{1,2}, 李潮海¹

(1. 河南农业大学 农学院, 作物生长与发育调控省重点实验室, 河南 郑州 450002;

2. 周口师范学院 植物学重点实验室, 河南 周口 466000)

摘要:研究了渗透胁迫下, 玉米品种农大 108(抗旱性较强)和掖单 13(抗旱性较弱)幼苗类囊体膜上非共价结合态(Noncovalently conjugated, NCC)多胺(Polyamines, PAs)和高氯酸不溶性共价结合态(Perchloric acid insoluble covalently conjugated, PISCC)多胺(PA)含量的变化。发现渗透胁迫下, 抗旱性弱的掖单 13 的 NCG-亚精胺(Spermidine, Spd)、PISCC-腐胺(Putrescine, Put)和 PISCC-Spd 下降幅度明显大于抗旱性强的农大 108; 掖单 13 的 NCG-Put 含量明显上升, NCG-精胺(Spermine, Spm)含量明显下降, 而农大 108 的 NCG-Put 和 NCG-Spm 含量变化不明显。外源 Spd 处理明显抑制了渗透胁迫下掖单 13 类囊体膜上 NCG-Spd 含量的下降, 也提高了掖单 13 玉米幼苗的抗性; Spd 生物合成的专一性抑制剂——MGBG 处理, 则明显促进了渗透胁迫下农大 108 类囊体膜上 NCG-Spd 含量的下降, 也降低了农大 108 玉米幼苗的抗性。PISCC-PAs 生物合成的专一性抑制剂—— α -phen 处理, 促进了渗透胁迫下玉米幼苗类囊体膜上 PISCC-PAs 含量的下降, 而且明显降低了玉米幼苗的抗性。表明玉米幼苗类囊体膜上 NCG-Spd、PISCC-Spd 和 PISCC-Put 在胁迫条件下的稳定有利于增强玉米幼苗适应渗透胁迫的能力。

关键词: 玉米; 结合态多胺; 渗透胁迫; 类囊体膜

中图分类号: S513.01 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2007)02-0086-04

Effect of Osmotic Stress on the Content of Conjugated PA to the Thylakoid Membrane of Maize Seedlings

LIU Huai-pan^{1, 2}, HU Bing-yi², LIU Tian-xue^{1, 2}, LI Chao-hai¹

(1. Henan Key Laboratory for Regulating Controlling Crop Growth and Development, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China; 2. Key Laboratory of Plant Science, Zhoukou Normal University, Zhoukou 466000, China)

Abstract: The changes in contents of noncovalently conjugated polyamines (NCG-PAs) and perchloric acid insoluble covalently conjugated polyamines (PISCC-PAs) to thylakoid membrane were investigated in seedling leaves of two maize (*Zea mays* L.) cultivars, Nongda 108 (drought-tolerant) and Yedan 13 (drought-sensitive) under osmotic stress. On the 7th day after polyethylene glycol (PEG)-6 000 treatment, the contents of NCG-spermidine (Spd), PISCC-putrescine (Put) and PISCC-Spd decreased more significantly in Yedan 13 than in Nongda 108. In Yedan 13, the contents of NCG-Put and NCG-spermine (Spm) decreased more significantly, while Nongda 108 showed unaltered levels in both of them. Under osmotic stress, exogenous Spd treatment inhibited the decrease of NCG-Spd level in Yedan 13 and enhanced its tolerance to stress. Treatment with ethylglyoxal-bis (guanyldihydrazone) (MGBG), which is an inhibitor of Spd biosynthesis, enhanced the decrease of NCG-Spd level in Nongda 108 and decreased its tolerance to stress. Treatment with α -phen, an inhibitor of PISCC-PAs biosynthesis, enhanced the decrease of PISCC-PAs and decreased the tolerance of seedlings to stress. The results suggested that the stability of NCG-Spd, PISCC-Put and PISCC-Spd contents in thylakoid membrane could enhance the adaptation of maize seedlings to osmotic stress.

Key words: Maize; Conjugated PA; Osmotic stress; Thylakoid membrane

众所周知, 植物细胞被复杂的骨架结构和膜系统分隔成不同的细胞器。在长期的进化过程中, 每个细胞器逐渐分化成既相互联系又相互独立的特殊

的结构和功能单位。多胺定位于各种各样的细胞器中, 不同形态不同种类的多胺在各个细胞器的分布以及所执行的功能各异^[1]。

收稿日期: 2006-10-28

基金项目: 科技部重大科技专项基金项目(2004BA502A); 中国博士后基金项目(2005037633)

作者简介: 刘怀攀(1970-), 男, 河南郑州人, 博士后, 主要从事作物干旱生理研究

通讯作者: 李潮海(1956-), 男, 河南巩义人, 博士生导师, 主要从事作物栽培与耕作学研究。

多胺(Polyamine, PA)是生物代谢过程中产生的一类具有生物活性的低分子量脂肪族含氮碱,常见多胺有腐胺(Put)、亚精胺(Spd)和精胺(Spm)等。Put加入氨丙基残基,生成亚精胺(Spd)和精胺(Spm),氨丙基的提供者是S-腺苷蛋氨酸(SAM)经过S-腺苷蛋氨酸脱羧酶(SAMDC)催化脱羧而形成的, SAMDC被甲基乙二醛双(鸟嘌呤)即MGBG强烈的抑制。越来越多的研究证明,多胺可以提高植物的抗渗透胁迫能力^[2, 3]。植物体内的多胺除了以游离态(free: f)形式存在外,还有非共价结合态(Non-covalently conjugated, NCC)和高氯酸不溶性共价结合态(Perchloric acid insoluble covalently conjugated, PIS-CC)等形态。所谓非共价结合态是指在生理 pH 范围内 PAs 充分质子化而带正电荷,可以与生物体内带负电荷的生物大分子如酸性蛋白质、膜磷脂和核酸等靠静电结合。所谓高氯酸不溶性共价结合态多胺是指游离态多胺与生物大分子如蛋白质、糖醛酸或木质素等共价结合而成,催化此反应的酶是转谷酰胺酶(TGase),此酶的专一性抑制剂是菲咯啉(Phenanthroline: ϕ -Phen)。免疫化学技术^[4]证明, TGase 主要存在于叶绿体内,说明 PISCG-PAs 与叶绿体的功能稳定有着极为密切的关系^[5]。

光合作用的细胞器——叶绿体对各种胁迫的敏感反应越来越引起学者们的高度重视^[6],多胺和叶绿体关系的研究也引起了学者们的广泛关注。He 等^[7]报道,经过外源 Spd 预处理的黄瓜幼苗叶片的类囊体膜上比对照在冷胁迫下有较高的 Spd 水平和较高的生长速率,并发现黄瓜幼苗叶片经 Spd 预处理可以缓解叶绿素荧光产量(Fv/Fm)、类囊体膜的光合电子传递活性和碳代谢酶活性的下降以及类囊体膜脂过氧化水平的增高。他们推测叶绿体内高水平的 Spd 有助于提高黄瓜叶片光合结构的冷适应能力。我们以前的研究发现,质膜、液泡膜和线粒体膜上的结合态多胺与植物的抗旱性有明显关系^[8-10]。然而,目前尚缺乏渗透胁迫下类囊体膜上 NCG-PAs 和 PISCG-PAs 含量变化的研究。本研究旨在探讨玉米幼苗类囊体膜上这两种结合态多胺与抗水分胁迫的关系以及外源多胺与多胺合成抑制剂对这种关系的影响。

1 材料和方法

1.1 材料培养与处理

玉米种子(掖单 13 和农大 108)用 0.1% 的 $Hg-Cl_2$ 消毒 5 min,用流动的自来水浸种 24 h,在 25℃下催芽后,选取一致的种子均匀播在底部有孔、装有石

英砂的小型硬质、不透明的塑料杯中(10 粒/杯)。1/2 Hoagland 营养液培养,昼夜温度分别是(20±5)℃和(10±5)℃,自然光照,每 2 d 换一次营养液,培养至第二叶片充分伸长,分别用含以下 5 组试剂的 1/2 Hoagland 营养液进行处理(对照用 1/2 Hoagland 营养液培养):①PEG-6000(20%);②PEG-6000(20%) + Spd(1 mmol/L);③PEG-6000(20%) + MGBG(1 mmol/L);④PEG-6000(20%) + MGBG(1 mmol/L) + Spd(1 mmol/L);⑤PEG-6000(20%) + ϕ -Phen(1 mmol/L),同时第②、③和④、⑤组分别用 1 mmol/L 的 Spd, MGBG, MGBG+ Spd 和 ϕ -Phen 早晚各叶面喷施 1 次,每次喷施的量为 5 mL/杯,对照喷施清水。以上处理 7 d 后充分洗幼苗 3 次,叶片取样。

1.2 类囊体膜的提取

按刁丰秋等^[11]方法,稍加修改。将提取的叶绿体沉淀用低渗缓冲液(HEPES-Tris 25 mmol/L, pH 8.0)清洗 2 次,再用低渗溶液悬浮后 4℃静置 5 min, 20 000×g 离心 15 min,用 2 mL 研磨缓冲液悬浮沉淀,即得类囊体膜微囊制剂。

1.3 类囊体膜微囊蛋白的分离与检测

将提取的类囊体膜微囊一部分加入 TritonX-100 至终浓度为 1%,用 150 W 超声波于冰浴上破碎 30 s (2 次),冰浴上放置 30 min, 20 000×g 离心 30 min (4℃)。上清液为可溶性膜蛋白溶液。蛋白质含量测定按 Bradford^[12]方法进行。

1.4 2 种类囊体膜上结合态多胺的提取与检测

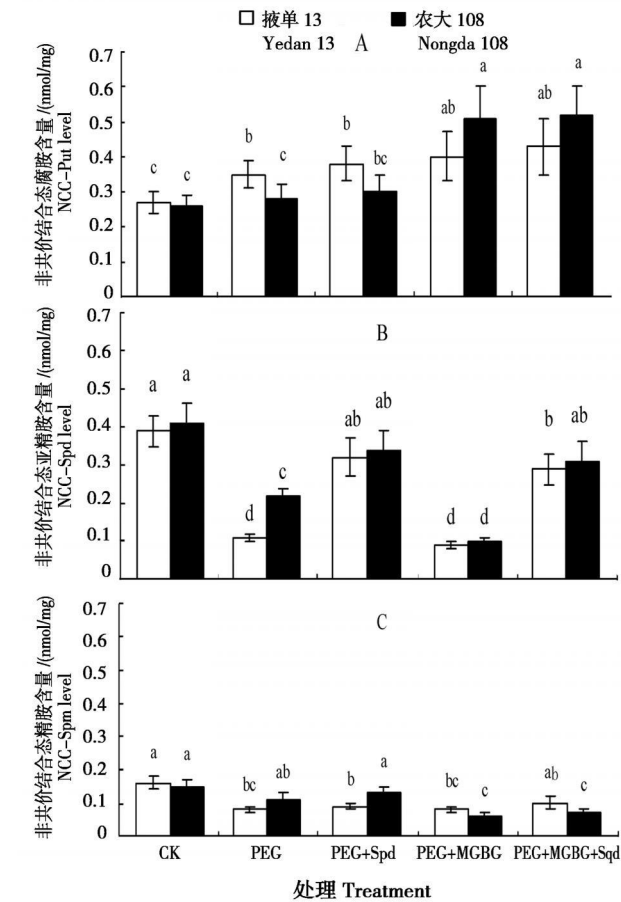
向提取的膜微囊制剂中加入 PCA 至终浓度为 5%,以沉淀去除蛋白质部分。27 000×g 离心 40 min,类囊体膜微囊上非共价结合的多胺就位于上清液中。

将上述 1.3 提取的可溶性膜蛋白液中加入 PCA 至终浓度为 5%, 27 000×g 离心 40 min,沉淀为蛋白质部分(其上含有 PISCG-PAs),按 Kiriakos 等^[13]方法检测 NCG-PAs 和 PISCG-PAs。

2 结果与分析

2.1 渗透胁迫对玉米幼苗类囊体膜上 NCG-PAs 含量的影响

渗透胁迫下,2 个品种的 NCG-Spd(图 1-B)含量都明显下降,而且抗旱性强的农大 108 的 NCG-Spd 含量下降幅度明显小于抗旱性弱的掖单 13;掖单 13 的 NCG-Put(图 1-A)含量明显上升, NCG-Spm(图 1-C)含量明显下降;而农大 108 的 NCG-Put(图 1-A)和 NCG-Spm(图 1-C)含量变化不明显。



图中的小写字母代表用 Duncan 法多重比较的显著性差异水平, $P < 0.05$, 下同

Means with different letters in lowercase (a–c) are significantly different at $P < 0.05$ on Duncan's multiple range tests, the same as follows

图1 PEG、Spd 和 MGBG 对玉米幼苗类囊体膜上非共价结合态多胺 NCG-Put (A), NCG-Spd (B) 和 NCG-Spm (C) 含量的影响

Fig. 1 Effect of PEG, Spd and MGBG on the levels of noncovalently conjugated PAs (NCG-PAs): NCG-Put (A), NCG-Spd (B) and NCG-Spm (C) in thylakoid membrane prepared from maize seedling leaves

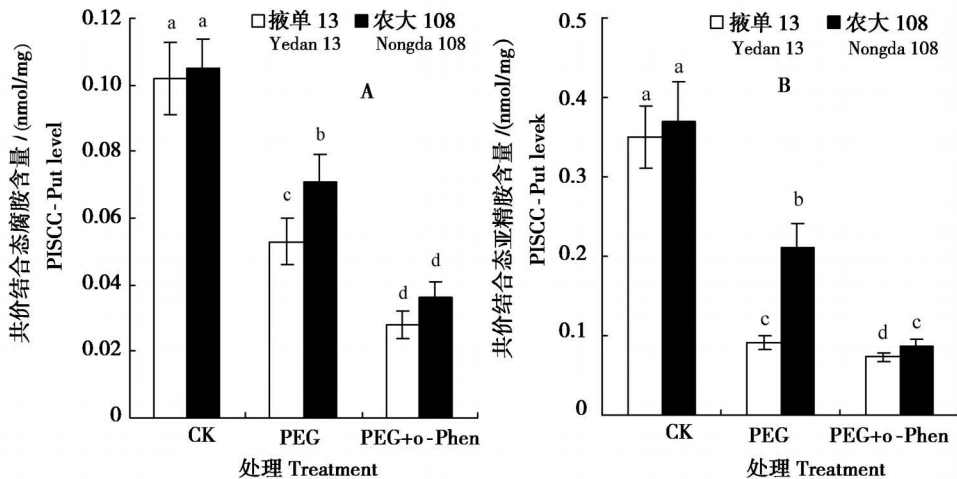


图2 PEG 和 o-Phen 对玉米幼苗类囊体膜上 PISCG-Put (A) 和 PISCG-Spd (B) 含量的影响
Fig. 2 Effect of PEG and o-Phen on the levels of PISCG-Put (A) PISCG-Spd (B) in thylakoid membrane prepared from maize seedling leaves

2.2 渗透胁迫下外源的 Spd 和 MGBG 对玉米幼苗类囊体膜上 NCG-PAs 含量的影响

外源 Spd 处理明显抑制了渗透胁迫下两品种类囊体膜上 NCG-Spd 的下降(图 1-B)。与 PEG 处理比较, PEG+MGBG 处理明显增加农大 108 类囊体膜上 NCG-Put 含量(图 1-A), 明显降低其 NCG-Spd(图 1-B)和 NCG-Spm(图 1-C)含量, 对掖单 13 影响不大。

2.3 渗透胁迫和 o-Phen 对玉米幼苗类囊体膜上 PISCG-PAs 水平的影响

渗透胁迫使得两品种的 PISCG-Put(图 2-A)和 PISCG-Spd(图 2-B)都明显下降, 但抗旱性强的农大 108 的下降幅度明显小于抗旱性弱的掖单 13。类囊体膜上 PISCG-Spm 含量极低, 而且渗透胁迫对其的影响不大。o-phen 处理更加明显促进了渗透胁迫下农大 108 玉米幼苗类囊体膜上 PISCG-Put(图 2-A)和 PISCG-Spd(图 2-B)的下降。

3 讨论

3.1 渗透胁迫与玉米幼苗类囊体膜上 NCG-PAs 的关系

玉米幼苗叶绿体类囊体膜上的 NCG-PAs 变化趋势明显不同于质膜、液泡膜和线粒体膜, 除了掖单 13 NCG-Put 上升外, 2 个品种的 NCG-Spd 都明显下降, 并且抗旱性强的农大 108 的 NCG-Spd 下降幅度明显小于抗旱性弱的掖单 13, 掖单 13 的 NCG-Put 含量明显上升, 而农大 108 的 NCG-Put 和 NCG-Spm 含量变化不明显。这些结果说明, 类囊体膜上的 NCG-Spd 有助于增强玉米幼苗对渗透胁迫抗性。外源 Spd 和 Spd 合成抑制剂 MGBG 处理试验结果也与此一致: 外施 Spd 在明显抑制掖单 13 在胁迫下 NCG-Spd 水平降低的同时, 也明显增强其对水分胁迫的

抗性^[3];而 MGBG 是 Spd 生物合成关键酶 S-腺苷蛋氨酸脱羧酶(SAMDC)的抑制剂,MGBG 明显促进农大 108 在胁迫条件下 NCG-Spd 水平的降低,也降低了其对胁迫的抗性^[3]。叶片光合能力的下降与叶绿体超微结构的变化有关,武玉叶等^[14]报道,水分胁迫导致叶绿体外形变圆,类囊体肿胀,片层间距加大,基质片层模糊,最终导致叶绿体的解体。叶绿体超微结构的变化又导致叶绿体活性下降,叶绿体活性的降低涉及电子传递、光合磷酸化以及光合碳还原有关酶的活性的降低等,其中,尤以光合磷酸化对水分胁迫的反应最为敏感^[15-17]。可以推测,渗透胁迫条件下 Spd 靠自身的多聚阳离子特性通过与类囊体膜上的带负电的磷脂、蛋白质等非共价结合,阻止叶绿素的丧失和保持完善的类囊体结构,从而维护类囊体的光合功能。前人的研究结果也从不同侧面支持这一观点:He 等^[7]还发现,经过冷锻炼的菠菜叶片比对照有较高的 SAMDC 活性,从而有较高的 Spd 水平和较高的抗冷胁迫能力,MGBG 处理则引起抗性下降,而外源 Spd 又可逆转 MGBG 的生理效应。

3.2 渗透胁迫与玉米幼苗类囊体膜上 PISCG-PAs 的关系

Dondini 等^[5]的研究证明,多胺可以共价结合到叶绿素 a/b 天线复合体,CP24,CP26 和 Rubisco 的大亚基上。在此研究结果的基础上,我们研究发现,渗透胁迫使得 2 个品种的 PISCG-Put 和 PISCG-Spd 都明显下降,而且抗旱性强的农大 108 的下降幅度明显小于抗旱性弱的掖单 13。据此推测,类囊体膜上的 PISCG-Put 和 PISCG-Spd 有利于提高幼苗的抗渗透胁迫能力。 α -Phen 处理试验也可以间接证明这一推测,因为 α -Phen 明显促进了渗透胁迫下玉米幼苗类囊体膜上 PISCG-Put 和 PISCG-Spd 水平下降,也明显降低了玉米幼苗的抗性^[3]。PAs 和类囊体膜上蛋白质以共价键结合后形成 PISCG-PAs,可能增强渗透胁迫下类囊体膜蛋白结构和功能的稳定性。这与我们以前在质膜、液泡膜和线粒体膜上的研究结果是一致的^[8-10]。

参考文献:

[1] Masgrau C, Panicot M, Cordeiro A, *et al.* Production of transgenic tobacco plants with arginine decarboxylase under the control of an inducible promoter [M] // Smallwood M F, Calvert C M, Bowles D J. Plant Responses to Environmental Stress. Oxford OX41RE, UK: BIOS Scientific Publishers Limited, 1999, 39: 191-199.

[2] 张 胜,刘怀攀,陈 龙,等.亚精胺提高大豆 幼苗抗旱性[J]. 华北农学报,2005,20(4):25-27.

[3] Liu H P, Ji X E, Shi L G, *et al.* Effect of osmotic stress on the contents of different form polyamines in leaves of maize seedlings [J]. Acta Agronomica Sinica, 2006, 32 (10): 1430-1436.

[4] DeLuca S, Beninati S, Serafini-Fracassini D. Polyamines in chloroplasts: identification of their glutamyl and acetyl derivatives [J]. Biochem J, 1995, 305: 233-237.

[5] Dondini L, Duca S D, Dall'Agata L, *et al.* Suborganellar localisation and effect of light on Helianthus tuberosus chloroplast transglutaminases and their substrates [J]. Planta, 2003, 217: 84-96.

[6] 赵延明,董树亭,高宏伟.玉米叶片叶绿素含量遗传主效应及其与环境互作的遗传分析[J]. 华北农学报,2006,21(4):5-8.

[7] He L, Nada K, Tachibana S. Effect of spermidine pretreatment through the roots on growth and photosynthesis of chilled cucumber plant (*Cucumis sativus* L.) [J]. J Japan Soc Hort Sci, 2002, 71: 490-498.

[8] Liu H P, Yu B J, Liu Y L. Effect of osmotic stress on the activity of H^+ -ATPase and the levels of covalently and noncovalently conjugated polyamines in plasma membrane from wheat seedling roots [J]. Plant Sci, 2005, 168: 1599-1607.

[9] Liu H P, Liu Y L, Yu B J. Increased polyamines conjugated to tonoplast vesicles correlate with maintenance of the H^+ -ATPase and H^+ -PPase Activities and enhanced osmotic stress tolerance in wheat [J]. J Plant Growth Regul, 2004, 23: 156-165.

[10] Liu H P, Liu J, Zhang Y Y, Liu Y L. Relationship between ATPase activity and conjugated polyamines in mitochondrial membrane from wheat seedling roots under osmotic stress [J]. J Environ Sci, 2004, 16: 712-716.

[11] 刁丰秋,章文华,刘友良.盐胁迫下大麦幼苗类囊体膜组成和功能的变化[J]. 植物生理学报,1997,2: 105-111.

[12] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Anal Biochem, 1976, 72: 248-254.

[13] Kiriakos K, Maria D, Christakis H, *et al.* A narrow-pore HPLC method for the identification and quantitation of free, conjugated, and bound polyamines [J]. Anal Biochem, 1993, 214: 484-489.

[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):263-268.

[15] 杨晓青,张岁岐,梁宗锁,等.水分胁迫对不同抗旱类型冬小麦幼苗叶绿素荧光参数的影响[J]. 西北植物学报,2004,24: 812-816.

[16] 李 扬,孙存华,贺鸿雁,等. PEG 渗透调节对甘薯光合作用的影响[J]. 河南农业科学,2005(6):37-39.

[17] 王启明,李方远,徐心诚,等.干旱胁迫对花英期大豆叶片细胞膜透性和渗透调节物质含量的影响[J]. 河南农业科学,2005(8):40-43.