

低氧胁迫下黄瓜幼苗根系多胺代谢的变化

汪 天^{1,2} 王素平¹ 郭世荣^{1*} 高洪波¹

(¹南京农业大学园艺学院, 南京 210095; ²安徽农业大学森林利用学院, 合肥 230036)

摘 要: 利用外源 Spd、PAO 抑制剂研究了黄瓜幼苗根系在低氧水培时的生长状况以及内源 PA_s、H₂O₂ 含量和 PAO 活性的动态变化。结果表明, 外源 PA_s 对低氧胁迫下黄瓜幼苗根系的生长有促进作用; 低氧处理后 3 种 PA_s 含量都明显上升, 外源 Spd 和 PAO 抑制剂增加了根系中的 PA_s 含量, 降低了根系中 H₂O₂ 含量, 减缓了低氧伤害; PA_s 为低氧胁迫的应激产物, PAO 为适应酶类, 其活性随 PA_s 含量的变化而发生变化。

关键词: 黄瓜; 低氧胁迫; 多胺; H₂O₂; 多胺氧化酶

中图分类号: S 642.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2005) 03-0433-05

Changes of Polyamines Metabolism in Roots of Cucumber Seedlings under Root-zone Hypoxia Stress

Wang Tian^{1,2}, Wang Suping¹, Guo Shirong^{1*}, and Gao Hongbo¹

(¹College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; ²College of Forest Utilization, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract: The effects of exogenous spermidine (Spd) and inhibitor of polyamine oxidase (PAO) on growth of roots, endogenous polyamine levels, hydrogen peroxide (H₂O₂) content and activity of polyamine oxidase in roots of cucumber seedlings under root-zone hypoxia grown hydroponically were studied. The results showed that exogenous polyamines could improve roots growth of cucumber seedlings, and levels of free putrescine (Put), spermidine (Spd) and spermine (Spm) in cucumber roots obviously increased under hypoxia stress. Exogenous Spd and inhibitor of PAO induced an increase in free polyamine levels and decreased H₂O₂ content in cucumber roots, which could alleviate damage of hypoxia stress to cucumber seedlings. Polyamines are products responding to hypoxia stress and PAO belongs to adaptive enzyme whose activities change with levels of polyamines.

Key words: Cucumber; Hypoxia stress; Polyamine; Hydrogen peroxide; Polyamine oxidase

多胺 (Polyamines, PA_s) 是生物体氮代谢过程中产生的一类次生代谢物质, 主要包括腐胺 (Put)、亚精胺 (Spd)、精胺 (Spm) 和尸胺 (Cad)。PA_s 代谢的特征之一为植物在受到生物和非生物因素胁迫时, 组织内的 PA_s 浓度急剧变化^[1]; 多胺氧化酶 (Polyamine oxidase, PAO) 是催化生物体内 PA_s 氧化的关键酶, 通过调节细胞内 PA_s 的水平和生成物的浓度, 参与植物体对各种逆境胁迫的反应和生长发育过程^[2]。H₂O₂ 是 PAO 氧化 PA_s 的产物之一, 也是目前较受关注的细胞内氧化信号分子, H₂O₂ 在逆境生理的作用上表现出保护与毒害的双重性^[3]。本文通过外源 PA_s 和 PAO 抑制剂对低氧胁迫下黄瓜幼苗的处理, 检测了幼苗根系生长及其内源 PA_s、H₂O₂ 含量和 PAO 活性变化, 旨在阐明 PA_s 在黄瓜根际低氧逆境中的生理作用, 为进一步研究其生理机制提供理论依据。

1 材料与方法

收稿日期: 2004 - 07 - 29; 修回日期: 2004 - 11 - 15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30170645); 江苏省自然科学基金资助项目 (BK2002110)

*通讯作者 Author for correspondence (E-mail: shirongguo@hotmail.com)

1.1 试材与处理

试验于 2003 年 9 月至 2004 年 6 月在南京农业大学玻璃温室中进行。以黄瓜 (*Cucumis sativus* L.) 品种 ‘津春 2 号’ 为材料。种子在 28 ℃ 恒温箱中催芽 30 h 后, 播入装有石英砂的穴盘中育苗, 昼温 25~30 ℃, 夜温 16~20 ℃, 自然光照。在幼苗第 3 片真叶展开时, 移入栽培槽进行水培, 营养液为 Hoagland 配方, 预培养 3 d 后开始处理。以正常通气为对照 (CK), 间歇地给栽培槽营养液中通入空气 (30 min · h⁻¹, 溶解氧浓度为 6~8 mg · L⁻¹); 低氧水培用溶解氧浓度调节器 (美国 Quantum, Q25D 型) 调节营养液的溶解氧浓度, 设定值为 1.5 mg · L⁻¹ (误差小于 ±0.20 mg · L⁻¹)。试验设 3 种处理: A 为低氧水培, B 为低氧水培加外施 Guazatine (PAO 活性抑制剂), C 为低氧水培加外施 Spd。A、B、C 的低氧处理从试验开始一直持续到试验结束。在低氧处理期间, 每天 18 时对处理 B 和 C 叶面喷施 Guazatine 2 mmol · L⁻¹, Spd 1 mmol · L⁻¹, 处理 A 喷施同样体积的水。

1.2 测定方法

根系生长分析: 用台式扫描仪 (日本产 LA1600 (+)) 将根系图像扫描存入电脑, 再用图像分析软件 WinRHIZO (加拿大 Regent Instruments 公司) 分析根长、根表面积、根体积、根直径和根尖数。

多胺含量的测定: 在刘俊等^[4]测定方法的基础上加以改进。提取: 称 0.5 g 根系鲜样, 加入 1.6 mL 预冷的 5% HClO₄ 冰浴研磨至匀浆, 然后冰浴 1 h, 于 14 000 ×g 离心 30 min (4 ℃), 取上清液 1 mL, 加入 2 mL NaOH 2 mol · L⁻¹ 和 10 μL 苯甲酰氯, 涡旋混匀, 37 ℃ 水浴下孵育 30 min; 加 2 mL 饱和 NaCl 和 3 mL 乙醚混匀萃取, 于 3 000 ×g 离心 5 min, 取 1.5 mL 乙醚相, 通风橱中将乙醚吹干, 溶于 100 μL 甲醇, 保存在 -20 ℃ 冰箱中待测。取 10 μL 用岛津 LC-10ATVP 型高压液相色谱分析仪检测多胺, 流动相为 64% 的甲醇 (用超纯水配制)。检测条件: ODS-反相 C18 柱 (150 mm × 6 mm), SPD-6AV 紫外检测, 波长 254 nm, 柱温 25 ℃, 流速 0.5 mL · min⁻¹。

游离态多胺氧化酶活性的测定: 参照汪天等^[5]改进的方法进行。

细胞壁结合态多胺氧化酶活性的测定: 细胞壁的分离参照赵旌旌等^[6]的方法进行。取试材根系 0.5 g, 分离得到细胞壁组织。加入 1.0 mL 磷酸缓冲液 (0.1 mol · L⁻¹, pH 6.5)、0.2 mL 显色液 (用 0.1 mol · L⁻¹, pH 6.5 的磷酸缓冲液配制, 100 mL 显色液中含 25 μL N, N-二甲基苯胺, 10 mg 4-氨基氨基吡啶)、0.1 mL 辣根过氧化物酶溶液 (250 U · mL⁻¹), 用 15 μL PAs (20 mmol · L⁻¹) 启动反应后, 充分混匀悬浮, 25 ℃ 静置 30 min, 10 000 ×g 离心 10 min (25 ℃), 上清液在波长 550 nm 处测光密度值, 以 0.001 OD₅₅₀ · min⁻¹ 为 1 个酶活单位 (U)。

H₂O₂ 的测定: 参照 Akio 等^[7]的方法, 并加以改进。称 0.5 g 鲜样试材, 加入 1.6 mL 预冷的 0.2 mol · L⁻¹ HClO₄ 冰浴研磨至匀浆后, 以 10 000 ×g 离心 5 min (4 ℃), 取上清液, 加 4 mol · L⁻¹ KOH 调 pH 值为 7.5, 以 10 000 ×g 离心 5 min (4 ℃), 取上清液 1 mL, 加 0.4 mL 显色液 (与测定多胺氧化酶显色液同) 和 0.1 mL 过氧化物酶溶液 (250 U · mL⁻¹), 充分混匀后立即测定波长 550 nm 处光密度值。以相同方法不同 H₂O₂ 浓度作标准曲线求相应 H₂O₂ 值。

每处理 30 株, 于处理的 0、2、4、6、8、10、12、14 d 取黄瓜幼苗根系进行测定。每次随机取 3 株, 每株取样后重复测定 3 次, 取平均数。试验重复 3 次。

所有数据均用 Microsoft Excel 和 SAS 统计软件分析。

2 结果与分析

2.1 黄瓜幼苗根系生长的变化

表 1 为处理第 10 天时黄瓜幼苗根系的生长情况。从表中可以看出, 根际低氧胁迫显著抑制黄瓜根系的生长, 平均单株根的总长、总表面积、总体积以及总根尖数分别为对照的 50.92%、69.1%、65.39% 和 51.99%, 但平均根径却有所增加。外源喷施 Spd 后可减轻低氧的伤害, 根的总长、总表面积、总体积以及总根尖数较低氧胁迫分别增加 47%、31%、40% 和 72%; 喷施多胺氧化酶抑制剂

则增加 23.16%、8.5%、14.62%和 46.45%。表明外源 PA s对低氧胁迫下黄瓜根系的生长有促进作用，而 PAO抑制剂通过对 PAO的抑制而调节植株体内 PA s水平，从而完成生理调节作用。

表 1 低氧胁迫下外源多胺及 PAO抑制剂对单株黄瓜幼苗根系生长的影响

Table 1 Effects of exogenous polyamine and inhibitor of PAO on growth of roots of cucumber seedlings

| 处理 Treatments | 总长 Total length (cm) | 总表面积 Total area (cm ²) | 总体积 Total volume (dm ³) | 平均单根径 Average diameter(mm) | 总根尖数 Total roots tip amount |
|---|-------------------------|---------------------------------------|--|-------------------------------|--------------------------------|
| 对照 Control(通气水培 Aeration hydroponics) | 1 263.75 a | 84.28 a | 5.23 a | 0.731 b | 4 037 a |
| A(低氧水培 Hypoxia hydroponics) | 643.53 c | 58.24 c | 3.42 c | 0.825 a | 2 099 d |
| B(低氧水培 + Guazatine Hypoxia + Guazatine) | 792.58 bc | 63.19 bc | 3.92 bc | 0.849 a | 3 074 c |
| C(低氧水培 + Spd Hypoxia + Spd) | 947.29 b | 76.36 b | 4.78 b | 0.722 b | 3 619 b |

注：每列字母不同表示邓肯氏新复极差检验在 5%水平上差异显著。

Note: Means within each column with the different letter are significantly different at $P=0.05$ level by Duncan's new multiple test

2.2 黄瓜幼苗根系多胺含量的动态变化

从图 1可以看出，低氧胁迫后第 2天，黄瓜幼苗根系中 Put即显著上升，第 4天达最大值，是同期对照的 2.71倍，随后平缓下降，在第 14天时已略低于对照；外施 Spd后，黄瓜幼苗根系内 Put含量显著高于低氧处理，第 6天达最大值，是同期低氧处理的 1.34倍，此后含量下降，但一直高于低氧处理，也高于对照；施用 PAO抑制剂后，PA s分解减少，Put不断积累，第 10天时达最大值，是同期低氧处理的 2.27倍，随后急剧下降。表明，低氧处理增加了黄瓜幼苗根系 Put的积累，外施 Spd和 PAO抑制剂也增加了低氧处理黄瓜幼苗根系 Put的积累。

黄瓜幼苗根系低氧胁迫后第 2天 Spd即显著上升，第 4天达最大值，是同期对照的 2.07倍，随后平缓下降，第 10天时急剧下降，在第 14天时已略低于对照；外施 Spd后，根系内 Spd含量显著高于低氧处理，第 8天达最大值时，是同期低氧处理的 1.44倍，此后含量下降，但一直显著高于低氧处理和对照；施用 PAO抑制剂后，Spd在第 8天时达最大值，是同期低氧处理的 1.66倍，随后急剧下降。表明，低氧处理增加了黄瓜幼苗根系 Spd的积累，外施 Spd和 PAO抑制剂也增加了低氧处理下黄瓜幼苗根系 Spd的积累。

黄瓜幼苗根系中 Spm的含量要远低于 Put和 Spd的含量，低氧胁迫后第 2天 Spm即开始显著上升，第 6天达最大值，是同期对照的 5.65倍，随后急剧下降，在第 10天后降至对照水平，12 d时显著低于对照；外施 Spd后，黄瓜幼苗根系内 Spm含量显著高于低氧处理，但在第 6天达最大值时，要略低于同期的低氧处理，此后含量下降，但一直显著高于低氧处理；施用 PAO抑制剂后，Spm在第 6天时达最大值，是同期低氧处理的 1.3倍，此后虽下降，但仍显著高于低氧处理。表明，

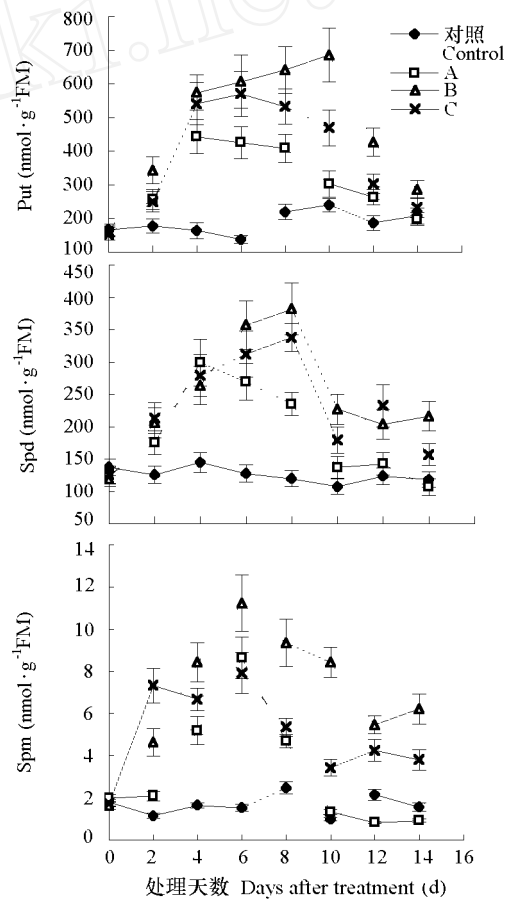


图 1 低氧胁迫下外源多胺及 PAO抑制剂对黄瓜幼苗根系多胺含量的影响
对照、A、B、C，见表 1。

Fig 1 Effects of exogenous polyamine and inhibitor of PAO on PA s content in roots of cucumber seedlings
Control, A, B, C, see Table 1.

低氧处理增加了黄瓜幼苗根系 Spm 的积累, 外施 Spd 和 PAO 抑制剂进一步增加了低氧处理下黄瓜幼苗根系中 Spm 的积累。

2.3 黄瓜幼苗根系多胺氧化酶活性的动态变化

从图 2 中可以看出, 不同处理下黄瓜幼苗根系中的细胞壁结合态 PAO 活性和游离态 PAO 活性变化趋势基本一致。低氧处理后 2 d, 细胞壁结合态 PAO 活性略低于对照, 第 4 天后显著高于对照和其它处理, 第 8 天时达最大值, 细胞壁结合态 PAO 活性是同期对照的 2.02 倍, 游离态 PAO 活性是同期对照的 1.55 倍, 随后开始下降, 但仍显著高于对照; 外施 Spd 和 PAO 抑制剂处理在观测期间 PAO 活性相对变动幅度不大, 且低于低氧处理, 尤其在第 8 天至第 10 天, 此后与低氧处理逐渐接近。值得注意的是, 细胞壁结合态 PAO 活性要远大于相应的游离态 PAO 活性 (8.54 ~ 13.17 倍), 而且变化趋势基本一致 ($R^2 = 0.8569 \sim 0.8992$)。表明游离态 PAO 来源于细胞壁结合态 PAO, PAO 活性主要定位于细胞壁上。

2.4 黄瓜幼苗根系 H_2O_2 含量的动态变化

从图 2 中可以看出, 低氧处理下黄瓜幼苗根系中的 H_2O_2 迅速积累, H_2O_2 含量第 8 天时达最大值, 是同期对照的 3.77 倍, 此后开始下降, 但显著高于其它处理和对照, 第 14 天时是同期对照的 2.57 倍。Spd 和 PAO 抑制剂处理后相对于低氧胁迫 H_2O_2 含量有不同程度的显著降低, 尤其是 Spd 处理的第 8 天 H_2O_2 含量达最大值时, 只有同期低氧处理的 48.64%。表明 Spd 和 PAO 抑制剂的处理可以降低低氧胁迫下根系 H_2O_2 含量。

3 讨论

PA s 对增强植物的抗逆性具有重要的作用。植物在盐胁迫下一般能够积累较多的 PA s^[8]; 低温预处理在减轻黄瓜冷害的同时, 延长了 Put 含量增加的过程^[9]。本试验中, 黄瓜根系中的 3 种 PA s 含量在低氧处理后的第 2 天开始显著上升, 分别在第 4 ~ 6 天达到最大值后下降, 第 12 ~ 14 天时 Spm 低于对照。而外源 Spd 和 PAO 抑制剂则明显减缓了多胺的下降, 结合表 1 表明, PA s 促进了低氧下根系的生长, 可缓解低氧胁迫对根系的伤害, PA s 参与了低氧逆境下的生理代谢, 是低氧胁迫下的应激产物。

PA s 以带电荷的氨基和亚氨基通过离子键、氢键和疏水作用等非共价键形式与核酸、蛋白质及带电荷的磷脂等相互作用, 调节其生理活性和功能, 进而控制代谢, 提高植物抗逆性^[10]。PA s 与膜上带负电的磷脂结合会中和膜上负电荷, 导致膜电势降低, 膜上静电特性的改变可以调节膜结合酶的活性, 影响到与能量偶联的离子渗透能力以及被动运输。通过降低质膜流动性, 促进膜稳定性的提高进而降低 H^+ 的跨膜扩散, 从而稳定细胞质的 pH 值, 而根细胞质 pH 的降低是低氧引起作物伤害的主要原因^[11]。PA s 不仅是阳离子, 而且是 H^+ 的载体, 它可以部分代替 SOD 的作用, 通过歧化反应达到

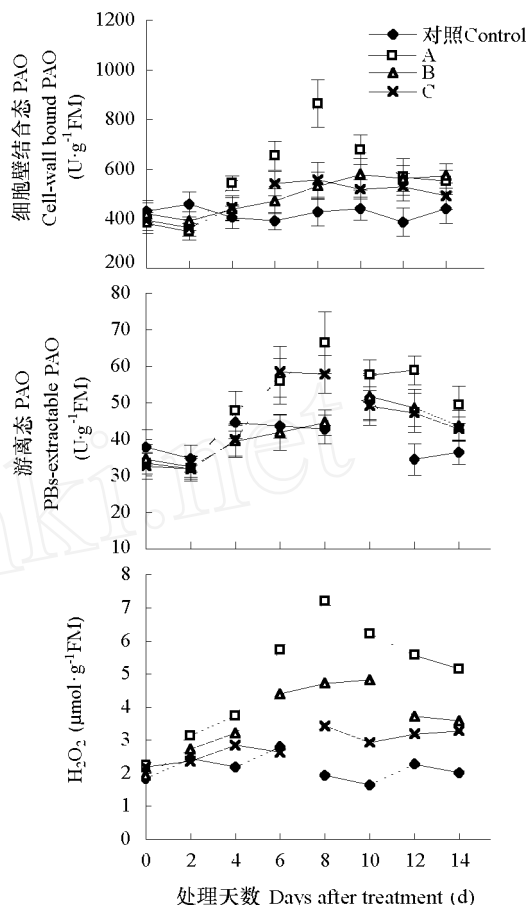


图 2 低氧胁迫下多胺及 PAO 抑制剂对黄瓜幼苗根系 PAO 活性和 H_2O_2 含量的影响

对照、A、B、C 见表 1。

Fig. 2 Effects of exogenous polyamine and inhibitor of PAO on PAO activities and H_2O_2 content in roots of cucumber seedlings

Control, A, B, C see Table 1.

有效清除自由基的目的,提高植物的抗逆性^[12]。

PA s由 PAO氧化脱氨基,生成醛、氨和 H_2O_2 ^[13],能调节内源 PA s水平,还对分解产物起着一定的生理作用。PAO活性主要定位于细胞壁^[14]。在盐胁迫下大麦幼苗根系细胞壁结合态 PAO第1天即上升,第3天时开始下降^[4]。本试验黄瓜幼苗根系 PAO活性在低氧胁迫下最初较低,第4天后显著升高,均在第8天时达到最大值,此后下降,但一直高于对照,这也与 PA s的变化一致。表明低氧逆境与盐逆境不同,低氧下细胞壁的酸性环境^[15]有利于 PAO活性的提高,而 PAO为适应性酶类,随着 PA s的变化而变化。PA s含量的增加促进了 PAO的提高,虽然通过 PAO抑制剂的应用发现低氧处理下黄瓜幼苗根系中 PA s的含量与细胞壁结合态 PAO的活性有一定的相关性 ($R^2 = 0.6838$),但与低氧处理相比,PA s的增加却减缓了 H_2O_2 含量的迅速积累,表明 H_2O_2 的产生有着多种途径,PAO氧化 PA s产生的 H_2O_2 不是构成对根系伤害的主要原因。有关多胺处理后减缓 H_2O_2 含量升高的机理以及多胺代谢中 H_2O_2 的作用,有必要通过试验进一步探讨。

参考文献:

- 1 Elisabeth T, Martin-Tanguy J. Polyamines, floral induction and floral development of strawberry. *Plant Growth Regulation*, 1995, 17: 157 ~ 165
- 2 Santa G A, Acosta P A M, Bolarin C. Changes in free polyamine levels induced by salt stress in leaves of cultivated and wild tomato species. *Physiol Plant*, 1997, 101: 341 ~ 346
- 3 刘 新, 张蜀秋, 姜成后. 植物体内一氧化氮的来源及其与其它信号分子之间的关系. *植物生理学通讯*, 2003, 39 (5): 513 ~ 518
Liu X, Zhang S Q, Lou C H. The sources of nitric oxide and its relationship to other signals in plants. *Plant Physiology Communications*, 2003, 39 (5): 513 ~ 518 (in Chinese)
- 4 刘 俊, 刘友良. 盐胁迫下大麦幼苗多胺的种类和状态与多胺氧化酶活性的关系. *植物生理与分子生物学学报*, 2004, 30 (2): 141 ~ 146
Liu J, Liu Y L. The relations between polyamine types and forms and polyamine oxidase activities in barley seedlings under salt stress. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 2004, 30 (2): 141 ~ 146 (in Chinese)
- 5 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 (3): 358 ~ 360
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 roots under hypoxia stress. *Plant Physiology Communications*, 2004, 40 (3): 358 ~ 360 (in Chinese)
- 6 中国科学院上海植物生理研究所, 上海市植物生理学会. 现代植物生理学实验指南. 北京: 科学出版社, 1999. 258 ~ 259
Shanghai Institute of Plant Physiology of Chinese Academy of Sciences, Shanghai Society for Plant Physiology. Guide for plant physiology experiments. Beijing: Science Press, 1999. 258 ~ 259 (in Chinese)
- 7 Akio Uchida, Andre T, Jagendorf, Takashi Hibino. Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice. *Plant Science*, 2002, 163: 515 ~ 523
- 8 赵福庚, 孙 诚, 章文华, 刘友良. 盐胁迫对大麦叶片类囊体膜上两种形态多胺含量和膜蛋白合成的影响. *植物生态学报*, 2003, 27 (1): 137 ~ 140
Zhao F G, Sun C, Zhang W H, Liu Y L. Effects of salt stress on the levels of covalently and noncovalently conjugated polyamines in leaf thylakoid membrane isolated from barley seedlings. *Acta Phytocologica Sinica*, 2003, 27 (1): 137 ~ 140 (in Chinese)
- 9 范 华, 冯双庆, 赵玉梅. 黄瓜、番茄冷害以及黄瓜温度预处理与多胺的相关性. *中国农业大学学报*, 1996, 1 (1): 108 ~ 112
Fan H, Feng S Q, Zhao Y M. The correlation of polyamines with chilling injury of cucumber and tomato and the treatments for alleviating chilling injury. *Journal of China Agricultural University*, 1996, 1 (1): 108 ~ 112 (in Chinese)
- 10 赵福庚, 孙 城, 刘友良, 刘兆普. 盐胁迫对大麦幼苗质膜、液泡膜上共价和非共价结合多胺含量的影响. *植物学报*, 2000, 42 (9): 920 ~ 926
Zhao F G, Sun C, Liu Y L, Liu Z P. Effects of salinity stress on the levels of covalently and noncovalently conjugated polyamines in plasma membrane and tonoplast isolated from barley seedlings. *Acta botanica Sinica*, 2000, 42 (9): 920 ~ 926 (in Chinese)
- 11 Roberts J K M, Andrade F H, Anderson I C. Further evidence that cytoplasmic acidosis is a determinant of flooding intolerance in plants. *Plant Physiology*, 1985, 77: 492 ~ 494
- 12 Sophis B, Ulrich K, Gerd A. Re-aeration following hypoxia or anoxia leads to activation of the antioxidative defense system in roots of wheat seedlings. *Plant Physiology*, 1998, 116: 651 ~ 658
- 13 Federico R, Angelini R. Biochemistry and physiology of polyamines in plants (Sbucum R D, Flores H E, eds). USA: CRC Press, 1991. 41 ~ 56
- 14 Kaur-Sawhney R, Flores H E, Galston A W. Polyamine oxidase in oat leaves: A cell wall-localized enzyme. *Plant Physiology*, 1981, 68: 494 ~ 498
- 15 潘瑞炽, 董思得. 植物生理学 (第三版). 北京: 高等教育出版社, 1995. 42 ~ 45
Pan R C, Dong Y D. Plant physiology (the third version). Beijing: Higher Education Press, 1995. 42 ~ 45 (in Chinese)