盐碱混合胁迫对裸燕麦幼苗叶片脯氨酸和多胺代谢的影响

刘建新* 王金成 刘秀丽

(甘肃省高校陇东生物资源保护与利用省级重点实验室, 陇东学院生命科学与技术学院, 甘肃庆阳 745000)

摘 要 为探讨裸燕麦对盐碱混合胁迫的脯氨酸(Pro)和多胺(PAs)响应机制,采用温室砂培试验,研究了低(25 mmol·L^{-1})、高(75 mmol·L^{-1})浓度盐碱混合胁迫0、1、3、5和7 d幼苗叶片Pro和PAs含量及相关代谢酶活性的变化。结果表明:与对照相比,盐碱混合胁迫在整个胁迫期间提高了裸燕麦叶片Pro含量,高浓度胁迫提高的幅度大于低浓度胁迫;低浓度胁迫下吡咯啉-5-羧酸合成酶(P5CS)活性提高,而鸟氨酸-δ-氨基转移酶(δ-OAT)和脯氨酸脱氢酶(ProDH)活性受抑;高浓度胁迫下δ-OAT活性提高,而P5CS和ProDH活性下降,说明低浓度胁迫下Pro合成以谷氨酸途径为主,高浓度胁迫下以鸟氨酸途径为主;低、高浓度盐碱混合胁迫下,游离态腐胺(Put)、亚精胺(Spd)和精胺(Spm)及结合态Spd和束缚态Spd、Spm含量提高,结合态Put、Spm和束缚态Put含量在胁迫1~5 d时提高,胁迫7 d时下降,且高浓度胁迫的变幅大于低浓度胁迫;Put/PAs和(cPAs+bPAs)/fPAs在胁迫1~3 d时提高,胁迫5~7 d时下降或变化不明显,(Spd+Spm)/Put的变化却相反;整个胁迫期间低浓度胁迫保持了较低的Put/PAs和较高的(Spd+Spm)/Put,(cPAs+bPAs)/fPAs除胁迫1 d时低浓度胁迫低于高浓度胁迫外,其余胁迫时间两浓度处理间差异不显著;精氨酸脱羧酶(ADC)和鸟氨酸脱羧酶(ODC)活性在低、高浓度盐碱混合胁迫期间提高,二胺氧化酶(DAO)活性在胁迫1~3 d下降或变化不大,胁迫5~7 d时升高,多胺氧化酶(PAO)活性的变化与DAO相反,且高浓度胁迫下ADC、ODC、DAO和PAO的变幅大于低浓度胁迫。说明盐碱混合胁迫初期(1~3 d)游离态PAs(fPAs)向结合态和束缚态PAs(cPAs+bPAs)转化增强,低浓度胁迫后期(5~7 d)Put向Spd和Spm转化的能力强于高浓度胁迫,但高浓度胁迫在整个胁迫期间PAs合成和分解的速率更高。

关键词 盐碱混合胁迫; 裸燕麦; 脯氨酸; 多胺

Effects of salt-alkaline mixed stress on proline and polyamine metabolism in leaves of naked oat seedlings. LIU Jian-xin*, WANG Jin-cheng, LIU Xiu-li (*College of Life Science and Technology, Longdong University, Provincial Key Laboratory for Protection and Utilization of Longdong Bio-resources in Gansu Province, Qingyang* 745000, *Gansu, China*).

Abstract: To explore the proline and polyamine metabolism-responsive mechanisms of naked oat (*Avena nuda*) under salt-alkaline mixed stress, a naked oat cultivar 'Dingyou No. 6' was cultured with perlite-sandy pot in greenhouse. The contents of proline and polyamine and the activities of proline and polyamine-metabolizing enzymes of naked oat leaves on 0, 1, 3, 5 and 7 days by the treatments using Hoagland nutrient solution added with mixed salt-alkali (molar ratio of $NaCl : Na_2SO_4 : NaHCO_3 : Na_2CO_3 = 12 : 8 : 9 : 1$) at 25 and 75 mmol·$L^{-1}$ were investigated after the seedlings had three leaves. The results showed that both low and high levels of salt-alkaline stress significantly increased the proline contents in leaves during the whole stress compared with the control, and the increment was higher under the high concentration stress. Activities of

甘肃省庆阳市科技计划项目(KZ2014-19)资助。
收稿日期: 2016-03-24 接受日期: 2016-07-30
*通讯作者 E-mail: liujx1964@163.com

pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS) in leaves were enhanced significantly under the low concentration stress, while the activities of ornithine-δ-aminotransferase (δ-OAT) and proline dehydragenase (ProDH) were inhibited obviously. The δ-OAT activities were enhanced significantly, but P5CS and ProDH activities were decreased obviously under the high concentration stress. These changes demonstrated that the proline in naked oat seedlings was mainly metabolized through the pathway of glutamate under low concentration stress, and an ornithine pathway was predominant under high concentration stress. Moreover, the contents of free putrescine (Put), free spermidine (Spd), free spermine (Spm), conjugated Spd, bound Spd and bound Spm in leaves were increased significantly in the whole period of both levels of stress, and the contents of conjugated Put, conjugated Spm and bound Put were increased significantly in the 1-5 days of salt-alkaline stress, but they were obviously decreased on day 7 under the same stress. All of these changes were more obvious under the high concentration stress than that under the low concentration stress. The values of Put/PAs and (cPAs+bPAs)/fPAs were increased significantly in the first 3 days, but decreased or without significant changes in the 5-7 days under the same stress, while the changes of (Spd+Spm)/Put demonstrated the contrary trend. Low concentration stress had lower Put/PAs value and higher (Spd+Spm)/Put value in the whole period, and the (cPAs+bPAs)/fPAs value was lower in the first day under the low concentration stress compared with the high concentration stress; during the 3-7 days, there were no significant differences between the two concentration treatments. Furthermore, the activities of arginine decarboxylase (ADC) and ornithine decarboxylase (ODC) were increased significantly in the whole period under each level of stress, and the diamine oxidase activities in the first 3 days of the stress decreased or slightly changed while a significant increase was observed in the 5-7 days. The change of polyamine oxidase (PAO) activities demonstrated the contrary to the DAO. These changes were much greater under the high concentration stress than under the low concentration stress. All of the results mentioned above suggested that salt-alkaline stress enhanced the capabilities for the transformation of free polyamine to conjugated and bound polyamines in the early period (1-3 days), and the low-concentration stress had stronger capabilities for the transformation of Put to Spd and Spm in the late period (5-7 days) compared with the high concentration stress, while the rate of PAs synthesis and decomposition in the whole period under the high concentration stress was faster than that under the low concentration stress.

Key words: salt-alkaline mixed stress; *Avena nuda*; proline; polyamine.

土壤盐碱化是生态环境恶化和农业发展的重要限制因素。据报道,全球有约 $1.5\times10^9\ hm^2$ 的盐碱地,中国盐碱地面积 $2.6\times10^7\ hm^2$(薛延丰等,2008)。植物体内盐分离子的积累会促进细胞碳氮代谢趋向合成渗透溶质以增强植株适应盐渍逆境的能力(李品芳等,2005)。脯氨酸(proline,Pro)和多胺(polyamines,PAs)是植物体内 2 种重要的渗透调节物质,具有调节离子平衡、降低细胞酸性和稳定蛋白质构象的作用(Aziz *et al.*,1998)。植物 Pro 的合成有谷氨酸(Glu)和鸟氨酸(Orn)2 条途径,Δ^1-吡咯啉-5-羧酸合成酶(Δ^1-pyrroline-5-carboxylate synthetase,P5CS)和鸟氨酸-δ-氨基转移酶(ornithine-δ-aminotransferase,δ-OAT)分别是两条途径的调控酶(He *et al.*,2002;Szabados *et al.*,2010)。脯氨酸脱氢酶(proline dehydrogenase,ProDH)是催化 Pro 降解的限速酶(Trovato *et al.*,2008)。PAs 是一类含两个和两个以上氨基的脂肪族含氮碱,主要包括腐胺(putrescine,Put)、亚精胺(spermidine,Spd)和精胺(spermine,Spm),以多聚阳离子形态存在,可与带负电荷的蛋白质、核酸和膜脂结合稳定细胞结构和功能(Aziz *et al.*,1998)。PAs 合成的途径一是鸟氨酸通过鸟氨酸脱羧酶(orhtinine decarboxylase,ODC)脱羧形成 Put,二是精氨酸经过精氨酸脱羧酶(arginine decarboxylase,ADC)形成鲱精胺(agmatine,Agm),进一步合成 Put。Spd 和 Spm 分别是在 Put 和 Spd 上增添一个氨丙基形成。二胺氧化酶(diamine oxidase,DAO)和多胺氧化酶(polytamine oxidase,PAO)是催化 PAs 降解的限速酶(Kavi Kishor *et al.*,2005)。

研究表明,盐胁迫下的黄瓜(*Cucumis sativus*)Put 积累,Pro 合成增加,且 Spd、Spm 和 Pro 的积累提高了黄瓜的耐盐性(段九菊等,2006)。Roosens 等(2002)研究发现,转 δ-OAT 基因烟草(*Nicotiana*

tabacum)在 NaCl 胁迫下 Pro 的积累比对照高且生物量大。王聪等(2011)对 NaCl 胁迫下两个耐盐性不同的菜用大豆(*Glycine max*)PAs 代谢的研究表明,耐盐品种 PAs 合成的能力比盐敏感品种强,Put 向 Spd 和 Spm 及游离态 PAs(fPAs)向结合态和束缚态 PAs(cPAs+bPAs)转化的能力也较强。碱性盐 Na_2CO_3 和 $NaHCO_3$ 胁迫下,碱地风毛菊(*Saussurea runcinata*)Pro 积累以鸟氨酸途径为主,而 Pro 降解在 $NaHCO_3$ 胁迫下的幼苗根系和叶片及 Na_2CO_3 胁迫下的根系中得到加强(夏方山等,2011)。这些研究表明,Pro 和 PAs 代谢参与植物对盐、碱胁迫的响应。然而,已有的研究多为单一中性盐胁迫(简称盐胁迫)或碱性盐胁迫(简称碱胁迫)下植物 Pro 和 PAs 代谢的变化,盐碱混合胁迫下 Pro 和 PAs 代谢的研究鲜见报道。

裸燕麦(*Avena nuda*)是燕麦属的一个亚种,盐碱抗性较强,被称为是改良盐碱地的先锋作物(范远等,2011)。我国裸燕麦的种植主要分布在内蒙古、河北、甘肃等省区,每年种植面积达 55 万 hm^2。积累 Pro 和可溶性糖及进行气孔排盐是裸燕麦适应盐碱胁迫的重要策略(王波等,2006)。本研究以“定莜 6 号”裸燕麦品种为实验材料,根据甘肃省裸燕麦栽培地土壤盐分的组成特点,研究低、高两种浓度盐碱混合胁迫对 Pro 和 PAs 含量及相关代谢酶活性的影响,探讨裸燕麦对盐碱混合胁迫的 Pro 和 PAs 代谢响应机制,以期为耐盐品种筛选和盐碱地高效利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料培养与试验方法

试验于 2015 年 4—9 月在甘肃省高校陇东生物资源保护与利用省级重点实验室和生物科技园日光温室进行。“定莜 6 号”裸燕麦种子由甘肃省定西市旱作农业科研推广中心提供。选饱满一致的种子播种在装有珍珠岩底部带孔塑料盆(口径 20 cm,高 14 cm)中,播量约 200 粒·盆$^{-1}$。浇水后置温室培养,温度为 16~32 ℃,湿度为 65%~80%,光照强度为 480~760 μmol·m^{-2}·s^{-1}。幼苗 2 叶 1 心期进行疏苗,每盆保留 120 株壮苗,3 叶 1 心期进行盐碱混合胁迫。根据甘肃省裸燕麦栽培地盐分组成,将中性盐 NaCl、Na_2SO_4 和碱性盐 $NaHCO_3$、Na_2CO_3 按 12∶8∶9∶1摩尔质量比配制盐碱混合溶液,设置 25 和 75 mmol·L^{-1}两个低、高浓度(用 Hoagland 营养液配制)进行根部浇灌幼苗处理,浇灌每天 19:00 进行,浇灌量约 1000 mL。以浇灌 Hoagland 营养液作为对照。每 8 盆为 1 个重复,重复 4 次,随机化排列。为防止盐碱冲击幼苗,高浓度处理提前进行,按每天 25 mmol·L^{-1}逐渐递增至 75 mmol·L^{-1},分别在达到设定浓度后的第 0、1、3、5、7 d 采集幼苗倒数第2~3片叶,用液氮速冻后置冰箱-80 ℃保存,检测相关指标。

1.2 指标测定方法

1.2.1 Pro 含量及 P5CS、δ-OAT 和 ProDH 活性 采用李合生(2000)的茚三酮显色法测定单位鲜重材料的 Pro 含量。P5CS、δ-OAT 和 ProDH 活性按赵贵林等(2011)的方法测定。以每小时 ΔOD_{535} 变化 0.01 表示一个 P5CS 活性单位(U);以每小时生成 1 mmol P5C 的量为一个 δ-OAT 活性单位(U);以每分钟 ΔOD_{600} 减少 0.001 为一个 ProDH 活性单位(U)。酶活性均以单位鲜重材料的活性单位数表示。

1.2.2 PAs 含量及 ADC、ODC、DAO 和 PAO 活性 按 Hu 等(2012)的方法浸提游离态、结合态和束缚态 PAs,用高效液相色谱仪(Dionex P680 型)检测单位鲜重材料 Put、Spd 和 Spm 含量,层析柱反相 C_{18} 柱(250 mm×4.6 mm),流动相 64% 甲醇,进样量 10 μL,流速 0.6 mL·min^{-1},柱温 25 ℃,波长 254 nm。

按段九菊等(2006)的方法浸提 ADC 和 ODC 酶液,活性检测参照 Hu 等(2012)的方法;DAO 和 PAO 酶液提取和活性测定参照汪天等(2004)的方法,以 0.001 ΔOD_{550}·min^{-1}为 1 个酶活力单位(U)。所有酶活性以单位鲜重材料的活力单位数表示。

1.3 数据分析

数据以平均值±标准差表示,SPSS 20.0 方差分析,Duncan 法多重比较($\alpha=0.05$)。

2 结果与分析

2.1 盐碱混合胁迫对裸燕麦幼苗叶片 Pro 含量的影响

由图 1 可见,盐碱混合胁迫导致裸燕麦叶片 Pro 含量显著提高,75 mmol·L^{-1}处理的提高幅度大于 25 mmol·L^{-1}处理;Pro 含量随盐碱胁迫处理时间延长呈先升后降变化,处理 5 d 时 Pro 含量最高,7 d 时转而下降。

2.2 盐碱混合胁迫对裸燕麦幼苗叶片 P5CS、δ-OAT和 ProDH 活性的影响

从图2可知,对照组裸燕麦叶片P5CS、δ-OAT

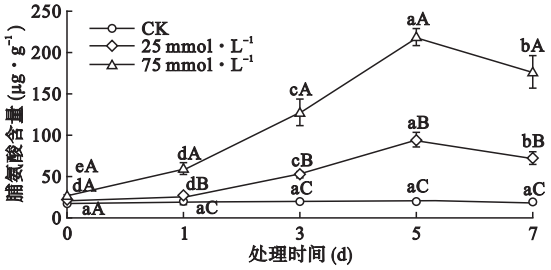


图 1 盐碱混合胁迫对裸燕麦幼苗叶片脯氨酸含量的影响

Fig.1 Effect of salt-alkaline mixed stress on proline contents in leaves of naked oat seedlings

不同小写字母表示同一浓度处理在不同时间差异显著,不同大写字母表示同一时间不同浓度处理间差异显著($P<0.05$)。

和 ProDH 活性在不同时间的变化不大。25 mmol · L^{-1}盐碱混合胁迫明显提高了 P5CS 活性,P5CS 活性在处理 5 d 时最高,7 d 时有所下降,但仍高于对照;75 mmol · L^{-1}处理下 P5CS 活性随处理时间延长不断降低。与对照相比,25 mmol · L^{-1}处理降低了 δ-OAT活性,并随处理时间延长 δ-OAT 活性先降后升,而 75 mmol · L^{-1}处理提高了 δ-OAT 活性,但随胁迫时间延长呈先升后降变化,处理 5 d 时活性最大,处理 7 d 时活性转而下降。盐碱混合胁迫下 ProDH 活性下降,75 mmol · L^{-1}处理的降幅大于 25 mmol · L^{-1};随处理时间延长,ProDH活性均呈先降后升趋势,处理 5 d 时活性最低,7 d 时有所升高,但仍低于胁迫前的活性。

2.3 盐碱混合胁迫对裸燕麦幼苗叶片 PAs 含量的影响

2.3.1 游离态 Put、Spd 和 Spm 含量的变化 如图 3 显示,25 和 75 mmol · L^{-1}处理均提高了裸燕麦叶片游离态 Put、Spd 和 Spm 含量,其中 75 mmol · L^{-1}处理的增幅大于 25 mmol · L^{-1};随胁迫时间延长,游离态 Put、Spd 和 Spm 含量呈明显增加后转向下降趋势,但对照组在不同时间的变化不大。

2.3.2 结合态 Put、Spd 和 Spm 含量的变化 从图 4 可见,对照组的结合态 Put、Spd 和 Spm 含量在不同时间无显著差异,高、低浓度盐碱混合胁迫下三者含量随时间不同变化迥异。25 mmol · L^{-1}盐碱混合胁迫下,裸燕麦叶片结合态 Put 含量在胁迫 1、3 d 时显著升高,增幅分别为 23.4%和 86.5%,胁迫 5 d 时下降至胁迫前水平,7 d 时显著降低。75 mmol · L^{-1}处理下,结合态 Put 含量于胁迫 1 d 时即出现峰值,此后显著下降。与对照相比,盐碱混合胁迫 1、3 d 的结合态 Put 含量显著提高,胁迫 5 d 时无显著差异,7 d 时明显下降。

25和75 mmol · L^{-1}盐碱混合胁迫提高了裸燕

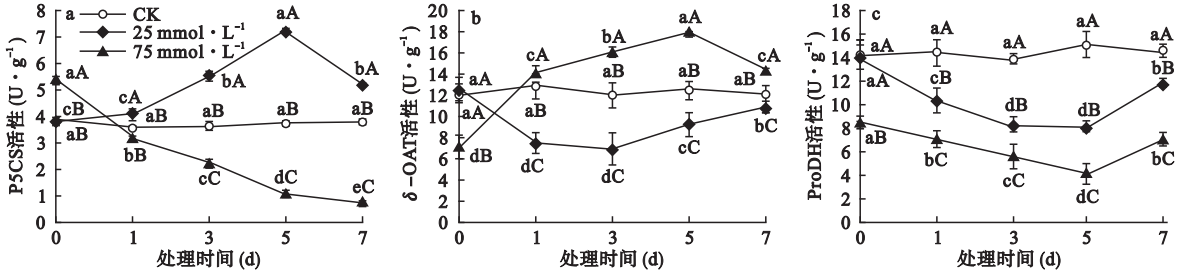


图 2 盐碱混合胁迫对裸燕麦幼苗叶片 P5CS、δ-OAT 和 ProDH 活性的影响

Fig.2 Effect of salt-alkaline mixed stress on P5CS, δ-OAT and ProDH activities in naked oat seedling leaves

不同小写字母表示同一浓度处理在不同时间差异显著,不同大写字母表示同一时间不同浓度处理间差异显著($P<0.05$)。

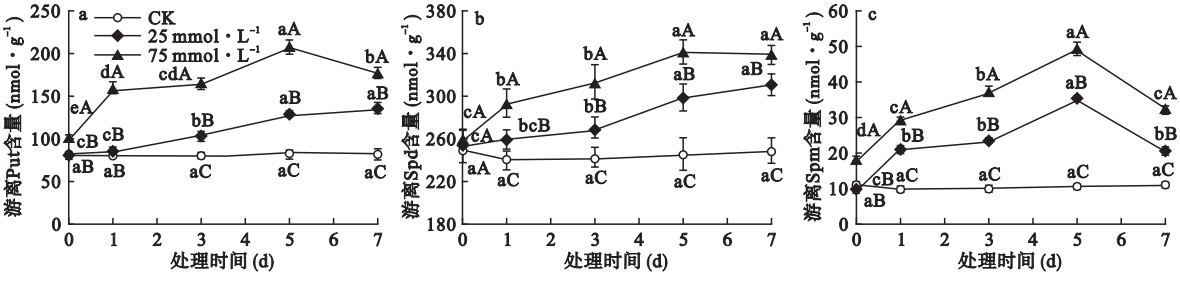


图 3 盐碱混合胁迫对裸燕麦幼苗叶片游离态 Put、Spd 和 Spm 含量的影响

Fig.3 Effect of salt-alkaline mixed stress on contents of free Put, Spd and Spm in naked oat seedling leaves

不同小写字母表示同一浓度处理在不同时间差异显著,不同大写字母表示同一时间不同浓度处理间差异显著($P<0.05$)。

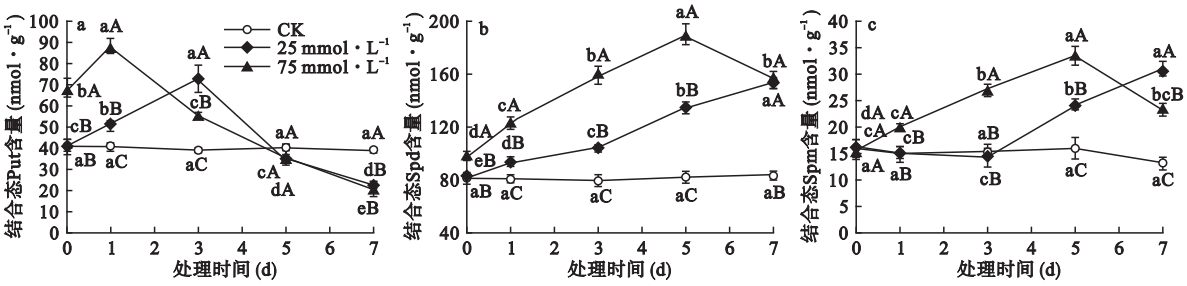


图 4 盐碱混合胁迫对裸燕麦幼苗叶片结合态 Put、Spd 和 Spm 含量的影响

Fig.4 Effect of salt-alkaline mixed stress on contents of conjugated Put, Spd and Spm in naked oat seedling leaves

不同小写字母表示同一浓度处理在不同时间差异显著,不同大写字母表示同一时间不同浓度处理间差异显著($P<0.05$)。

麦叶片结合态 Spd 含量,75 mmol · L^{-1}处理的增幅大于 25 mmol · L^{-1}。25 mmol · L^{-1}处理下结合态 Spd 含量随处理时间延长不断增加,75 mmol · L^{-1}处理的结合态 Spd 含量呈先升后降变化,处理 5 d 时出现最大值,7 d 时明显下降,但仍高于胁迫前的含量。

25 mmol · L^{-1}处理 1、3 d 时结合态 Spm 含量保持稳定,处理 5、7 d 时明显提高;75 mmol · L^{-1}处理的结合态 Spm 含量随处理时间延长先升后降,胁迫 5 d 时含量最高,7 d 时转而下降,但仍比胁迫前含量高。与对照相比,25 mmol · L^{-1}处理 1、3 d 的结合态 Spm 含量无显著差异,5、7 d 时显著提高;75 mmol · L^{-1}处理 1~5 d 时结合态 Spm 含量不仅高于对照,还显著高于 25 mmol · L^{-1}处理,7 d 时其含量高于对照但低于 25 mmol · L^{-1}处理。

2.3.3 束缚态 Put、Spd 和 Spm 含量的变化 由图 5 可知,25 和 75 mmol · L^{-1}盐碱混合胁迫下,裸燕麦叶片束缚态 Put 含量随处理时间延长先升后降,25 mmol · L^{-1}处理于胁迫 3 d 时出现峰值,胁迫 7 d 时显著低于胁迫前水平;75 mmol · L^{-1}处理在胁迫 1 d 时束缚态 Put 含量即出现峰值,此后快速下降,胁迫 5、7 d 时显著低于胁迫前含量。与对照相比,25 和 75 mmol · L^{-1}处理的束缚态 Put 含量于胁迫 1、3 d 时明显提高,且 75 mmol · L^{-1}处理的增幅大于 25 mmol · L^{-1},胁迫 5 d 时与对照差异不显著,胁迫 7 d 时显著低于对照,且 75 mmol · L^{-1}处理的含量低于 25 mmol · L^{-1}。

25 和 75 mmol · L^{-1}处理的束缚态 Spd 含量随时间延长先升后降,处理 5 d 时出现峰值,7 d 时转而下降,但仍高于胁迫前的含量。与对照相比,除 25 mmol · L^{-1}处理 1 d 时的含量差异不明显外,其余处理时间均升高,且 75 mmol · L^{-1}处理的束缚态 Spd 含量高于 25 mmol · L^{-1}。

25 和 75 mmol · L^{-1}处理的束缚态 Spm 含量随时间延长呈升-降-升趋势,胁迫 1 d 时其含量显著升高,胁迫 3 d 时明显下降,此后持续升高。与对照相比,25 和 75 mmol · L^{-1}处理均显著提高了束缚态 Spm 含量,但 25 和 75 mmol · L^{-1}处理间的差异不显著。

2.3.4 Put/PAs、(Spd + Spm)/Put 和 (cPAs + bPAs)/fPAs 的变化 图 6 显示,25 和 75 mmol · L^{-1}处理下裸燕麦叶片 Put/PAs 呈急剧增加后大幅下降,分别于胁迫 3 和 1 d 时达到峰值,7 d 时降至最低。25 mmol · L^{-1}处理在胁迫3 d时Put/PAs较对

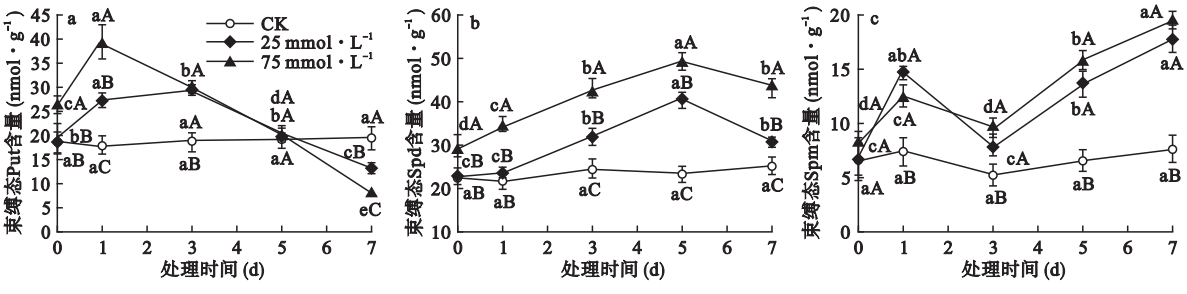


图 5 盐碱混合胁迫对裸燕麦幼苗叶片束缚态 Put、Spd 和 Spm 含量的影响

Fig.5 Effect of salt-alkaline mixed stress on contents of bound Put, Spd and Spm in naked oat seedling leaves

不同小写字母表示同一浓度处理在不同时间差异显著,不同大写字母表示同一时间不同浓度处理间差异显著($P<0.05$)。

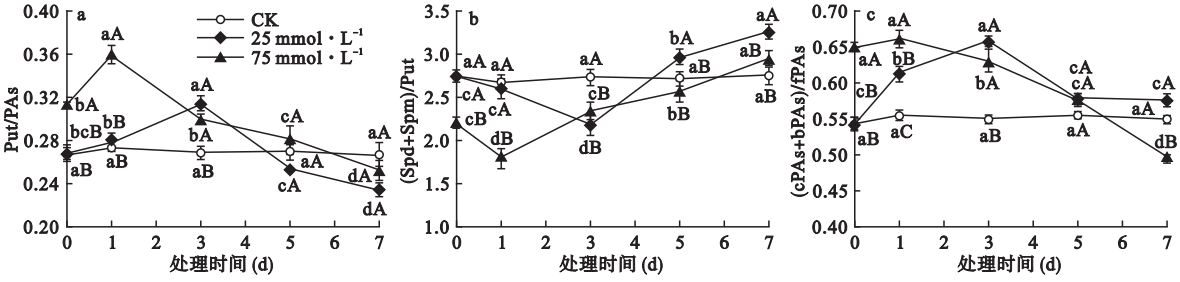


图 6 盐碱混合胁迫对裸燕麦幼苗叶片 Put/PAs、(Spd+Spm)/Put 和(cPAs+bPAs)/fPAs 的影响

Fig.6 Effect of salt-alkaline mixed stress on Put/PAs, (Spd+Spm)/Put and (cPAs+bPAs)/fPAs in naked oat seedling leaves

不同小写字母表示同一浓度处理在不同时间差异显著,不同大写字母表示同一时间不同浓度处理间差异显著($P<0.05$)。

照显著升高,5、7 d 时显著降低;75 mmol · L^{-1}处理在胁迫 1、3 d 时 Put/PAs 较对照显著提高,5、7 d 时与对照差异不显著,但明显高于 25 mmol · L^{-1}处理。

25 和 75 mmol · L^{-1}处理下(Spd+Spm)/Put 随时间延长先降后升,分别于胁迫 3 和 1 d 时其值最小。与对照相比,25 mmol · L^{-1}处理 3 d 时(Spd+Spm)/Put 显著降低,5、7 d 时明显升高;75 mmol · L^{-1}处理 1~5 d 时(Spd+Spm)/Put 低于对照,7 d 时差异不显著。除处理 3 d 外,其余时间 25 mmol · L^{-1}比 75 mmol · L^{-1}处理保持了相对较高的(Spd+Spm)/Put。

(cPAs+bPAs)/fPAs 值在 25 mmol · L^{-1}处理下先急剧增加后大幅下降,胁迫 3 d 时其值最大,7 d 时降至最低;75 mmol · L^{-1}处理下先小幅增加后平稳下降。胁迫 1、3 d 时 25 和 75 mmol · L^{-1}处理的(cPAs+bPAs)/fPAs 均高于对照,5 d 时差异不明显,7 d 时 25 mmol · L^{-1}处理与对照无显著差异,75 mmol · L^{-1}处理低于对照。75 mmol · L^{-1}处理 1 d 的(cPAs+bPAs)/fPAs 值大于 25 mmol · L^{-1},其余时间差异不显著或降低。

2.4 盐碱混合胁迫对裸燕麦幼苗叶片 ADC、ODC、DAO 和 PAO 活性的影响

ADC 和 ODC 是 PAs 合成的关键酶。25 mmol · L^{-1}处理下裸燕麦叶片 ADC 活性随时间延长不断提高,ODC 活性呈大幅递增后快速下降;75 mmol · L^{-1}处理的 ADC 和 ODC 活性随时间延长呈先升后降趋势(图 7)。与对照相比,25 和 75 mmol · L^{-1}处理的 ADC 和 ODC 活性均显著提高,且 75 mmol · L^{-1}的增幅大于 25 mmol · L^{-1}。

DAO 和 PAO 是分解 PAs 的限速酶。25 mmol · L^{-1}处理下 DAO 活性随时间延长略微下降后大幅升高;PAO 活性在处理 1~3 d 时快速提高,

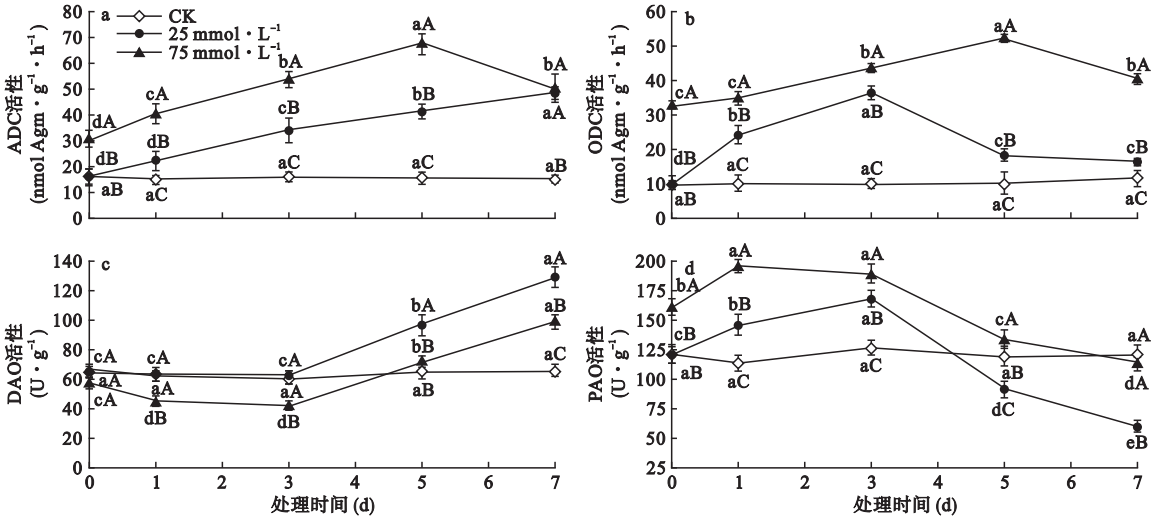


图 7 盐碱混合胁迫对裸燕麦幼苗叶片 ADC、ODC 和 DAO、PAO 活性的影响

Fig.7 Effect of salt-alkaline mixed stress on activities of ADC, ODC, DAO and PAO in naked oat seedling leaves

不同小写字母表示同一浓度处理在不同时间差异显著,不同大写字母表示同一时间不同浓度处理间差异显著($P<0.05$)。

5~7 d时又急剧下降。75 mmol·L^{-1}处理使DAO活性先降后升,而PAO活性先升后降。与对照相比,25 mmol·L^{-1}处理1、3 d时DAO活性无显著变化,5、7 d时明显升高;而PAO活性在胁迫1、3 d时显著升高,5、7 d时明显下降;75 mmol·L^{-1}处理1~5 d时DAO活性显著低于对照或差异不明显,且低于同期25 mmol·L^{-1}处理的DAO活性,处理7 d时DAO活性高于对照,但低于25 mmol·L^{-1}处理;而PAO活性在处理1~5 d时高于对照和25 mmol·L^{-1}处理,处理7 d时与对照差异不显著,但高于25 mmol·L^{-1}处理。

3 讨 论

盐碱胁迫下Pro积累不仅能够增强植物渗透调节能力,还对细胞蛋白质和膜系统具有保护作用(Ashraf *et al.*,2007)。本试验表明,盐碱混合胁迫提高了裸燕麦叶片Pro含量,且75 mmol·L^{-1}处理的增幅大于25 mmol·L^{-1}。这与NaCl胁迫下菊苣(*Cichorium intybus*)(王康等,2011)和$NaHCO_3$胁迫下碱地风毛菊(*Saussurea runcinata*)(夏方山等,2011)的响应一致。说明积累Pro是裸燕麦适应盐碱混合胁迫的重要防护反应,但这种保护超过一定的胁迫时间作用会下降,两浓度处理下Pro积累表现为持续增加5 d后转向下降(图1)。

Zhen等(2009)研究表明,盐胁迫下芦苇(*Phragmites australis*)Pro的合成主要通过Glu途径;NaCl胁迫下菊苣Pro的积累Glu和Orn途径均有贡献,低强度胁迫时以Glu途径为主,高强度胁迫时Orn途径占主导地位(王康等,2011);碱胁迫下碱地风毛菊Pro合成以Orn途径为主,且ProDH活性在$NaHCO_3$胁迫下的幼苗根系和叶片及Na_2CO_3胁迫下的根系中显著提高,而Na_2CO_3胁迫下的幼苗叶片中下降(夏方山等,2011)。本试验表明,盐碱混合胁迫下的裸燕麦幼苗在胁迫的1~7 d,25 mmol·L^{-1}处理提高了P5CS活性,而δ-OAT活性却明显下降,P5CS活性随处理时间延长的变化与Pro积累一致,δ-OAT活性随胁迫时间延长先降后升;75 mmol·L^{-1}处理下P5CS活性低于对照和25 mmol·L^{-1}处理,δ-OAT活性高于对照和25 mmol·L^{-1}处理,并随处理时间延长不断下降,而δ-OAT活性与Pro水平的变化一致(图1和图2)。说明在低浓度盐碱混合胁迫下裸燕麦Pro合成以Glu途径为主,尤其在胁迫初期(5 d前),胁迫后期(5 d后)随Glu合成途径的下降,Orn途径合成能力明显增强,这可能与P5CS受Pro反馈调节,而δ-OAT则不受Pro反馈抑制有关(Zhen *et al.*,2009);在高浓度盐碱混合胁迫下,裸燕麦Pro合成Orn途径占主导地位。

Put、Spd和Spm是常见的3种类型PAs,根据其在高氯酸中溶解性的不同分为游离态、结合态和束缚态。逆境条件下,植物体内PAs不仅发生含量变化,而且不同种类和形态PAs会发生相互转化(Alcázar *et al.*,2010)。张自坤等(2010)研究发现,用黑籽南瓜嫁接的黄瓜根系中游离态、结合态和束缚态Put、Spd和Sp含量及结合态和束缚态Put含量的提高有利于嫁接黄瓜提高对铜胁迫的适应能力。NaCl胁迫下耐盐菜用大豆品种较盐敏感品种在种子发育过程中维持了相对较高的PAs水平及较强的Put向Spd和Spm、游离态PAs向结合态PAs和束缚态PAs转化的能力(王聪等,2011)。本研究表明,25和75 mmol·L^{-1}盐碱混合胁迫均提高了裸燕麦幼苗叶片游离态Put、Spd和Spm含量,但75 mmol·L^{-1}处理的增幅更大;结合态和束缚态Put含量在胁迫初期(1~3 d)显著提高,且75 mmol·L^{-1}处理的含量高于25 mmol·L^{-1}或差异不显著,但在胁迫后期(5~7 d)其含量显著下降或变化不明显,且75 mmol·L^{-1}处理的含量低于25 mmol·L^{-1},而结合态和束缚态Spd和Spm含量明显提高,除胁迫7 d时结合态Spm含量75 mmol·L^{-1}处理低于25 mmol·L^{-1}处理外,其余处理时间均表现为75 mmol·L^{-1}处理大于25 mmol·L^{-1}。说明维持较高水平的各种类型PAs是裸燕麦适应更高强度盐碱胁迫的重要特征。

PAs的组成和比例与植物的抗盐性相关。大豆幼苗中(Spd+Spm)/Put增加及Put/PAs下降的幅度与其耐盐性呈正相关(於丙军等,2004)。盐胁迫下耐盐菜用大豆品种种子中Put/PAs低于盐敏感品种,而(Spd+Spm)/Put和(cPAs+bPAs)/fPAs却相反(王聪等,2011)。本研究显示,25和75 mmol·L^{-1}盐碱混合胁迫下,裸燕麦幼苗叶片中Put/PAs在胁迫初期(1~3 d)显著提高,胁迫后期(5~7 d)明显降低或变化不大,在整个处理期25 mmol·L^{-1}处理较75 mmol·L^{-1}处理具有较低的Put/PAs值。(Spd+Spm)/Put值在25和75 mmol·L^{-1}盐碱混合胁迫1~3 d下降,5~7 d提高,且25 mmol·L^{-1}较75 mmol·L^{-1}处理维持了相对较高的(Spd+Spm)/Put值。说明随着盐碱混合胁迫时间延长,裸燕麦Put

向 Spd 和 Spm 转化能力增强,低浓度胁迫下的转化能力强于高浓度胁迫。有研究指出,适量 Put 含量的增加能够提高苜蓿(*Medicago sativa*)对水分胁迫的抗性(Goicoechea *et al.*,1998),但过量 Put 积累却对转基因烟草(*Nicotiana tabacum*)造成了伤害(Panicot *et al.*,2002),盐胁迫下 Spd 和 Spm 含量的提高有利于水稻(*Oryza sativa*)抗盐性的增强(Roy *et al.*,2005)。裸燕麦幼苗在低浓度(25 mmol · L^{-1})盐碱混合胁迫下,叶片中较低水平的 Put/PAs 和较高的(Spd+Spm)/Put 值可能是其能够耐受的重要原因。(cPAs+bPAs)/fPAs 值在 25 和 75 mmol · L^{-1}盐碱混合胁迫前期(1~3 d))显著提高,胁迫后期(5~7 d)则变化不大,除胁迫 1 d 时 75 mmol · L^{-1}处理的(cPAs+bPAs)/fPAs 大于 25 mmol · L^{-1}外,其余胁迫时间均差异不显著。说明低、高浓度盐碱混合胁迫均增强裸燕麦胁迫前期游离态 PAs 向结合态和束缚态 PAs 的转化,这可能是其增强盐碱适应性的重要机制。

研究表明,拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)ADC 活性提高,Put 和 Spd 含量则增加(Urano *et al.*,2003),抑制 ADC 基因表达的拟南芥突变体在盐胁迫下 ADC 活性降低,PAs 合成减少,盐敏感性增强(Kasinathan *et al.*,2004)。本研究表明,盐碱混合胁迫下裸燕麦叶片 ADC 和 ODC 活性提高,且 75 mmol · L^{-1}处理的增幅大于 25 mmol · L^{-1}。说明盐碱混合胁迫下裸燕麦启动了 Put 合成的 Orn 和 Arg 途径,Put 合成的能力在高浓度胁迫下更强。DAO 催化 Put(二胺)的氧化分解。本研究表明,裸燕麦在盐碱混合胁迫初期(1~3 d)Put 降解速率较低,胁迫后期(5~7 d)分解速率提高,且高浓度处理的分解速率低于低浓度处理。据此推断,盐碱混合胁迫下的裸燕麦幼苗在胁迫后期 Put 含量下降分解可能不是主要原因,Put 向 Spd 和 Spm 转化的加强可能成为重要因素,但高浓度胁迫下相对较高的 Put 水平可能与相对较低的 DAO 活性有关。PAO 是催化 Spd(三胺)和 Spm(四胺)等 PAs 分解的关键酶。本研究中,盐碱混合胁迫提高了裸燕麦胁迫初期(1~3 d)的 PAO 活性,加速了 PAs 的分解,且 75 mmol · L^{-1}高浓度胁迫的分解速率大于 25 mmol · L^{-1}低浓度胁迫,这可能也是低浓度处理下(Spd+Spm)/Put 高于高浓度处理的重要原因。综上所述,裸燕麦幼苗 ADC 和 ODC 活性在高浓度盐碱混合胁迫更强的激活作用及相对较低的 DAO 活性可能促进了游离态 Put 的更多积累,Put 随即转化为 Spd 和 Spm,进而形成结合态和束缚态 PAs,但相对较高的 PAO 活性加速了 Spd 和 Spm 的分解,使高浓度胁迫的(Spd+Spm)/Put 低于低浓度胁迫。

4 结 论

低浓度(25 mmol · L^{-1})盐碱混合胁迫下,裸燕麦幼苗叶片 P5CS 活性升高,δ-OAT 和 ProDH 活性下降,Pro 积累是以 Glu 为主要途径合成增强和分解下降共同作用的结果;高浓度(75 mmol · L^{-1})盐碱混合胁迫下 δ-OAT 活性提高,P5CS 和 ProDH 活性下降,Pro 积累以 Orn 为主要途径合成增强和分解下降协同作用所致。高浓度胁迫下 Pro 积累高于低浓度胁迫的原因可能与高浓度胁迫下 ProDH 降幅更大有关。

高浓度盐碱混合胁迫下,相对较高的 ADC、ODC 和较低的 DAO 活性,维持了相对较高游离态、结合态和束缚态 PAs 水平;而相对较高的 PAO 活性可能是造成(Spd+Spm)/Put 低于低浓度胁迫的重要原因。

盐碱混合胁迫初期(1~3 d)Put/PAs 值提高,(Spd+Spm)/Put 值下降,胁迫后期(5~7 d)变化则相反,且低浓度胁迫具有更低的 Put/PAs 和较高的(Spd+Spm)/Put,说明低浓度盐碱混合胁迫后期更有利于 Put 向 Spd 和 Spm 的转化。

盐碱混合胁迫初期(1~3 d)(cPAs+bPAs)/fPAs 值提高,胁迫后期(5~7 d)变化不明显,且高、低浓度胁迫下的变化无差异,说明盐碱混合胁迫初期游离态 PAs 向结合态和束缚态 PAs 的转化能力更强。

参考文献

段九菊, 郭世荣, 樊怀福, 等. 2006. 盐胁迫对黄瓜幼苗根系脯氨酸和多胺代谢的影响. 西北植物学报, **26**(12): 2486-2492.

范 远, 任长忠, 李品芳, 等. 2011. 盐碱胁迫下燕麦生长及阳离子吸收特征. 应用生态学报, **22**(11): 2875-2882.

李合生. 2000. 植物生理生化实验原理和技术. 北京: 高等教育出版社.

李品芳, 白文波, 杨志成. 2005. NaCl 胁迫对苇状羊茅离子吸收与运输及其生长的影响. 中国农业科学, **38**(7): 1458-1565.

汪 天, 郭世荣, 刘 俊, 等. 2004. 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, **40**(3): 358-360.

王 波, 宋凤斌. 2006. 燕麦对盐碱胁迫的反应和适应性. 生态环境, **15**(3): 625-629.

王 聪, 朱月林, 杨立飞, 等. 2011. NaCl胁迫对菜用大豆种子多胺代谢的影响. 应用生态学报, **22**(11): 2883-2893.

王 康, 刘艳香, 董 洁, 等. 2011. 盐胁迫对菊苣幼苗脯氨酸积累及其代谢途径的影响. 草地学报, **19**(1): 102-106.

夏方山, 董秋丽, 董宽虎. 2011. 碱性盐胁迫对碱地风毛菊苗期脯氨酸代谢途径的影响. 中国草地学报, **33**(1): 48-53.

薛延丰, 刘兆普. 2008. 不同浓度NaCl和Na_2CO_3处理对菊芋幼苗光合及叶绿素荧光的影响. 植物生态学报, **32**(1): 161-167.

於丙军, 吉晓佳, 刘 俊, 等. 2004. 氯化钠胁迫下野生和栽培大豆幼苗体内的多胺水平变化. 应用生态学报, **15**(7): 1223-1226.

张自坤, 刘世琦, 刘素慧, 等. 2010. 嫁接对铜胁迫下黄瓜幼苗根系多胺代谢的影响. 应用生态学报, **21**(8): 2051-2056.

赵贵林, 陈 强, 胡国霞, 等. 2011. 水稻脯氨酸代谢关键酶对水分胁迫的响应. 干旱地区农业研究, **29**(3): 80-83.

Alcázar R, Altabella T, Marco F, *et al*. 2010. Polyamines: Molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. *Planta*, **231**: 1237-1249.

Ashraf M, Foolad MR. 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany*, **59**: 206-216.

Aziz A, Martin-tanguy J, Larher F. 1998. Salt-induced changes in polyamine and tyramine levels can regulate proline accumulation in tomato leaf discs treated with sodium chloride. *Physiologia Plantarum*, **104**: 1387-1394.

Goicoechea N, Szalai G, Antolin MC, *et al*. 1998. Influence of arbuscular mycorrhizae and rihizobium on free polyamines and proline levels in water-stress alfalfa. *Journal of Plant Physiology*, **153**: 706-711.

He LX, Nada K, Yoshihisa K, *et al*. 2002. Enhanced susceptibility interruption of chill-induced increase of S-adenosylmethionine decarboxylase activity in leaves of Spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Plant Cell Physiology*, **43**: 196-206.

Hu X, Zhang Y, Shi Y, *et al*. 2012. Effect of exogenous spermidine on polyamine content and metabolism in tomato exposed to salinity-alkalinity mixed stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, **57**: 200-209.

Kasinathan V, Wingler A. 2004. Effect of reduced arginine decarboxylase activity on salt tolerance and on polyamine formation during salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum*, **121**: 101-107.

Kavi Kishor PB, Sangam S, Amrutha RN, *et al*. 2005. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Current Science*, **88**: 424-438.

Panicot M, Masgrau C, Borrell A, *et al*. 2002. Effects of putrescine accumulation in tobacco transgenic plants with different expression levels of oat arginine decarboxylase. *Physiologia Plantarum*, **114**: 281-287.

Roosens NH, Bitar FA, Loenders K, *et al*. 2002. Overexpression of ornithine δ-arninotransferase increase proline biosynthesis and confers osmotolerance in transgenic plants. *Molecular Breeding*, **9**: 73-80.

Roy P, Niyogi K, Sengupta DN, *et al*. 2005. Spermidine treatment to rice seedlings recovers salinity stress-induced damage of plasma membrane and PM-bound H^+-ATPase in salt-tolerant and salt-sensitive rice cultivars. *Plant Science*, **168**: 583-591.

Szabados L, Savouré A. 2010. Proline: A multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science*, **15**: 89-97.

Trovato M, Mattioli R, Costantino P. 2008. Multiple roles of proline in plant stress tolerance and development. *Rendiconti Lincei: Scienze Fisiche e Naturali*, **19**: 325-346.

Urano K, Yoshiba Y, Nanjo T, *et al*. 2003. Characterization of *Arabidopsis* genes involved in biosynthesis of polyamines in abiotic stress responses and developmental stages. *Plant, Cell and Environment*, **26**: 1917-1926.

Zhen WB, Ma QH. 2009. Proline metabolism in response to salt stress in common reed [*Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud]. *Botanica Marina*, **52**: 307-315.

作者简介 刘建新,男,1964年生,教授,主要从事植物生理生态与细胞信号转导研究。E-mail: liujx1964@163.com

责任编辑 李凤芹