

外源鸟氨酸对菹草 (*Potamogeton crispus* L.) 抗镉胁迫能力的影响*

夏海威, 吴娟, 黄敏, 施国新**, 乔绪强, 陈霖, 姜岩, 汪鹏合

(南京师范大学生命科学学院, 江苏省生物多样性与生物技术重点实验室, 南京 210023)

摘要: 本文以组织培养技术培养的菹草无菌苗为实验材料, 研究了 2 mmol/L 外源鸟氨酸 (L-Orn) 对 40 $\mu\text{mol/L}$ 镉 (Cd) 胁迫下菹草体内 Cd 含量、光合色素水平、超氧阴离子 ($\text{O}_2^{\cdot-}$) 产生速率、过氧化氢 (H_2O_2)、丙二醛 (MDA) 与可溶性蛋白含量以及脯氨酸和多胺代谢的影响。结果显示: (1) 在单一 Cd 胁迫下, 菹草体内的 Cd 大量积累, 达到 335.00 $\mu\text{g/g}$, 并诱导了明显的氧化胁迫, 具体表现为 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 产生速率以及 H_2O_2 和 MDA 含量显著升高, 可溶性蛋白以及光合色素含量明显下降。外源 L-Orn 的添加很大程度上抑制了菹草体内 Cd 的积累, Cd 含量降至 232.50 $\mu\text{g/g}$, 并降低了活性氧 (ROS) 水平, 减轻了膜脂过氧化程度, 减缓了光合色素和可溶性蛋白的分解。 (2) 在单一 Cd 胁迫下, 伴随着吡咯啉-5-羧酸合成酶 (P5CS) 活性的增加和脯氨酸脱氢酶 (ProDH) 活性的下降, 菹草体内的脯氨酸含量轻微增加, 仅为对照组的 1.91 倍, 而外源 L-Orn 显著增强了 P5CS 和 δ -鸟氨酸转氨酶 (OAT) 的活性, 使脯氨酸含量大幅度升高, 为对照组的 8.36 倍。 (3) 单一 Cd 胁迫分别通过激活精氨酸脱羧酶 (ADC)、鸟氨酸脱羧酶 (ODC) 和多胺氧化酶 (PAO) 的活性, 使腐胺 (Put) 的含量增加, 亚精胺 (Spd) 和精胺 (Spm) 含量减少。而施用外源 L-Orn 后, ADC 和 ODC 的活性进一步增强, Put 的含量大幅增加, 并促进 Put 向 Spd 和 Spm 的转化, 同时 PAO 的活性下降, 使 Spd 和 Spm 含量增加, 从而使总多胺含量增加。由此可见, 外施 L-Orn 可通过抑制 Cd 的进入和参与调节脯氨酸以及多胺代谢, 抑制 ROS 的积累、膜脂过氧化、光合色素以及蛋白质的分解, 一定程度上增强菹草对 Cd 胁迫的抗性。

关键词: 菹草; 镉; 鸟氨酸; 氧化胁迫; 脯氨酸; 多胺

Effects of exogenous ornithine on resistance of *Potamogeton crispus* L. to cadmium stress

XIA Haiwei, WU Juan, HUANG Min, SHI Guoxin, QIAO Xuqiang, CHEN Lin, JIANG Yan & WANG Penghe
(Jiangsu Key Lab of Biodiversity and Biotechnology, College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, P. R. China)

Abstract: Sterile of *Potamogeton crispus* L. cultured by tissue culture technology, were used as experimental materials. In this study, the effects of 2 mmol/L exogenous ornithine (L-Orn) application on Cd accumulation, superoxide anion ($\text{O}_2^{\cdot-}$) generation rate, photosynthetic pigments, hydrogen peroxide (H_2O_2), malondialdehyde (MDA) and soluble protein contents, as well as the metabolisms of proline and polyamines under 40 $\mu\text{mol/L}$ Cd stress were investigated. Results indicated that (1) Cd addition alone promoted a substantial accumulation of Cd to 335.00 $\mu\text{g/g}$ and apparently induced oxidative stress, specific performance as follows: obviously raised $\text{O}_2^{\cdot-}$ generation rate, H_2O_2 and MDA contents, as well as decreased photosynthetic pigments and soluble protein contents. Meanwhile, exogenous application of L-Orn markedly inhibited the accumulation of Cd to 232.50 $\mu\text{g/g}$, reduced ROS level, alleviated membrane lipid peroxidation and retarded the degradation of photosynthetic pigments and soluble protein. (2) Single Cd treatment slightly increased proline content to 1.91-fold than control by activating pyrroline-5-carboxylate (P5CS) activity and restraining proline dehydrogenase (ProDH) activity, whereas exogenous addition of L-Orn further activated P5CS and ornithine- δ -aminotransferase (OAT) activities, thus significantly increasing proline accumulation to 8.36-fold than control. (3)

* 江苏高校优秀学科建设工程项目 (164320H106) 资助。2013-05-10 收稿; 2013-06-24 收修稿。夏海威 (1988~), 男, 硕士研究生; E-mail: xiahaiweiwww@163.com.

** 通信作者; E-mail: gxshi@nynu.edu.cn.

Cd exposure alone enhanced arginine decarboxylase (ADC), ornithine decarboxylase (ODC) and polyamine oxidase (PAO) activities, as a result, increasing putrescine (Put) content and reducing spermidine (Spd) and spermine (Spm) contents. However, adjunction of exogenous L-Orn sharply added Put content by strengthening ADC and ODC activities compared with single Cd treatment, and encouraged Put to transform into Spd and Spm, moreover reduced PAO activity, hence raised Spd and Spm contents, finally increased total polyamines content. The results demonstrated that the supplement of exogenous L-Orn restrained ROS accumulation, membrane lipid peroxidation and the degradation of photosynthetic pigments and soluble protein thought inhibiting the accumulation of Cd and involving in regulation of proline and polyamines metabolisms, consequently to a certain extent enhanced Cd stress tolerance of *Potamogeton crispus* L.

Keywords: *Potamogeton crispus* L.; cadmium; ornithine; oxidative stress; proline; polyamines

在采矿、冶金和化工等行业中,大量的重金属通过各种途径进入土壤、水体中,造成不同程度的环境污染,且能通过食物链危及人体健康^[1]. 其中 Cd 是环境中主要的重金属污染物之一,也是生物毒性最强的重金属之一,它对植物的毒害表现在生理、生化、细胞和分子等水平,如失绿、生长抑制、光合作用和蛋白质合成紊乱、活性氧积累、脂质过氧化以及营养失衡和超微结构损伤等^[2-5]. 其中,氧化胁迫是重金属对植物造成毒害的重要途径,光合色素、超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)产生速率、丙二醛(MDA)、过氧化氢(H_2O_2)以及可溶性蛋白含量的变化常作为衡量氧化胁迫的指标^[6-8].

L-Orn 是植物体中的一种非必需氨基酸,在脯氨酸和多胺合成过程中起着十分重要的作用^[9]. L-Orn 在 δ -鸟氨酸转氨酶(OAT)的作用下生成脯氨酸,脯氨酸是植物体内的渗透调节物质,主要以游离状态广泛存在于植物体中,除参与渗透调节以外,还有保护蛋白质、生物膜、亚细胞结构以及清除活性氧等功能^[10-11]. 另外,L-Orn 在鸟氨酸脱羧酶(ODC)的催化下可生成腐胺(Put),Put 经亚精胺合成酶(SPDS)催化生成亚精胺(Spd),Spd 在精胺合成酶(SPMS)作用下合成精胺(Spm). 多胺是广泛存在于生物体内的一类具有生物活性的低分子量脂肪族含氮生物碱,不仅能够促进植物体的生长发育,而且与植物体的抗逆性也有密切的关系,如 Shen 等^[12]发现 Put、Spd 和 Spm 都能够缓解低温胁迫对南瓜叶片造成的膜脂过氧化,Durmu 等^[13]的研究表明 Put 和 Spm 能够增强玉米抵抗百草枯造成的氧化胁迫能力,Xu 等^[14]的研究表明 Spd 能够缓解 Cu 胁迫对空心莲子菜造成的氧化伤害. 一方面脯氨酸和多胺的抗氧化作用已经得到了大量的研究证实^[37-38,43],另一方面在胁迫条件下植物细胞也会积累大量的 L-Orn^[15-16],这些都暗示了作为两者共同前体的 L-Orn 可能在某种程度上也能够缓解逆境胁迫对植物造成的伤害.

然而,目前关于 L-Orn 缓解效果的研究多集中在动物^[17-18]以及植物对其他胁迫的研究上^[19],对水生植物重金属胁迫的研究却很少涉及. 本实验以组织培养技术培养的菹草无菌苗为实验材料,采用在营养液中添加外源 L-Orn 的方法,研究其对镉胁迫下菹草的氧化损伤、脯氨酸和多胺代谢的影响,以探讨外源 L-Orn 提高菹草抗 Cd 胁迫能力的生理生化机制,为 L-Orn 在水生植物抵御重金属胁迫方面提供一定的理论依据,为水生植物抗性生理研究增添新的素材.

1 材料和方法

1.1 实验材料

菹草(*Potamogeton crispus* L.)隶属于眼子菜科(Potamogetonaceae)眼子菜属(*Potamogeton*),为多年生水生草本植物. 实验所用的菹草采自南京市琵琶湖水域,以幼嫩菹草带节间的茎段培养的无菌苗为实验对象.

1.2 实验方法

1.2.1 菹草无菌苗的培养 参照高健等^[20]的方法并作适当修改,选取幼嫩菹草靠近顶端的粗壮茎段作为外植体,用清水冲洗干净,在无菌环境中依次经过 5% 的 H_2O_2 消毒 15 min,无菌水冲洗 3 次,10% 次氯酸钠消毒 30 s,无菌水冲洗 5 次,之后将菹草带侧芽的茎段剪成约 1 cm 左右,辨认形态学上端后,插入含 6-BA (2.0 mg/L) 和 IBA (0.5 mg/L) 的 MS 培养基中诱导芽分化. 待茎间侧芽长至 2 cm 左右时,将其转入含 6-BA (1.0 mg/L) 的继代培养基中培养. 1 个月后,转入灭菌的 1/10 Hogland 培养液中进行生根培养. 整个组培过程在培养室中完成,光暗周期比为 16 h: 8 h,光照强度为 240 ~ 300 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,光照温度为 25 $^{\circ}\text{C}$: 18 $^{\circ}\text{C}$ (L:D).

1.2.2 菹草无菌苗的实验处理 选取大小相似,生长状况一致的菹草无菌苗,然后将这些植株分成3组进行处理.对照(CK)组:用1/10 Hoagland 营养液培养;Cd处理组:用含40 $\mu\text{mol/L}$ CdCl_2 (根据预实验结果选择)的1/10 Hoagland 营养液培养;Cd + L-Orn处理组:在含有40 $\mu\text{mol/L}$ CdCl_2 的1/10 Hoagland 营养液中加入2 mmol/L L-Orn (根据预实验结果选择),2天更换一次培养液.材料处理期间与无菌苗培养时的条件保持一致,实验设置3次重复.5 d后,去离子水洗净、揩干,进行各项生理指标的测定,菹草的量用鲜重表示.

1.2.3 Cd含量的测定 称取0.2 g菹草叶片,硝酸和高氯酸消化后,用电感耦合等离子原子发射光谱仪(ICP-AES, USA)进行测定.

1.2.4 叶绿素和类胡萝卜素含量测定 称取0.2 g菹草叶片,用80%的丙酮冰浴研磨,离心,用分光光度计(Thermo GENESYS 10, USA)测定470、647和663 nm处的吸收度值,按 Lichtenthaler^[21]的公式计算.

1.2.5 O_2^- 产生速率、 H_2O_2 、MDA和可溶性蛋白含量的测定 O_2^- 产生速率采用王爱国等^[22]的方法测定; H_2O_2 的含量用南京建成生物工程研究所的 H_2O_2 试剂盒(序号:A046)测定;MDA含量参考文献[23]的方法测定.可溶性蛋白含量采用考马斯亮蓝 G-250 法^[24]测定,以牛血清蛋白(BSA)(Sigma, USA)为标准蛋白.

1.2.6 脯氨酸含量及P5CS、OAT、ProDH活性的测定 脯氨酸含量用酸性茚三酮法^[25]测定;吡咯啉-5-羧酸合成酶(P5CS)的活性用 García-Ríos 的方法^[26]测定,以0.01 $\Delta\text{OD}_{340} \text{ min}^{-1}$ 为1个酶活单位(U);鸟氨酸转移酶(OAT)的活性参照 Kim 的方法^[27],以100 ΔOD_{310} 为1个酶活单位(U);脯氨酸脱氢酶(ProDH)的酶活采用 Rena 的方法^[28]测定,以0.001 $\Delta\text{OD}_{340} \text{ min}^{-1}$ 为1个酶活单位(U).

1.2.7 多胺含量及多胺酶活性的测定 多胺含量采用 Aziz 等的方法^[29]测定;精氨酸脱羧酶(ADC)和鸟氨酸脱羧酶(ODC)的活性测定采用参照赵福庚等的方法^[30];多胺氧化酶(PAO)和二胺氧化酶(DAO)的活性根据汪天等的方法^[31]进行测定.

1.3 统计分析

实验结果为3次实验的平均值 \pm 标准差,用 Excel 和 SPSS 17.0 软件完成原始数据处理和制图.各指标不同处理间进行单因素方差分析, $P \geq 0.05$ 表示无显著差异; $P < 0.05$ 表示差异显著; $P < 0.01$,表示差异极显著.本文图表中不同小写字母表示数值之间差异显著($P < 0.05$),相同小写字母之间表示差异不显著.

2 结果与分析

2.1 外源 L-Orn 对 Cd 胁迫下菹草 Cd 含量的影响

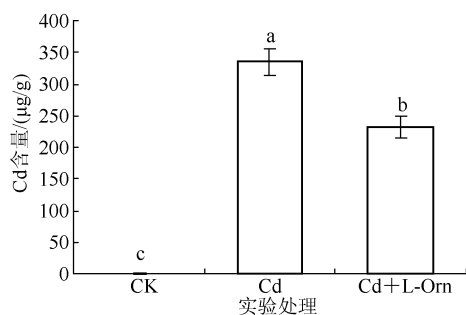


图1 外源 L-Orn 对 Cd 胁迫下菹草 Cd 含量的影响

Fig. 1 Effect of exogenous L-Orn on Cd content in *P. crispus* under Cd stress

单一40 $\mu\text{mol/L}$ Cd处理条件下,菹草体内的Cd含量达到了335.00 $\mu\text{g/g}$,而加入2 mmol/L L-Orn后,菹草体内的Cd含量降至232.50 $\mu\text{g/g}$,比单一Cd处理降低了30.67% ($P < 0.05$) (图1).

2.2 外源 L-Orn 对 Cd 胁迫下菹草光合色素含量的影响

单一Cd胁迫后叶绿素a、叶绿素b、类胡萝卜素和叶绿素总含量分别为对照组的65.96% ($P < 0.01$)、51.44% ($P < 0.01$)、77.94% ($P < 0.05$)和63.86% ($P < 0.01$),而施用外源L-Orn后,上述指标分别达到了对照组的85.22%、68.05%、103.68%、83.21% (表1).统计分析表明,Cd + L-Orn处理组与单一Cd处理组之间叶绿素a和类胡萝卜素含量有显著性差异($P < 0.05$),叶绿素b和总叶绿素含量有极显著差异($P < 0.01$).由此可见,外源L-Orn在一定程度上抑制了Cd胁迫所造成的光合色素的降解.

表1 外源 L-Orn 对 Cd 胁迫下菹草光合色素含量的影响
Tab.1 Effects of exogenous L-Orn on photosynthetic pigments content in *P. crispus* under Cd stress

实验处理	叶绿素 a/(mg/g)	叶绿素 b/(mg/g)	类胡萝卜素/(mg/g)	总叶绿素/(mg/g)
对照组	1.407 ± 0.068 ^a	0.554 ± 0.010 ^a	0.272 ± 0.017 ^a	2.233 ± 0.095 ^a
Cd 处理组	0.928 ± 0.054 ^c	0.285 ± 0.003 ^c	0.212 ± 0.022 ^b	1.426 ± 0.073 ^c
Cd + L-Orn 处理组	1.199 ± 0.029 ^b	0.377 ± 0.014 ^b	0.282 ± 0.006 ^a	1.858 ± 0.037 ^b

2.3 外源 L-Orn 添加对 Cd 胁迫下菹草 O₂⁻ 产生速率、H₂O₂、MDA 和可溶性蛋白含量的影响

单一 Cd 胁迫后菹草 O₂⁻ 产生速率和 H₂O₂ 含量升高,分别为对照组的 1.28 倍($P < 0.05$)和 1.89 倍($P < 0.01$),而外源 L-Orn 显著降低了 O₂⁻ 的产生速率和 H₂O₂ 的含量,分别降为 Cd 处理组的 84.79% ($P < 0.05$)和 79.98% ($P < 0.05$)(图 2A 和图 2B).

MDA 是膜质过氧化作用的主要产物,其含量是反映膜质过氧化作用强弱和质膜受破坏程度的重要标志.单一 Cd 胁迫使菹草 MDA 的含量升高,为对照组的 1.19 倍($P < 0.05$),而外源 L-Orn 显著降低了菹草 MDA 的含量,仅为 Cd 处理组的 84.28% ($P < 0.05$)(图 2C).

Cd 胁迫降低了菹草可溶性蛋白的含量,其含量仅为对照组的 69.29% ($P < 0.01$),而施用外源 L-Orn 显著缓解了这种下降趋势,其含量达到对照组的 84.22% ($P < 0.05$).统计分析表明,Cd + L-Orn 处理组与单一 Cd 处理组之间可溶性蛋白含量的差异达到显著水平($P < 0.05$)(图 2D).

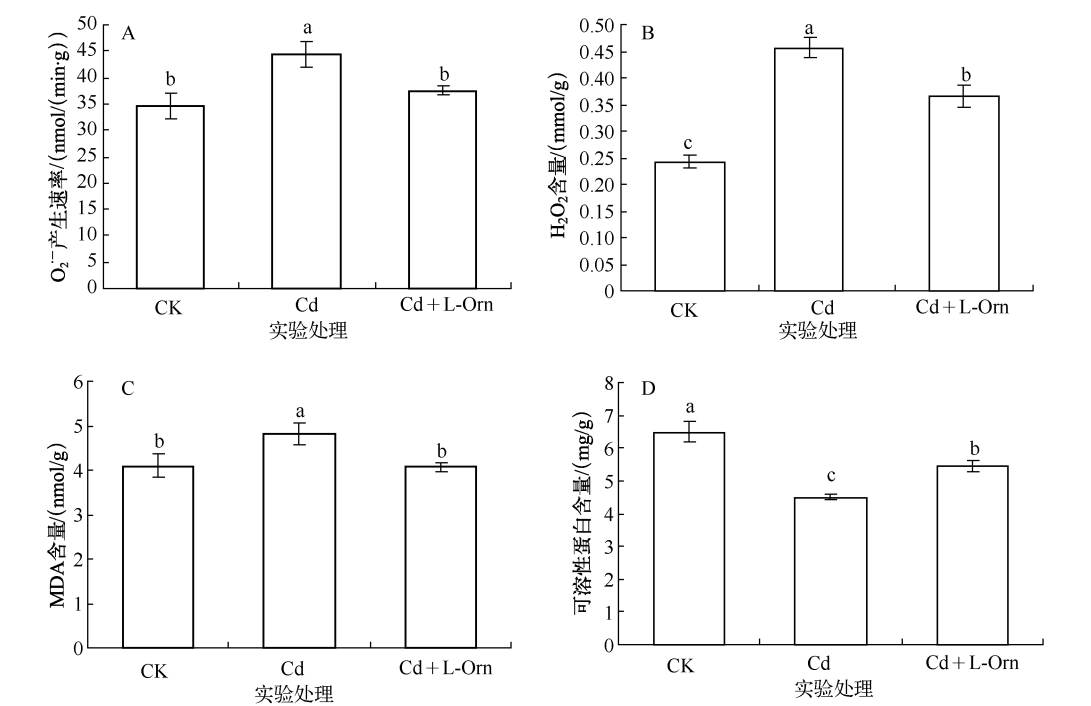


图2 外源 L-Orn 对 Cd 胁迫下菹草 O₂⁻ 产生速率以及 H₂O₂、MDA 和可溶性蛋白含量的影响

Fig.2 Effect of exogenous L-Orn on O₂⁻ generation rate and H₂O₂, MDA, and soluble protein contents in *P. crispus* under Cd stress

2.4 外源 L-Orn 对 Cd 胁迫下菹草脯氨酸含量及其代谢酶活性的影响

2.4.1 外源 L-Orn 对 Cd 胁迫下菹草脯氨酸含量的影响 菹草脯氨酸含量在单一 Cd 胁迫下升高,为正常水平的 1.91 倍($P < 0.05$),而施用外源 L-Orn 后,菹草脯氨酸含量急剧上升,为 Cd 处理组的 8.36 倍($P < 0.01$)(图 3A).

2.4.2 外源 L-Orn 对 Cd 胁迫下菹草脯氨酸代谢酶活性的影响 单一 Cd 胁迫后菹草 P5CS 的活性升高,为对照组的 1.32 倍 ($P < 0.05$),添加外源 L-Orn 后,P5CS 和 OAT 的活性分别为 Cd 处理组的 1.49 倍 ($P < 0.05$) 和 5.26 倍 ($P < 0.01$) (图 3B 和图 3C). 单一 Cd 胁迫后菹草 ProDH 活性降低,为对照组的 75.35% ($P < 0.05$),外源 L-Orn 进一步降低了 ProDH 的活性,仅为对照组的 64.4% ($P < 0.05$),然而 ProDH 在单一 Cd 胁迫组与 Cd + L-Orn 处理组之间无显著相关性 ($P > 0.05$) (图 3D).

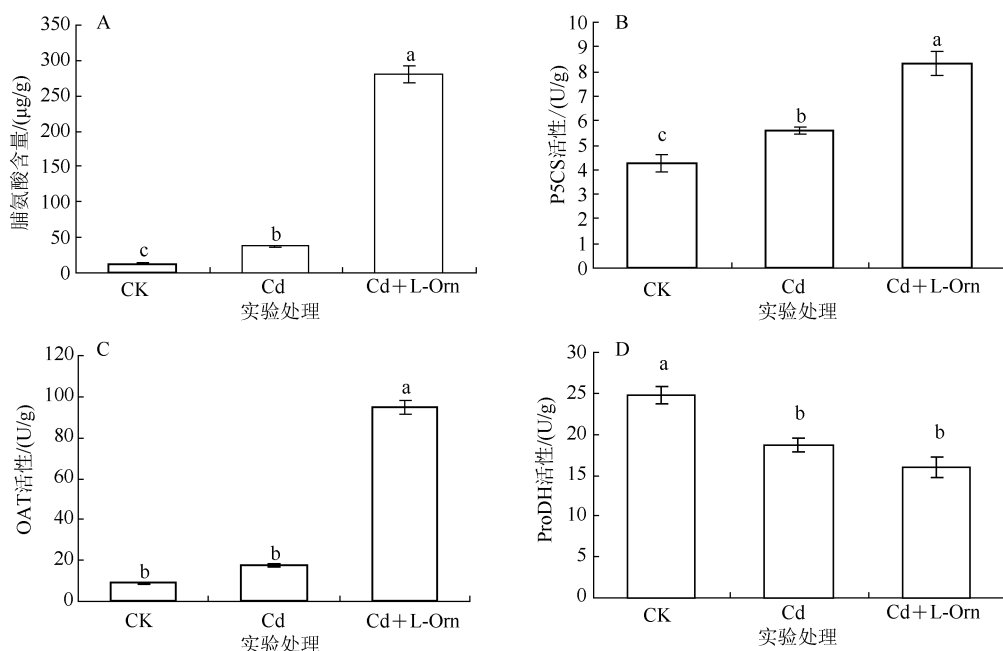


图 3 外源 L-Orn 对 Cd 胁迫下菹草脯氨酸含量和脯氨酸代谢酶活性的影响

Fig. 3 Effects of exogenous L-Orn on proline content and metabolizing enzymes activities in *P. crispus* under Cd stress

2.5 外源 L-Orn 对 Cd 胁迫下菹草多胺含量及其代谢酶活性的影响

2.5.1 外源 L-Orn 对 Cd 胁迫下菹草多胺含量的影响 在单一 Cd 胁迫下,Put 含量升高,为对照组的 1.24 倍 ($P < 0.05$),而 Spd 和 Spm 含量下降,分别为正常水平的 52.63% ($P < 0.05$) 和 62.83% ($P < 0.05$),总多胺含量为对照组的 83.13% ($P < 0.05$). 外源 L-Orn 处理后,Put、Spd、Spm 和总多胺含量均显著高于 Cd 处理组,分别为 Cd 处理组的 2.93 倍 ($P < 0.01$)、1.31 倍 ($P < 0.05$)、2.92 倍 ($P < 0.01$) 和 2.22 倍 ($P < 0.01$) (图 4A). 说明施用外源 L-Orn 可以促进菹草体内 Put 含量的升高,并促进 Put 向 Spd 和 Spm 的转化,使 Spd 和 Spm 的含量升高,从而使总多胺含量也升高.

2.5.2 外源 L-Orn 对 Cd 胁迫下菹草多胺代谢酶活性的影响 在单一 Cd 胁迫下,ADC 的活性和 ODC 的活性均升高,分别为对照组的 1.55 倍 ($P < 0.05$) 和 1.21 倍 ($P < 0.05$). 添加 2 mmol/L L-Orn 后,ADC 的活性为对照组的 1.47 倍 ($P < 0.05$),ODC 的活性为对照组的 1.96 倍 ($P < 0.01$). 统计分析表明,外源 L-Orn 和单一 Cd 毒害处理之间 ADC 的活性差异不显著 ($P > 0.05$),而 ODC 的活性差异极显著 ($P < 0.01$) (图 4B 和图 4C). 单一 Cd 胁迫使 PAO 和 DAO 的活性增强,分别为对照组的 1.99 倍 ($P < 0.01$) 和 1.80 倍 ($P < 0.05$),施用外源 L-Orn 后,PAO 的活性低于 Cd 处理组,为其 70.69% ($P < 0.01$),而 DAO 的活性高于 Cd 处理组,为其 1.45 倍 ($P < 0.01$) (图 4D).

3 讨论

Cd 胁迫能对水生植物产生多种毒害效应^[32],其中氧化胁迫是 Cd 对植物造成的最显著的伤害^[7]. 本实

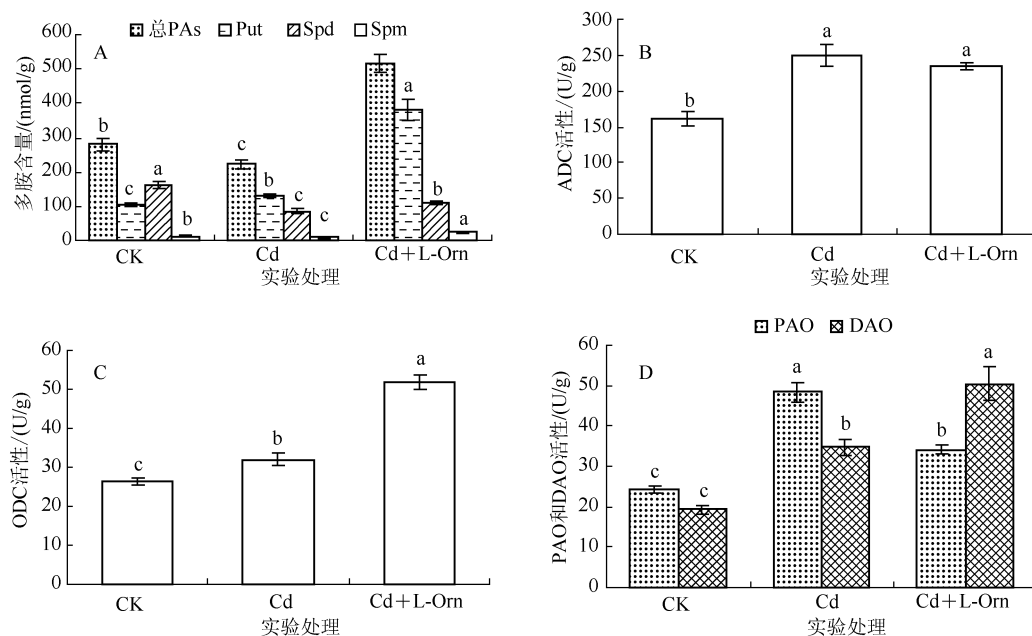


图4 外源 L-Orn 对 Cd 胁迫下菹草多胺含量和多胺代谢酶活性的影响

Fig. 4 Effects of exogenous L-Orn on polyamines content and metabolizing enzymes activities in *P. crispus* under Cd stress

验结果表明,40 $\mu\text{mol/L}$ Cd 胁迫显著增加了菹草对 Cd 的积累,诱导产生了大量的 ROS,加剧了膜脂过氧化程度,并促进了叶绿素和蛋白质的分解,说明此浓度的 Cd 已对菹草造成了明显的氧化胁迫^[33],而过量的氧化胁迫对植物细胞是有害的,甚至能够引起植物细胞的死亡^[34]. 2 mmol/L 的外源 L-Orn 的添加显著抑制了菹草对 Cd 的积累,降低了 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的产生速率以及 H_2O_2 和 MDA 的含量,提高了光合色素和可溶性蛋白含量,表明 2 mmol/L 的外源 L-Orn 在一定程度上缓解了 40 $\mu\text{mol/L}$ Cd 胁迫造成的氧化损伤,增强了菹草对 Cd 胁迫的抗性.

脯氨酸与植物逆境胁迫的关系十分密切,许多逆境胁迫包括重金属胁迫都能诱导脯氨酸的大量积累^[35]. Ashraf 等^[11]和 Alia 等^[36]发现脯氨酸可以作为逆境修复过程中的氮素和碳架,并可以作为自由基清除剂、膜的稳定剂和细胞质内酶的保护剂,从而对各种逆境胁迫起保护作用. Islam 等^[37-38]研究表明外源脯氨酸可提高 Cd 胁迫下烟草细胞超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)的活性和抗氧化剂小分子抗坏血酸(ASA)和谷胱甘肽(GSH)的含量以及 ASA-GSH 循环酶抗坏血酸过氧化物酶(APX)和谷胱甘肽还原酶(GR)的活性,缓解 Cd 胁迫对烟草细胞造成的伤害. 脯氨酸在植物体内的合成可以通过 OAT 催化 Orn 生成,也可以通过 P5CS 催化谷氨酸(Glu)形成,脯氨酸的降解则通过 ProDH 进行. 本研究中,单一 Cd 胁迫下,菹草体内的 P5CS 活性显著升高,OAT 的活性略微升高,ProDH 的活性显著下降,从而使脯氨酸含量升高,说明植物可通过调节体内的脯氨酸水平来减轻 Cd 胁迫造成的伤害. 另外,P5CS 活性升高的幅度显著大于 OAT,表明 P5CS 起关键作用的谷氨酸途径在单一 Cd 胁迫下对脯氨酸的积累起主导作用. 施用外源 L-Orn 后,脯氨酸含量进一步升高,且 OAT 活性升高的幅度明显高于 P5CS,表明外源 L-Orn 能够有效地通过激活 OAT 的活性增加 Cd 胁迫下菹草体内的脯氨酸含量,这与 Rocha 等^[39]的研究结果类似. 另外,Xu 等^[40]的研究表明,脯氨酸提高龙葵对 Cd 胁迫的抗性主要是通过抑制 ROS 的积累和保护膜的完整性,而不是通过抑制其对 Cd 的积累,因为脯氨酸预处理后龙葵体内的 Cd 并没有减少. 因此,外源 L-Orn 显著增强菹草对 Cd 胁迫的抗性,可能是因为外源 L-Orn 能够显著激活 OAT 的活性,大幅提高脯氨酸的含量,从而提高菹草清除 ROS 的能力,增强膜的稳定性.

多胺是一种类似“第二信使”的活性物质,研究表明多胺代谢广泛参与调节植物逆境胁迫反应^[41-42]. 多胺属于抗氧化系统的一部分,可以通过抑制 NADPH 氧化酶的活性减少 O_2^- 的积累^[43],也可以与自由基结合通过阻止脂质过氧化来抵抗氧化胁迫^[44],还可以与带负电荷的核酸、磷脂和酶蛋白等结合,调节膜的生化特性以及核酸的结构和功能,阻止蛋白质降解,促进抗氧化酶活性增强等,进而提高植物的抗氧化能力^[45]. 植物体内 Put 可以经由 ADC 催化生成精氨酸(Arg),也可以由 ODC 直接催化生成 L-Orn, Put 通过 DAO 降解, Put 也可以通过转化生成 Spd 和 Spm, Spd 和 Spm 的降解则通过 PAO. 本实验结果表明,单一 Cd 胁迫下,菹草体内的 Put 含量增加, Spd 和 Spm 的含量减少. Put 含量的升高是 ADC 和 ODC 的活性升高引起的, Spd 和 Spm 含量的下降,一方面是由于 PAO 的活性显著升高,加速了 Spd 和 Spm 的降解,另一方面可能由于 Put 向 Spd 和 Spm 的转化过程受到了抑制. 另外, ADC 活性增高的幅度显然大于 ODC,说明在单一 Cd 胁迫下, Put 的积累以 ADC 途径为主. 添加外源 L-Orn 后,菹草体内 ODC 的活性显著升高,积累了更多的 Put,这与 Tobias 等^[46]利用外源 L-Orn 研究小鼠骨髓瘤细胞时的研究结果一致,说明外源 L-Orn 能够有效地激活 ODC 活性,促进 Put 的合成. 添加外源 L-Orn 后, Spd 和 Spm 的含量也显著升高,一方面是因为 PAO 的活性显著低于 Cd 处理组,减少了 Spd 和 Spm 的分解,另一方面 PAO 的活性显著高于对照组,说明外源 L-Orn 处理组 Spd 和 Spm 的分解速度大于对照组,但其 Spd 和 Spm 的含量却高于对照组,表明外源 L-Orn 促进了 Put 向 Spd 和 Spm 的转化. 另外,外源 L-Orn 使 Put 大幅升高,而 Spd 和 Spm 升高的幅度较小,这可能是因为 Put 是 L-Orn 的直接产物,也可能是因为外源 L-Orn 促进 S-腺苷甲硫氨酸脱羧酶(SAMDC)基因表达的能力受限^[47],而 SAMDC 是 Spd 和 Spm 合成过程的关键酶. 另外,本文也发现单一 Cd 处理组和添加外源 L-Orn 处理组菹草内源 Put 增加的同时, DAO 的活性也升高,这可能是一种反馈调节机制,以阻止 Put 的过量积累. 目前,人们对于 Spd 和 Spm 的抗氧化作用已广为接受^[14,43],而 Put 的抗氧化作用仍存在争议,如 Mohapatra 等发现过量的 Put 能够加重白杨的氧化损伤^[48],但同时大量的研究也表明 Put 能够增强植物抵抗逆境胁迫的能力^[49-51],本实验中外源 L-Orn 大幅增加了 Put 含量,增强了菹草对 Cd 胁迫的抗性,因此本研究结果证实了 Put 对菹草在 Cd 胁迫下的保护性作用. 另外, Choudhary 等^[52]研究发现多胺能够通过抑制萝卜细胞膜上的重金属 ATP 酶(HMAs)基因的表达,从而抑制重金属离子进入植物体内. 因此,外源 L-Orn 降低菹草对 Cd 的吸收,抑制 ROS 的积累,增强菹草抵抗 Cd 胁迫的能力,可能是因为外源 L-Orn 能够显著激活 ODC 的活性,大幅增加多胺的含量.

综上所述,施用外源 L-Orn 一方面降低了进入菹草体内的 Cd,显著抑制了 Cd 诱导的氧化胁迫,包括降低了 ROS 的积累、抑制了膜脂过氧化程度、减少光合色素以及蛋白质的分解;另一方面通过大幅提高 OAT 和 ODC 的活性显著增加菹草体内脯氨酸和多胺含量,启动了一系列的生理生化机制,增强菹草抗 Cd 胁迫的能力,增强其自身对水体 Cd 污染的容忍性.

4 参考文献

- [1] Järup L. Hazards of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin*, 2003, **68**(1):167-182.
- [2] Sanità di Toppi L, Gabbriellini R. Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany*, 1999, **41**(2):105-130.
- [3] Pandey N, Sharma CP. Effect of heavy metals Co^{2+} , Ni^{2+} and Cd^{2+} on growth and metabolism of cabbage. *Plant Science*, 2002, **163**(4):753-758.
- [4] 徐勤松, 计汪栋, 杨海燕等. 镉在槐叶萍叶片中的蓄积及其生态毒理学分析. *生态学报*, 2009, **29**(6):3019-3027.
- [5] 施国新, 杜开和. 汞、镉污染对黑藻叶细胞伤害的超微结构研究. *植物学报*, 2000, **42**(4):373-378.
- [6] Macfarlane GR, Burchett MD. Photosynthetic pigments and peroxidase activity as indicators of heavy metal stress in the Grey Mangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. *Marine Pollution Bulletin*, 2001, **42**(3):233-240.
- [7] Cuypers A, Plusquin M, Remans T et al. Cadmium stress: an oxidative challenge. *Biomaterials*, 2010, **23**(5):927-940.
- [8] Guo TR, Zhang GP, Zhang YH. Physiological changes in barley plants under combined toxicity of aluminum, copper and cadmium. *Colloids and Surface B: Biointerfaces*, 2007, **57**(2):182-188.
- [9] Kato A, Ohki H, Inai K et al. Molecular regulation of nicotine biosynthesis. *Plant Biotechnology*, 2005, **22**(5):389-392.

- [10] Kishor PBK, Sangam S, Amrutha PN *et al.* Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Currents Science*, 2005, **88**(3):424-438.
- [11] Ashraf M, Foolad MR. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany*, 2007, **59**(2):206-216.
- [12] Shen WY, Nada K, Tachibana S. Involvement of polyamines in the chilling tolerance of cucumber cultivars. *Plant Physiology*, 2000, **124**(1):431-439.
- [13] Durmu N, Kadioglu A. Spermine and putrescine enhance oxidative stress tolerance in maize leaves. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2005, **27**(4A):515-522.
- [14] Xu XY, Shi GX, Ding CX *et al.* Regulation of exogenous spermidine on the reactive oxygen species level and polyamine metabolism in *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb under copper stress. *Plant Growth Regulation*, 2011, **63**(3):251-258.
- [15] Kalamaki MS, Merkouropoulos G, Kanellis AK. Can ornithine accumulation modulate abiotic stress tolerance in *Arabidopsis*? *Plant Signaling & Behavior*, 2009, **4**(11):1099-1101.
- [16] Mohapatra S, Minocha R, Long S *et al.* Transgenic manipulation of a single polyamine in poplar cells affects the accumulation of all amino acids. *Amino Acids*, 2010, **38**(4):1117-1129.
- [17] Shi HP, Fishel RS, Efron DT *et al.* Effect of supplemental ornithine on wound healing. *Journal of Surgical Research*, 2002, **106**(2):299-302.
- [18] Kurauchi I, Shigemori I, Yamada S *et al.* Comparison of central effects of L-Orn metabolites on the stress responses of neonatal chicks. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 2009, **8**(12):2580-2584.
- [19] Kalamaki MS, Alexandrou D, Lazari D *et al.* Over-expression of a tomato N-acetyl-L-glutamate synthase gene (SINAGS1) in *Arabidopsis thaliana* results in high ornithine levels and increased tolerance in salt and drought stresses. *Journal of Experimental Botany*, 2009, **60**(6):1859-1871.
- [20] 高健,杨勐. 沉水植物菹草的组织培养和快速繁殖. 植物生理学通讯, 2006, **42**(2):251-252.
- [21] Lichtenthaler HK. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, 1987, **148**:350-382.
- [22] 王爱国,罗广华. 植物的超氧自由基与羟胺反应的定量关系. 植物生理学通讯, 1990, **26**(6):55-57.
- [23] 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, 2000:164-165.
- [24] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, **72**(1/2):248-254.
- [25] Bates LS, Waldren RP, Teare ID. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 1973, **39**(1):205-207.
- [26] García-Ríos M. Cloning of a polycistronic cDNA from tomato encoding γ -glutamyl kinase and γ -glutamyl phosphate reductase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, **94**(15):8249-8254.
- [27] Kim HR. Assay of ornithine aminotransferase with minhydrin. *Analytical Biochemistry*, 1994, **223**(2):205-207.
- [28] Rena AB. Proline dehydrogenase and pyrroline-5-carboxylate reductase from pumpkin cotyledons. *Phytochemistry*, 1975, **14**(3):657-661.
- [29] 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**(2):175-186.
- [30] Zhao FG, Sun C, Liu YL *et al.* Relationship between polyamine metabolism in roots and salt tolerance of barley seedlings. *Acta Botanica Sinica*, 2003, **45**(3):295-300.
- [31] 汪天,郭世荣,刘俊等. 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.
- [32] Garg P, Tripathi RD, Rai UN *et al.* Cadmium accumulation and toxicity in submerged plant *Hydrilla verticillata* (L. F.) Royle. *Environmental Monitoring and Assessment*, 1997, **47**(2):167-173.
- [33] Singh S, Eapen S, D'Souza SF. Cadmium accumulation and its influence on lipid peroxidation and antioxidative system in an aquatic plant *Bacopa monnieri* L. *Chemosphere*, 2006, **62**(2):233-246.
- [34] Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 2002, **7**(9):405-410.
- [35] Dinakar N, Nagajyothi PC, Suresh S *et al.* Cadmium induce changes on proline, antioxidant enzymes, nitrate and nitrite

- reductases in *Arachis hypogaea* L. . *Journal of Environmental Biology*, 2009, **30**(2):289-294.
- [36] Alia, Saradhi PP. Proline accumulation under heavy metal stress. *Journal of Plant Physiology*, 1991, **138**(5):554-558.
- [37] Islam MM, Hoque MA, Okuma E *et al.* Exogenous proline and glycinebetaine increase antioxidant enzyme activities and confer tolerance to cadmium stress in cultured tobacco cells. *Journal of Plant Physiology*, 2009, **166**(15):1587-1597.
- [38] Islam MM, Hoque MA, Okuma E *et al.* Proline and glycinebetaine confer cadmium tolerance on tobacco bright yellow-2 cells by increasing ascorbate-glutathione cycle enzyme activities. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2009, **73**(10):2320-2323.
- [39] Rocha IMA, Vitorello VA, Silva JS *et al.* Exogenous ornithine is an effective precursor and the δ -ornithine amino transferase pathway contributes to proline accumulation under high N recycling in salt-stressed cashew leaves. *Journal of Plant Physiology*, 2012, **169**(1):41-49.
- [40] Xu J, Yin HX, Li X. Protective effects of proline against cadmium toxicity in micropropagated hyperaccumulator, *Solanum nigrum* L. . *Plant Cell Reports*, 2009, **28**(2):325-333.
- [41] Takahashi T, Kakehi JI. Polyamines; ubiquitous polycations with unique roles in growth and stress response. *Annals of Botany*, 2010, **105**(1):1-6.
- [42] Hussain SS, Ali M, Ahmad M *et al.* Polyamines; natural and engineered abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Biotechnology Advances*, 2011, **29**(3):300-311.
- [43] Papadakis AK, Roubelakis-Angelakis KA. Polyamines inhibit NADPH oxidase-mediated superoxide generation and putrescine prevents programmed cell death induced by polyamine oxidase-generated hydrogen peroxide. *Planta*, 2005, **220**(6):826-837.
- [44] Drolet G, Dumbroff EB, Legge RL *et al.* Radical scavenging properties of polyamines. *Phytochemistry*, 1986, **25**(2):367-371.
- [45] Bros W, Langebartels C, Michel C *et al.* Polyamines as radical scavengers and protectants against ozone damage. *Phytochemistry*, 1989, **28**(6):1589-1595.
- [46] Tobias KE, Kahana C. Exposure to ornithine results in excessive accumulation of putrescine and apoptotic cell death in ornithine decarboxylase overproducing mouse myeloma cells. *Cell Growth and Differentiation*, 1995, **6**(10):1279-1285.
- [47] Gholami M, Fakhari AR, Ghanati F. Selective regulation of nicotine and polyamine biosynthesis in tobacco cells by enantiomers of ornithine. *Chirality*, 2013, **25**(1):22-27.
- [48] Mohapatra S, Minocha R, Long S *et al.* Putrescine overproduction negatively impacts the oxidative state of poplar cells in culture. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2009, **47**(4):262-271.
- [49] Cuevas JC, López-Cobollo R, Alcázar R *et al.* Putrescine is involved in *Arabidopsis* freezing tolerance and cold acclimation by regulating abscisic acid levels in response to low temperature. *Plant Physiology*, 2008, **148**(2):1094-1105.
- [50] Verma S, Mishra SN. Putrescine alleviation of growth in salt stressed *Brassica juncea* by inducing antioxidative defense system. *Journal of Plant Physiology*, 2005, **162**(6):669-677.
- [51] Asthir B, Koundal A, Bains NS. Putrescine modulates antioxidant defense response in wheat under high temperature stress. *Biologia Plantarum*, 2012, **56**(4):757-761.
- [52] Choudhary SP, Oral HV, Bhardwaj R *et al.* Interaction of brassinosteroids and polyamines enhances copper stress tolerance in *Raphanus sativus*. *Journal of Experimental Botany*, 2012, **63**(15):5659-5675.