

## 铜胁迫对菹草无菌苗多胺及活性氧代谢的影响\*

姜岩, 施国新\*\*, 陈霖, 汪鹏合, 乔绪强, 田秀丽

(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 210046)

**摘要:** 本文研究了不同浓度  $\text{Cu}^{2+}$  (0, 1, 2, 4, 8, 12  $\mu\text{mol/L}$ ) 对菹草无菌苗多胺(PAs)及活性氧代谢的影响. 结果表明, 随着  $\text{Cu}^{2+}$  处理浓度的升高: (1) 菹草无菌苗植株的超氧化物歧化酶(SOD)活性逐渐上升, 过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)活性则表现为先升后降; (2) 超氧阴离子( $\text{O}_2^-$ )产生速率逐渐增大, 过氧化氢( $\text{H}_2\text{O}_2$ )和丙二醛(MDA)有所积累, 可溶性蛋白含量降低; (3) 游离态多胺含量与多胺总含量的变化一致, 均表现为腐胺(Put)含量先升后降, 亚精胺(Spd)含量逐渐降低, 精胺(Spm)含量逐渐上升; 游离态多胺(Spd + Spm)/Put的比值在高浓度  $\text{Cu}^{2+}$  胁迫时迅速上升; 结合态 Put 和 Spm 的含量变化与游离态的变化一致, 而结合态 Spd 的含量与对照相比均略有上升; 束缚态 Put 和 Spd 含量先升后降, 而 Spm 含量则逐渐降低; (4) 精氨酸脱羧酶(ADC)、多胺氧化酶(PAO)和二胺氧化酶(DAO)活性均表现为先升后降, 而鸟氨酸脱羧酶(ODC)活性变化不明显. 可见,  $\text{Cu}^{2+}$  对菹草无菌苗造成了明显的氧化胁迫, 抗氧化酶活性的升高, Spm 含量的升高, Put 向 Spd 和 Spm 的转化以及不同状态多胺之间的转化, 在菹草无菌苗抵抗  $\text{Cu}^{2+}$  胁迫过程中发挥着重要的作用.

**关键词:** 菹草; 无菌苗;  $\text{Cu}^{2+}$  胁迫; 活性氧; 多胺代谢

## Effect of copper stress on polyamine and reactive oxygen species metabolism in aseptic seedlings of *Potamogeton crispus* L.

JIANG Yan, SHI Guoxin, CHEN Lin, WANG Penghe, QIAO Xuqiang & TIAN Xiuli

(*Jiangsu Key Lab of Biodiversity and Biotechnology, College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, P. R. China*)

**Abstract:** Taking aseptic seedlings of *P. crispus* as the experimental material, the effect of different concentrations of  $\text{Cu}^{2+}$  (0, 1, 2, 4, 8, 12  $\mu\text{mol/L}$ ) on the metabolism of polyamine(PAs) and reactive oxygen were investigated. With the increasing of  $\text{Cu}^{2+}$  concentration, the results indicated that: (1) Superoxide dismutase(SOD) activity increased markedly, while the activities of peroxidase(POD) and catalase(CAT) increased progressively followed by a decline. (2) The generation rate of  $\text{O}_2^-$  and the content of  $\text{H}_2\text{O}_2$  and MDA increased, while soluble protein content decreased. (3) Free putrescine(Put) content first enhanced and then reduced notably. However, the content of free spermidine(Spd) decreased gradually and spermine(Spm) increased significantly. Therefore, the ratio of free (Spd + Spm)/Put promptly increased under high concentrations of  $\text{Cu}^{2+}$  stress. The changes of total PAs content were similar to those on free PAs. Perchloric acid soluble conjugated(PS-conjugated) Put and Spm changed in the same pattern as free PAs. While PS-conjugated Spd content increased slightly. In addition, the content of perchloric acid insoluble bound(PIS-bound) Put and Spd first increased and then decreased, but they were still higher than those in the control. Moreover, PIS-bound Spm content declined. (4) With the increase of  $\text{Cu}^{2+}$  concentration, the activity of arginine decarboxylase(ADC) sharply decreased after a transient increase, while the activity of ornithine decarboxylase(ODC) did not change significantly. Polyamine oxidase(PAO) and diamine oxidase(DAO) activities increased gradually, followed by a decrease. Our results suggested that  $\text{Cu}^{2+}$  stress induced obvious oxidative damage on aseptic seedlings of *P. crispus*. The up-regulation of antioxidant enzymes activities and Spm content, the changes of Put into Spd and Spm as well as the conversion between different forms of polyamines played a key role in the adaptation mechanism of aseptic seedlings of *P. crispus* under  $\text{Cu}^{2+}$  stress.

\* 江苏高校优势学科建设工程项目(164320H106)和国家自然科学基金项目(30870139)联合资助. 2012-11-09 收稿; 2012-12-20 收修改稿. 姜岩, 女, 1987年生, 硕士研究生; E-mail: jiangyan2853@126.com.

\*\* 通信作者; E-mail: gxshi@njnu.edu.cn.

**Keywords:** *Potamogeton crispus* L.; aseptic seedling;  $\text{Cu}^{2+}$  stress; reactive oxygen; polyamine metabolism

$\text{Cu}^{2+}$  是植物生长发育必需的微量营养元素,但过量的  $\text{Cu}^{2+}$  会对植物产生毒害<sup>[1-2]</sup>.  $\text{Cu}^{2+}$  胁迫导致植物体内产生大量活性氧,对细胞膜、细胞结构等造成伤害,导致细胞代谢紊乱<sup>[3]</sup>. 多胺是一类高生物活性的脂肪族含氮碱,能促进植物的生长发育,延迟衰老,提高植物的抗逆性等<sup>[4]</sup>. 有研究表明,外源多胺可以缓解  $\text{Cu}^{2+}$  胁迫对水鳖的毒害症状<sup>[5]</sup>,提高  $\text{Cu}^{2+}$  胁迫下苜蓿叶片生物膜的保护作用<sup>[6]</sup>,但关于内源多胺在植物体抵抗  $\text{Cu}^{2+}$  胁迫方面的研究较少. 目前研究中所采用的实验材料大多为自然生长的植物,取材受季节限制,实验结果易受植物生长环境的影响. 鉴于此,本文以菹草无菌苗为实验材料,研究了  $\text{Cu}^{2+}$  胁迫对菹草无菌苗的抗氧化酶活性、 $\text{O}_2^-$  产生速率、 $\text{H}_2\text{O}_2$  含量、MDA 含量及可溶性蛋白含量的影响,并研究了  $\text{Cu}^{2+}$  胁迫对菹草无菌苗内源多胺代谢的影响,试图探讨菹草无菌苗内源多胺在  $\text{Cu}^{2+}$  胁迫逆境适应中的变化及作用,并为进一步研究植物抗重金属胁迫的生理生化机制提供理论依据.

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

菹草(*Potamogeton crispus* L.)为眼子菜科植物,多年生沉水草本,根状茎细长,多分枝,侧枝短,叶呈披针形. 本次实验所用菹草于2010年11月采自南京市琵琶湖水域,以菹草带节间的幼嫩茎段诱导产生的无菌苗作为研究对象.

### 1.2 研究方法

1.2.1 菹草无菌苗的培养 选取菹草靠近顶端的幼嫩茎段作为外植体,用清水冲洗干净,在无菌环境中依次经过5%的 $\text{H}_2\text{O}_2$ 消毒15 min,无菌水冲洗3次;10%次氯酸钠消毒30s,无菌水冲洗5次后将菹草带侧芽的茎段剪成约8 mm长,接种于含6-BA(2.0 mg/L)和IBA(0.5 mg/L)的MS培养基中诱导芽分化;15 d左右茎间侧芽约2 cm长,转入含6-BA(2.0 mg/L)的MS继代培养基继代培养20 d;而后置于1/10的无菌Hoagland营养液中进行生根培养1个月以得到完整的无菌苗. 整个组培过程在培养室进行,培养温度为25℃,每天光照16 h,光照强度为1200~1500 lx.

1.2.2  $\text{Cu}^{2+}$  对菹草无菌苗的毒害处理 选取生长状况一致的菹草无菌苗植株置于含0、1、2、4、8和12  $\mu\text{mol/L}$   $\text{CuSO}_4$ (以纯 $\text{Cu}^{2+}$ 计)的无菌1/10 Hoagland营养液( $\text{Cu}^{2+}$ 浓度为32 nmol/L)中,每个处理设3次重复,置于与培养无菌苗环境一致的培养室中培养. 处理5 d后取菹草无菌苗完整植株,去离子水洗净、揩干,进行各项生理指标测定.

1.2.3 SOD、POD和CAT活性的测定 SOD活性测定采用NBT光化还原法<sup>[7]</sup>,以抑制NBT光还原50%所需的酶量为1个酶活性单位(U);POD活性测定采用愈创木酚方法<sup>[8]</sup>,以每分钟 $\text{OD}_{470}$ 的变化为1个酶活性单位(U);CAT活性测定采用钼酸盐法<sup>[9]</sup>,以每分钟分解1  $\mu\text{mol}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ 所需的酶量为1个酶活性单位(U).

1.2.4  $\text{O}_2^-$  产生速率、 $\text{H}_2\text{O}_2$ 和MDA含量的测定  $\text{O}_2^-$ 产生速率采用王爱国等<sup>[10]</sup>的羟胺氧化法测定,以 $\text{nmol}/(\text{min} \cdot \text{g}(\text{FW}))$ 表示; $\text{H}_2\text{O}_2$ 的含量采用分光光度法,用南京建成生物工程研究所的 $\text{H}_2\text{O}_2$ 试剂盒测定;MDA含量按李合生<sup>[11]</sup>的方法测定.

1.2.5 可溶性蛋白含量的测定 可溶性蛋白含量用考马斯亮蓝G-250法<sup>[12]</sup>测定,以牛血清白蛋白(BSA)为标准蛋白.

1.2.6 多胺含量及其代谢酶的测定 多胺含量的测定采用Aziz等<sup>[13]</sup>的方法,以 $\text{nmol}/\text{g}(\text{FW})$ 表示;精氨酸脱羧酶(ADC)和鸟氨酸脱羧酶(ODC)的活性根据Zhao等<sup>[14]</sup>的方法测定,其活性分别以1  $\mu\text{mol}$  Agm/h和1  $\mu\text{mol}$  Put/min为1个酶活性单位(U)表示;多胺氧化酶(PAO)和二胺氧化酶(DAO)的活性测定参照汪天等<sup>[15]</sup>的方法,以0.001 $\Delta\text{OD}_{550}/\text{min}$ 为1个酶活性单位(U).

### 1.3 统计分析

实验结果为3次重复的平均值 $\pm$ 标准差,采用Excel和SPSS 17.0统计软件对实验数据进行制图和统计分析. 用相关系数( $r$ )对各指标与 $\text{Cu}^{2+}$ 浓度间进行相关性统计, $P \geq 0.05$ 表示无显著相关性, $P < 0.05$ 表示显著差异, $P < 0.01$ 表示极显著差异.

## 2 实验结果

### 2.1 Cu<sup>2+</sup> 胁迫对菹草无菌苗 SOD、POD、CAT 活性的影响

随着 Cu<sup>2+</sup> 浓度升高, SOD 活性明显被激活, 表现为逐渐上升的趋势, 在 Cu<sup>2+</sup> 浓度为 12 μmol/L 时最大, 为对照的 1.92 倍; POD 和 CAT 活性随 Cu<sup>2+</sup> 浓度的升高均表现为先升后降, 二者均在 Cu<sup>2+</sup> 浓度为 1 μmol/L 时达到峰值, 分别为对照的 3.97 和 2.52 倍, 后逐渐降低. 相关性分析表明, SOD 活性变化与 Cu<sup>2+</sup> 处理浓度间达到极显著正相关 ( $r = 0.9796, P < 0.01$ ) (图 1).

### 2.2 Cu<sup>2+</sup> 胁迫对菹草无菌苗 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 产生速率、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量和 MDA 含量的影响

O<sub>2</sub><sup>-</sup> 的产生速率随 Cu<sup>2+</sup> 浓度的升高总体呈逐渐增大趋势, 在 Cu<sup>2+</sup> 浓度为 12 μmol/L 时最大, 为对照的 1.72 倍 (图 2A); 随 Cu<sup>2+</sup> 浓度的升高, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量呈现先升后降的趋势但仍高于对照, 在 Cu<sup>2+</sup> 浓度为 1 μmol/L 时达最大, 为对照的 1.60 倍 (图 2B); O<sub>2</sub><sup>-</sup> 的产生速率与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量均在 Cu<sup>2+</sup> 浓度为 4 μmol/L 时降低至与对照组相当; MDA 含量随 Cu<sup>2+</sup> 浓度的升高呈先升后降趋势, 仍明显高于对照, 在 Cu<sup>2+</sup> 浓度为 1 μmol/L 时达最大, 为对照组的 1.28 倍 (图 2B). 相关性分析表明, O<sub>2</sub><sup>-</sup> 的产生速率与 Cu<sup>2+</sup> 处理浓度间达到显著正相关 ( $r = 0.7916, P < 0.05$ ).

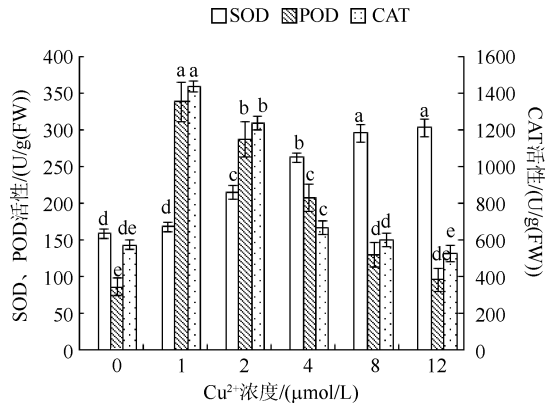


图 1 Cu<sup>2+</sup> 胁迫对菹草无菌苗 POD、SOD 和 CAT 活性的影响 (不同字母代表差异显著, 下同)

Fig. 1 Effects of Cu<sup>2+</sup> stress on POD, SOD and CAT activities in aseptic seedlings of *P. crispus*

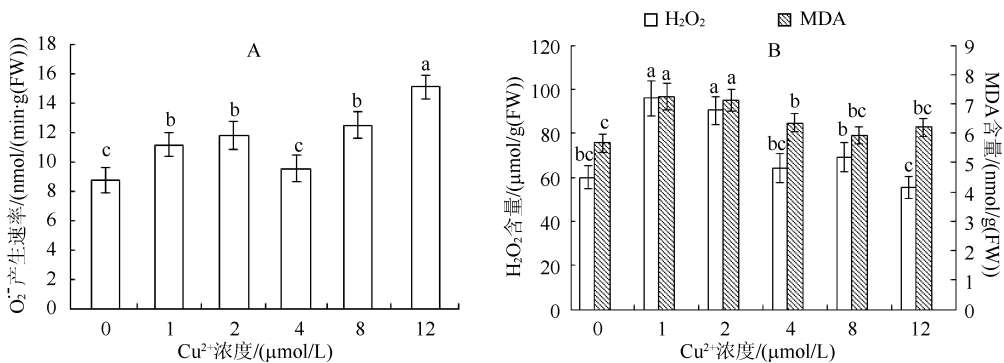


图 2 Cu<sup>2+</sup> 胁迫对菹草无菌苗 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 产生速率(A) 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、MDA 含量(B) 的影响

Fig. 2 Effects of Cu<sup>2+</sup> stress on O<sub>2</sub><sup>-</sup> generation rate(A), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and MDA contents (B) in aseptic seedlings of *P. crispus*

### 2.3 Cu<sup>2+</sup> 胁迫对菹草无菌苗可溶性蛋白含量的影响

随着 Cu<sup>2+</sup> 浓度的升高, 菹草无菌苗可溶性蛋白含量在短暂升高后迅速降低, 在 Cu<sup>2+</sup> 浓度为 12 μmol/L 时最低, 为对照的 84.59% (图 3).

### 2.4 Cu<sup>2+</sup> 胁迫对菹草无菌苗多胺含量的影响

2.4.1 游离态多胺含量的变化 随着 Cu<sup>2+</sup> 浓度升高至 2 μmol/L, 菹草无菌苗游离态 Put 含量短暂上升至最大, 为对照的 1.45 倍, 后迅速降低; 游离态 Spd 的含量则随 Cu<sup>2+</sup> 浓度的升高逐渐降低, 当 Cu<sup>2+</sup> 浓度为 12 μmol/L 时, 其含量仅为对照组的 56.50%; 游离态 Spm 的含量在 Cu<sup>2+</sup> 浓度为 0~8 μmol/L 时逐渐上升, 在

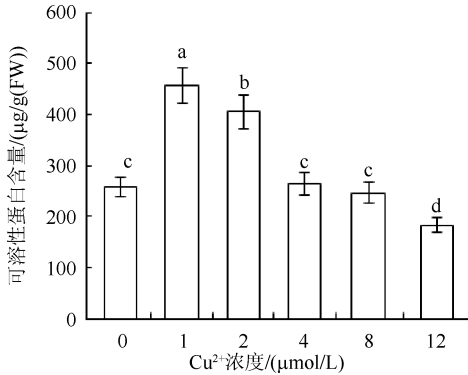


图3 Cu<sup>2+</sup>胁迫对菹草无菌苗可溶性蛋白含量的影响

Fig. 3 Effect of Cu<sup>2+</sup> stress on soluble protein content in aseptically cultured seedlings of *P. crispus*

12 µmol/L 时略有下降,但仍为对照组的 1.46 倍(图 4A);游离态(Spd + Spm)/Put 的比值在 Cu<sup>2+</sup> 浓度为 0 ~ 2 µmol/L 时有所降低,之后随着 Cu<sup>2+</sup> 浓度的升高迅速增大(图 4B). 相关性分析表明,游离态 Spd 的含量变化与 Cu<sup>2+</sup> 浓度之间呈极显著负相关( $r = -0.8920$ ,  $P < 0.01$ ).

2.4.2 结合态多胺含量的变化 菹草无菌苗的结合态 Put 含量在 Cu<sup>2+</sup> 浓度为 0 ~ 2 µmol/L 时缓慢上升并在 2 µmol/L 时达到峰值,为对照组的 1.17 倍,后其含量迅速下降并显著低于对照;随着 Cu<sup>2+</sup> 浓度升高,结合态 Spd 的含量与对照组相比有所上升;结合态 Spm 含量随 Cu<sup>2+</sup> 浓度的升高逐渐升高,当 Cu<sup>2+</sup> 浓度为 8 µmol/L 时含量达到最大值,为对照组的 1.87 倍(图 4C). 相关性分析表明,结合态 Put 含量变化与 Cu<sup>2+</sup> 处理浓度之间达到显著负相关( $r = -0.8478$ ,  $P < 0.05$ );结合态 Spm 含量变化与 Cu<sup>2+</sup> 处理浓度之间呈极显著正相关( $r = 0.9178$ ,  $P < 0.01$ ).

2.4.3 束缚态多胺含量的变化 束缚态 Put 及 Spd 的含量均随 Cu<sup>2+</sup> 浓度升高逐渐升高,分别在 Cu<sup>2+</sup> 浓度为 4 µmol/L 和 2 µmol/L 时达到峰值,分别为对照组的 5.59 和 1.78 倍,之后二者含量均降低,但仍高于对照;束缚态 Spm 的含量随 Cu<sup>2+</sup> 浓度升高逐渐降低,当 Cu<sup>2+</sup> 浓度为 12 µmol/L 时,其含量仅为对照组的 4.49% (图 4D).

2.4.4 多胺总含量的变化 随着 Cu<sup>2+</sup> 浓度升高,Put 总含量呈先升后降的趋势,在 Cu<sup>2+</sup> 浓度为 2 µmol/L 时达到最大值,为对照组的 1.35 倍,之后其含量迅速降低并低于对照;Spd 的总含量随着 Cu<sup>2+</sup> 浓度的升高逐渐降低,当 Cu<sup>2+</sup> 浓度为 12 µmol/L 时,其含量最低,仅为对照组的 68.03%;随 Cu<sup>2+</sup> 浓度升高,Spm 的总含量逐渐上升,在 Cu<sup>2+</sup> 浓度为 8 µmol/L 时达到峰值,为对照组的 1.78 倍,之后略有降低. 相关性分析表明,Spd 总含量变化与 Cu<sup>2+</sup> 处理浓度之间达到极显著负相关( $r = -0.8748$ ,  $P < 0.01$ );Spm 总含量变化与 Cu<sup>2+</sup> 处理浓度呈显著正相关( $r = 0.8039$ ,  $P < 0.05$ ) (图 4E).

### 2.5 Cu<sup>2+</sup>胁迫对菹草无菌苗 ADC、ODC、PAO 和 DAO 活性的影响

随着 Cu<sup>2+</sup> 浓度升高,ADC 的活性表现为先升后降,在 Cu<sup>2+</sup> 浓度为 1 µmol/L 时活性最大,为对照组的 1.18 倍,后其活性逐渐降低并低于对照;ODC 活性随着 Cu<sup>2+</sup> 浓度升高,变化不明显;PAO 和 DAO 的活性随 Cu<sup>2+</sup> 浓度升高均表现为先升后降趋势,分别在 Cu<sup>2+</sup> 浓度为 4 µmol/L 和 1 µmol/L 时达到峰值,之后酶活性下降,但均高于对照(图 5). 相关性分析表明,PAO 活性变化与 Cu<sup>2+</sup> 处理浓度呈显著正相关( $r = 0.7714$ ,  $P < 0.05$ ).

## 3 讨论

逆境条件下,植物体内活性氧代谢的平衡被打破,产生大量的 O<sub>2</sub><sup>-</sup>、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,对植物造成伤害. 抗氧化酶系统在清除活性氧方面发挥着重要作用<sup>[16]</sup>. SOD 能歧化 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 为 O<sub>2</sub> 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,而 CAT 和 POD 则催化 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 形成 H<sub>2</sub>O<sup>[17]</sup>. 研究认为,O<sub>2</sub><sup>-</sup> 的过量积累导致膜脂过氧化或膜脂脱酯作用产生 MDA,从而破坏膜结构,MDA 含量是反映膜脂过氧化作用的强弱和质膜受破坏程度的重要指标<sup>[18]</sup>. 本研究结果显示,随着 Cu<sup>2+</sup> 浓度升高,O<sub>2</sub><sup>-</sup> 产生速率迅速增大,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量有所积累(图 2),同时菹草无菌苗 SOD 的活性迅速升高,POD 和 CAT 的活性也出现不同程度的升高(图 1),O<sub>2</sub><sup>-</sup> 产生速率的增大及 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的积累诱导了 SOD、POD 和 CAT 活性的升高,在 Cu<sup>2+</sup> 浓度为 4 µmol/L 时,O<sub>2</sub><sup>-</sup> 的产生速率与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量均有所降低,此时较高活性的 SOD、POD 和 CAT 对 O<sub>2</sub><sup>-</sup>、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 起到了较有力的清除作用. 在高浓度 Cu<sup>2+</sup> 胁迫时,POD 和 CAT 活性有所降低,导致了 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 在菹草无菌苗植物体内的积累,造成细胞膜结构损伤,致使 MDA 含量升高(图 2B).

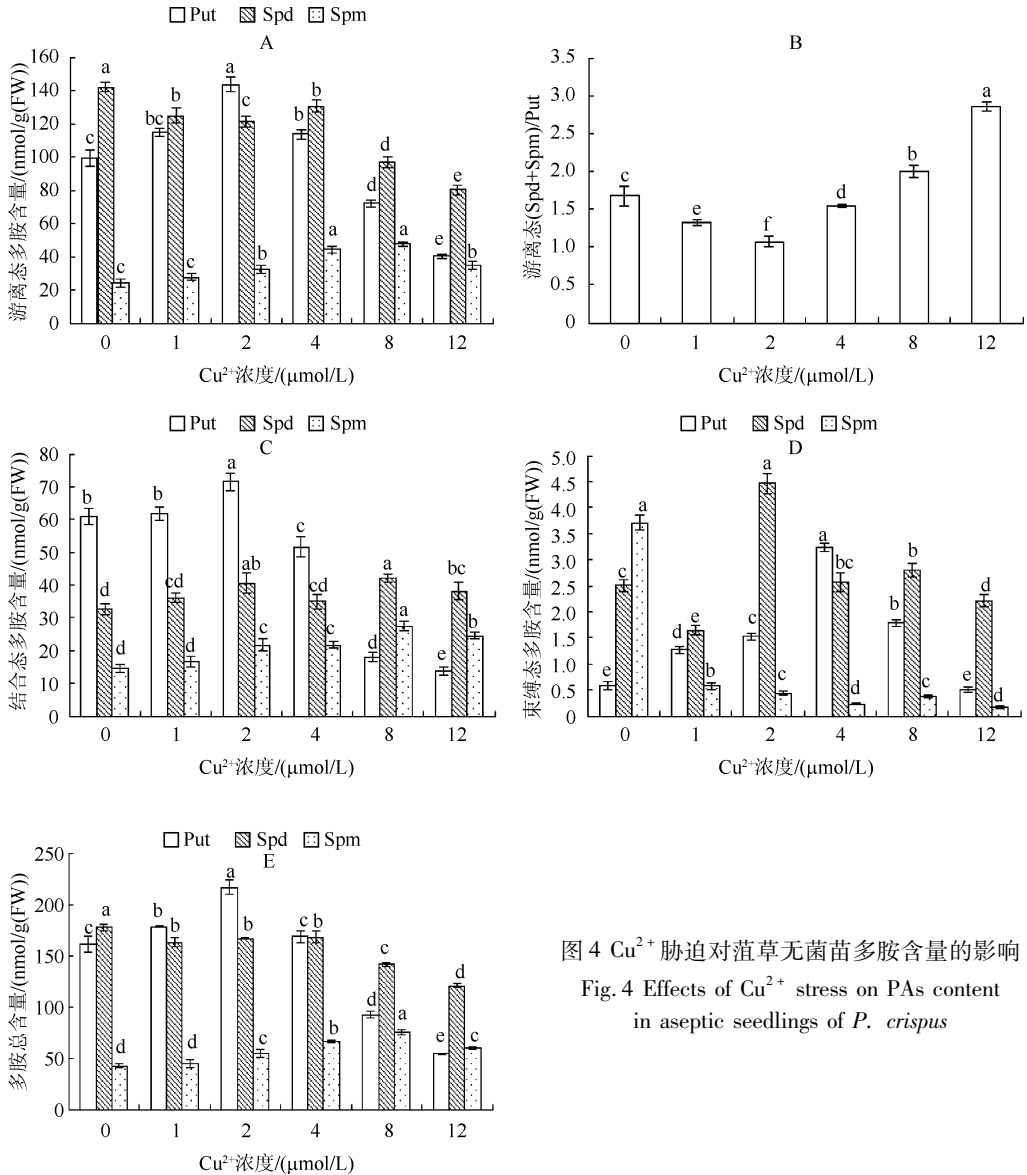


图4 Cu<sup>2+</sup>胁迫对菹草无菌苗多胺含量的影响  
Fig. 4 Effects of Cu<sup>2+</sup> stress on PAs content in aseptic seedlings of *P. crispus*

可溶性蛋白含量降低是植物重金属胁迫的特征之一,本研究结果显示,高浓度 Cu<sup>2+</sup>胁迫导致菹草无菌苗可溶性蛋白含量迅速降低(图3).这主要是因为:(1) Cu<sup>2+</sup>进入细胞后促进蛋白水解酶的活性,加强原有蛋白质的分解<sup>[19]</sup>;(2) Cu<sup>2+</sup>对蛋白合成的众多酶系均有毒害和抑制作用,并且使蛋白质合成的相关细胞器受到损伤,抑制新蛋白的合成<sup>[20]</sup>.

多胺可以参与植物对逆境的响应,在清除活性氧自由基、维持生物膜稳定性等方面具有重要作用<sup>[21]</sup>.多胺的代谢特征之一是植物受到逆境胁迫时,体内多胺含量迅速发生变化,并且不同种类、不同形态的多胺可以相互转化<sup>[22]</sup>.多胺的氨基化程度越高,氨基数目越多,清除自由基的效果越好,因此三胺、四胺清除自由基的能力大于二胺,也就是说 Spd 和 Spm 清除自由基的能力要大于 Put<sup>[23]</sup>.相关研究表明,游离态(Spd + Spm)/Put 的升高有利于植物抵抗重金属胁迫<sup>[24]</sup>.本研究结果表明,在高浓度 Cu<sup>2+</sup>胁迫时,游离态(Spd + Spm)/Put 迅速增大(图4B),这可能是由于游离态 Put 向 Spd 和 Spm 发生转化,对增强菹草无菌苗抵抗 Cu<sup>2+</sup>胁迫有重要的作用.

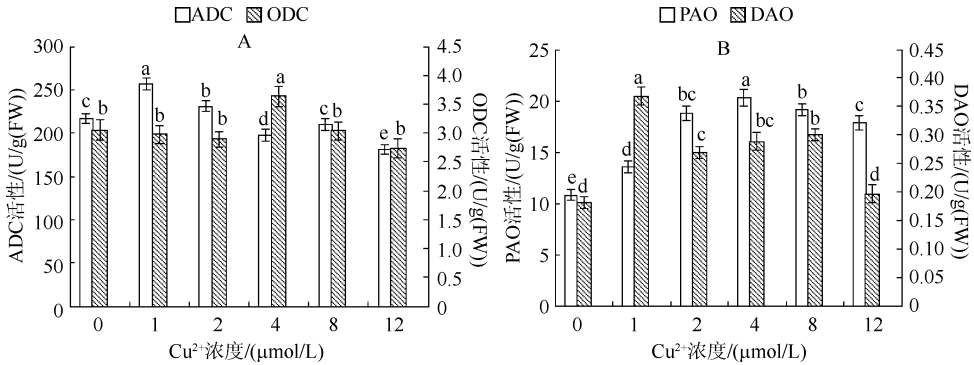


图5 Cu<sup>2+</sup>胁迫对菹草无菌苗 ADC, ODC(A), PAO, DAO(B)活性的影响

Fig. 5 Effects of Cu<sup>2+</sup> stress on ADC, ODC(A), PAO, DAO(B) activities in aseptic seedlings of *P. crispus*

研究表明,游离态多胺可以向结合态和束缚态多胺转化,结合态多胺能形成分子屏障,抵御外界不良因素的侵染,束缚态多胺则可通过大分子的交联稳定细胞内成分,结合态和束缚态多胺含量的增加可以增强植物抵抗胁迫的能力<sup>[25]</sup>. 本研究结果显示,低浓度 Cu<sup>2+</sup>胁迫时,结合态多胺含量均有所上升,可能是游离态多胺向结合态发生了转化,之后随着胁迫作用的加强,结合态 Spd 和 Spm 有所积累(图 4C),较高含量的结合态 Spd 和 Spm 有利于菹草无菌苗抵御 Cu<sup>2+</sup>胁迫. 在较低浓度 Cu<sup>2+</sup>胁迫时,束缚态 Put 和 Spd 含量上升,随着 Cu<sup>2+</sup>浓度进一步增大,束缚态 Put 含量迅速降低,而束缚态 Spd 含量变化平缓,可能是 Put 向 Spd 发生了转化,但二者含量仍高于对照(图 4D). 由于束缚态 Put 和 Spd 是束缚态多胺的主要成分,在胁迫期间,维持较高的束缚态 Put 和 Spd 含量,有利于稳定细胞结构<sup>[23,26]</sup>,提高菹草无菌苗的抗逆性. 而束缚态 Spm 含量(图 4D)随 Cu<sup>2+</sup>浓度升高迅速降低,可能是向结合态发生了转化,也说明其对 Cu<sup>2+</sup>胁迫比较敏感.

植物合成 Put 有两条途径,一是精氨酸(Arg)在 ADC 的作用下脱羧,生成鲛精胺(Agm),再脱去一分子氨生成 Put;二是精氨酸(Arg)先脱去一分子脲,生成鸟氨酸(Orn),然后经 ODC 催化生成 Put. 汪沛洪<sup>[27]</sup>认为在渗透胁迫条件下,Put 含量的上升是由于胁迫导致了 ADC 活性的上升,ODC 则不参与反应. 本实验中,处理后,在低浓度 Cu<sup>2+</sup>胁迫时 ADC 活性受到激发,逐渐上升,之后随着 Cu<sup>2+</sup>胁迫的进一步加深,其活性下降并低于对照,但 ODC 活性变化不明显(图 5A),说明 Put 的 ADC 生物合成途径与菹草无菌苗对 Cu<sup>2+</sup>胁迫的反应有关. Put 的降解酶 DAO 活性随 Cu<sup>2+</sup>浓度升高表现与 ADC 相同,均为先升后降,但 DAO 活性均高于对照组(图 5B),可能是 Put 快速合成,并作为底物激活 DAO,使其氧化活性增强,从而反馈调节 Put. PAO 是催化生物体内多胺降解的关键酶,其通过调节细胞内多胺的水平和生成物浓度,参与植物对各种逆境胁迫的反应和生长发育过程<sup>[28]</sup>. 本研究表明,随着 Cu<sup>2+</sup>浓度升高,PAO 活性逐渐升高,后有所降低但仍明显高于对照组(图 5B),这可能是由于 Spm 含量的升高诱导了 PAO 活性的同步升高,进而维持多胺代谢平衡. Spd 在 PAO 的降解作用下,其含量随着 Cu<sup>2+</sup>浓度的升高逐渐下降. 而 Spm 含量升高可能是菹草无菌苗抵抗 Cu<sup>2+</sup>胁迫的信号之一,是对胁迫伤害的一种适应性反应,提高了菹草无菌苗抗胁迫的能力.

综上所述,在 Cu<sup>2+</sup>胁迫下,菹草无菌苗活性氧积累,膜脂过氧化程度增大,可溶性蛋白含量降低,表现出明显的氧化胁迫. 在一定 Cu<sup>2+</sup>胁迫浓度范围内,菹草无菌苗抗氧化酶活性的升高, Spm 含量的增大, Put 向 Spd 和 Spm 的转化以及不同状态多胺之间的转化,在一定程度上有利于降低活性氧对植物体的破坏,稳定细胞结构,提高菹草无菌苗抵抗 Cu<sup>2+</sup>胁迫的能力.

#### 4 参考文献

- [1] Sommer AL. Copper as an essential for plant growth. *Plant Physiology*, 1931, 6(2): 339-345.
- [2] Fernandes JC, Henriques FS. Biochemical, physiological, and structural effects of excess copper in plants. *The Botanical Review*, 1991, 57(3): 246-273.
- [3] 潘秋红,施国新,徐勤松等. Cu<sup>2+</sup>对菱叶片生理指标及超微结构的毒理学效应分析. *武汉植物学研究*, 2009, 27

- (5):527-532.
- [ 4 ] 王 聪,朱月林,杨立飞等. NaCl 胁迫对菜用大豆种子多胺代谢的影响. 应用生态学报,2011,**22**(11):2883-2893.
- [ 5 ] 王红霞,胡金朝,施国新等. 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. 生态学报,2010,**30**(10):2784-2792.
- [ 6 ] 王 学,徐恒戡. 外源多胺对铜胁迫下苜蓿叶片生物膜的保护作用. 植物生理学通讯,2008,**44**(3):449-453.
- [ 7 ] Beyer WF, Fridovich I. Assaying for superoxide dismutase activity: Some large consequences of minor changes in conditions. *Analytical Biochemistry*, 1987, **161**(2): 559-566.
- [ 8 ] 张志良,瞿伟菁. 植物生理学实验指导. 北京:高等教育出版社,2003:67-69.
- [ 9 ] Karsten U, Franklin LA, Lüning K *et al.* Natural ultraviolet radiation and photosynthetically active radiation induce formation of mycosporine-like amino acids in the marine macroalga *Chondrus crispus* (Rhodophyta). *Planta*, 1998, **205**(2): 257-262.
- [ 10 ] 王爱国,罗广华. 植物的超氧化物自由基与羟胺反应的定量关系. 植物生理学通讯,1990,(6):55-57.
- [ 11 ] 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.
- [ 12 ] 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.
- [ 13 ] Aziz A, Martin TJ, Larher F. Stress-induced changes in polyamine and tyramine levels can regulate proline accumulation in tomato leaf discs treated with sodium chloride. *Physiologia Plantarum*, 1998, **104**(2): 195-202.
- [ 14 ] 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.
- [ 15 ] 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.
- [ 16 ] 丁能飞,傅庆林,刘 琛等. 盐胁迫对两个大白菜品种抗氧化酶活性及离子吸收的影响. 浙江农业学报,2008,**20**(5):322-327.
- [ 17 ] 计汪栋,施国新,杨海燕等. 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.
- [ 18 ] Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Sci*, 2002, **7**(1): 405-410.
- [ 19 ] 王 学,施国新,徐勤松等. 镉、铊及重金属元素铬、锌对竹叶眼子菜的毒害作用. 中国稀土学报,2004,**22**(5): 682-686.
- [ 20 ] Prasad MNV, Malec P, Waloszek A. Physiological response of *Lemna trisulca* L. (duckweed) to cadmium and copper bioaccumulation. *Plant Science*, 2001, **161**:881-889.
- [ 21 ] 刘正鲁,朱月林,魏国平等. NaCl 胁迫对茄子嫁接苗叶片多胺代谢和 ABA 含量的影响. 生态学报,2008,**28**(4): 1586-1592.
- [ 22 ] Alcázar R, Altabella T, Marco F *et al.* Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. *Planta*, 2010, **231**(6): 1237-1249.
- [ 23 ] Drolet G, Dumbroff EB, Legge RL *et al.* Radical scavenging properties of polyamines. *Phytochemistry*, 1986, **25**(2): 367-371.
- [ 24 ] 田秀丽,施国新,徐 君等. Cr<sup>6+</sup> 胁迫对水花生 (*Alternanthera philoxeroides*) 愈伤组织多胺代谢的影响. 湖泊科学,2011,**23**(6):955-960.
- [ 25 ] 赵福庚,刘友良. 高等植物体内特殊形态多胺的代谢及调节. 植物生理学通讯,2000,**36**(1):1-6.
- [ 26 ] Slocum RD, Kaur-Sawhney R, Galston AW. The physiology and biochemistry of polyamines in plants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1984, **235**(2): 283-303.
- [ 27 ] 汪沛洪. 植物多胺代谢的酶类与胁迫反应. 植物生理学通讯,1990,(1):1-7.
- [ 28 ] 张自坤,刘世琦,刘素慧等. 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,2010,**21**(8): 2051-2056.