

钠盐胁迫对小麦叶片核酸损伤和多胺积累的影响

谈建康¹, 安树青²

(1. 南京大学环境学院, 江苏 南京 210093; 2. 南京大学生命科学学院, 江苏 南京 210093)

摘要:采用室内培养、测定方法研究不同浓度的 NaCl, Na₂SO₄ 和 Na₂CO₃ 胁迫对小麦 (*Triticum aestivum*) 叶片 H₂O₂、核酸代谢和多胺影响。结果表明, 在钠盐胁迫下 H₂O₂ 含量随着胁迫浓度的增加而增加, 其中 Na₂CO₃ 胁迫下 H₂O₂ 含量增加最显著。核酸含量随着胁迫浓度的增加而减少, 且 RNA 含量变化明显大于 DNA, 而核酸酶的活性在低浓度胁迫下升高, 高浓度胁迫下降低, 证实钠盐胁迫主要影响核酸的合成, 其中对小麦叶片 RNA 的影响明显大于对 DNA 的影响。多胺亦随之积累, Na₂CO₃ 胁迫下多胺积累最显著, 且变化量为腐胺 (Put) > 精胺 (Spm) > 亚精胺 (Spd); 高钠盐胁迫下多胺积累不明显, 其中腐胺在 200 mmol · L⁻¹ 下反而减少。

关键词:钠盐; 小麦; 核酸; 核酸酶; 多胺

中图分类号:S131.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1672-2043(2004)03-0428-04

Effects of Sodium Salt on Polyamines Accumulation and Detriments of Nucleic Acid in Wheat Leaves

TAN Jian-kang¹, AN Shu-qing²

(1. Environmental Science College, Nanjing University, Nanjing 210093, China; 2. Biological Science College, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

Abstract: Sodium salt stress effects on Wheat (*Triticum aestivum*) were studied. The content of H₂O₂, nucleic acid metabolism and polyamine accumulation in wheat leaves were measured under different concentrations of NaCl, Na₂SO₄ and Na₂CO₃. The content of H₂O₂ increased with the increase of the salt concentrations, and the effects of different salt were in an order: NaCl < Na₂SO₄ < Na₂CO₃. The nucleic acid contents were decreased under the salt stress, which showed that the decreased quantity was RNA > DNA. The activities of nucleases reduced with the increase of the salt concentrations, but they rose under the low concentration stress. The effects on RNA were greater than those on DNA. The polyamines increased with the increase of the salt concentrations, and the order of the increased quantities was Put > Spm > Spd; while the Put contents showed no significant increases under sever stress of high sodium salt concentrations, but decreased under the treatment of 200 mmol · L⁻¹.

Keywords: sodium salt; wheat; nucleic acid; nuclease; polyamine

逆境胁迫(干旱、光、热、冷等)会引起植物细胞内 H₂O₂ 增加和内源多胺代谢异常^[4, 7, 8, 11]。H₂O₂ 能通过 Harber-Weiss 反应产生 OH·, 导致植物细胞质膜氧化损伤, 核酸代谢紊乱, 较高的胁迫浓度则引起细胞坏死^[5, 7, 12], 但不同钠盐胁迫下核酸代谢变化的报道较少。而多胺能与大分子物质(核酸、膜磷脂等)结合,

形成对环境胁迫的响应, 起到一定的抗逆作用^[2, 5, 8]。但是目前多胺在逆境胁迫下的作用机制尚未清楚, 一些研究认为腐胺、精胺、亚精胺均积累, 并能对植物的核酸、膜脂起保护作用^[3, 7, 8], 有些资料却认为只有 Put 和植物的抗逆性有重要的联系, 或者认为多胺含量多少并不能决定植物的抗逆能力^[2, 10]。本实验针对我国不同类型盐碱土, 分析不同钠盐 (NaCl, Na₂SO₄ 和 Na₂CO₃) 胁迫下 H₂O₂、内源多胺的积累与核酸代谢的关系, 以期得出一定的相关规律, 为我国丰富的盐土资源的利用提供一些理论依据。

收稿日期: 2003-09-19

基金项目: 国家自然科学基金(31070173)

作者简介: 谈建康(1975—), 男, 博士在读, 主要从事环境毒理学研究。

E-mail: tanjiankang2002@163.com

1 材料和实验方法

小麦幼苗(扬麦 158)于 25 ℃/20 ℃、光照强度 5 000 ~ 7 000 lx、1/2 Hoagland 营养液条件下培养至约 3.5 cm 时,用浓度为 0, 50, 100, 150 和 200 mmol · L⁻¹ NaCl, Na₂SO₄ 和 Na₂CO₃ 的 1/2 Hoagland 溶液处理。处理 2 周后取新鲜叶片待测定。

1.1 H₂O₂ 的测定

按照林植芳等^[4]方法测定。以 μmol · g⁻¹FW 表示。

1.2 核酸(DNA 和 RNA)的测定

核酸总量按段辉国^[5]的方法测定,DNA 含量用二苯胺法测定,RNA 含量用总核酸减去 DNA 含量获得,最终含量用相对于空白处理的百分比表示。

1.3 核酸酶(DNase 和 RNase)活性的测定

DNase 与 RNase 活性按 Mittler^[12] 等人的方法测定。

1.4 多胺的测定

称取新鲜叶片,用 10% 冰过氯酸于 4 ℃ 下研磨,并 15 000 g 离心 20 min,取上清液 500 μL 混合 1 mL 2 mol · L⁻¹ NaOH,加入 10 μL 苯甲酰氯后振荡均匀,室温下放置 20 min,加入 2 mL 饱和 NaCl 和 2 mL 无水乙醚,4 000 g 离心 5 min,收集醚相,冷冻干燥,甲醇溶解,参照 Flores^[7]等人的方法测定多胺。

2 结果分析

2.1 钠盐胁迫对 H₂O₂ 含量的影响

如图 1,在 NaCl 胁迫下 H₂O₂ 含量缓慢增加,在 150 mmol · L⁻¹ 时分别比对照增加了 15%, 22%, 36% 和 33%。在 Na₂SO₄ 胁迫下 H₂O₂ 含量变化类似 NaCl 胁迫处理,在 > 150 mmol · L⁻¹ 处理下增幅明显,分别比对照增加了 45% 和 55%。在 Na₂CO₃ 胁迫下,当胁迫浓度高于 100 mmol · L⁻¹ 时,分别比对照增加 48%, 51% 和 95%,显著增加。由此表明,在低浓度胁迫下,3 种盐胁迫影响很小;而高浓度(> 100 mmol · L⁻¹)时 Na₂SO₄ 影响明显大于 NaCl 影响,Na₂CO₃ 影响最显著。植物体内 H₂O₂ 生成毒性更大的 OH ·^[4,11]。在逆境胁迫下,植物体内 H₂O₂ 代谢平衡失调,导致其含量升高。当它积累到一定的水平,必然会诱发植物膜脂不饱和脂肪酸发生连锁的过氧化反应,使膜脂受到自由基伤害^[4,6]。在本实验中 H₂O₂ 含量随着钠盐胁迫浓度的增加而明显增加,尤其在低浓度钠盐和 Na₂CO₃ 胁迫下,表明了小麦幼苗受到较严重的

膜脂损伤。同时,植物体内 H₂O₂ 的含量变化与 MDA 的积累呈显著的正相关性($r = 0.782 \sim 0.937$, MDA 数据参照文献[6])。MDA 作为膜脂损伤的一个标志物,一般认为其积累的越多,膜脂过氧化速率就越大,即细胞膜损伤程度越大。因此进一步证实了钠盐胁迫能通过影响 H₂O₂ 代谢对细胞脂膜造成过氧化损伤。

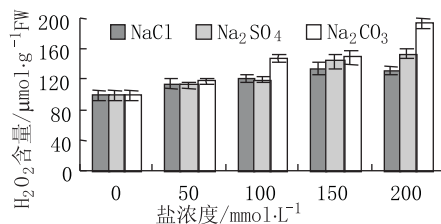


图 1 不同盐溶液对小麦叶片 H₂O₂ 含量的影响

Figure 1 Effect of different salt solutions on the content of H₂O₂ in wheat leaves

2.2 钠盐胁迫对核酸含量的影响

DNA 含量随着钠盐胁迫浓度增大而减少(图 2)。其中 Na₂SO₄ 和 NaCl 胁迫对 DNA 含量影响类似;Na₂CO₃ 胁迫下 DNA 含量显著减小,分别为空白的 95.29%, 62.40%, 65.30%, 38.70%, 在 200 mmol · L⁻¹ Na₂CO₃ 胁迫时 DNA 含量约为 NaCl 和 Na₂SO₄ 影响下的 50%,明显低于前二者处理。RNA 含量变化类似于 DNA 含量的变化(图 3),但减少量明显大于 DNA 的变化量(在 200 mmol · L⁻¹ 时为空白的 50.7%, 47.4%, 28.5%),表明钠盐胁迫能减少小麦

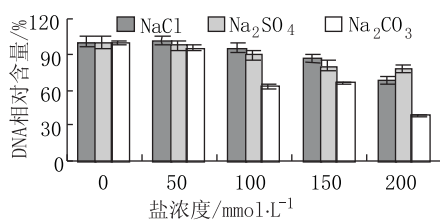


图 2 不同盐溶液对小麦叶片 DNA 含量的影响

Figure 2 Effect of different salt solutions on the content of DNA in wheat leaves

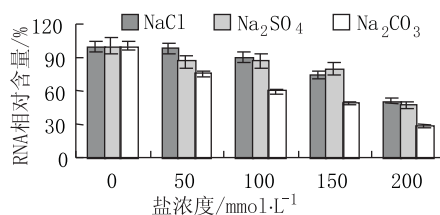


图 3 不同盐溶液对小麦叶片 RNA 含量的影响

Figure 3 Effect of different salt solutions on the content of RNA in wheat leaves

叶片核酸的积累, 其中对 RNA 代谢的影响大于对 DNA 的影响。

2.3 钠盐胁迫对核酸酶含量的影响

DNase 酶活性在盐胁迫下呈下降趋势(图 4), 且 Na_2CO_3 胁迫下活力下降最快, Na_2SO_4 胁迫下酶活力下降略大于 NaCl 胁迫下的变化。RNase 酶对盐胁迫亦十分敏感(图 5)。在 NaCl 胁迫下, 当盐浓度低于 $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 酶活性高于对照, 分别为对照的 108.7%, 105.5% 和 103.3%; 随着胁迫浓度的增加酶活性减弱。在 Na_2SO_4 胁迫下, 当盐浓度在低于 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 酶活性亦高于对照, 为对照的 102.2%, 105.4%, 略低于 NaCl 胁迫的影响; 当胁迫浓度增大时, 酶活性迅速下降至分别为对照的 67.8%, 64.5%。在 Na_2CO_3 胁迫下, 酶活性显著下降, 分别为对照的 74.9%, 73.8%, 55.7% 和 57.4%。由此可见, 钠盐胁迫下核酸酶的活性受到了抑制, 但低浓度的钠盐胁迫能促进 RNase 酶的活性。RNase 对盐胁迫较 DNase 敏感。

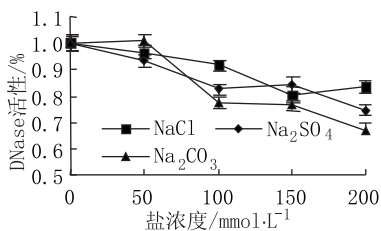


图 4 不同盐溶液对小麦叶片 DNase 活性的影响

Figure 4 Effect of different salt solutions on the activity of DNase in wheat leaves

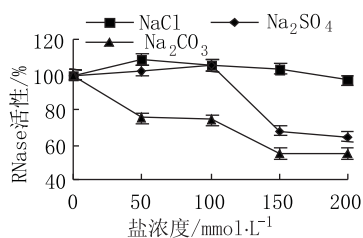


图 5 不同盐溶液对小麦叶片 RNase 活性的影响

Figure 5 Effect of different salt solutions on the activity of RNase in wheat leaves

植物在逆境中并非完全被动的衰减生命, 而是积极地进行核酸和蛋白质等生命物质的代谢^[3, 9, 15]。在胁迫下植物核酸可通过高级修饰保护和抗氧化保护下保持稳定^[3, 9, 13]; 但随着胁迫强度的增加, 内源 H_2O_2 的积累, 加剧核酸过氧化, 加速核酸降解^[6, 14], 因此在低浓度钠盐胁迫下核酸含量变化不明显, 而在高浓度胁迫和 Na_2CO_3 胁迫下核酸含量明显减少, 并与 H_2O_2

的积累有较显著的负相关性($r = -0.824$)。一些研究认为, 逆境胁迫下膜系统的破坏, 细胞区隔内某些物质的释放直接诱导了 DNase, RNase 活性, 甚至直接损伤核酸, 使 DNA, RNA 剪切、降解和修饰, 致使核酸代谢平衡失控^[9, 13, 14]。而本实验中在低浓度胁迫下 RNase 的活性升高, 将导致 RNA 水解而含量随之降低, 但在高浓度胁迫下 RNase 活性降低, RNA 的含量却随之减少; 而 DNA 含量和 DNase 活性均降低, 由此可以推断在钠盐胁迫下核酸的减少主要由核酸的合成减弱决定, 而并非由核酸的降解加剧造成。同时研究表明, 钠盐胁迫下小麦幼苗 DNA 含量变化趋势比 RNA 小, 说明高浓度钠盐胁迫对核酸的影响主要体现在对 RNA 合成机制的影响。

2.4 钠盐胁迫对多胺含量的影响

如图 6, 在 NaCl 胁迫下, 小麦叶片腐胺(put)含量明显积累; Na_2SO_4 胁迫下 Put 的变化与 NaCl 胁迫的影响相似; Na_2CO_3 胁迫下 Put 的积累显著高于 NaCl 和 Na_2SO_4 胁迫下 Put 的积累量; 而在 $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Na_2CO_3 胁迫下 Put 含量明显减少。由此推测低浓度的钠盐胁迫条件能诱导 Put 的合成, 并随着胁迫强度的增加, Put 明显积累, 而在高浓度 Na_2CO_3 胁迫下 Put 合成机制受到限制, Put 含量明显减少。

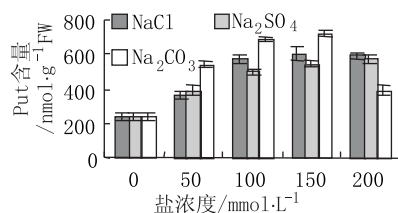


图 6 不同盐溶液对小麦叶片 Put 含量的影响

Figure 6 Effect of different salt solutions on the content of Put in wheat leaves

亚精胺(Spd)的积累类似于 Put 的积累(如图 7), 在 NaCl 胁迫下 Spd 明显积累, 但随着胁迫浓度的增加, 在高浓度胁迫($> 100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)下积累不明显, 分别为对照的 170%, 179% 和 167%; Na_2SO_4 胁迫下 Spd 含量的变化类似于 NaCl 胁迫的影响; Na_2CO_3 胁迫下 Spd 的积累显著大于 NaCl 和 Na_2SO_4 下的 Spd 变化。

在钠盐胁迫下精胺(Spm)的积累类似于 Put 的积累(如图 8), 且不同的钠盐类型影响差异显著: $\text{NaCl} < \text{Na}_2\text{SO}_4 < \text{Na}_2\text{CO}_3$ 。

多胺是植物体代谢过程中产生的一种小分子脂肪族含氮碱, 在逆境条件下大量积累, 参与植物机体

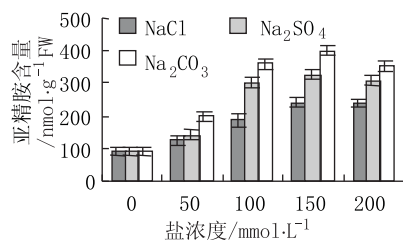


图 7 不同盐溶液对小麦叶片亚精胺含量的影响

Figure 7 Effect of different salt solutions on the content of Spd in wheat leaves

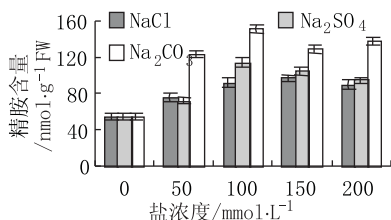


图 8 不同盐溶液对小麦叶片精胺含量的影响

Figure 8 Effect of different salt solutions on the content of Spm in wheat leaves

对逆境胁迫的响应,延缓植物机体细胞的衰老^[2, 3, 7, 8]。钠盐胁迫不仅明显提高植物体内 Put 积累,也提高了 Spd 和 Spm 积累^[3, 8];在低浓度盐胁迫下,多胺含量明显增加,这与前人的实验结果是一致的^[3, 7, 8, 10],并且与 H₂O₂ 的积累有较显著的正相关性 ($r = -0.726$),而在高浓度胁迫下 Put 明显减少,这与小麦在胁迫下耐逆反应极不相应,很有可能是由于在强盐胁迫下腐胺的合成机制受损,Put 含量减少,导致植物机体抗逆的能力减弱,与高浓度胁迫下植物体衰老甚至凋亡的现象具有良好的一致,暗示了 Put 与植物的抗逆能力可能有直接的联系^[3, 8]。Spm 和 Spd 含量及变化量明显低于 Put (Put > Spm > Spd),亦说明了钠盐胁迫下多胺的积累主要表现于 Put 的积累,Put 的大量积累可能参与了植物的抗逆反应。同时,多胺不仅能直接或间接的清除自由基,而且能与核酸等大分子以共价键结合在一起,稳定核酸结构^[15],在低浓度钠盐胁迫下多胺的增加,可增强核酸结构的稳定性,这与核酸在低浓度胁迫下保持稳定,在高浓度下胁迫下由于多胺合成受阻而核酸急剧减少的现象相一致,进一步暗示了多胺增强植物的抗逆能力。目前关于多胺与核酸结合以提高核酸稳定性机理的研究较少,有待进一步深入研究。

3 结论

钠盐胁迫促进了小麦体内 H₂O₂ 的积累,其中

Na₂CO₃ 胁迫下增加最显著。核酸含量随着胁迫浓度增加而减少;RNase 的活性在低浓度胁迫下升高,高浓度胁迫下降低,而 DNase 活性降低,证实钠盐胁迫主要影响核酸的合成,其中对小麦叶片 RNA 的影响明显大于对 DNA 的影响。多胺亦随之积累,Na₂CO₃ 胁迫下多胺积累最显著,且变化量为腐胺 (Put) > 精胺 (Spm) > 亚精胺 (Spd);高钠盐胁迫下多胺积累不明显。

参考文献:

- [1] 安树青,王铮峰,等. NaCl, Na₂SO₄ 和 Na₂CO₃ 对小麦生长、脯氨酸及 Na⁺, K⁺ 含量影响的比较研究[J]. 南京大学学报(自然科学), 1996, 32(4): 610 - 614.
- [2] 张木清,陈如凯,余松烈. 水分胁迫下蔗叶多胺代谢变化及其同抗旱性的关系[J]. 植物生理学报, 1996, 22 (3): 327 - 332.
- [3] 陈坤明,张承烈. 干旱期间春小麦叶片多胺含量与作物抗旱性的关系[J]. 植物生理学报, 2000, 26 (5): 381 - 386.
- [4] 林植芳,李双顺,林桂珠,等. 老叶片和叶绿体中 H₂O₂ 的积累与膜脂过氧化关系[J]. 植物生理学报, 1988, 14(1): 16 - 22.
- [5] 段辉国. 亚精胺对小麦离体叶片衰老过程中核酸和核酸酶的影响[J]. 四川师范学院学报(自然科学版), 1999, 20(3): 230 - 233.
- [6] 谈建康,安树青,等. NaCl, Na₂SO₄ 和 Na₂CO₃ 胁迫对小麦叶片自由基含量及质膜透性的比较研究[J]. 植物学通报, 1998, 15(6): 82 - 86.
- [7] Flores H E, Galston. Analysis of polyamines in high plants by high performance liquid chromatography[J]. *Plant Physiol*, 1994, 17: 507 - 523.
- [8] Galston C W. Polyamines in plant physiology[J]. *Plant Physiol*, 1990, 94: 406 - 410.
- [9] Halliwell B. Toxic effects of oxygen on plant tissue[A]. In: *Chloroplasts Metabolism*[C]. Clarendon Press. Oxford, 1981. 179 - 185.
- [10] Hiatt A C, Malmberg R L. Utilization of putrescine in tobacco cell lines resistant to inhibitors of polyamine syntheses[J]. *Plant Physiol*, 1988, 86: 441 - 446.
- [11] Liang Z. H₂O₂ isolation of spinach leaf peroxisomes in 0.25 molar sucrose solution by percoll density gradient centrifugation[J]. *Plant Physiol*, 1982, 70: 1210 - 1212.
- [12] Mittler R, Iam E. Identification, characterization and purification of a tobacco endonuclease activity induced on hypersensitive response cell death[J]. *The Plant Cell*, 1995, (7): 1951 - 1962.
- [13] Ocirk L F, Steighrer R J. Oxidized apurine/apyrimidine site formed in DNA by oxidative mutagens[J]. *Mut Res*, 1989, 214: 13 - 22.
- [14] Rosen G M, Ranckman E J. Spin trapping of superoxide and hydroxyl radical[J]. *Methods Enzymol*, 1984, 105: 198 - 209.
- [15] Votyakova T V, Wallace H M. The covalent attachment of polyamines to proteins in plant mitochondria[J]. *Europ J Biochem*, 1999, 260(1): 250 - 257.