

外源多胺、多胺合成前体及抑制剂对花生 连体叶片衰老的影响

王晓云, 李向东, 邹琦

(山东农业大学生命科学学院, 山东泰安 271018)

摘要: 对生长中后期大田花生连体叶片喷施外源多胺、多胺合成前体提高了叶片多胺含量, 延缓了叶片衰老过程中叶绿素及蛋白质含量的下降, 提高了活性氧清除酶类的活性, 降低了膜脂过氧化产物丙二醛含量; 喷施多胺合成抑制剂 MGBG[甲基乙二醛-双(脒基脒)], 对叶片多胺含量及衰老无显著影响。

关键词: 多胺; 衰老; 花生; 叶片

中图分类号: S565.2 文献标识码: A 文章编号: 0578-1752(2000)03-0030-06

多胺对高等植物多种生理过程的调节作用已引起人们的重视^[1]。外源多胺能够延缓黑暗诱导的离体叶片的衰老, 特别是精胺(Spm)和亚精胺(Spd)具有明显的保绿和抑制蛋白质降解的作用^[1,2,12]。有人指出外源多胺很难透过叶表皮, 也难在细胞间转移, 其保绿效果仅局限于和溶液接触的叶片切口附近, 而多胺合成前体却能较快被植物组织吸收、运输, 且在体内较快转化为多胺^[3,13]。然而近期的研究表明, 对水分胁迫下的植株喷施外源多胺, 具有明显延缓早促衰老的作用^[2,13]。能否对大田作物喷施多胺或多胺合成前体, 以延缓衰老, 对此我们进行了以下试验。

1 材料与方 法

1.1 供试材料与处理

试验于山东农业大学实习农场进行, 供试花生品种辐 8707, 5 月初播种, 密度 14 墩/m² (每公顷 14 万墩)。于结荚期分别喷以 1 mmol/L 的 Spd、10 mmol/L 的 L-Arg (L-精胺酸, 多胺合成前体)、5 mmol/L 的多胺合成抑制剂 MGBG[甲基乙二醛-双(脒基脒)], 每公顷用药液 750kg, 以喷水为对照。为了便于附着, 每升药液中加入 1 滴吐温 20。小区面积 3× 5 m², 随机区组排列, 重复 3 次。

1.2 取样方法

选择生长一致的植株主茎, 标记叶龄 10d(叶片展开后天数)的倒 3 叶和叶龄 20d 的倒 5 叶, 喷后 5d, 进行第一次采样, 随叶龄增加, 每 8d 左右采标记叶一次, 直至收获, 每样采 25 株, 共 100 片叶片, 追踪不同处理两个叶位叶片的衰老情况。

1.3 测试项目

多胺含量的测定参照 H agege^[14]和杨浚^[6]薄层-荧光分析法, 略作修改, 以 5% 高氯酸提取样品, 取 0.4ml 上清液加入 0.4ml 丹磺酰氯丙酮液(3mg/ml)和 0.3ml 饱和 Na₂CO₃, 置于

收稿日期: 1999-08-04

作者简介: 王晓云(1962-), 女, 山东泰安人, 山东农业大学副教授, 博士。邹琦为本文通讯联系人。

60℃ 恒温水浴中 15 min, 加入苯进行抽提并进行薄层层析, 用荧光分光光度计测定。叶绿素含量的测定参照 Arnon^[15]法, 可溶性蛋白质含量、丙二醛(MDA)含量参照文献[17], 超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)活性参照文献[17]和[8]方法测定。

2 结果与分析

2.1 不同处理叶绿素含量的变化

从不同处理倒 3 叶的叶绿素含量变化可以看出(图 1, 左), 在喷施处理 5~20d(叶龄 15~30d)内, 对照叶绿素含量处于缓慢下降期, 处理 20d 后叶绿素含量急剧下降。喷施 Spd 后, 在处理 5~20d 内, 叶绿素含量不仅没有下降, 反而略有提高, 统计分析表明其叶绿素含量显著高于对照, 特别是喷施后 12d 和 20d, Spd 处理的叶绿素含量, 分别比对照高 27.8% 和 34.7%。处理 20d 后喷施 Spd 的叶绿素含量也急剧下降, 从测试结果看, 略高于对照, 但差异不显著。总的看, Spd 处理使叶绿素缓降期后延, 但衰老后期无作用。L-Arg 处理的叶绿素含量变化趋势与对照相似, 但处理后 5d 和 12d 的叶绿素含量显著高于对照, 分别比对照高 8.6% 和 11.1%。MGBG 处理的叶绿素含量与对照无显著差异。

从倒 5 叶叶绿素含量的变化看(图 1, 右), 对照叶绿素含量在喷施处理后 5~12d(叶龄 25~32d)内缓慢下降, 处理 12d 后随叶龄增加叶绿素含量急剧下降, 与倒 3 叶叶龄 15~30d 内叶绿素含量缓慢下降, 30d 后急剧下降相似。Spd 和 L-Arg 处理在喷后 12d 内叶绿素含量没有下降反而略有上升, 12d 后随叶龄增加含量下降。两处理间叶绿素含量无显著差异, 但除处理后 5d 的测试结果与对照无差异外, 其余都显著高于对照, 以处理后 20d 的结果差异最大, Spd 和 L-Arg 处理的叶绿素含量分别比对照高 27.2% 和 31.6%。MGBG 处理除喷后 12d 叶绿素含量显著低于对照外, 其余与对照无显著差异。

2.2 不同处理蛋白质含量的变化

不同处理倒 3 叶叶片蛋白质含量的变化见图 2(左), 对照蛋白质含量在处理 12d(叶

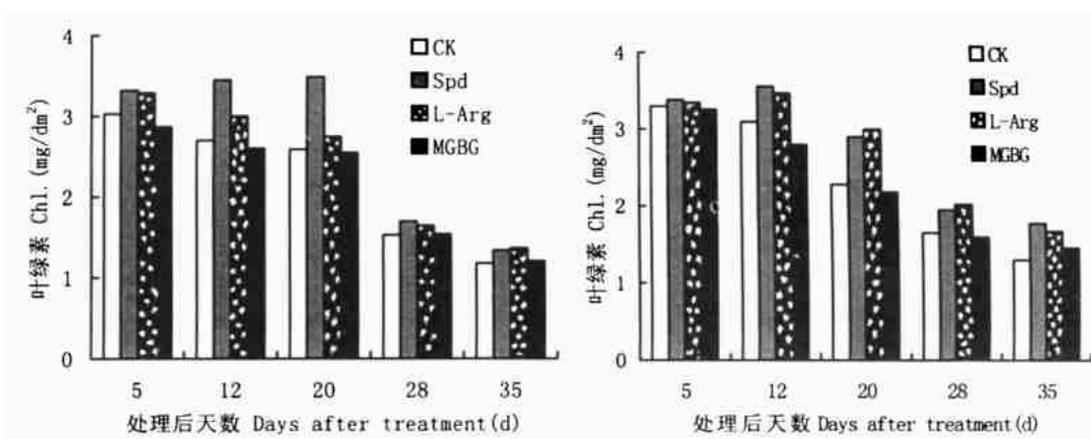


图 1 不同处理的花生倒 3 叶(左)和倒 5 叶(右)叶绿素含量的变化

Fig. 1 Changes of chlorophyll content in the top 3rd leaf (left) and top 5th leaf (right) of peanut by different treatments

龄 22d) 达最大值, 即叶龄 22d 内, 随叶龄增加蛋白质含量上升, 叶龄 22d 后, 随叶龄增加蛋白质含量下降。Spd 处理的蛋白质含量也在处理后 12d 达峰值, 处理后 5 d、12 d 和 20d 的蛋白质含量都显著高于对照。这说明喷施 Spd 既提高了蛋白质合成又延缓了蛋白质降解。喷施 L-Arg 后叶片蛋白质含量与对照的变化趋势一致, 但 12d 和 20d 的结果显著高于对照。MGBG 处理与对照无显著差异。

倒 5 叶蛋白质含量的变化结果表明(图 2, 右), 各处理喷施后 5d(叶龄 25d) 蛋白质含量最高, 随叶龄增加蛋白质含量逐渐降低。Spd 处理, 喷施后 20d 内蛋白质含量显著高于对照。L-Arg 处理后 12d 的结果显著高于对照, 其他时期的结果虽高于对照, 但差异不显著。MGBG 处理, 喷施后 5d 的结果显著低于对照, 其他时期无显著差异。

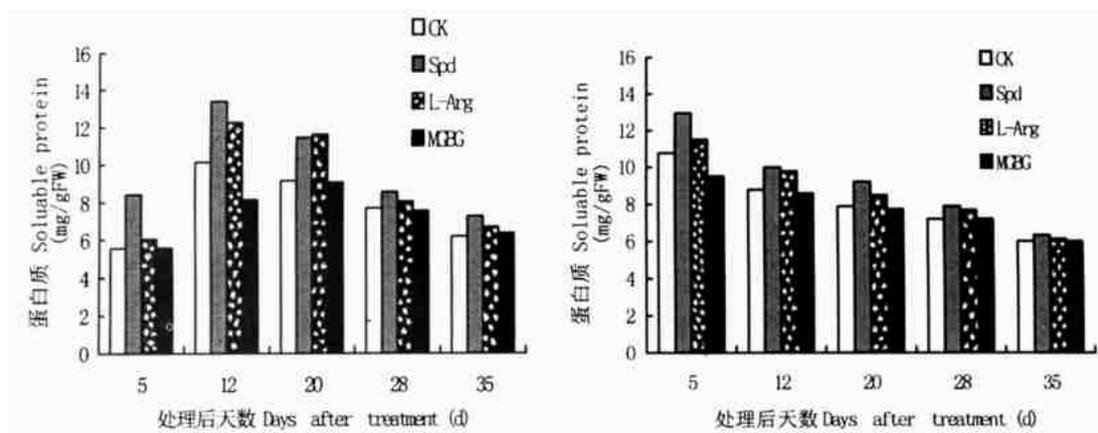


图 2 不同处理的花生倒 3 叶(左)和倒 5 叶(右)可溶性蛋白质含量的变化

Fig. 2 Changes of soluble protein content in the top 3rd leaf (left) and top 5th leaf (right) of peanut by different treatments

2.3 不同处理活性氧代谢的差异

组织衰老与活性氧对膜脂和生物大分子的氧化损伤有密切关系, 在正常情况下, 活性氧的产生和清除之间处于动态平衡, 但当植物衰老时, 活性氧清除酶活性下降, 不能完全清除细胞内的活性氧, 使膜脂不饱和脂肪酸过氧化, 积累过氧化产物 MDA, 因此 MDA 含量可反映细胞内膜脂过氧化水平。表 1 为喷施处理后 28d 不同叶位叶活性氧清除酶活性及 MDA 含量, 可以看出, Spd 和 L-Arg 显著提高了活性氧清除酶特别是 SOD 和 CAT 的活性, 降低膜脂过氧化程度, 使 MDA 含量显著低于对照。而 MGBG 处理的 MDA 含量与对照无显著差异。

2.4 喷施多胺合成前体及多胺合成抑制剂对内源多胺含量的影响

倒 3 叶和倒 5 叶内源多胺的种类及含量的测定结果见表 2 和表 3。喷施 L-Arg 和 MGBG 未引起多胺种类的变化, 各种多胺含量却有明显变化。对倒 3 叶来说, 对照的 Spm 和 Spd 含量随叶龄增加, 其含量为下降趋势。喷施 L-Arg 后, 在 20d 内 Spm 的含量显著高于对照, 特别是喷后 5d, L-Arg 处理的 Spm 含量为 118nmol/gFW, 为对照 57.9 的 2.04 倍。随处理后时间延长, 效果越来越小, 处理后 12d 和 20d 的 Spm 含量分别比对照高 28.2% 和

表 1 不同处理对花生叶片保护酶活性和 MDA 含量的影响¹⁾

Table 1 Effects of different treatments on activities of protect enzymes and MDA content in peanut leaves

处理 Treatment	倒 3 叶 The top 3rd leaf				倒 5 叶 The top 5th leaf			
	SOD	CAT	POD	MDA	SOD	CAT	POD	MDA
	CK	472.8	15.45	13.20	47.38	440.6	12.36	16.185
Spd	630.5**	25.37**	15.54	36.45**	515.8**	18.68**	19.614*	39.54*
L-A rg	555.2**	23.22**	19.11**	37.88**	548.1**	17.54**	18.795*	40.88*
MGBG	481.1	14.21	16.47*	49.55	465.7*	7.14**	15.825	42.53

¹⁾SOD: unit/gFW; CAT: H₂O₂m g/gFW; POD: Δ 470/gFW; MDA: nm ol/gFW;

* 为 5% 显著水平; ** 为 1% 显著水平。下同

* Significant at 5% level, ** Significant at 1% level. The same as below

表 2 不同处理倒 3 叶花生叶片内源多胺含量的动态变化

Table 2 Changes of PAs content of the 3rd leaf from top of peanut by different treatments

多胺种类 PAs type	处理 Treatments	不同采样时期叶片内源多胺含量 PAs contents in different sampling date(nm ol/gFW)				
		5d	12d	20d	28d	35d
		Spm	CK	57.90	29.10	21.01
	L-A rg	118.0**	37.30*	26.42*	14.71	13.89
	MGBG	49.34*	26.73	23.12	13.35	13.27
Spd	CK	45.16	39.78	38.34	22.23	23.43
	L-A rg	67.57**	45.68*	39.08	24.16	21.26
	MGBG	38.86*	36.45	39.87	20.17	22.93
Put	CK	309.1	685.5	357.9	175.6	150.1
	L-A rg	1022**	964.0**	536.5**	387.4**	349.9**
	MGBG	473.8**	531.9**	332.4	163.3	156.4
PAs	CK	412.2	754.5	417.2	210.2	187.7
	L-A rg	1208**	1047**	602.0**	426.3**	385.1**
	MGBG	562.0**	595.1**	395.4	196.8	192.6

表 3 不同处理倒 5 叶花生叶片内源多胺含量的动态变化

Table 3 Changes of PAs content of the 5th leaf from top of peanut by different treatments

多胺种类 PAs type	处理 Treatments	不同采样时期叶片内源多胺含量 PAs contents in different sampling date(nm ol/gFW)				
		5d	12d	20d	28d	35d
		Spm	CK	42.71	31.52	31.65
	L-A rg	58.61**	32.59	34.33	13.78	15.75
	MGBG	51.38*	33.93	29.69	12.34	14.26
Spd	CK	41.13	36.23	27.14	20.98	21.4
	L-A rg	46.71*	42.37*	33.38*	21.67	24.08
	MGBG	42.38	38.96	26.83	19.54	20.65
Put	CK	409.4	454.9	230.5	93.22	78.55
	L-A rg	502.6**	511.7**	345.8**	165.6**	71.07
	MGBG	427.1	363.2**	209.7	88.52	80.20
PAs	CK	493.2	522.7	289.3	127.7	115.8
	L-A rg	607.9**	586.7**	413.5**	201.1**	110.9
	MGBG	520.9	436.1**	266.2	120.4	115.1

25.8%。处理 20d 后的测试结果与对照无显著差异。对 Spd 含量的影响,也是喷施早期效果较明显,5d 和 12d 的 Spd 含量显著高于对照,对叶片后期 Spd 含量无影响。对照 Put 含量是一个先上升后下降的变化过程,喷施 L-Arg 后,显著提高了整个叶片功能期的 Put 含量,L-Arg 处理后 5d 叶片 Put 含量即达最大值,此时 Put 含量是对照的 3.31 倍,随叶龄增加,Put 含量下降。三种多胺中,Put 含量最高,且比 Spm 和 Spd 高出一个数量级,因此多胺总量的变化取决于 Put 含量的变化。MGBG 对各种多胺含量影响不大,规律也不明显。倒 5 叶的变化情况与倒 3 叶相似。

3 讨论

目前,花生生产上,后期叶片普遍易早衰,成为限制产量进一步提高的重要因素,如何协调好后期叶片衰老与产品器官充实之间的关系,将对提高花生产量起到积极作用。

关于多胺可以延缓叶片衰老的实验结果,多半是利用离体叶片在黑暗条件下做出的^[1,2,12],而对大田条件下整株植物叶片内源多胺变化与衰老之间关系的研究极少^[9]。根据我们的试验结果^[10],花生幼嫩叶片 Spm 和 Spd 的含量最高,随叶龄增加含量下降,叶片 Put 含量从叶片展开到 20~30d,是上升阶段,当叶片达到最大功能期时,Put 含量达最大值,并随叶龄增加而减少,多胺总量的变化趋势与 Put 含量相似,当叶片达到最大功能期时,多胺总量达最大值,叶片衰老程度越重,内源多胺含量越少。本实验结果表明,对大田花生喷施外源多胺、多胺合成前体,一般 20d 内,有提高叶片叶绿素、蛋白质含量并延缓衰老过程中其含量下降的作用,Spd 处理的效果比 L-Arg 处理更为明显。通过测定叶片内源多胺含量发现,L-Arg 有提高叶片 Spm 和 Spd 含量的作用,但一般幅度不大,而对 Put 含量的影响最大,L-Arg 显著提高了整个叶片功能期的 Put 含量。多胺是多聚阳离子,氨基数目越多,活性越高,三种多胺中 Spm 活性最强,Put 最弱,Spd 居中,这可能是 Spd 处理比 L-Arg 处理效果更明显的原因。喷施 MGBG 总的来说对多胺的影响较小,且规律不明显,喷施效果也不明显。前人曾指出,在光合组织中,多胺使叶绿体发育良好,组织排列紧密,有稳定叶绿体类囊体膜,防止叶绿素、蛋白质降解的作用^[11],这与我们的试验结果一致。已观察到多胺稳定燕麦类囊体膜上关键蛋白质、D₁、D₂、Cyt_f 和 Rubisco 大亚基的功能,推测多胺延缓衰老的作用与蛋白质翻译后的修饰作用有关^[16]。

叶片衰老过程中,细胞内活性氧代谢平衡被破坏,过剩的活性氧引发并加剧膜脂过氧化,形成过氧化产物 MDA。MDA 又是一种能强烈地与细胞内各种成分发生反应的物质,因而引起酶系统和膜系统的严重损伤。Drolet(1986)最早研究发现多胺能有效地清除化学和酶系统产生的自由基,更重要的是它们能清除由衰老的微粒体膜所产生的超氧化物自由基^[17]。本试验结果证实,通过喷施外源多胺和多胺合成前体,提高了花生体内多胺含量,同时提高了清除活性氧的保护酶类的活性,使膜脂过氧化程度降低。这表明多胺延缓衰老的作用与活性氧代谢有关,它可直接或通过提高保护酶活性清除活性氧。至于多胺是如何提高保护酶活性的,还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 蒋琳,沈曾佑,张志良,等.多胺对裸大麦离体叶片活性氧代谢的影响[J].植物生理学报.1993,19(4):367~371.

- [2] 张国珍, 周睿, 孙山, 等. 精胺对离体小麦叶片膜脂过氧化的影响[J]. 山东农业大学学报. 1992, 23(2): 176~179.
- [3] 杨浚, 俞炳泉. 精胺对离体大麦叶片叶绿素和蛋白质含量的影响[J]. 植物生理学通讯. 1989, (2): 42~44.
- [4] 商振清, 王秀芬, 周慧欣. 亚精胺对提高玉米幼苗抗旱机理的研究[J]. 河北农业大学学报. 1996, 19(3): 60~63.
- [5] 檀建新, 史吉平, 李广敏, 等. 亚精胺对水分胁迫下玉米幼苗内源乙烯和多胺含量的影响[J]. 植物生理学通讯. 1995, 31(2): 99~102.
- [6] 杨浚, 贺平清, 俞炳泉. 植物多胺的薄层-荧光测定法[J]. 植物生理学通讯. 1988, (6): 63~66.
- [7] 李柏林, 梅慧生. 燕麦叶片衰老与活性氧代谢的关系[J]. 植物生理学报. 1989, 15(1): 6~10.
- [8] 黄维玉, 蒋小满, 王亚来, 等. 离区过氧化物酶与叶柄脱落的关系[J]. 陕西师大学报. 1986, (3): 55~62.
- [9] 沈仁峰, 吴振球. 杂交水稻连体和离体叶片衰老与多胺的关系[J]. 湖南农学院学报. 1993, 19(2): 117~130.
- [10] 王晓云, 马池珠, 李向东. 花生不同衰老型品种叶片衰老过程中多胺变化规律的研究[J]. 中国油料作物学报. 1999, 21(3): 31~34.
- [11] Evans P T, Malmberg R L. Do polyamines have roles in plant development[J]. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant mol. Biol. 1989, 40: 235~269.
- [12] Altman A. Retardation of radish leaf senescence by polyamines[J]. Physiol. Plant. 1982, 54: 189~193.
- [13] Cheng S H, Kao C H. Localized effect of polyamine on chlorophyll loss. Plant Cell Physiol. 1983, 24: 1463~1467.
- [14] Hagege D, Kevers C, Geuns J, et al. Ethylene production and polyamine content of fully habituated sugarbeet call[J]. J. Plant Physiol. 1994, 143: 722~725.
- [15] Arnon D I. Copper enzymes in isolated chloroplast, polyphenol oxidase in *Beta vulgaris* [J]. Plant Physiol. 1949, 24: 1.
- [16] Serafini-Fracassini D, Duca S D, Beninati S. Plant transglutaminases[J]. Phytochemistry. 1995, 40(2): 355~365.
- [17] Drolet G, Dumbroff E, Legge R L, et al. Radical scavenging properties of polyamines[J]. Phytochemistry. 1986, 25: 367~371.

Effect of Polyamines on Senescence of Attached Peanut Leaves

Wang Xiaoyun, Li Xiangdong, Zou Qi

(Life Science Academy, Shandong Agricultural University, Taian, Shandong 271018)

Abstract: By spraying an exogenous polyamine (Spd), one of its precursor L-Arg and an inhibitor of polyamine biosynthesis on the intact leaves of peanut in the middle and late stages in the field, the relationship between polyamines and senescence was studied. By spraying Spd and L-Arg the endogenous polyamines were raised and the loss of chlorophyll and protein delayed, the activities of active oxygen scavenger enzymes (SOD, CAT and POD) raised and the content of lipid peroxide MDA reduced significantly. Spraying the inhibitor of polyamine biosynthesis MGBG (methylglyoxal bis-(guanylhydrazine)) didn't have significant effects on endogenous polyamines and leaf senescence.

Key words: Polyamines; Senescence; Peanut; Leaves