

水分胁迫对水稻叶片可溶性糖和游离脯氨酸含量的影响

陈晓远, 凌木生, 高志红

(韶关学院英东生物工程学院, 广东 韶关 512005)

摘要: 在营养液培养条件下, 测定了水稻品种金优 402 幼苗叶片中可溶性糖、游离脯氨酸和游离氨基酸的含量。结果表明, 经 50g/L PEG - 6000 处理 5d 的植株, 其叶片可溶性糖、游离脯氨酸和游离氨基酸总量均增加。PEG 处理 1d, 可溶性糖和游离氨基酸总量上升到最大值, 并分别达到对照的 1.6 倍和 1.98 倍; PEG 处理 3d, 游离脯氨酸上升到最大值, 达到对照的 1.6 倍, 游离脯氨酸维持较高值的时间比可溶性糖多 2d。可溶性糖、游离脯氨酸和游离氨基酸总量的累积在水分胁迫前期均表现为急剧上升的趋势, 达到峰值后开始下降, 下降的趋势为先剧烈后缓慢, 最后在胁迫解除 2d 后减少到接近对照的水平。试验期间, 水稻叶片中游离脯氨酸占游离氨基酸总量的百分数在处理与对照间无明显差异, 两者均在 4% 左右。

关键词: 水稻; 聚乙二醇; 水分胁迫; 可溶性糖; 游离脯氨酸

中图分类号: S511 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004 - 3268(2006)12 - 0026 - 05

Effects of Water Stress on Soluble Sugars and Free Proline Content in Leaves of Rice

CHEN Xiao yuan, LING Mu sheng, GAO Zhi hong

(Yingdong College of Bioengineering, Shaoguan University, Shaoguan 512005, China)

Abstract: A solution cultivation experiment, with /without PEG, was conducted to evaluate the effects of water stress on soluble sugars and free proline content in leaf of rice variety Jinyou 402 cultivated in simulating water stress condition. The results were as follows: the content of soluble sugars, free proline and total free amino acid in leaf of rice under 5 days water stress induced by 50 g/L PEG all increased; the content of soluble sugars and total free amino acid of leaves treated with PEG for 1 day reached their maximum and arrived at 1.6 times and 1.98 times compared with the control; the free proline content in leaves treated with PEG for 3 days reached its maximum and was 1.6 times as much as that of control and the duration of keeping the peak value of free proline was 2 days longer than that of soluble sugars; the accumulation of soluble sugars, free proline and total free amino acid mounted up rapidly during prophase of water stress and arrived the peak values, then dropped rapidly at first and slowly declined to near the levels of the control after 2 days of water stress relief. The ratio of free proline content to total free amino acid content in the leaves was 4% or so, there was no significant difference between treatments and the control.

Key words: Rice; Polyethylene glycol (PEG); Water stress; Soluble sugar; Free proline

收稿日期: 2006 - 07 - 14

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(33135)

作者简介: 陈晓远(1968 -), 男, 内蒙古丰镇人, 教授, 博士, 主要从事作物水分关系研究。

游离脯氨酸(Proline)是一种广泛存在于植物体内的偶极含氮化合物,是植物细胞中的一种游离氨基酸,具有很高的水溶性。有些学者研究认为,它可以保护细胞膜系统,维持胞内酶的结构,减少胞内蛋白质的降解^[1]。自20世纪50年代Kemple和Macpherson发现多年生黑麦草在干旱胁迫下叶片中累积脯氨酸之后,对它的研究逐渐受到重视^[2]。可溶性糖是一类具有渗透调节功能的小分子有机化合物,是逆境条件下很多非盐生植物的渗透调节剂^[3,4],植物体内可溶性糖累积是对水分胁迫的应激反应^[5]。虽然一般认为在渗透胁迫压力下游离脯氨酸和可溶性糖作为有机渗透物质而积累,但是对于脯氨酸的表现则一直存有争议^[6-10],有待进一步研究^[11,12]。

聚乙二醇(Polyethylene glycol, PEG)是一种惰性的、非离子型的渗透调节剂,可以人为模拟水分胁迫。本研究采用经PEG处理的营养液培养水稻,研究水分胁迫对水稻幼苗中可溶性糖、游离脯氨酸和游离氨基酸总量的影响,了解游离脯氨酸和可溶性糖含量的变化与水稻适应水分胁迫的关系。

1 材料和方法

1.1 试验材料

试验所用材料为水稻品种金优402,来自广东省农科院。

1.2 试验方法

水稻种子经0.1%的HgCl₂溶液表面消毒20min,无菌水洗净后用清水浸种24h,取出后在32℃下催芽24h,再用砂培法于人工气候箱(LRH-800-GS)中进行育苗。培养至一叶一心期,挑选生长一致的幼苗,移栽到打好孔的PVC板上,用海绵固定,进行水培,每个孔内移入1株水稻。培养液的配制采用日本木村B水稻培养液配方,并添加2mmol/L硅酸钠。培养条件为:光照15h,叶面光强4600lx,光照期温度30℃,黑暗期温度27℃,相对湿度65%~75%。水稻生长过程中每隔1d换1次营养液(pH4.9~5.1)。

试验设置2个处理,即加PEG处理(下称+PEG)和不加PEG处理(下称-PEG)。+PEG处理为模拟水分胁迫处理,营养液中加入50g/L PEG-6000,其渗透势相当于-50kPa。-PEG处理为对照,其营养液中不加PEG-6000。水分胁迫处理,从水稻幼苗移栽2周后(三叶一心期)开始进行,持续处理5d,然后转入正常培养液继续培养2d。

取样方法:处理前,先把水稻分成2份,分别取样测定,取样完成后,1份用作水分胁迫处理,另一份用作对照。胁迫处理后第2天进行取样测定,每天取样1次,连续取样测定5d,水分胁迫解除后再连续取样测定2d。

1.3 测定方法

1.3.1 可溶性糖含量的测定 采用蒽酮比色法。取新鲜叶片0.5g,剪碎放入三角瓶,加入20ml蒸馏水,用塑料薄膜封口,于沸水中提取30min,冷却后过滤并定容至100ml,此为待测液。吸取待测液0.5ml于20ml试管中,加蒸馏水1.5ml,蒽酮乙酸乙酯0.5ml,浓H₂SO₄(比重为1.84)5ml,充分振荡,立即将试管放入沸水中,准确保温1min,取出后自然冷却至室温,在630nm波长下测定光吸收值(OD)。在0~100μg/ml范围内作标准曲线。

1.3.2 游离脯氨酸含量的测定 采用磺基水杨酸提取法。分别取0.5g新鲜叶片,加少量(2~3ml)3%磺基水杨酸研磨提取,磺基水杨酸最终体积为5ml。转入离心管中,沸水浴中提取10min。冷却后以3000r/min离心10min,得上清液待测。取2ml上清液,加2ml冰乙酸,2ml茛三酮,混匀后沸水显色60min,取出冷却后用4ml甲苯萃取,静置片刻,取甲苯相(粉红色)于离心管,3000r/min离心5min,然后在520nm波长处测定OD值。以甲苯为空白对照。在1~6μg/ml范围内作标准曲线。

1.3.3 游离氨基酸总量的测定 采用茛三酮溶液显色法。取0.5g新鲜叶片于研钵中,加入5ml10%乙酸,研磨成匀浆后用蒸馏水稀释到100ml,混匀过滤,得待测液。取1ml待测液,加入20ml干燥试管中,分别加入无氨蒸馏水1ml,水合茛三酮3ml,抗坏血酸0.1ml,充分混匀后,试管口盖上玻璃球,置沸水中加热15min,取出后用冷水迅速冷却并不时摇动,冷却后用60%的乙醇定容至20ml,混匀后用1cm光径比色皿在570nm波长比色测定。在1~5μg/ml范围内作标准曲线。

1.4 统计分析

本试验采用完全随机设计,4次重复,每个重复10株。所有数据均采用Microsoft excel进行统计分析,不同处理间进行t检验。

2 结果与分析

2.1 水分胁迫对水稻叶片可溶性糖含量的影响

图1显示,50g/L PEG-6000处理的水稻叶片中可溶性糖含量显著增加($P < 0.05$,表1),+PEG

处理的可溶性糖含量在各取样时段均高于-PEG处理。PEG处理1d,水稻叶片中可溶性糖含量急剧增加并积累到最高水平,达到 $153\mu\text{g/g}$,比对照(-PEG处理)高出67%,达到对照的1.6倍。随着水分胁迫的持续,+PEG处理的可溶性糖含量开始下降,下降的趋势为先剧烈后缓慢,最后在PEG处理4d和5d时稳定在同一个水平($110\mu\text{g/g}$);水分胁迫解除后,虽然+PEG处理可溶性糖的积累有所下降,但仍明显高于对照($P < 0.05$)。试验期间,+PEG处理的可溶性糖含量累积过程可用多项式函数 $y = -0.536x^4 + 8.6631x^3 - 46.065x^2 + 82.311x + 97.549$ ($R^2 = 0.8442$)来描述;而-PEG处理的可溶性糖累积则几乎呈线性变化($y = 0.4045x + 92.889$),其含量基本保持在 $93 \sim 98\mu\text{g/g}$ 。

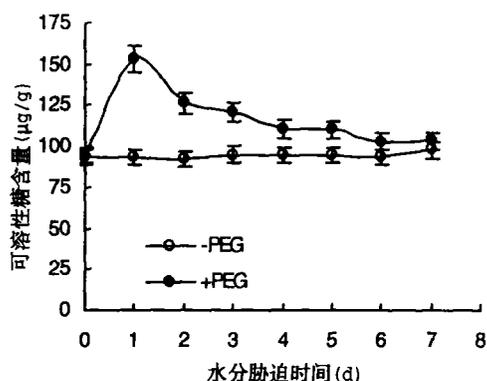


图1 水分胁迫对水稻叶片可溶性糖含量的影响

表1 +PEG处理与-PEG处理水稻叶片中可溶性糖含量的差异显著性比较 ($\mu\text{g/g}$)

处理时间(d)	-PEG	+PEG
0	93.5195±0.7603 a	94.5167±0.1875 a
1	93.4088±0.7672 a	153.0138±16.9012 b
2	92.5594±3.4709 a	126.4611±2.6765 b
3	94.9598±0.5558 a	121.0323±8.3296 b
4	94.3320±0.9376 a	110.4335±1.0808 b
5	94.5538±9.6388 a	110.1011±2.0014 b
6	93.7041±0.3512 a	102.6413±0.3853 b
7	97.3972±7.3919 a	103.1952±1.8753 b

注:小写字母相同者表示差异未达5%显著水平,下同

2.2 水分胁迫对水稻叶片游离脯氨酸含量的影响

图2和表2列出了 50g/L PEG-6000胁迫处理和对照水稻叶片中游离脯氨酸含量的变化,从表2可以看出,处理与对照叶片中游离脯氨酸含量具有显著性差异($P < 0.05$)。PEG胁迫1d,水稻叶中游离脯氨酸的含量快速增加,从 $17.5723\mu\text{g/g}$ 上升到 $28.0197\mu\text{g/g}$,升幅达59%,接近对照的1.5倍;胁迫3d,水稻叶片中游离脯氨酸含量达到最高值,

与对照相比,其增幅高达65%,达到对照的1.6倍。从PEG处理第4天开始,水稻叶片中游离脯氨酸含量逐渐减少,其中,以PEG处理第4天与第3天之间的减幅最大,前者比后者降低了23%,PEG处理第4天以后,水稻叶片中游离脯氨酸含量渐趋稳定,PEG处理第5天只比第4天减少了3%。PEG胁迫解除后,水稻叶片中游离脯氨酸的含量继续下降,但下降幅度较小,PEG解除后第1天比解除前下降了4%,而PEG解除后第2天只比第1天前下降了0.3%。试验结束时,+PEG处理叶片中的游离脯氨酸含量已经基本恢复到对照的水平(图2)。+PEG处理的游离脯氨酸含量累积过程可用多项式函数 $y = 0.3103x^3 - 3.9081x^2 + 12.529x + 18.096$ ($R^2 = 0.9217$)来描述。

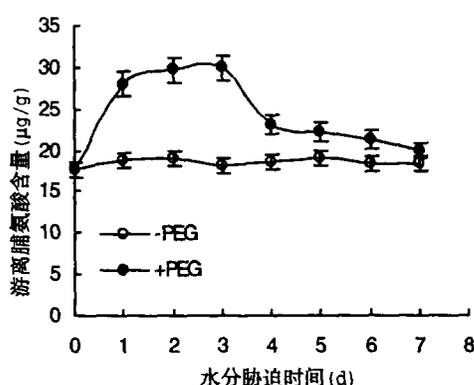


图2 水分胁迫对水稻叶片游离脯氨酸含量的影响

表2 +PEG处理与-PEG处理水稻叶片中游离脯氨酸含量的差异显著性比较 ($\mu\text{g/g}$)

处理时间(d)	-PEG	+PEG
0	17.6808±0.3097 a	17.5723±0.0980 a
1	18.8376±0.1059 a	28.0197±0.2391 b
2	18.946±0.2235 a	29.6826±0.0823 b
3	18.1507±0.2862 a	29.9356±0.3920 b
4	18.4399±0.1451 a	23.1033±1.8387 b
5	19.0183±0.1215 a	22.2357±0.0510 b
6	18.2953±0.1882 a	21.2596±0.1098 b
7	18.2230±0.0274 a	19.9221±0.0823 b

2.3 水分胁迫对水稻叶片中游离氨基酸总量的影响

图3显示, 50g/L PEG-6000处理的水稻叶片游离氨基酸总量的累积趋势与其可溶性糖的累积趋势较为近似。PEG胁迫1d,水稻叶片游离氨基酸急剧增加并达到最大值,其含量由原来的 $376.5397\mu\text{g/g}$ 增加到 $828.5301\mu\text{g/g}$,增幅达120%,比对照高出98%。随着水分胁迫的持续,游离氨基酸总量的积累逐渐下降。胁迫解除后,游离氨基酸的积累

经过 1d 的下降后趋于稳定, 但试验结束时仍比对照高 15%。无论是在胁迫期间还是胁迫解除后, +PEG 处理叶片中的游离氨基酸总量都与其对照达到了 5% 的显著性差异(表 3)。

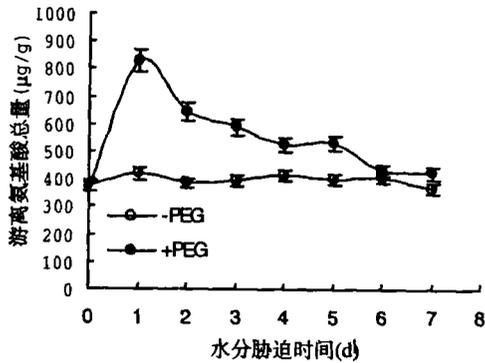


图 3 水分胁迫对水稻叶片游离氨基酸总量的影响

表 3 +PEG 处理与 -PEG 处理水稻叶片中游离氨基酸总量的差异显著性比较 (μg/g)

处理时间(d)	-PEG	+PEG
0	373.2723±67.6141 a	376.5397±217.0767 a
1	417.9268±138.7867 a	828.5301±153.0213 b
2	385.2528±42.7036 a	643.3774±96.0831 b
3	397.2333±185.0490 a	591.0990±74.7313 b
4	414.6594±96.0831 a	527.9293±99.6418 b
5	403.7681±14.2345 a	532.2858±74.7313 b
6	408.1246±10.6759 a	433.1747±46.2622 b
7	370.0049±24.9104 a	425.5507±46.2622 b

对比图 1、图 2 和图 3 可以看出, 水稻叶片中可溶性糖、游离脯氨酸和游离氨基酸总量在水分胁迫前期都表现为急剧上升的趋势, 达到各自的峰值后, 随着水分胁迫时间的持续, 3 种有机物质的含量开始逐渐减少, 并在胁迫解除 2d 后降低到接近对照的水平。可溶性糖和游离氨基酸总量的峰值均出现在 PEG 处理 1d, 而游离脯氨酸的峰值则出现在 PEG 处理 3d。水分胁迫解除后, 可溶性糖、游离脯氨酸和游离氨基酸总量仍然高于对照。水稻叶片中游离脯氨酸占游离氨基酸总量的百分数大约保持在 4% 左右, 处理与对照间无明显差异(表 4)。

表 4 水稻叶片中游离脯氨酸含量占游离氨基酸总量的百分数 (%)

处理时间(d)	-PEG	+PEG
0	4.7367	4.6668
1	4.5074	3.3819
2	4.9178	4.6136
3	4.5693	5.0644
4	4.4470	4.3762
5	4.7102	4.1774
6	4.4828	4.9079
7	4.9251	4.6815

3 讨论

可溶性糖主要有蔗糖、葡萄糖、果糖和半乳糖等^[13], 可溶性糖含量的增加被普遍看作是植物对水分胁迫的一种适应机制。张宪政^[14] 对小麦的研究表明, 小麦在缓慢的水分胁迫下, 可溶性糖含量增加, 参与降低植株体内的渗透压。李德全等^[9] 报道, 土壤干旱胁迫下, 小麦叶中脯氨酸、可溶性糖等有机溶质增加。张美云等^[9] 发现, 在 PEG - 6000 渗透胁迫下, 80% 野生大豆的可溶性糖含量高于对照。本研究中, 50g/L PEG - 6000 处理的水稻叶片中, 可溶性糖含量显著增加, 处理 1d 即达到对照的 1.6 倍。进一步证明, 一定数量的可溶性糖累积很可能是植物对水分渗透胁迫的应急反应, 是适应逆境的一种表现。

王霞^[15] 等认为, 渗透调节作用有一定的局限性, 严重干旱会使植物体渗透调节能力降低或丧失^[8]。我们的试验支持这一点, 随着水分胁迫的持续, 水稻叶片中可溶性糖含量开始下降, 下降的趋势为先剧烈后缓慢, 并在处理后第 4 天和第 5 天趋于稳定。本试验后期的水分胁迫程度(渗透势为 -50 kPa 的 PEG - 6000 溶液连续培养 4~5 d) 基本相当于重度水分胁迫, 因此, 符合上述渗透调节能力降低的条件。

脯氨酸是植物蛋白质的组分之一, 并以游离状态广泛地存在于植物体中。有学者研究指出, 从脯氨酸的生物合成来看, 水分胁迫将影响脯氨酸的形成, 最终造成脯氨酸的积累在胁迫处理的末期下降和停止^[9]。本试验表明, 无论是可溶性糖的积累, 还是游离脯氨酸的积累, 均未在水分胁迫结束时停止, 直到水分胁迫解除后第 2 天才降低到接近于对照的水平, 说明水分胁迫对可溶性糖和游离脯氨酸合成的影响具有后效应(After effect)。据报道, 在整个干旱处理过程中, 脯氨酸与可溶性糖积累进程不同, 脯氨酸在干旱后期含量降低, 而可溶性糖在干旱后期大量积累^[13]。我们的试验结果显示, 虽然脯氨酸与可溶性糖积累进程不同, 前者在 PEG - 6000 处理 3d 达到最大值, 后者在 PEG - 6000 处理 1d 达到最大值, 但是两者的含量均在胁迫后期下降, 即胁迫的程度和时间对渗透物质的变化有较大的影响, 在一定限度的胁迫下(本试验为 PEG - 6000 处理 3d), 可溶性糖可能先于脯氨酸的积累, 但脯氨酸维持较高值的时间比可溶性糖长。当胁迫开始时, 可溶性糖迅速积累, 胁迫强度和时间进一步增加则脯氨酸

积累强度增大,脯氨酸和可溶性糖可能有相互补偿的作用。上述现象不同于前人的研究报道,需要进一步证实。

Mattion^[2]研究发现,小麦幼苗在水分胁迫时氨基酸都有所累积,但脯氨酸累积更多。然而本试验的数据却并不支持 Mattion 的发现。本研究结果显示,PEG 处理 1d,水稻叶片中游离氨基酸总量比处理前约增加 452 $\mu\text{g/g}$,而游离脯氨酸只比处理前增加约 12 $\mu\text{g/g}$,试验期间,游离脯氨酸占游离氨基酸总量的百分数在处理与对照间无明显差异,两者均保持在 4%左右(表 4)。因此,除可溶性糖和游离脯氨酸外,可能还存在其他氨基酸物质参与了水稻幼苗的水分渗透胁迫反应^[16]。

参考文献:

- [1] 赵勇,马雅琴,翁跃进.盐胁迫下小麦甜菜碱的脯氨酸含量变化[J].植物生理与分子生物学报,2005,31(1):103-106.
- [2] 刘学师,任小林,苗卫东,等.游离脯氨酸与植物抗旱性[J].河南职业技术学院学报,2002,30(3):35-37.
- [3] 刘凤荣,陈火英,刘杨,等.盐胁迫下不同基因型番茄可溶性物质含量的变化[J].植物生理与分子学报,2004,30(1):99-104.
- [4] 喻方圆,徐锡增,Robert D G.水分和热胁迫对苗木针叶可溶性糖含量的影响[J].南京林业大学学报(自然科学版),2004,28(5):1-5.
- [5] 杨洪兵,韩振海,许雪峰.NaCl 和等渗聚乙二醇对苹果属植物游离脯氨酸含量的影响[J].植物生理学通讯,2004,41(2):157-162.
- [6] 李德全,邹琦,陈炳嵩.土壤干旱下不同抗旱性小麦品种的渗透调节和渗透调节物质[J].植物生理学报,

1992,18(1):37-44.

- [7] Yoshiba Y, Kiyosye T, Nakashima K, *et al.* Regulation of levels of proline as an osmolyte in plants under water stress[J]. Plant Cell Physiol, 1997, 38: 1095-1102.
- [8] 鲍思伟,谈锋,廖志华.土壤干旱对蚕豆叶片渗透调节能力的影响[J].西南农业大学学报,2001,23(4):353-359.
- [9] 张美云,钱吉,郑师章.渗透胁迫下野生大豆游离脯氨酸和可溶性糖的变化[J].复旦学报(自然科学版),2001,40(5):558-561.
- [10] Vamerali T, Saccomani M, Bona S, *et al.* A comparison of root characteristics in relation to nutrient and water stress in two maize hybrids[J]. Plant Soil, 2003, 255: 157-167.
- [11] Hare PD, Cress WA. Metabolic implication of stress-induced proline accumulation in plants[J]. Plant Growth Regul, 1998, 21: 79-102.
- [12] Trotel-Aziz P, Niogret MF, Larher F. Proline level is partly under the control of abscisic acid in canola leaf discs during recovery from hyper osmotic stress[J]. Physiol Plant, 2000, 110: 376-383.
- [13] Wang X, Hou P. Plant adaptation on physiology under drought stress[J]. Arid Zone Research, 2001, 18(2): 42-46.
- [14] Zhang XZ. Physiological Research Method[M]. Beijing: Agricultural Publishing Press, 1992. 91-95.
- [15] 王霞,侯平,伊林克.水分胁迫对圣柳植物可溶性糖的影响[J].干旱地区研究,1999,16(2):1-10.
- [16] 张立军,樊金娟,阮燕晔,等.聚乙二醇在植物渗透胁迫生理研究中的应用[J].植物生理学通讯,2004,40(3):361-364.

(上接第 25 页)

参考文献:

- [1] 苏祯祿,任和平.河南玉米[M].北京:中国农业科技出版社,1994.
- [2] 姜丽华,顾国达.加入 WTO 对我国饲料工业的影响及对策[J].饲料工业,2002,23(5):46-47.
- [3] 董树亭.优质专用玉米[M].济南:山东人民出版社,1999.
- [4] 戴景瑞.我国玉米生产发展的前景及对策[J].作物杂志,1998(5):6-11.
- [5] 霍仕平,晏庆九.玉米子粒含油量的研究及其育种进展[J].玉米科学,1994,2(3):752-771.
- [6] 刘仁东,杨秀海.我国高油玉米的发展前景展望[J].作物杂志,1995(3):1-5.

- [7] 刘治先.高油玉米 Alexho 子粒生长期含油率及其脂肪酸的变化[J].作物杂志,1988(4):36-38.
- [8] 宋同明,苏胜宝,陈绍江,等.高油玉米前途光明[J].玉米科学,1997,5(3):32-37.
- [9] 宋同明.高油玉米自交系的培育与改良[J].作物杂志,1991(3):15-16.
- [10] 宋同明.高油玉米[M].北京:北京农业大学出版社,1992.
- [11] 全国农业技术推广服务中心.中国玉米新品种动态[M].北京:中国农业科技出版社,2001.
- [12] 顾晓红.中国玉米种质资源的品质性状的分析与评估[J].玉米科学,1998,6(1):14-16.
- [13] 赵克明.改善玉米品质,推广优质玉米[J].玉米科学,2000,8(1):8-10.