

# 亚精胺浸种对玉米幼苗根尖线粒体 ATPase 活性 与结合态亚精胺含量的影响

周琳<sup>1</sup>, 王进<sup>1</sup>, 杜红阳<sup>2</sup>, 刘怀攀<sup>1,2\*</sup>

(1. 周口师范学院 生命科学系, 河南 周口 466000;

2. 河南农业大学 作物生长与发育调控省重点实验室, 河南 郑州 450002)

**摘要:** 以抗旱性不同的玉米品种农大 108(抗旱性较强)和掖单 13(抗旱性较弱)为材料, 经过亚精胺(Spd)浸种处理, 研究在聚乙二醇(PEG)-6000 渗透胁迫下, 幼苗根尖线粒体 ATPase 水解活性与膜上非共价结合态多胺含量的关系。结果表明, 渗透胁迫条件下, 抗性强的农大 108 的 ATPase 活性下降的幅度明显小于抗性弱的品种掖单 13, 而农大 108 的线粒体膜上非共价结合态亚精胺的上升幅度明显大于掖单 13。亚精胺浸种处理, 明显增强了掖单 13 幼苗的抗性, 促进了掖单 13 在胁迫条件下非共价结合态 Spd 含量的增加, 同时抑制其在胁迫条件下 ATPase 活性的降低。这些结果表明, 亚精胺浸种处理, 通过提高玉米幼苗根尖线粒体膜上的非共价结合态 Spd 含量, 维持 ATPase 活性的稳定, 从而提高玉米幼苗的抗渗透胁迫能力。

**关键词:** 亚精胺浸种; 渗透胁迫; 玉米幼苗; 线粒体膜 ATPase; 结合态多胺

**中图分类号:** Q945 S513 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2009)08-0029-04

## Effect of Seed Soaking with Spermidine on ATPase Activity and Conjugated Polyamine Content in Mitochondria Membrane of Maize Seedling Root under Osmotic Stress

ZHOU Lin<sup>1</sup>, WANG Jin<sup>1</sup>, DU Hong-yang<sup>2</sup>, LIU Huai-pan<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Life Sciences, Zhoukou Normal University, Zhoukou 466000, China; 2. Henan Key Laboratory for Regulating Controlling Crop Growth and Development, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002 China)

**Abstract:** Two maize (*Zea mays* L.) cultivars, Nongda 108 (drought-tolerant) and Yedan 13 (drought-sensitive) were selected to investigate the effects of seed soaking with spermidine on ATPase activity and conjugated-polyamine contents in mitochondria membrane of seedling roots under osmotic stress. The result showed that, in 7 days after polyethylene glycol (PEG)-6000 treatment, the ATPase activity decreased more in Yedan 13 than in Nongda 108, while the content of noncovalently conjugated-spermidine (Spd) increased more in Nongda 108 than in Yedan 13. Under osmotic stress, seed soaking with spermidine could obviously increase the noncovalently conjugated-Spd level and inhibit the decrease of ATPase activity in Yedan 13, so as to enhance its tolerance to stress. The results suggested that Spd seed-soaking could enhance the tolerance of maize seedlings to osmotic stress, especially for the drought-sensitive cultivar, by increasing the noncovalently conjugated-Spd level and maintaining the stability of ATPase activity in mitochondria membrane.

收稿日期: 2009-01-11

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No. 30771296); 河南省基础与前沿技术研究计划项目 (082300430310); 河南省教育厅自然科学基金基础研究计划项目 (2007180052)

作者简介: 周琳 (1966-), 女, 河南淮阳人, 副教授, 主要从事作物干旱生理研究。

通讯作者: 刘怀攀 (1970-), 男, 河南邓州人, 教授, 博士后, 博士生导师, 主要从事作物抗性生理研究。

**Key words:** Spermidine seed-soaking; Osmotic stress; Maize (*Zea mays* L.) seedling; Mitochondria membrane ATPase; Conjugated polyamine

越来越多的研究证明,多胺可以提高植物的抗逆性<sup>[1~7]</sup>。常见多胺有腐胺(Put)、亚精胺(Spd)和精胺(Spm)等。植物体内的多胺除了以游离形式存在外,还有非共价结合态。所谓非共价结合态是指在生理 pH 范围内,多胺充分质子化而带正电荷,可以与植物体内带负电荷的生物大分子如酸性蛋白质、膜磷脂和核酸等靠静电结合。探讨多胺浸种提高植物抗逆性的机理已成为热点。我们前期研究了质膜<sup>[8]</sup>和液泡膜<sup>[9]</sup>上结合态多胺与渗透胁迫的关系,然而目前国内外未见多胺浸种处理对幼苗根尖线粒体膜上结合态多胺和 ATPase 活性影响的报道。为此,研究了 Spd 浸种处理,对玉米幼苗根尖线粒体 ATPase 活性与结合态 Spd 含量的影响,报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料

选取抗旱性较强的农大 108 和抗旱性较弱的掖单 13 玉米种子为材料,用 0.1% 的 HgCl<sub>2</sub> 消毒 5min,再用去离子水冲洗后,精选饱满、大小一致且无病虫害的玉米种子,用滤纸吸去种子表面的水分。用 1mmol/L Spd 溶液(对照用清水)浸种 24h。上述种子在 25℃ 下催芽后,选取外部形态一致的种子均匀播在底部有孔、装有石英砂的小型硬质、不透明的塑料杯中(15 粒/杯)。温室中培养,保持温度是 25℃/20℃(白天/黑夜)置于 14h 光周期下,用金属卤化物灯进行光照,使在植物冠层保持 250μmol/(m<sup>2</sup>·s)的光合光子通量密度。空气相对湿度在 60%~70%之间。用 1/2 Hoagland 培养液进行培养。每 2d 换 1 次营养液,培养至第 2 叶片充分伸长定苗(每杯留下长势、大小一致的 10 株幼苗)。

1.2 处理

试验共设 3 个处理:①用含 PEG-6000(20%)的 1/2 Hoagland 营养液处理浸种的幼苗(PEG+Spd);②用含 PEG-6000(20%) 1/2 Hoagland 营养液处理未经浸种的幼苗(PEG);③用 1/2 Hoagland 营养液培养(CK)。处理第 7 天充分洗幼苗 3 次,取样,检测指标,3 次重复,取平均值。

1.3 幼苗相对含水量(RWC)的测定

RWC 按称重法测定<sup>[10]</sup>。

1.4 线粒体膜微囊的提取与 ATPase 水解活性检测

按 Pomeroy 方法<sup>[11]</sup>提取线粒体膜微囊,稍加修

改。提取的线粒体于冰浴上用 300W 超声波破碎 30s (2 次),冰浴上放置 30min,100 000g 离心 60min (4℃),沉淀即为线粒体膜微囊。按 Bi 等方法<sup>[12]</sup>测 ATPase 的水解活性。

1.5 线粒体膜微囊蛋白的分离与检测

将提取的线粒体膜微囊一部分加入 TritonX-100 至终浓度为 1%,150W 超声波于冰浴上破碎 30s (2 次),冰浴上放置 30min,20 000g 离心 30min (4℃)。上清液为可溶性膜蛋白溶液。蛋白质含量测定按 Bradford<sup>[13]</sup>方法进行。

1.6 线粒体膜上结合态多胺的提取与检测

向提取的膜微囊制剂中加入高氯酸至终浓度为 5%,以沉淀去除蛋白质部分。27 000g 离心 40min。线粒体膜微囊上非共价结合的亚精胺位于上清液中,取上清液按 Kiriakos 方法<sup>[14]</sup>检测结合态亚精胺。

2 结果与分析

2.1 PEG 和 Spd 浸种对玉米幼苗叶片相对含水量的影响

渗透胁迫 7d,与对照相比,2 个玉米品种的叶片相对含水量降低,并且抗旱性弱的掖单 13 的降低幅度显著大于农大 108(图 1),说明 2 个品种都受到了不同程度的渗透胁迫伤害,掖单 13 的受害程度较大。Spd 浸种处理,明显抑制了掖单 13 在渗透胁迫下相对含水量的下降(图 1),说明经过 Spd 浸种的幼苗抵抗渗透胁迫的能力提高。

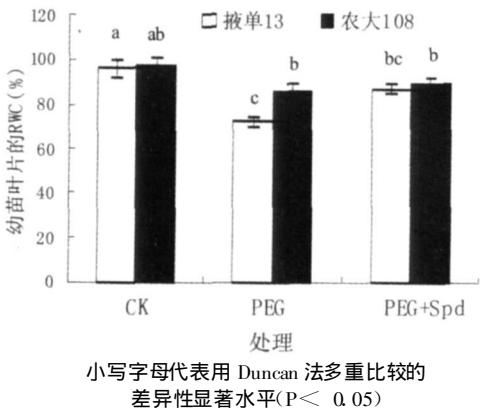


图 1 PEG 和 Spd 浸种对玉米幼苗叶片相对含水量的影响

2.2 PEG 和 Spd 浸种对玉米幼苗根尖线粒体膜上 ATPase 水解活性的影响

从图 2 可以看出,渗透胁迫下,玉米幼苗根线粒体膜上 ATPase 的水解活性下降,而且抗旱性强的农

大 108 的下降幅度显著小于抗旱性弱的掖单 13。Spd 浸种处理, 明显抑制了渗透胁迫下掖单 13 线粒体膜上 ATPase 水解活性的下降。

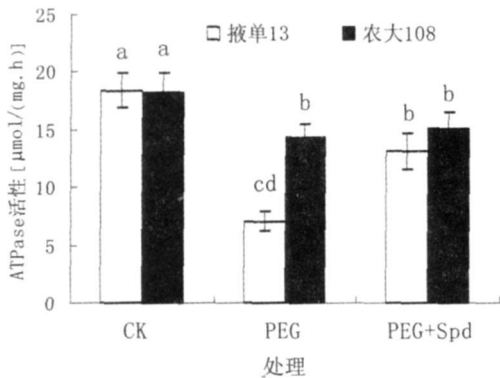


图2 PEG 和 Spd 浸种对玉米幼苗根尖线粒体膜上 ATPase 水解活性的影响

### 2.3 PEG 和 Spd 浸种对玉米幼苗根尖线粒体膜上结合态 Spd 含量的影响

从图 3 可以看出, 渗透胁迫提高了线粒体膜上非共价结合态 Spd 的水平, 并且抗旱性强的农大 108 非共价结合态 Spd 的升幅明显大于抗旱性弱的掖单 13。Spd 浸种处理, 明显促进了渗透胁迫下掖单 13 膜上非共价结合态 Spd 水平的增高。

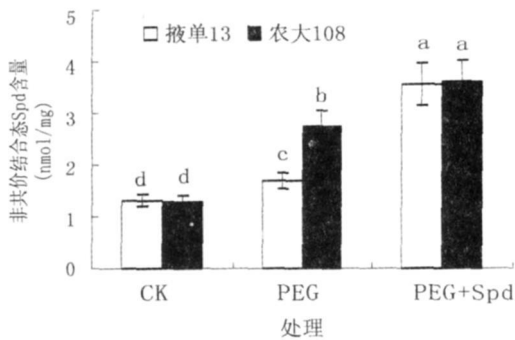


图3 PEG 和 Spd 浸种对玉米幼苗根尖线粒体膜上非共价结合态 Spd 含量的影响

### 3 讨论与结论

我们以前的研究表明, 农大 108 的抗渗透胁迫能力明显大于掖单 13<sup>[4]</sup>。本研究表明, 渗透胁迫引起了 2 个品种玉米幼苗的根线粒体膜上 ATPase 水解活性的下降, 而且农大 108 的下降幅度显著小于掖单 13。这就暗示了线粒体膜上 ATPase 水解活性在渗透胁迫条件下的稳定有助于提高幼苗的抗渗透胁迫能力。Spd 浸种处理, 不仅提高了幼苗(特别是抗旱性弱的品种)的抗渗透胁迫能力, 而且明显缓解幼苗根尖线粒体膜 ATPase 水解活性的下降, 说明在渗透胁迫条件下, 线粒体维持一定的 ATPase 水解活性对于适应水分胁迫有积极意义。众所周知, 线粒体膜上 ATPase 除了

具有能利用跨内膜的质子浓度梯度合成 ATP 的功能外, 还能利用 ATP 水解产生的能量而重新建立(稳定)跨内膜的质子浓度梯度<sup>[5,9]</sup>。所以 ATPase 的合成与水解 ATP 的功能应该保持稳定平衡; 而且, 在逆境条件下, 维持一定的跨内膜质子浓度梯度是实现线粒体本身物质运输的重要基础保障, 所以, 渗透胁迫下维持线粒体膜上 ATPase 一定的水解活性就显得尤为重要。

渗透胁迫下, 抗旱性强的农大 108 幼苗根尖线粒体膜上的非共价结合态 Spd 的升高幅度明显大于抗旱性弱的掖单 13, 农大 108 线粒体膜上 ATPase 的水解活性下降幅度显著小于掖单 13, 这些结果暗示了玉米幼苗根尖线粒体膜上的非共价结合态 Spd 在胁迫条件下的上升有利于维护膜上 ATPase 水解活性的稳定。Spd 浸种处理, 不仅明显促进了渗透胁迫下掖单 13 膜上非共价结合态 Spd 水平的增高, 而且明显缓解幼苗根尖线粒体膜 ATPase 水解活性的下降, 相关分析表明, 渗透胁迫下, 线粒体膜上 ATPase 的水解活性与非共价结合态 Spd 呈显著正相关。

### 参考文献

- [1] 杜红阳, 刘怀攀, 李潮海, 等. 植物体内特殊形态多胺与水分胁迫关系研究进展[J]. 河南农业科学, 2007(12): 9—13.
- [2] 刘怀攀, 牛明功, 李潮海, 等. 亚精胺对渗透胁迫下玉米幼苗叶片抗氧化非酶物质的影响[J]. 河南农业科学, 2007(3): 25—28.
- [3] Liu H P, Dong B H, Zhang Y Y, *et al.* Relationship between osmotic stress and the levels of free, conjugated and bound polyamines in leaves of wheat seedlings[J]. Plant Sci 2004, 166 (5): 1261—1267.
- [4] Liu H P, Ji X E, Shi L G, *et al.* Effect of osmotic stress on the contents of different form polyamines in leaves of maize seedlings[J]. Acta Agronomica Sinica, 2006, 32(10): 1430—1436.
- [5] 倪张林, 魏家绵. ATP 合酶的结构与催化机理[J]. 植物生理和分子生物学报, 2003, 29(3): 367—374.
- [6] Alberts B, Johnson A, Lewis J. Molecular biology of the cell[M]. New York: Garland Science, 2002: 779—781.
- [7] 史留功, 周琳, 刘怀攀. 亚精胺浸种对小麦幼苗抗渗透胁迫能力的影响[J]. 河南农业科学, 2008(7): 29—32.
- [8] Liu H P, Yu B J, Liu Y L, *et al.* Effect of osmotic stress on the activity of H<sup>+</sup>-ATPase and the levels of covalently and noncovalently conjugated polyamines in plasma membrane from wheat seedling roots [J]. Plant Sci, 2005, 168: 1599—1607.

(下转第 35 页)

累大量的渗透调节物质(如脯氨酸、可溶性糖和可溶性蛋白)等<sup>[11]</sup>。本试验中3种处理下绿豆幼苗脯氨酸、可溶性糖含量和可溶性蛋白显著增加,而淀粉的含量则减少,这可能是由于淀粉分解的缘故。同时,逆境胁迫会使植物产生大量的活性氧(ROS)对细胞膜进行氧化伤害使细胞离子渗漏,增加电导率<sup>[12]</sup>。为了清除过多的活性氧自由基,植物自身的SOD、POD和CAT组成了保护酶系统来减少这种伤害<sup>[13]</sup>。试验结果也表明,在3种盐胁迫下,作为标志膜伤害的MDA含量明显上升,相对电导率也随之增加,这些结果说明盐胁迫使绿豆幼苗细胞内离子出现渗漏,细胞膜受到了一定的伤害。保护酶测定显示,在应答盐胁迫绿豆幼苗的SOD、POD和CAT活性都出现了一定程度的增强,且一直呈上升趋势。此结果与任文伟等<sup>[14]</sup>先上升后下降的结果不尽一致,可能是由于处理的盐浓度没有超过自身的调控能力所致。

参考文献:

[1] 赵福庚,刘友良.胁迫条件下高等植物体内脯氨酸代谢及调节的研究进展[J].植物学通报,1999,16(5):56—63.  
[2] 郭建华,李跃进,卢伟丽.3种盐胁迫对小麦苗期生长的影响[J].华北农学报,2007,22(3):148—150.  
[3] 单长卷,杨文平,张胜利.土壤干旱对豫麦54号小麦灌浆期生长和生理特性的影响[J].河南农业科学,2008(12):27—30.  
[4] Flowers T J. Improving crop salt tolerance[J]. J Exp

Bot, 2004, 55: 307—319.

[5] 李合生.植物生理生化实验原理和技术[M].北京:高等教育出版社,2000.  
[6] 陈建勋,王晓峰.植物生理学实验指导[M].广东:华南理工大学出版社,2006.  
[7] 郝再彬,苍晶.植物生理学实验[M].哈尔滨:哈尔滨工业大学出版社,2004:106—108.  
[8] Giamopolitis C N, Ries S K. Superoxide dismutase II purification and quantitative relationship with water soluble protein in seedlings[J]. Plant Physiology, 1979, 59(1): 315—318.  
[9] 沈文庵,叶茂炳,徐朗莱.小麦旗叶自然衰老过程中清除活性氧能力的变化[J].植物学报,1997,39(7):634—640.  
[10] 罗红艺,景红娟,李金枝.含矮壮素的保鲜剂对非洲菊切花衰老的影响[J].植物生理学通讯,2004,40(6):553—555.  
[11] 张亚冰,刘崇怀,潘兴,等.盐胁迫下不同耐盐性葡萄砧木丙二醛和脯氨酸含量的变化[J].河南农业科学,2006(4):84—86.  
[12] 王宝山,姚郭义.盐胁迫对沙枣愈伤组织膜透性、膜脂过氧化物和SOD活性影响[J].河北农业大学学报,1993,16(4):20—24.  
[13] 王宝山.生物自由基与植物膜伤害[J].植物生理学通讯,1988,24(2):12—18.  
[14] 任文伟,罗山泉,郑师章.不同种源羊草的SOD、POD的活性及丙二醛含量的比较[J].植物生态学报,1997,21(1):77—82.

(上接第31页)

[9] Liu H P, Liu Y L, Yu B J, *et al.* Increased polyamines conjugated to tonoplast vesicles correlate with maintenance of the H<sup>+</sup>-ATPase and H<sup>+</sup>-PPase activities and enhanced osmotic stress tolerance in wheat [J]. J Plant Growth Regul, 2004, 23: 156—165.  
[10] 龚富生,张嘉宝.植物生理学实验[M].北京:气象出版社,1995:8—9  
[11] Pomeroy M K. Studies on the respiratory properties of mitochondria isolated from developing winter wheat seedlings[J]. Plant Physiology, 1974, 53: 653—657.  
[12] Bi R Q, Li J S, Wang H C. Effect of composition of biomembrane lipid on the regulation and control of

membrane function and phase transition. (I) effects of tween on the ATPase activity of mitochondria in corn root apex [J]. Acta Biochim Biophys Sin, 1981, 13: 245—250.

[13] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Anal Biochem, 1976, 72: 248—254.  
[14] Kiriakos K, Maria D, Christakis H. A narrow-pore HPLC method for the identification and quantitation of free, conjugated and bound polyamines[J]. Anal Biochem, 1993, 214: 484—489.