

多胺与香蕉抗寒性的关系的研究

周玉萍, 王正询, 田长恩

(广州大学生物与化学工程学院, 广东广州 510405)

摘要: 人工气候箱中模拟寒潮对香蕉苗造成低温伤害, 低温胁迫前用 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 多胺(PAs)和 D-精氨酸(D-Arg)喷洒香蕉叶片。结果表明, 低温胁迫后香蕉叶片内源腐胺(Put)含量下降, 亚精胺(Spd)含量明显增多, 精胺(Spm)比较稳定; D-Arg 处理的内源多胺总量明显降低。外源 Spd 和 Spm 可以提高受冷胁迫的香蕉叶片中过氧化物酶(POD)活性、降低电解质渗漏率、增加可溶性糖和脯氨酸的含量, 有助于提高香蕉的抗寒力; Put 对香蕉抗寒力没有明显影响; D-Arg 则有不利作用。

关键词: 香蕉; 多胺; 抗寒性

中图分类号: Q69; S13 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2003)04-0352-05

Studies on the relation of polyamines and cold-resistance of banana

ZHOU Yu-ping, WANG Zheng-xun, TIAN Chang-en

(School of Biological Science and Chemical Engineering, Guangzhou University, Guangzhou 510405, China)

Abstract: The plantlets of banana (*Musa acuminata* (AAA group) 'Dwarf Cavendish' Brazil) suffered from low-temperature stress caused by the artificial lowering of temperature in the phytotron. $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ polyamines (PAs) and D-Arginine (D-Arg) sprayed on the banana leaves before the chilling stress. The experiments suggested that endogenous putrescine (Put) content dropped dramatically, but endogenous spermidine (Spd) content increased obviously and spermine (Spm) content stabilized in banana leaves suffered by chilling stress; Endogenous polyamine contents dropped obviously in banana leaves suffered by D-Arginine treatment. Activities of peroxidase (POD) and contents of soluble sugars and proline were increased, and relative electric leakage of cytoplasmic membranes were reduced in banana leaves by Spd and Spm treatments. So the results is that Spd and Spm can increase the ability of cold-resistance, but Put may have a less role and D-Arg has opposite role in the ability to cold-resistance.

Key words: banana; polyamines; cold-resistance

香蕉为热带果树, 极不耐寒。低温冷害是地处亚热带的华南地区香蕉最主要的自然灾害之一, 研究香蕉冷害机制和寻求提高香蕉抗寒力的技术日益受到重视(王泽槐等, 1994; 周碧燕等, 1995; 郑家基等, 1996; 周玉萍等, 2002)。

多胺普遍存在于植物体内, 调节着植物的生长发育、形态建成和抗逆性(Phillip 等, 1989; Slocum

等, 1984)。有关多胺提高植物抗性方面的研究主要有苹果的抗渍性(Wang 和 Steffens, 1985), 黄瓜(Wang, 1987)、玉米(宋凤斌等, 1995)、柑橘(林定波等, 1994)、龙眼(郑家基等, 1996)的抗寒性等。这些研究均证实植物对各种环境胁迫的反应与多胺有密切关系, 逆境胁迫会引起植物体内多胺的改变。本文通过对香蕉苗进行低温胁迫后测定叶片内源多胺

收稿日期: 2002-09-16 **修订日期:** 2003-01-20

作者简介: 周玉萍(1970-), 女, 湖北黄梅人, 讲师, 硕士, 从事植物抗性生理研究。

含量,与叶面喷施一定浓度的多胺(腐胺、亚精胺、精胺)及多胺合成抑制剂(D-精氨酸)对低温胁迫后的香蕉苗各项抗寒生理指标的影响,探讨不同多胺增强香蕉抗寒力的生理效应。

1 材料和方法

1.1 材料

供试材料为广东大量栽培的巴西蕉(*Musa acuminata* (AAA group) 'Dwarf Cavendish 'Brazil')的高杆品系,选健康香蕉的吸芽进行快速繁殖,试管苗于2002年3月5日移植到营养杯中栽培,幼苗按常规进行管理,栽培至2002年6月,香蕉苗假茎高约20 cm,着生4~5片展开叶。

1.2 处理方法

选取生长势一致,无病虫害的健康幼苗18株分为2组,其中一组为3株置于室内(室温30℃左右)自然生长,每天喷洒蒸馏水;另一组15株进行冷胁迫处理,在人工气候箱(LRH250-GS)内进行逐步降温,降温过程为25℃ 24 h,15℃ 24 h,6℃ 24 h。香蕉苗在15℃处理之前,按表1进行5种不同的处理(每处理3株苗),药品为整株喷施,以叶片上下表面湿透为准;6℃处理(周玉萍等,2002)24 h后立即取样测试各项生理指标。配合降温过程的光照条件为:每天光照12 h,光照强度为40 $\mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$,相对湿度为70%~80%。实验重复5次。

1.3 内源多胺测定

称取0.5 g新鲜叶片加入5 mL预冷的5%高氯酸,研磨,匀浆,冰浴浸提1 h后高速冷冻离心

(26 000 \times g 4℃)25 min(离心机型号:HITACHI himac CR21),取上清液。按杨浚等(1988)的薄层析法分离丹磺化多胺,以荧光分光光度计(型号:970CRT,上海分析仪器总厂)分别测定丹磺化 Put、Spd 和 Spm 的荧光值,再根据标准曲线求出样品的多胺含量。Put、Spd 和 Spm 标样为 Sigma 产品,含量大于98%。

1.4 过氧化物酶活性测定

采用愈创木酚法(张志良,1980)测定,称取0.1 g新鲜叶片,加入10 mL磷酸缓冲液(pH6.5),研磨,匀浆,以3 000 \times g离心20 min,上清液用于酶活性测定。

1.5 电解质渗漏率测定

采用刘鸿先等(1985)的方法,以打孔器取叶片18片,抽真空,以20 mL纯水浸泡2 h后,在30℃下测叶片的第一次电导率 E_1 ,样品煮沸5 min,冷却至30℃,测定第二次电导率 E_2 ,以 $E_1/E_2 \times 100\%$ 计算电解质渗漏率百分率(相对电导率表示)。

表1 实验用香蕉苗的不同处理方法
Table 1 Different treatments of banana plantlets in the experiment

样品 Sample	处理方法 Treatments
对照 Control	nature temperature+H ₂ O
处理1 Treatment 1	chilling stress+H ₂ O
处理2 Treatment 2	chilling stress+1 mmol \cdot L ⁻¹ Put ¹⁾
处理3 Treatment 3	chilling stress+1 mmol \cdot L ⁻¹ Spd ¹⁾
处理4 Treatment 4	chilling stress+1 mmol \cdot L ⁻¹ Spm ¹⁾
处理5 Treatment 5	chilling stress+1 mmol \cdot L ⁻¹ D-Arg ¹⁾

1) Put: putreacine 腐胺; Spd: spermidine 亚精胺; Spm: spermine 精胺; D-Arg: D-Arginine D-精氨酸, four drugs all made by the Sigma company.

表2 低温胁迫和D-Arg对香蕉叶片中内源多胺含量的影响

Table 2 Effects of chilling stress and D-Arg on polyamines(PAs) contents in banana leaves

处理 Treatments	多胺含量 Polyamines content			
	PAs($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ FW)	Put($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ FW)	Spd ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ FW)	Spm($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ FW)
CK	477.72	165.65 \pm 2.47	174.90 \pm 7.74	137.17 \pm 6.74
Chilling	421.49	74.20 \pm 3.48	213.91 \pm 8.72	133.38 \pm 8.80
Chilling+D-Arg	349.64	57.20 \pm 4.53	134.70 \pm 9.91	157.74 \pm 9.35

1.6 可溶性多糖测定

采用蒽酮法(张志良,1980),称0.5 g鲜叶,研磨,匀浆,置80℃热水浴30 min后,加入饱和中性醋酸铅,除去混合液中的蛋白质,过滤后,即为可溶性糖提取液。

1.7 脯氨酸测定

采用酸性茚三酮法(张志良,1980),称2 g鲜叶,用80%乙醇研磨,匀浆,定容至10 mL,加盖后,

在黑暗中提取24 h,以3 000 \times g离心,即为脯氨酸提取液。

2 结果与分析

2.1 香蕉苗经低温胁迫后内源多胺的变化

表2表明,香蕉苗经低温胁迫后叶片内源多胺的总量(PAs)下降11.17%,其中,Put的含量下降

显著,达到 55.21%,Spd 含量上升 22.30%,Spm 含量基本不变;冷胁迫前喷施 D-Arg 的内源多胺总量(PAs)与室温对照相比下降 26.81%,其中,Put、Spd 分别下降 65.47%、22.98%,但 Spm 含量增加 15.00%。

试验结果表明,香蕉苗在遭受低温胁迫时,内源多胺各组分的变化情况不同,Put 减少,Spd 明显增多,Spm 比较稳定。这种现象可能是由于低温胁迫导致 Put 合成的减少或者是参与催化 Spd 合成的酶的活性增强,部分 Put 转化为 Spd,从而大量积累 Spd 的缘故。D-Arg 抑制了 Put 的合成,同时也抑制了 Spd 的增加。

2.2 外源多胺对低温胁迫后香蕉叶片过氧化物酶活性的影响

过氧化物酶(POD)属于植物膜系统的保护酶,能有效地清除低温胁迫所产生的活性氧自由基,使植物免受低温伤害,大量研究表明,POD 是反映植物抗寒性的重要生理指标。表 3 表明,与对照比较,冷胁迫 24 h 后,香蕉叶片 POD 活性降低了 9.63%;叶面喷施 Spd 和 Spm 明显提高了 POD 活性,分别达到 33.00%、18.25%;喷施 Put 和 D-Arg 致使 POD 活性明显降低。试验结果说明,适当浓度的 Spd 和 Spm 能提高低温胁迫期香蕉 POD 活性,对细胞膜的稳定性有一定作用,1 mmol·L⁻¹的 Put 和 D-Arg 对香蕉的 POD 活性有不利影响。

表 3 多胺对低温胁迫 24 h 香蕉叶片过氧化物酶活性的影响

Table 3 Effects of PAs on the POD activity in banana leaves subjected to chilling stress for 24 h

处理 Treatments	POD Activity ($\Delta OD \cdot \text{min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{FW}$)	与对照相比的改变量 Changes compared with CK (%)	
CK	7.58±0.61	0	
Chilling	6.85±0.58	-9.63	0
Chilling+Put	6.26±0.85	-17.41	-8.61
Chilling+Spd	9.11±0.79	+20.18	+33.00
Chilling+Spm	8.10±0.77	+6.86	+18.25
Chilling+D-Arg	6.19±0.83	-18.34	-9.64

2.3 外源多胺对低温胁迫后香蕉叶片细胞质渗漏率的影响

相对电导率是衡量细胞内电解质扩散到细胞外的一项生理指标。植物受到低温伤害,生物膜首先发生膜脂的物理相变,细胞膜产生龟裂,因而膜的透性增大,大量电解质外泄,细胞的渗漏率提高,植物

遭受伤害。

表 4 表明,冷胁迫 24 h 导致香蕉叶片细胞质渗漏率提高了 24.01%,结果说明 6℃的低温胁迫致使叶片相对电导率提高,表明细胞膜稳定性降低,细胞内含物外渗增多。冷胁迫前喷施外源多胺和 D-Arg 能改变香蕉叶片细胞膜的稳定性。其中 Spd 和 Spm 使相对电导率分别降低了 26.63%、21.40%,有利于提高细胞质膜的稳定性,从而提高了香蕉的抗寒性;Put 和 D-Arg 致使叶片相对电导率略微提高,对香蕉叶片细胞膜没有保护作用。

表 4 多胺对低温胁迫期 24 h 香蕉叶片电解质渗漏率的影响

Table 4 Effects of PAs on the electrolyte leakage in banana leaves subjected to chilling stress for 24 h

处理 Treatments	电解质渗漏率 The electrolyte leakage (%)	与对照相比的改变量 Changes compared with CK (%)	
CK	11.87±1.02	0	
Chilling	14.72±1.31	+24.01	0
Chilling+Put	14.80±1.15	+24.68	+0.54
Chilling+Spd	10.80±0.35	-9.01	-26.63
Chilling+Spm	11.57±0.39	-2.52	-21.40
Chilling+D-Arg	15.83±0.79	+33.36	+7.54

表 5 多胺对低温胁迫期 24 h 香蕉叶片可溶性多糖的影响

Table 5 Effects of PAs on the contents of soluble sugars in banana leaves subjected to chilling stress for 24 h

处理 Treatments	可溶性多糖 Soluble sugars (mg·g ⁻¹ FW)	与对照相比的改变量 Changes compared with CK (%)	
CK	0.47±0.04	0	
Chilling	0.56±0.05	+20.13	0
Chilling+Put	0.55±0.05	+17.34	-2.32
Chilling+Spd	0.60±0.04	+28.69	+7.13
Chilling+Spm	0.64±0.05	+36.40	+13.55
Chilling+D-arg	0.54±0.07	+16.06	-3.39

2.4 外源多胺对低温胁迫后香蕉叶片可溶性多糖的影响

表 5 表明,与室温对照比较,冷胁迫 24 h 导致香蕉叶片可溶性多糖含量增加 20.13%,冷胁迫前,喷施不同多胺,能不同程度提高冷胁迫后可溶性多糖的含量,其中 Spm 效果最显著,提升幅度为 36.40%,Spd 次之,提升幅度为 28.69%,但 Put 和 D-Arg 处理,使香蕉叶片可溶性糖含量与冷胁迫比较,变化不明显。试验结果说明,Spm 和 Spd 通过提高低温胁迫下的叶片可溶性多糖的含量,

增加细胞质的浓度,从而降低细胞膜对低温的敏感性,降低细胞膜脂相变温度,有利于增强植株的抗寒性。

2.5 外源多胺对低温胁迫 24 h 后香蕉叶片脯氨酸的影响

作为植物细胞内的一种游离氨基酸——脯氨酸含量的变化对低温比较敏感,低温可以促使脯氨酸积累。脯氨酸的增加有助于细胞或组织持水,增强植物对不良环境的抵抗力。表 6 表明,与室温对照比较,冷胁迫 24 h 导致香蕉叶片脯氨酸含量增加 32.10%,喷施多胺能普遍提高冷胁迫后香蕉叶片脯氨酸含量,其中 Spm 效果最显著,升幅达 53.48%; Spd 次之,升幅为 45.94%; Put 为 35.29%,与冷胁迫基本相同;D-Arg 则会导致冷胁迫后的脯氨酸含量的降低。试验结果说明,Spm 和 Spd 能够提高香蕉冷胁迫后的叶片内脯氨酸的含量,有利于提高香蕉苗的抗寒力,Put 效果不明显,D-Arg 不利于香蕉在低温条件下的脯氨酸积累。

表 6 多胺对低温胁迫期 24 h 香蕉叶片脯氨酸的影响

Table 6 Effects of PAs on the content of proline in banana leaves subjected to chilling stress for 24 h.

处理 Treatments	脯氨酸 Proline (mg · g ⁻¹ FW)	与对照相比的改变量 Changes compared with CK (%)	
CK	36.61 ± 3.18	0	
Chilling	48.36 ± 4.21	+32.10	0
Chilling+Put	49.53 ± 6.34	+35.29	+2.42
Chilling+Spd	53.43 ± 2.30	+45.94	+10.48
Chilling+Spm	56.19 ± 3.73	+53.48	+16.18
Chilling+D-Arg	44.51 ± 3.71	+21.57	-7.96

3 讨 论

在高等植物中,多胺包括腐胺(二胺)、亚精胺(三胺)和精胺(四胺),氨基数目越多,生理活性越大。多胺生物合成途径的中心产物是腐胺(Put),由精氨酸通过两条不同的路线而形成的;其中主要途径是精氨酸(Arg)首先由精氨酸脱羧酶(ADC)催化脱羧,生成鲱精胺(Agm),从而生成腐胺。而腐胺再经过加入氨基残基,生成亚精胺(Spd)和精胺(Spm)。精氨酸脱羧酶在植物中广泛分布,仅存在于细胞溶质中,对 L-精氨酸表现绝对特异性;D-精氨酸(D-Arg),二氟甲基氨基酸(DFMA)则是该酶的活性抑制剂,抑制植物体内腐胺的合成(Phillip

和 Russell,1989)。

有关环境胁迫与多胺关系的研究表明,一些报道认为植物在遭受各种胁迫时会导致 Put 大量积累,而 Spd 和 Spm 含量不变(Flores 和 Galston,1984;Flores 和 Walter,1991),这与 ADC 活性有关,胁迫发生时 ADC 活性提高。而另一些报道有黄瓜幼苗在低温(5℃)和常温(20℃)下处理 2~24 h 后,测得的 Spd 含量表明,低温处理的较常温处理的增加 116%~66%(Wang,1987),春小麦在受到 O₃ 胁迫时,虽然 ADC 活性升高,但经由 ADC 途径合成 Put 能力的增强并未导致 Put 的大量积累,而是 Spd 和 Spm 的升高(安黎哲等,1995);温州蜜柑经抗寒锻炼,叶片 Put 急剧下降,Spd、Spm 含量增加,抗寒力最大时,它们的含量均达到极值(林定波等,1994)。本试验结果表明,香蕉在遭受低温胁迫后,叶片内的 Put 含量急剧下降,而 Spd 大量积累,Spm 含量较稳定;D-Arg 处理使 PAs 总量下降,抑制了 Put 的合成,并且 Spd 含量也明显下降。这一结果与后者基本相符。因此,植物在遭受不同的环境胁迫条件下,内源多胺各组分的变化情况很不一致,这是由于胁迫使植物体内 Put 向 Spd 和 Spm 转化能力不同所致,低温胁迫使植物体内的 Put 向 Spd 和 Spm 转化能力增强,此外,不同的实验条件与各自涉及材料等因素都是导致结果差异的原因。

多胺对植物抗寒性的提高作用是多方面的。多胺作为多聚阳离子,可与膜结构上磷酸基团结合,直接维持膜的稳定性;同时,多胺可提高 SOD、POD、CAT 等活性而清除自由基,从而间接保护细胞膜;另外,多胺保护细胞的正常渗透性能而防止水分丢失,还可作为细胞内 pH 缓冲剂,有利于维持整个细胞的稳定性和阳离子的穿膜运动,可促进胁迫发生时蛋白质的合成(Galston 和 Sawhney,1990)。本试验表明,外源 Spd 和 Spm 能明显提高叶片 POD 活性、降低叶片的相对电导率、增加其可溶性糖及脯氨酸的含量;Put 对上述各抗寒因子的影响不明显。结合低温胁迫后,内源多胺各组分的变化情况来分析,在低温胁迫时,Put 含量的下降可能是由于 Put 转变成 Spd 的速度加快所致,是一种生理适应性反应。外源 Spd 和 Spm 对香蕉抗寒力的提高有着极其重要的作用;高浓度的 Put(1 mmol · L⁻¹)对香蕉抗寒力的提高没有发挥作用;D-Arg 由于抑制了 Put 的合成,致使 Put 向 Spd 转化减少,对香蕉抗寒力有一些负面影响。总之,多胺与香蕉抗寒性的关

系比较复杂,尚待进一步深入研究。

参考文献:

- 张志良. 1980. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社.
- An LZ(安黎哲), Wang XL(王勋陵). 1995. Changes and regulation of stress ethylene production and polyamine content in spring wheat leaves exposed to O₃(臭氧胁迫下春小麦叶片胁迫乙烯产生与多胺含量的变化与调控)[J]. *Acta Botanica Sinica*(植物学报), **37**(7): 527-533.
- Flores HE, Galston AW. 1984. Osmotic stress-induced polyamine accumulation in cereal leaves. II. Relation to amine acid pools[J]. *Plant Physiol*, **75**: 110-113.
- Flores SA, Walter GB. 1991. Polyamine concentrations and arginine decarboxylase activity in wheat exposed to osmotic stress[J]. *Plant Physiol*, **82**: 185-190.
- Galston AW, Sawhney BK. 1990. Polyamines in plant physiology[J]. *Plant Physiol*, **94**: 406-410.
- Lin DB(林定波), Liu ZQ(刘祖祺), Zhang SC(张石城). 1994. Effects of polyamines on cold hardiness development of citrus(多胺对柑橘抗寒力的效应)[J]. *Acta Horticulturae Sinica*(园艺学报), **21**(3): 222-226.
- Liu HX(刘鸿先), Zeng SX(曾韶西), Wang YR(王以柔), et al. 1985. Effect of low-temperature on the SOD of organelles of cotyledon in the different cold-resistance cucumbers(低温对不同耐寒力的黄瓜幼苗子叶细胞器的超氧化物歧化酶的影响)[J]. *Phytophysiological Sinica*(植物生理学报), **11**: 48-57.
- Phillip T Evans, Russell L Malmberg. 1989. Do polyamines have roles in plant development[J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol Copyright by Academic Press Inc*, **40**: 235-269.
- Slocum RD, Kaur-Sawhney R, Galston AW. 1984. The physiology and biochemistry of polyamines in plants[J]. *Arch Biochem Biophys*, **235**: 283-303.
- Song FB(宋凤斌), Dai JY(戴俊英), Li HY(李海燕), et al. 1995. Exogenously applied polyamines and drought tolerance in maize(外源多胺与玉米的耐旱性)[J]. *Maize Science*(玉米科学), **3**(3): 44-46.
- Wang SY. 1987. Changes of polyamines and ethylene in cucumber seedling in response to chilling stress[J]. *Physiol Plant*, **69**: 253-257.
- Wang SY, Steffens GL. 1985. Effect of paclobutrazol on water stress induced ethylene biosynthesis and polyamine accumulation on apple seedling leaves[J]. *Phytochemistry*, **24**: 2 185-2 190.
- Wang ZH(王泽槐), Liang LF(梁立峰). 1994. Changes of ascorbic acid content and CAT activity of banana leaves during low-temperature(香蕉冷害过程叶片抗坏血酸含量及过氧化氢酶活性的变化)[J]. *Journal of South China Agr Univ*(华南农业大学学报), **15**(3): 71-76.
- Yang J(杨俊), Huo PQ(贺平清), Yu BG(俞炳泉). 1988. Thin-layer chromatography and fluorometry for plant polyamines(植物多胺的薄层-荧光测定法)[J]. *Plant physiology communications*(植物生理学通讯), **6**: 63-66.
- Zheng JJ(郑家基), Xie HC(谢厚钗). 1996. The content changes of polyamines in Longan during wintering stages(龙眼越冬期叶片多胺含量的变化)[J]. *Acta Horticulturae Sinica*(园艺学报), **23**(3): 295-296.
- Zhou BY(周碧燕), Liang LF(梁立峰), Huang HB(黄辉白), et al. 1995. Effect of low-temperature and PPP333 on SOD and ABA of banana and Dajiao(低温和多效唑对香蕉及大蕉超氧化物歧化酶和脱落酸的影响)[J]. *Acta Horticulturae Sinica*(园艺学报), **22**(4): 331-335.
- Zhou YP(周玉萍), Liu HW(刘华伟), Feng YX(冯永新), et al. 2002. Effects of H₂O₂ and CaCl₂ on cold-resistance abilities in banana plantlets(过氧化氢与氯化钙对香蕉幼苗抗寒性的影响)[J]. *Journal of Guangzhou university (natural science edition)*(广州大学学报(自然科学版)), **1**(2): 33-36.
- Zheng JJ(郑家基), Xie HC(谢厚钗), Xiao YH(肖燕惠). 1996. ATPase and Protective enzyme activity and membrane lipid peroxidation in banana leaves in winter(香蕉越冬期 ATPase 和保护酶的活性及膜脂过氧化)[J]. *Journal of Fujian Agr Univ*(福建农业大学学报), **25**(4): 420-424.