沙丘芦苇特有一小分子化合物及其对叶绿体的逆境保护效应

浦铜良 程佑发 张承烈*

(兰州大学生命科学学院植物生理研究所, 兰州 730000. * 联系人, Email: zhangcl@lzu.edu.cn)

摘要 用柱层析手段从沙漠地区沙丘芦苇叶片中分离得到一种为该生态型所特有的小分子物质, 其化学特征与已报道的逆境胁迫诱导累积的溶质均不同, 具多氨基芳香族强极性特征. 其自然丰度与月平均气温和月极端高温值为指标的生境高温程度呈显著相关性, 并主要存在于光合细胞器叶绿体中. 该物质对离体叶绿体在高温下电子传递链的功能具有保护作用. 因此推测, 该独特小分子物质作为一种渗透保护剂主要通过稳定光合器官而赋予沙丘芦苇较强的抵抗生境高温及干旱的能力, 以适应沙漠地带恶劣的生长环境.

关键词 高温胁迫 可相容溶质 芦苇 自然生境

植物对干旱、高温、低温、高盐等不良环境的生理反应中最为显著的共同点之一是水分丧失, 并伴有光合作用的下降[1,2]. 而具有一定抗逆性的植物则经常表现为细胞内某种代谢物质的累积[3,4]. 已知具有增强植物抗逆能力的代谢物质多属于含氮化合物(脯氨酸、季胺类化合物及多胺类)或多羟基化合物 (蔗糖、多元醇、寡糖)[5]. 这些代谢物质不会干扰细胞中的正常生化反应, 但能通过调节细胞渗透势和保护生物大分子的结构以抵抗因细胞失水所引起的渗透胁迫等, 这些代谢物质被称为可相容溶质(compatible solutes)[6]. 可是, 由众多不同实验体系所得的研究结果, 为判断可相容溶质的累积对增强植物忍耐复杂自然环境所起的贡献造成了一定的难度. 因此, 使用在自然条件下具有稳定遗传耐/抗逆性植物进行实验, 以获得可相容溶质的累积和植物适应干旱等逆境之间的关系是十分有意义的.

芦苇(*Phragmites communis* Trin)是一种禾本科草本植物, 其典型生境为水沼、河流及其周边地带. 但是它可适应广泛的甚至是高度不良的陆地生境, 并演化出具有遗传差异的多种生态型[7~9]. 在中国西北沙漠地区(约 3.3×10^5 ha)生长着水芦和 3 种陆生性芦苇生态型. 我们在前期研究中发现, 在其对干旱、高温、高盐等生境的长期适应过程中表现出相应的和稳定的形态学和生态学特征[10]. 这些稳定的芦苇生态型是研究植物对土壤干旱、高盐抗性或耐受性的理想材料体系. 本文报道一种仅存在于沙丘生态型芦苇叶中具独特分子结构特征的可相容溶质, 并分析了其可能的逆境生理意义.

1 材料与方法

(ⅰ) 植物材料. 两种不同生境芦苇[10], 即沙丘芦苇(以下简称沙芦)和水生芦苇(以下简称水芦)叶片分别于 1998 年 5 月 7 日、7 月 15 日、9 月 15 日和 1999 年 7 月 3 日采自巴丹吉林沙漠南缘的甘肃省临泽县境内. 以上部第 1, 2 完全展开叶片为供试样品, 采下后立即投入液氮中固定并保存, 直至使用. 叶片温度参数用 Li-6000 便携式气体分析仪(Li-Cor, Lincoln, USA)测定. 气象资料参数来自于临泽县气象局.

(ⅱ) 沙芦叶片累积的特有小分子物(PAAC)的提取、纯化及定量定性分析. 沙芦叶片用

8~10 倍 (体积重量比) 体积 50 mmol/L HCl (含 5 mmol/L β-巯基乙醇, 0.2% Triton X-100)匀浆、提取两次. 合并的滤液用 NaOH 调节 pH 至 5~6 后, 加入一定量的羧甲基纤维素(CM-C)粉吸附、富集. 吸附了 PAAC 的 CM-C 经约 20 倍体积的丙酮, 0.2 mol/L NaCl, 50 mmol/L Gly-NaOH(pH =10)和蒸馏水分别清洗, 离心收集后, 以 5 mmol/L HCl 洗脱. 在中性(pH = 7.0)条件下用水饱和正丁醇萃取洗脱液 3 次, 合并的有机相经氮气(50℃)吹干, 定容于少量 80%甲醇, 供 TLC 检定和定量分析. TLC 所用硅胶 G 薄板(50 mm×70 mm×0.5 mm)在 1%三甲基氯硅烷的氯仿溶液中预展层一次, 进行固定相的硅烷化以降低其极性[11]. 硅烷化硅胶板经室温晾干后, 在 80℃条件下 2 h 除去多余的硅烷化试剂, 保存于干燥器中待用. 从定量芦苇叶片提纯的 PAAC 在硅烷化硅胶板上以 90%甲醇展开后, 由于 PAAC 本身的色泽而形成单一褐色斑点, R_f = 0.72. 薄板经 I_2 蒸气显色, 未检出其他杂质(图 1)(图像处理: Gel-Pro Analyzer, USA). 褐色斑点处 PAAC 经 80%甲醇浸提后, 紫外(287 nm)比色定量. 大量提纯时采用柱层析的方式, CM-C 柱经相同的清洗程序后, 用 10 mmol/L HCl 洗脱吸附的 PAAC, 再经正丁醇萃取, 干燥. 纯化 PAAC 的 UV 光谱(DU-7B, Beckman, USA), 400M ^{1}H-NMR 谱(FT-80A, Varian), 及 FAB-MS (ZAB-HS, VG)均委托国家重点实验室兰州大学仪器测试分析中心测试.

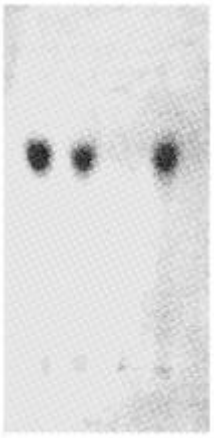

图 1 不同生态型芦苇叶片酸性提取液分离成分的 TLC 谱
A 为大量制备的纯化物, B 为沙芦, C 为水芦, D 为沙芦叶绿体

(ⅲ) 叶绿体的制备及其 Hill 反应测定. 芦苇叶绿体的制备按王颖君等人[12]的方法, 提取介质与悬浮介质 pH 均为 7.5. 叶绿体经各种处理及低渗胀破后测定以 Fe^{3+} 为电子受体的放氧活性. 反应介质含 50 mmol/L Hepes (pH = 7.6), 50 mmol/L 山梨醇, 5 mmol/L $MgCl_2$, 5 mmol/L NaCl, 10 mmol/L NH_4Cl 和 1 mmol/L $K_3Fe(CN)_6$. 样品 Chl 浓度约为 20 μg/mL. 光源为幻灯机, 光强 800 μmol·m^{-2}·s^{-1} PPFD. 由于芦苇叶片质地较硬, 研磨比较困难, 每批次实验之间的初始放氧活性有差异, 故本文采用初始对照的百分率表示相对活力[12]. 所有放氧活性数据为 4 或 5 批次的平均值. 电子传递的初始速率一般为 100~200 μmol O_2·mg^{-1} Chl·h^{-1}.

2 结果

2.1 沙芦特有小分子物质的生态型分布与季节含量变化

沙芦叶片酸性提取液呈现出与其他芦苇提取液不同的色泽, 可能是由于其中含有特定的化合物. 经分离纯化步骤得到了在硅胶 TLC 上具有单一斑点的深褐色提纯的化合物(图 1 中的 A, B), 在叶片中含量可达鲜重的 0.5%~0.6% (表 1). 由于同一地区水芦和其他一些生态型以及其他地区芦苇在任一时刻均未检测到这一物质, 所以判断为沙芦所特有, 是沙芦的一个独特性状.

表 1 生长季节不同时期沙芦特有小分子物质 PAAC 含量变化

月份	5	7	9
含量/ mg·g^{-1} FW	4.9 ± 0.3	5.8 ± 0.2	3.5 ± 0.2

分布于甘肃临泽地区巴丹吉林沙漠边缘有限面积区域内(1.5 × 2 km^2)的沙芦和水芦, 尽管

所处气候条件比较一致，但因土壤类型和水分供应方式以及局部日光辐射和气温的不同，演化出具明显不同形态和完全独立群体的多种生态型．水芦生长于常年积水的水沼中，而沙芦采集地位于沙漠区域的高大沙丘(5~10 m)之上．此处降水稀少，温差大，环境极为严酷(表 2)．在芦苇生长季节期间(5~10 月)降水多集中在 7 月，由于冬季和春季的持续干旱，使 4~5 月的旱情尤为严重．秋季(9 月)因雨季尚未结束和前期水分积累及气温回降，大气相对湿度和土壤湿度仍可保持相对较高水平．高温出现在 7 月盛夏，沙质地表处温度可达 61℃ (1999 年 7 月 3 日, 2:00 pm, 晴)，但由于时处雨季，水分状况仍优于生长季节前期(5 月) (表 2)．不同时期(5, 7, 9 月)沙丘芦苇叶片特有的 PAAC 含量也发生明显变化(表 1)，差值可高达 1 倍，说明其含量可能随某个(些)环境因子而波动．表 1, 2 数据表明，这种 PAAC 的含量与月平均大气相对湿度(RH)为指标的干旱程度的相关系数为 0.32；而与月平均气温和极端高温为指标的高温程度的相关系数分别为 0.91, 0.88.

表 2 沙芦样品采集地临泽县平川乡气象资料 (1994~1996 年)

月份	平均气温/℃	极端低温/℃	极端高温/℃	降水/mm	平均相对湿度/%
5	16.7	0.3	33.1	4.0	33
7	22.3	12.0	36.1	30	56
9	14.9	2.9	30.0	18.5	62

2.2 沙丘芦苇特有溶质的化学特征

被提纯的该化合物呈深褐色非晶体，化学组成 C(61.9%), H(5.8%), O(18.1%), N(14.2%)，呈明显的碱性和高极性，不溶于大多数的酮、酯、苯、氯仿等．易溶于水、稀酸、稀碱及含水醇中．

在 400M ^{1}H-NMR 测定谱上，具有典型的芳香环特征(未列出数据)，所以在紫外 312, 278 nm 处有两个强烈吸收峰(图 2)，$A_{1\ cm}^{0.1\%}$ 分别为 38.8, 34．利用 FAB-MS 测得分子量为 540.

戊二醛常被用于含-NH_2 基分子的偶联反应试剂，它通过其两端的醛基分别与不同分子的一级游离-NH_2 基反应生成稳定的 Schiff 碱，同时引起游离-NH_2 基的减少或消失[13]．在该提纯化合物水溶液(1 mg/mL) (pH = 7.0)中加入戊二醛至 1.25%后，在 5 min 内形成可见的沉淀，并在 20 min 内完成反应，所形成的沉淀物在 0.1 mol/L HCl 或 NaOH 或 0~0.5 mol/L NaCl 中均不溶解，也失去了在丙烯酰胺凝胶(6%)上泳动的能力，证明该反应产物(沉淀)是一个大分子聚合物．上述聚合作用及其比较强的碱性特征也表明，原化合物含两个或两个以上的游离氨基．因此我们得出初步结论，该小分子物质是一个多氨基芳香族化合物(Mr540) (polyamine aromatic compound，简称 PAAC).

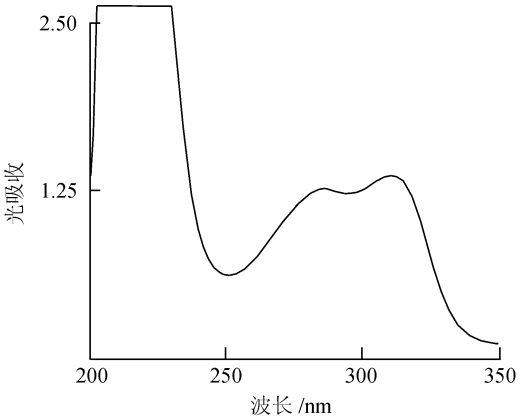

图 2 沙芦特有化合物 PAAC 的紫外吸收光谱
35 μg/mL 水溶液

2.3 PAAC 亚细胞分布和对叶绿体光合电子传递链的影响

为调查 PAAC 在沙芦叶片细胞内的分布及可能的作用部位，对沙芦叶片不同细胞器进行

了分级分离和 TLC 鉴定，结果在叶绿体组分中发现不易用 20~200 mmol/L NaCl 或 10 mmol/L EDTA 二钠盐洗去的 PAAC，含量达(0.96 ± 0.18) mg /mg Chl(7 月)(图 1 中的 D).

用自沙芦叶分离的 PAAC 处理离体涨破水芦叶绿体，室温放置 5 min 后测定以 Fe^{3+}为电子受体的 Hill 放氧活性 (图 3)，发现 PAAC 在 50~400 μg/mL 实验范围内均可促进离体叶绿体的活性. 最佳浓度约为 200 μg/mL. 如不加入 Fe^{3+}时，与相应的对照比较没有差别，表明该物质并非作为电子链传递成分或受体而发生上述效应. 而且,PAAC 在自然生长沙芦叶片内，特别在叶绿体组分内含量颇高,所以不可能作为光合电子链的传递成分介入到常规的光合作用中.

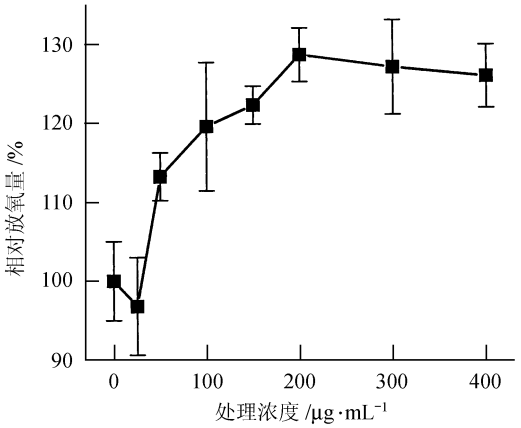

图 3　不同浓度沙芦 PAAC 对离体水芦叶绿体 Hill 放氧的作用

2.4　人为高温胁迫下沙芦和水芦及经 PAAC 处理后水芦叶绿体 Hill 放氧活性差别

如前所述，温度是取样沙漠地区的主胁迫因子之一，沙芦叶片的 PAAC 也与环境高气温条件相关，所以本文采用直接的温度变化作为实验胁迫[14]，将叶绿体放置不同时间后研究外源 PAAC 的可能功能.

在 25~40℃温度范围内，沙芦叶绿体(以 Chl 为基础)的光合放氧能力高于水芦(图 4). 且水芦叶绿体光合放氧的最佳温度约在 25℃，至 30℃和 35℃时急剧下降至 40%左右. 而沙芦的最适温度为 30~35℃，明显高于水芦叶绿体，甚至在 40℃时，仍可保持相当的活性. 同时，PAAC 处理明显提高高温(25~40℃)下水芦叶绿体的光合放氧能力，尽管在测试温度范围内总趋势仍是下降的，这可能是因为外源与内源 PAAC 的分布方式或/和浓度差异所造成的.与对照比较(25℃,水芦),在 30℃和 35℃条件下,经处理的水芦叶绿体仍能保持或较高地保持原有的光合放氧活性(分别为 100%和 50%),表现出 PAAC 可能的赋予叶绿体抗/耐高温的作用.

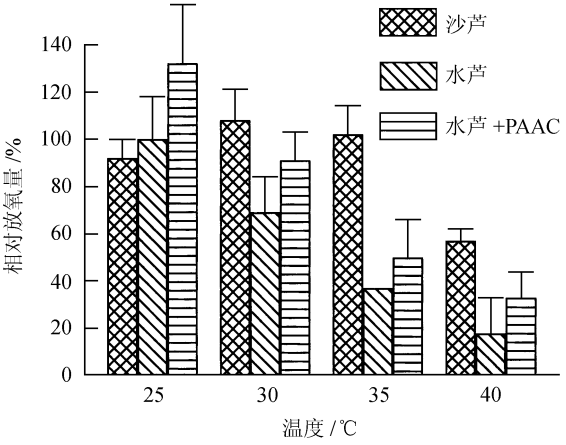

图 4　不同保温和测定温度下水芦和沙芦离体叶绿体 Hill 反应的差异及 PAAC 对水芦离体叶绿体 Hill 反应的促进和保护作用

水芦叶绿体经外源 PAAC 处理后在 25~40℃下放置 5 min，并于处理温度下测定以 Fe^{3+}为电子受体的 Hill 放氧. PAAC 处理终浓度为 200 μg/mL

2.5　PAAC 对离体叶绿体活性稳定性的影响

离体叶绿体随着离体时间的延长而逐渐失活[13]，特别是 PSⅡ的钝化. 实验结果表明，水芦完整叶绿体经室温(17℃)放置 15 h 后，其放氧活性仅为原来的 25%左右 (图 5). 但在 PAAC(200 μg/mL)存在条件下放置同样时间则仅有少量的下降(少于 30%)，较好地保留了原来的活性. 而且 PAAC 还可使已被放置 15 h 而钝化的叶绿体恢复部分活性.

3 讨论

低分子量渗透保护剂和渗透剂的累积被认为是植物克服环境胁迫的一种重要策略[1]. 不同植物物种累积的化合物种类与自然环境之间存在一定的相关性[2]. 这暗示, 在特定生境中的植物体内存在新的渗透保护剂或渗透剂. 生长于中国西部巴丹吉林沙漠境内高大沙丘上的芦苇, 从其叶片中可分离出一种独特的多氨基芳香族化合物(PAAC), 但在其他生态型芦苇中未检测到该化合物或类似物. PAAC 的含量呈现出明显的季节性变化, 与环境高气温之间呈现很高的相关性. 同时, 沙芦生境干旱, 其群落远较水芦稀疏, 故辐射升温高, 沙芦叶温明显高于水芦, 分别为 35℃, 27℃ (1999 年 7 月 3 日, 2:00 pm, 晴), 可以初步认为, 沙芦叶中累积的这一小分子化合物与其适应高温胁迫有一定的因果关系. 但也不能完全排除干旱的诱导作用, 因为在生长季节的早期(5 月上旬), 气温条件没有构成高温胁迫, 干旱状况却非常严重, 这一时期沙芦叶片 PAAC 含量也很高, 为最高含量(7 月)的 80%左右. 另外, 该时期气温较低, 干旱严重, 光合作用和根系吸收等生理活动受到极大的限制, 从而可能从能量, C, N 源等角度限制了 PAAC 的合成.

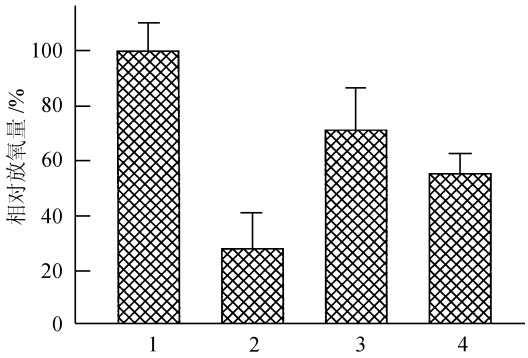

图 5 沙芦 PAAC 对水芦离体叶绿体室温放置过程中光合电子链的保护效应

1——对照, 2——室温放置 15 h, 3——PAAC 处理后室温放置 15 h, 4——室温放置 15 h 后 PAAC 处理

目前, 对于植物在胁迫条件下累积一些小分子化合物的生理作用被认为主要有两种可能: 一是能降低细胞的渗透势(Ψ_S), 二是能稳定生物膜和/或大分子结构[1]. PAAC 在沙丘芦苇叶中含量可高达 0.5~0.6 mg/g FW, 但如平均分布在细胞内, 则其对细胞渗透势降低的作用十分有限(大约 1.5 mmol/L), 因此推测, PAAC 可能并不具有明显的渗透调节的功能. 研究表明, 该化合物在叶绿体中含量很高(图 1 中的 D), 这种分布暗示其可能有减轻沙丘干旱高温及高光强条件下沙芦光合叶片叶绿体伤害的作用. 实验表明沙芦离体叶绿体光合电子链的最适温度(30~35℃)明显高于水芦(约 25℃), 而外源 PAAC 又可提高较高温度下水芦离体叶绿体电子链的放氧能力. 这一方面说明沙芦叶绿体自身具有适应较高温度的机制, 另一方面根据沙芦和水芦高温下放氧能力的差异和外施 PAAC 对水芦离体叶绿体高温下功能的改善, 可以认为 PAAC 对处于高温逆境下的沙芦有特定的保护作用. 高温条件可以影响到生物的膜系统相变状态, 反之, 膜酯的流动性或相变温度也与膜环境的二价或多价阳离子, 如 Mg^{2+}, Ca^{2+} 有很大关系, 它们与膜磷脂亲水端结合, 明显提高膜系统的相变温度[15]. PAAC 是以多价阳离子形式存在, 可能具有同样的结合保护作用, 从而保持较高温度下膜的相态和功能.

前人的工作[13]指出, 放置过程中叶绿体失活与光合膜系统组成的水解及蛋白钝化有关. 膜系统的降解产物游离脂肪酸, 特别是 18∶3 酸将直接抑制电子链传递功能. 而 PAAC 的存在可能抑制这些抑制性物质的产生或消除其抑制作用. 实验表明, PAAC 还可部分恢复因放置而钝化的叶绿体活性. 表明它可以消除已存在的引起叶绿体失活的因素, 即作为多价阳离子结合可能因放置过程中释放的游离脂肪酸等. 说明 PAAC 除具有高温逆境下保护叶绿体的功能外, 对正常温度下其他不良环境中的细胞、细胞器同样是有益的, 或是对受到极端高温等

逆境伤害后的植物迅速恢复其功能有着重要意义.

致谢 本工作为国家自然科学基金(批准号: 39870062)和国家重点基础研究发展规划(批准号: G1999011700)资助项目.

参 考 文 献

1 Holmberg N, Bülow L. Improving stress tolerance in plants by gene transfer. Trends in Plant Science, 1998, 3: 61~66

2 Bohnert H J, Nelson D E, Jensen R G. Adaptation to environmental stress. The Plant Cell, 1995, 7: 1099~1111

3 Galinski E. Compatible solutes of halophilic eubacteria molecular principles, water-solutes interaction, stress protection. Experientia, 1993, 49: 487~496

4 Potts M. Desiccation tolerance in prokaryotes. Microbiol Rev, 1994, 58: 755~805

5 McCue K F, HanSon A D. Drought and salt tolerance: towards understanding and application. Trends Biotech, 1990, 8: 358~362

6 Bartels D, Nelson D. Approaches to improve stress tolerance using molecular genetics. Plant Cell Environ, 1994, 17: 659~667

7 Haslam S M. Variation of population types in *Phragmites communis* Trin. Ann Bot, 1970, 34:147~158

8 Haslam S M. The performance of *Phragmites communis* Trin in relation to temperature. Ann Bot, 1975, 39: 881~888

9 Matoh T, Matsushita N, Takahashi E. Salt tolerance of the reed plants *Phragmites communis* Trin. Physiol Plant, 1988, 72: 8~14

10 Wang H L, Zhang C L, Liang H G. Seasonal changes of polyamines in habitat adaptation of different ecotypes of reed plants. Oecologia, 1995, 101: 119~123

11 **杨文澜, 马研林, 王万高, 等. 色谱及有关方法的实验室手册. 北京: 机械工业出版社**, 1986. 151

12 **王颖君, 叶济宇. 脓青素对光抑制条件下菠菜叶绿体的保护作用. 植物生理学报**, 1996, 22(2): 123~129

13 Papageorgiou G C. Stabilization of chloroplasts and subchloroplast particles. In: Pietro A S, ed. Methods in Enzymology, Vol 69. Photosynthesis and Nitrogen Fixation. 1980. 613~625

14 Heckathorn S A, Downs C A, Sharkey T D, et al. The small, methionine-rich chloroplast heat-shock protein protects photosystem Ⅱ electron transport during heat stress. Plant Physiol, 1998, 116: 439~444

15 Bohnert H J, Jenson R G. Strategies for engineering water-stress tolerance in plants. Trends in Biotechnology, 1996, 14: 89~97

(1999-10-26 **收稿**, 2000-02-29 **收修改稿**)