

茶氨酸诱导烟草幼苗抵御干旱胁迫的研究

刘炎红¹, 单丹丹², 刘松², 尤本武², 郭家明², 陈学平^{2*}

(1. 安徽省烟草公司烟叶处, 合肥 230022; 2. 中国科学技术大学烟草与健康研究中心, 合肥 230026)

摘要: 通过施用茶氨酸来减轻干旱胁迫对烟草幼苗的毒害, 并从抗氧化物质和抗氧化酶来探讨其作用机理。结果表明, 在干旱胁迫下, 0.25 mmol·L⁻¹ 茶氨酸能显著改善烟草幼苗的生长情况, 提高其存活率; 外源茶氨酸预处理不仅能显著提高干旱胁迫下烟草幼苗谷胱甘肽(GSH)含量, 还参与调节烟草幼苗超氧化物酶(SOD)过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)和抗坏血酸还原酶(APX)活性, 降低相对电导率、脯氨酸、过氧化氢(H₂O₂)和丙二醛(MDA)含量。茶氨酸诱导烟草幼苗抵御干旱胁迫是通过激发植物体抗氧化物质及抗氧化酶活性调节的综合结果。

关键词: 茶氨酸; 干旱胁迫; 烟草

中图分类号: S572

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X(2016)03-0405-05

The protective role of theanine in drought tolerance of tobacco seedlings

LIU Yanhong¹, SHAN Dandan², LIU Song², YOU Benwu², GUO Jiaming², CHEN Xueping²

(1. The Tobacco Leaf Department, Anhui Tobacco Company, Hefei 230022;

2. Tobacco and Health Reserch Center, University of Science and Technology of China, Hefei 230051)

Abstract: To study the role of theanine in protecting tobacco against drought stress, non-enzymic antioxidants and antioxidases in tobacco seedlings were investigated. The results showed that 0.25 mmol/L theanine could effectively improve plant growth and the survival rate of tobacco seedlings under drought stress. Meanwhile, analyses of physiological-biochemical indices indicated that theanine could increase the content of glutathione (GSH), adjust the activities of antioxidant enzymes, such as superoxide dismutase (SOD), acerbate peroxidase (APX), peroxidase (POD) and catalase (CAT), but it lowered the relative conductivity content, the proline content, the hydrogen peroxide (H₂O₂) level as well as the content of malondialdehyde (MDA). In conclusion, theanine is beneficial to relieving drought stress on tobacco seedlings through stimulating non-enzymic antioxidants and antioxidases in plants.

Key words: theanine; drought stress; tobacco

当植物蒸腾速率超过水分吸收速率或土壤缺乏植物可利用的水分时,植物会发生干旱胁迫。干旱胁迫下,植物组织含水量下降,水势降低质膜透性增大,同时,活性氧大量增加而引起膜脂过氧化,丙二醛(MDA)含量增加,电解质外渗,从而影响植株生长发育^[1]。烟草作为重要的经济作物,起源于雨量充沛的热带地区,对水分的要求很高^[2]。有研究指出,干旱胁迫下烟叶的产量降低,上中等烟比例减少,叶内还原糖含量下降,总氮和烟碱含量升高,

内在化学成分比例失调^[3]。同时,干旱胁迫导致烟叶中主要香气物质含量减少,香气质量变差^[4]。因此寻找提高植物抗旱性的方法以及探讨其内在机理对调节植物的生长发育具有十分重要的意义。

茶氨酸(theanine, N-乙基-γ-L-谷氨酰胺)是茶科植物一种丰富的非蛋白氨基酸。许多研究表明,茶氨酸具有抗肿瘤^[5]、降血压^[6]、抗肥胖^[7]、改善免疫系统^[8]等的多重功效。然而关于茶氨酸作为外源物质诱导植物抵御干旱胁迫的研究尚未报道。本试验

收稿日期: 2015-11-18

基金项目: 安徽省烟草公司“提升特色烟风格、增强抗逆性的高效绿色生长调节物质的研制与应用”项目(0920140421003)资助。

作者简介: 刘炎红, 农艺师。E-mail: liuyanhong@sian.cn

* 通信作者: 陈学平, 博士, 教授。E-mail: chenxp08@ustc.edu.cn

以云烟 87 为试验材料,研究不同浓度茶氨酸对干旱胁迫下烟草生长调节的机制,测定了干旱胁迫下烟草幼苗的存活率,相对电导率,抗氧化物质含量,抗氧化酶活性,以期对烟草干旱胁迫调控提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料和生长处理

烟草品种“云烟 87”来自于安徽农业科学院。灭菌种子均匀点播于霍格兰营养液润湿的珍珠岩中,置于(28±2)℃恒温室培养,待种子发芽后幼苗有 3~4 叶时,移栽长势一致的幼苗至 12 孔穴盆中培养,采用浓度为 0、0.25、0.5、1 mmol·L⁻¹ 茶氨酸溶液对幼苗叶片进行喷施处理,其中,对照组和自然生长组用蒸馏水进行喷施处理,重复 3 组。茶氨酸喷施处理 7 d 后,烟苗控水 10 d 作为干旱处理,处理结束后恢复灌水观察存活率,同时取样,液氮速冻后置于-70℃超低温冰箱保存。

1.2 生理生化指标的测定

酶液提取:取新鲜叶片约 0.2 g,在预先冷冻的研钵中加入 2 mL 50 mmol·L⁻¹ pH=7.0 的缓冲液(含有 1% PVP, 0.1% Na₂-EDTA),迅速研磨至匀浆,再加入 3 mL 缓冲液,16000 rad·s⁻¹ 高速冷冻离心机 4℃离心 20 min,上清液即为待测酶液。

脯氨酸含量测定采用茚三酮试剂法^[9];丙二醛(MDA)含量测定采用硫代巴比妥酸法^[10]。POD 测定参照 Bellamkonda 采用愈创木酚法^[11],SOD 活力测定参照 Bewley 的氮蓝四唑(NBT)法^[12],APX

活力的测定参照 Nakano 和 Asada 的方法^[13],GSH、H₂O₂ 和 CAT 参照南京建成生物试剂公司相应的测试试剂盒。

1.3 数据统计分析

实验数据表示为平均值 ± 标准偏差,数据分析采用单因素方差分析,置信区间 P<0.05,统计分析软件使用 Origin 9.1。

2 结果与分析

2.1 干旱胁迫下茶氨酸对烟草幼苗生长的影响

如图 1(A)所示,不同浓度茶氨酸(0.25、0.5、1 mmol·L⁻¹)对烟草幼苗预处理 7 d。干旱胁迫处理的烟草幼苗与正常条件(fresh 组)下的烟草幼苗相比,干旱处理后烟草幼苗均呈现严重萎蔫状态,叶片干枯发黄。图 1(B)中,恢复灌水 1 d 后,未经茶氨酸预处理的烟草幼苗存活率仅为 41.67%,而经茶氨酸预处理的烟草幼苗存活率分别为 91.67%、75%和 83.33%;灌水恢复 2 d 后,未经茶氨酸预处理的烟草幼苗存活率仅为 50.00%,而经茶氨酸预处理的存活率分别为 91.67%、83.33%和 83.33%;灌水恢复 3 d 后,未经茶氨酸处理的烟草幼苗存活率仅为 58.33%,而经茶氨酸预处理的烟草幼苗存活率分别为 91.67%、91.67%和 100%;灌水恢复 4 d 后,未经茶氨酸处理的烟草幼苗存活率仅为 66.67%,而经茶氨酸预处理的存活率分别为 100%、91.67%和 100%。以上结果表明,茶氨酸可以显著提高烟草幼苗的抗干旱能力。其中,0.25 mmol·L⁻¹ 茶氨酸预处理组烟草幼苗恢复灌水后恢复能力较好,存活率高。

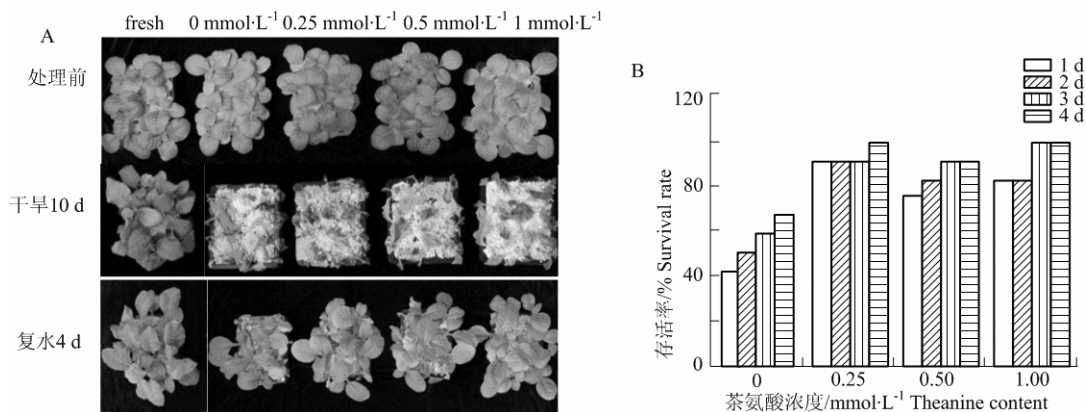


图 1 干旱胁迫下茶氨酸对烟草幼苗生长(A)及存活率(B)影响

Figure 1 Effect of theanine on tobacco seedlings' growth (A) and the survival rate (B) under drought stress

2.2 干旱胁迫下茶氨酸对烟草幼苗生理生化指标的影响

2.2.1 MDA 含量和相对电导率 在逆境胁迫下,植

物膜脂过氧化加剧,MDA 大量积累;同时细胞膜受损致胞液外渗而使相对电导率升高。因此,MDA 和相对电导率通常作为反映氧化胁迫的重要指

标^[14-15]。由图 2 (A) 可以看出, 干旱胁迫下, 烟草幼苗体内 MDA 含量升高, 0.25 和 0.5 mmol·L⁻¹ 茶氨酸预处理组烟草幼苗 MDA 含量比干旱胁迫组烟草幼苗分别降低了 24.96% 和 1.82%, 而 1 mmol·L⁻¹ 茶氨酸处理后 MDA 含量升高 3.65%。图 2 (B) 中,

干旱胁迫下相对电导率上升。茶氨酸预处理组烟草幼苗相对电导率比干旱胁迫组分别降低 29.10%、21.51% 和 36.8%, 呈显著差异。结果表明, 0.25 mmol·L⁻¹ 茶氨酸能够显著降低干旱胁迫对烟草幼苗细胞膜的损伤。

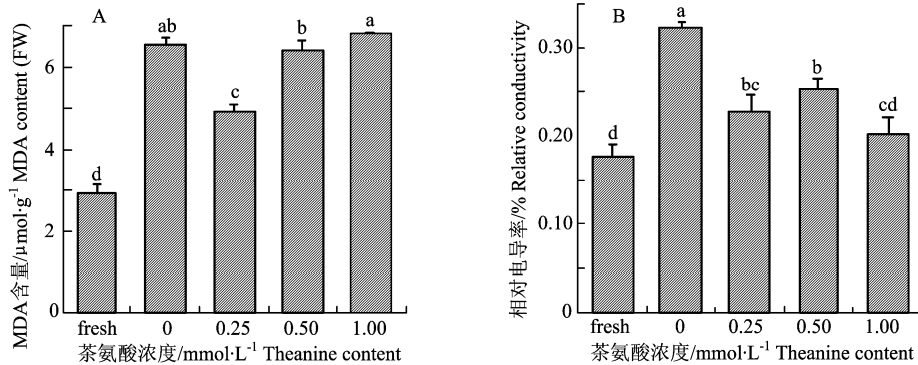


图 2 干旱胁迫下茶氨酸对烟草幼苗 MDA 含量 (A) 和相对电导率 (B) 的影响

Figure 2 Effect of theanine on the content of MDA (A) and relative conductivity (B) of tobacco seedlings under drought stress

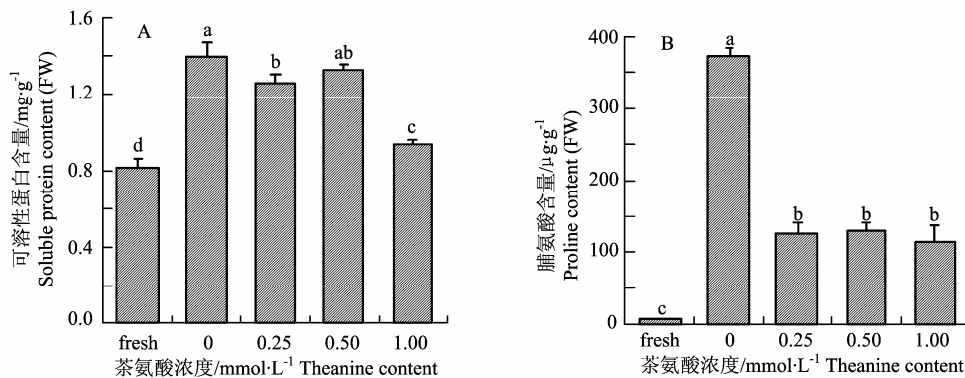


图 3 干旱胁迫下茶氨酸对烟草幼苗可溶性蛋白 (A)、脯氨酸 (B) 含量的影响

Figure 3 Effect of theanine on the content of soluble protein (A), proline (B) in tobacco seedlings under drought stress

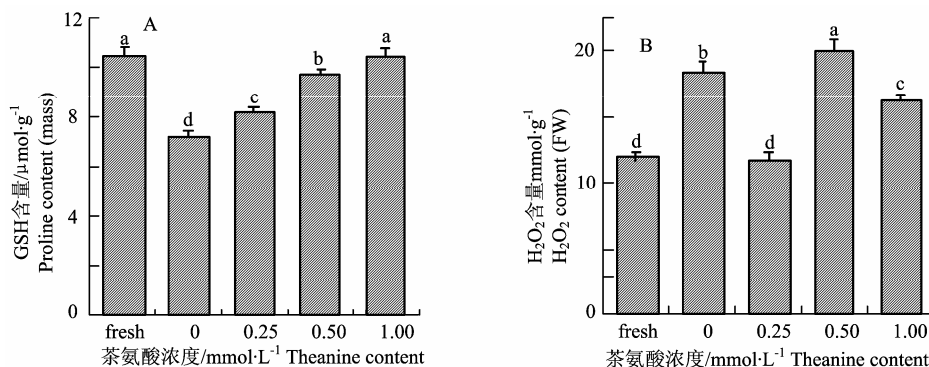


图 4 干旱胁迫下茶氨酸对烟草幼苗 GSH (A) 和 H₂O₂ (B) 的影响

Figure 4 Effect of theanine on the content of GSH (A) and H₂O₂ (B) of tobacco seedlings under drought stress

2.2.2 可溶性蛋白和脯氨酸含量 可溶性蛋白对植物与外界渗透压之间的平衡有协调作用, 能增强植物的吸水能力, 有利于维持植物体膜的稳定性以及水分平衡^[16]。由图 3 (A) 可知, 干旱胁迫下, 烟草幼苗体内可溶性蛋白含量上升, 这是烟草幼苗

通过可溶性蛋白的累积来缓解干旱胁迫造成的伤害; 而茶氨酸预处理组烟草幼苗可溶性蛋白含量比干旱胁迫组分别降低 9.35%、5.04% 和 32.37%。

逆境胁迫下, 植物会通过积累脯氨酸来调节细胞渗透压, 以增加适应环境的能力^[17]。由图 3 (B)

可知, 干旱胁迫下, 烟草幼苗体内脯氨酸含量均升高。茶氨酸预处理组烟草幼苗脯氨酸含量比干旱胁迫组分别降低 65.76%、64.52%和 68.66%。

以上结果表明, 茶氨酸预处理组烟草幼苗可溶

性蛋白和脯氨酸含量较干旱胁迫组均降低。这可能是茶氨酸减轻了干旱胁迫对烟草幼苗的毒害作用, 从而使烟草幼苗在干旱胁迫应激反应中可溶性蛋白和脯氨酸积累减少。

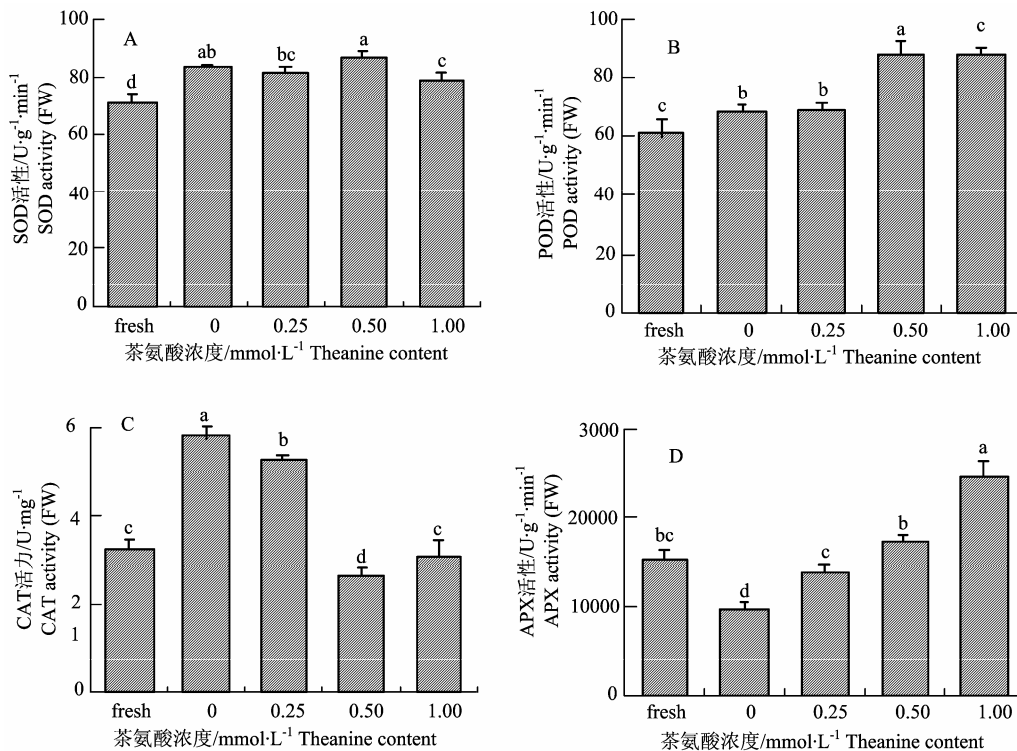


图 5 干旱胁迫下茶氨酸对烟草幼苗 SOD (A)、POD (B)、CAT (C) 和 APX (D) 活性的影响

Figure 5 Effect of Theanine on the activities of SOD (A), POD (B), CAT (C) and APX (D) of tobacco seedlings under drought stress

2.3 茶氨酸对干旱胁迫下烟草幼苗抗氧化酶影响

逆境胁迫下, 植物体抗氧化酶 SOD、POD、CAT 和 APX 参与清除过剩的 ROS, 从而维持其自身氧化分子的动态平衡^[20]。由图 5 可知, 干旱胁迫组烟草幼苗体内 SOD、POD 和 CAT 等抗氧化酶活性升高。由图 5 (A) 可知, 经 0.25 和 1 mmol·L⁻¹ 茶氨酸预处理组烟草幼苗 SOD 活性比干旱胁迫组分别降低了 2.15% 和 4.90%, 但 0.5 mmol·L⁻¹ 茶氨酸处理组烟草幼苗 SOD 活性比干旱胁迫组升高 6.59%。在图 5 (B) 中, 不同浓度茶氨酸预处理组烟草幼苗 POD 活性比干旱胁迫组分别增加了 1.63%、29.05% 和 30.27%。在图 5 (C) 中, 不同浓度茶氨酸预处理组烟草幼苗 POD 活性比干旱胁迫组分别降低 9.59%、54.45% 和 46.75%。由图 5 (D) 可知, 干旱胁迫组烟草幼苗 APX 活性出现降低, 而经不同浓度茶氨酸预处理的烟草幼苗 APX 活性比干旱胁迫组分别升高 41.6%、77.20% 和 148.04%, 呈显著差异。虽然 CAT 和 SOD 活性都有不程度的下降, 但 POD 和 APX 酶活性显著增加, 可以清除过量的 H₂O₂,

使活性氧维持在一个动态稳定的水平^[21]。茶氨酸预处理对烟草幼苗抗氧化酶变化的影响体现出抗氧化酶对机体调节的复杂性, 具体作用机制仍需进一步研究。

3 结论

干旱胁迫使烟草幼苗生长受到抑制, 植物严重萎蔫, 叶片干枯发黄; 复水后生长依然缓慢, 存活率低。此外, 烟草幼苗细胞膜脂质过氧化增加, 膜透性增加, 电解质外渗。研究发现, 0.25 mmol·L⁻¹ 茶氨酸预处理可以显著改善以上不良生长状况。一方面, 茶氨酸诱导烟草降低可溶性蛋白, 脯氨酸, 相对电导率, MDA 和 H₂O₂ 含量以减轻毒害; 另一方面, 茶氨酸诱导烟草幼苗增加 GSH 含量、调节抗氧化酶活性来增强烟草幼苗的抗氧化能力; 综上所述, 茶氨酸诱导烟草幼苗抵御干旱胁迫是通过激发植物体抗氧化酶和抗氧化物质综合的调节结果。

参考文献:

[1] CHAVES M M, FLEXAS J, PINHEIRO C. Photosynthe-

- sis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell [J]. *Annals of Botany*, 2009, 103(4): 551-560.
- [2] 贾燕超, 任庆成, 杨铁钊. 外源物质与烟草抗旱研究进展[J]. *中国农学通报*, 2009, 25(24): 530-533.
- [3] 于建军, 汪耀富. 干旱胁迫对烤烟干物质积累和产量品质的影响[J]. *烟草科技*, 1993(6): 30-33.
- [4] 韩锦峰, 汪耀富, 杨素勤. 干旱胁迫对烤烟化学成分和香气物质含量的影响[J]. *中国烟草*, 1994(1): 35-38.
- [5] LIU Q, DUAN H, LUAN J, et al. Effects of theanine on growth of human lung cancer and leukemia cells as well as migration and invasion of human lung cancer cells[J]. *Cytotechnology*, 2009, 59(3): 211-217.
- [6] YOKOGOSHI H, KATO Y, SAGESAKA Y M, et al. Reduction effect of theanine on blood pressure and brain 5-hydroxyindoles in spontaneously hypertensive rats [J]. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 1995, 59(4): 615-618.
- [7] ZHENG G, SAYAMA K, OKUBO T, et al. Anti-obesity effects of three major components of green tea, catechins, caffeine and theanine, in mice[J]. *In Vivo*, 2004, 18(1): 55-62.
- [8] MIYAGAWA K, HAYASHI Y, KURIHARA S, et al. Co-administration of l-cystine and l-theanine enhances efficacy of influenza vaccination in elderly persons: Nutritional status-dependent immunogenicity [J]. *Geriatrics & Gerontology International*, 2008, 8(4): 243-250.
- [9] MICHAEL P I, KRISHNASWAMY M. The effect of zinc stress combined with high irradiance stress on membrane damage and antioxidative response in bean seedlings [J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2011, 74: 171-177.
- [10] STEWART R R C, BEWLEY J D. Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes [J]. *Plant Physiology*, 1980, 65(2): 245-248.
- [11] RAMAKRISHNA B, RAO S S R. 24-Epibrassinolide alleviated zinc-induced oxidative stress in radish (*Raphanus sativus* L.) seedlings by enhancing antioxidative system [J]. *Plant Growth Regul*, 2012, 68(2): 249-259.
- [12] BEWLEY J D. Physiological aspects of desiccation tolerance—a retrospect [J]. *Int J Plant Sci*, 1995: 393-403.
- [13] NAKANO Y, ASADA K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts [J]. *Plant Cell Physiol*, 1981, 22(5): 867-880.
- [14] APEL K, HIRT H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2004, 55: 373-399.
- [15] ASHRAF M A, ASHRAF M, ALI Q. Response of two genetically diverse wheat cultivars to salt stress at different growth stages: leaf lipid peroxidation and phenolic contents [J]. *Pak J Bot*, 2010, 42(1): 559-565.
- [16] 单丹丹, 张清莉, 郭家明, 等. 茶氨酸对烟草幼苗生长及生理特性的影响[J]. *安徽农业大学学报*, 2015, 42(2): 283-289.
- [17] SIRIPORNADULSIL S, TRAINA S, VERMA D P S, et al. Molecular mechanisms of proline-mediated tolerance to toxic heavy metals in transgenic microalgae [J]. *The Plant cell*, 2002, 14(11): 2837-2847.
- [18] RAMAKRISHNA B, RAO S S R. 24-Epibrassinolide maintains elevated redox state of AsA and GSH in radish (*Raphanus sativus* L.) seedlings under zinc stress [J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2013, 35(4): 1291-1302.
- [19] GUO B, LIANG Y C, ZHU Y G, et al. Role of salicylic acid in alleviating oxidative damage in rice roots (*Oryza sativa*) subjected to cadmium stress [J]. *Environmental Pollution*, 2007, 147(3): 743-749.
- [20] 梁艳荣, 胡晓红, 张颖力, 等. 植物过氧化物酶生理功能研究进展[J]. *内蒙古农业大学学报(自然科学版)*, 2003, 24(2): 110-113.
- [21] PARVAIZ A, MARYAM S, SHARMA S. Reactive Oxygen Species, Antioxidants and Signaling in Plants [J]. *Journal of Plant Biology*, 2008, 51(3): 167-173.