

芦苇叶片中总氮同位素及游离氨基酸浓度对水淹的响应

赖媛媛^{1,2}, 朱仁果^{2,①}, 罗 笠², 吕 哲², 孙启斌³

(1. 昆明理工大学机电工程学院, 云南 昆明 650093;

2. 东华理工大学 江西省大气污染成因与控制重点实验室, 江西 南昌 330013; 3. 中山大学大气科学学院, 广东 广州 510275)

Response of total nitrogen isotope and free amino acid concentration in leaf of *Phragmites australis* to flooding
LAI Yuanyuan^{1,2}, ZHU Renguo^{2,①}, LUO Li², LYU Zhe², SUN Qibin³ (1. Faculty of Mechanical and Electrical Engineering, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650093, China; 2. Jiangxi Province Key Laboratory of the Causes and Control of Atmospheric Pollution, East China University of Technology, Nanchang 330013, China; 3. School of Atmospheric Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2019, 28(4): 107-109

Abstract: Total nitrogen content, total nitrogen isotope ($\delta^{15}\text{N}$), and free amino acid concentration in leaf of *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud. under flooding for 0-11 d were studied. The results show that with the increase of flooding days, there is no significant variation in total nitrogen content in leaf of *P. australis*, $\delta^{15}\text{N}$ value shows a gradual tend to be negative, and concentrations of total free amino acids, Ser, Asp, and Asn first increase and then decrease. Under flooding for 1 d, $\delta^{15}\text{N}$ value decreases obviously and free amino acid concentration increases obviously compared with those under flooding for 0 d. It is indicated that $\delta^{15}\text{N}$ value and free amino acid concentration are good indicators of *P. australis* under flooding condition.

关键词: 芦苇; 水淹; 总氮同位素; 游离氨基酸浓度

Key words: *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud.; flooding; total nitrogen isotope; free amino acid concentration

中图分类号: Q945.1; Q945.78 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2019)04-0107-03

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2019.04.12

湿地植物经常受到周期性或永久性的水淹胁迫^[1]。长期水淹会导致植物根系缺氧,限制植物的生长和发育^[2-3]。芦苇 [*Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud.] 因适应力强、生产力高而广泛分布在湿地中^[4]。水淹条件下,芦苇会形成大量通气组织^[5]以及高且少的茎节^[6]。

植物组织中总氮同位素 ($\delta^{15}\text{N}$) 被用于示踪植物在不同环境湿度下氮代谢变化^[7]。游离氨基酸作为植物中重要的初级氮代谢产物^[8],其浓度可以指示植物是否受到环境压力^[9],且游离氨基酸浓度对环境压力的响应较总氮含量更灵敏^[10]。Hsu 等^[11]的研究结果表明:洋蒲桃 [*Syzygium samarangense* (Blume) Merr. et L. M. Perry] 叶片中总游离氨基酸浓度在水淹 14 d 后升高了 26%,而其总氮含量在水淹 35 d 后才出现显著变化。

本研究以鄱阳湖典型湿地植物芦苇为研究对象,分析芦苇叶片中总氮含量、 $\delta^{15}\text{N}$ 值及游离氨基酸浓度对水淹时间的响应,以期明确水淹条件下芦苇叶片各指标的变化趋势,为鄱阳湖湿地植物保护提供科学支持。

1 材料和方法

1.1 材料

供试芦苇于 2016 年 4 月采自江西省鄱阳湖南矶湿地国家级自然保护区(北纬 28°54'、东经 116°15')。将只保留根部的芦苇样品栽植于塑料盆(长 70 cm、宽 40 cm、高 27 cm)中,栽培土壤为原植物生长土壤。定期浇水维持植物正常生长。2 个月后将长势相对一致的芦苇样品移栽到 PVC 管(直径 15 cm、高 30 cm)中,管内装 15 cm 深的原植物生长土壤,每管 1 株,2 周后,置于水箱(长 120 cm、宽 100 cm、高 96 cm)中进行水淹(自来水)实验。每天补充水箱内水量以保证水面淹没植株顶端。水淹实验在东华理工大学户外实验地进行。

1.2 方法

1.2.1 实验设计 设置水淹 0(未淹水)、1、4 和 11 d 共 4 个处理,每个处理 5 株,视为 5 次重复。实验完成后采集植物样品置于干净的自封袋中,立即带回实验室。

收稿日期: 2018-10-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(41463007)

作者简介: 赖媛媛(1993—),女,云南昆明人,硕士研究生,主要从事湿地植物生理方面的研究。

①通信作者 E-mail: zhurenguo@ecit.cn

1.2.2 样品前处理 采集的芦苇叶片用超纯水反复冲洗,彻底去除叶片表面的颗粒物和尘土,然后于75℃烘干48h,磨碎,过200目筛,干燥保存。取样品0.1g,用液氮磨碎后,加入2mL超纯水超声(180W)提取5min,于1000 r·min⁻¹、5℃离心5min,取上清液。使用Dowex 50WX8 H⁺阳离子交换树脂(美国Sigma-Aldrich公司)纯化氨基酸。

1.2.3 总氮含量和总氮同位素($\delta^{15}\text{N}$)的测定 取1.5mg上述样品,采用EA-IRMS[FLASH 2000元素分析仪,253 Plus同位素比值质谱仪(美国Thermo Fisher Scientific公司)]测定其总氮含量及 $\delta^{15}\text{N}$ 值。采用购自国际原子能机构的咖啡因(IAEA-600, $\delta^{15}\text{N}$ 值为+1‰)、硫酸铵(IAEA-N-2, $\delta^{15}\text{N}$ 值为+20.3‰)和谷氨酸(USGS41a, $\delta^{15}\text{N}$ 值为+47.6‰)标准品对测定值进行校正,样品重复测量精度小于0.2‰。

$\delta^{15}\text{N}$ 标准物质为大气氮,样品中 $\delta^{15}\text{N} = [(R_{\text{样品}}/R_{\text{标准}}) - 1] \times 1000\text{‰}$ 。式中, $R_{\text{样品}}$ 和 $R_{\text{标准}}$ 分别为样品和标准品中 ^{15}N 和 ^{14}N 自然丰度比。总氮含量和 $\delta^{15}\text{N}$ 值测定均在江西省大气污染成因与控制重点实验室完成。

1.2.4 游离氨基酸浓度的测定 20种氨基酸混合标准溶液硅烷化衍生后^[12],采用GC-MS[TRACE GC1310气相色谱,ISQ QD单四极杆质谱(美国Thermo Fisher Scientific公司)]进行测定,结合氨基酸NIST标准质谱图,仅列出存在显著差异的丝氨酸(Ser)、天冬氨酸(Asp)和天冬酰胺(Asn)的保留时间及特征离子(表1)。取1 μL 游离氨基酸硅烷化衍生产物进行GC-MS分析。通过与标准品对比,结合氨基酸NIST标准质谱图,对样品中Ser、Asp和Asn进行定性分析。选用1 nmol·L⁻¹ γ -氨基丁酸为内标,以游离氨基酸峰面积与 γ -

氨基丁酸峰面积比为横坐标(x),以游离氨基酸浓度为纵坐标(y)进行回归分析,得到线性回归方程及 R^2 值(表1),检测精度小于0.01‰。

表1 游离氨基酸衍生物特征
Table 1 Characteristics of free amino acid derivatives

氨基酸 Amino acid	保留 时间/min Retention time	线性回归方程 ¹⁾ Linear regression equation ¹⁾	R^2	主要离子碎片 Main ion fragments
丝氨酸 Ser	37.1	$y = 0.7953x - 0.0337$	0.9903	73,362,390,288
天冬氨酸 Asp	40.0	$y = 0.8698x - 0.0357$	0.9938	73,75,302,57
天冬酰胺 Asn	42.1	$y = 1.0017x - 0.0093$	0.9967	73,417,75,147

¹⁾ x : 游离氨基酸峰面积与 γ -氨基丁酸峰面积比 Ratio of peak area of free amino acid to peak area of γ -aminobutyric acid; y : 游离氨基酸浓度 Free amino acid concentration.

1.3 数据处理与分析

采用SPSS 23.0软件处理数据,采用Tukey检验进行多重比较。

2 结果和分析

实验结果(表2)表明:水淹0~11d,芦苇叶片中总氮含量无显著变化。水淹11d,芦苇叶片中总氮同位素($\delta^{15}\text{N}$)较水淹0d显著($P < 0.05$)偏负。随着水淹天数的增加,芦苇叶片中总游离氨基酸、丝氨酸(Ser)、天冬氨酸(Asp)和天冬酰胺(Asn)浓度均呈先升高后降低的趋势,其中,水淹4和11d,总游离氨基酸、Ser、Asp和Asn浓度较水淹1d显著下降。

表2 水淹条件下芦苇叶片中总氮含量、总氮同位素和游离氨基酸浓度的比较($\bar{X} \pm SD$)¹⁾

Table 2 Comparison on total nitrogen content, total nitrogen isotope, and free amino acid concentration in leaf of *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud. under flooding condition ($\bar{X} \pm SD$)¹⁾

水淹天数/d Flooding days	总氮含量/% Total nitrogen content	总氮同位素/‰ Total nitrogen isotope	浓度/($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$) Concentration			
			总游离氨基酸 Total free amino acids	丝氨酸 Ser	天冬氨酸 Asp	天冬酰胺 Asn
0	2.35±0.88a	+(2.08±0.74)a	20.03±9.23ab	1.59±0.69b	2.22±1.04ab	2.33±2.17ab
1	2.09±0.31a	+(1.43±0.47)ab	27.66±1.93a	3.09±0.48a	3.34±0.30a	4.07±1.72a
4	2.11±0.17a	+(1.03±0.18)ab	10.42±7.66bc	0.85±0.83b	1.37±1.27b	0.64±0.92b
11	2.26±0.10a	+(0.98±0.51)b	6.05±3.32c	0.57±0.39b	0.85±0.35b	0.39±0.27b

¹⁾ 同列中不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$) Different lowercases in the same column indicate the significant ($P < 0.05$) difference.

3 讨论和结论

氮同位素已被广泛用于了解植物在不同环境压力下(如干旱、水淹和营养限制等)的氮代谢机制研究^[13]。本研究中,随水淹时间的延长,芦苇叶片中总氮同位素逐渐偏负,这可能与高含水量土壤中微生物活性降低及净硝化作用受到限制有关^[14],说明芦苇叶片中总氮同位素能响应环境水分变化。但

植物组织不同代谢过程中产生的总氮同位素分馏差异很大^[13],植物中总氮同位素会掩盖植物代谢产物不同单体间的氮同位素差异^[15]。

游离氨基酸的通量变化可以响应环境压力(水淹)的变化^[16]。芦苇叶片中总氮含量在水淹0~11d无显著变化,而总游离氨基酸浓度在水淹4和11d后较水淹1d显著下降,可能由于植物中厌氧诱导酶的生物合成对氨基酸的需求增加^[17],也可能由于水淹条件下植物对硝酸盐的吸收下降加剧根部呼

吸作用减弱,导致能量(ATP)减少,造成从环境中获得的氮素被植物同化为氨基酸的过程受到影响^[11]。

植物为了适应外界环境的改变会快速做出应激反应。本研究中,芦苇叶片中丝氨酸(Ser)浓度在水淹1 d后显著上升,该结果与 Koppitz 等^[18]对经历洪水后芦苇的研究结果保持一致。推测可能由于水淹条件下,氧气浓度急剧下降,植物对碳水化合物需求的增加导致糖酵解代谢加快^[5],中间产物3-磷酸甘油酸盐积累,进而通过转氨作用造成 Ser 积累^[19]。水淹4和11 d后,芦苇叶片中 Ser 浓度显著降低,一方面与水淹条件下厌氧诱导酶的生物合成对氨基酸的需求增加有关^[17],另一方面可能与 Ser 被用于合成其他氨基酸及蛋白质有关^[19]。

天冬氨酸(Asp)和天冬酰胺(Asn)是高等植物氮运输中储存和运输化合物的主要氨基酸^[5]。本研究中,水淹4 d后,芦苇叶片中 Asp 和 Asn 浓度显著下降,与水淹21 d后象牙花(*Erythrina speciosa* Andr.)^[20]的变化趋势相似,可能是因为缺氧会减少碳流入三羧酸(TCA)循环,导致与TCA循环有关的酶活性下降,使TCA循环受限,从而造成植物组织中与TCA循环有关的氨基酸浓度下降^[21]。

综上所述,芦苇叶片中总氮同位素和游离氨基酸浓度对水淹的响应较总氮含量更灵敏,是指示芦苇受到环境压力(水淹)的良好指标。

参考文献:

- [1] 罗文泊, 谢永宏, 宋风斌. 洪水条件下湿地植物的生存策略[J]. 生态学杂志, 2007, 26(9): 1478-1485.
- [2] 宋鹏华, 曾其伟, 商敬哲, 等. 植物对水淹胁迫响应的研究进展[J]. 蚕业科学, 2013, 39(1): 160-165.
- [3] 穆亚楠, 安树青, 智颖飘, 等. 水位对大米草和蘆草种内种间关系的影响[J]. 生态学杂志, 37(4): 1010-1017.
- [4] 于洪贤, 黄璞玮. 湿地碳汇功能探讨: 以泥炭地和芦苇湿地为例[J]. 生态环境, 2008, 17(5): 2103-2106.
- [5] KOPPITZ H. Effects of flooding on the amino acid and carbohydrate patterns of *Phragmites australis* [J]. Limnologia, 2004, 34(1): 37-47.
- [6] VRETARE V, WEISNER S E B, STRAND J A, et al. Phenotypic plasticity in *Phragmites australis* as a functional response to water depth [J]. Aquatic Botany, 2001, 69(2/4): 127-145.
- [7] ZECHMEISTER H G, RICHTER A, SMIDT S, et al. Total nitrogen content and $\delta^{15}\text{N}$ signatures in moss tissue: indicative value for nitrogen deposition patterns and source allocation on a nationwide scale [J]. Environmental Science and Technology, 2008, 42(23): 8661-8667.
- [8] TCHERKEZ G, HODGES M. How stable isotopes may help to elucidate primary nitrogen metabolism and its interaction with (photo) respiration in C_3 leaves [J]. Journal of Experimental Botany, 2008, 59(7): 1685-1693.
- [9] KREUZWIESER J, HAUBERG J, HOWELL K A, et al. Differential response of gray poplar leaves and roots underpins stress adaptation during hypoxia [J]. Plant Physiology, 2009, 149(1): 461-473.
- [10] DE OLIVEIRA FERREIRA E V, NOVAIS R F, DUBAY G R, et al. Nitrogen supply affects root and shoot amino acid composition in *Eucalyptus* clones [J]. Australian Journal of Crop Science, 2016, 10(3): 280-290.
- [11] HSU Y M, TSENG M J, LIN C H. The fluctuation of carbohydrates and nitrogen compounds in flooded wax-apple trees [J]. Botanical Bulletin of Academia Sinica, 1999, 40(3): 193-198.
- [12] ZHU R G, XIAO H Y, ZHANG Z Y, et al. Compound-specific $\delta^{15}\text{N}$ composition of free amino acids in moss as indicators of atmospheric nitrogen sources [J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 14347.
- [13] GAUTHIER P P G, LAMOTHE M, MAHÉ A, et al. Metabolic origin of $\delta^{15}\text{N}$ values in nitrogenous compounds from *Brassica napus* L. leaves [J]. Plant, Cell and Environment, 2013, 36(1): 128-137.
- [14] SAH S P, BRUMME R. Altitudinal gradients of natural abundance of stable isotopes of nitrogen and carbon in the needles and soil of a pine forest in Nepal [J]. Journal of Forest Science, 2003, 49(1): 19-26.
- [15] KALCSITS L A, BUSCHHAUS H A, GUY R D. Nitrogen isotope discrimination as an integrated measure of nitrogen fluxes, assimilation and allocation in plants [J]. Physiologia Plantarum, 2014, 151(3): 293-304.
- [16] TCHERKEZ G. Natural $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ isotope composition in C_3 leaves: are enzymatic isotope effects informative for predicting the ^{15}N -abundance in key metabolites? [J]. Functional Plant Biology, 2011, 38(1): 1-12.
- [17] KREUZWIESER J, FÜRNISS S, RENNENBERG H. Impact of waterlogging on the N-metabolism of flood tolerant and non-tolerant tree species [J]. Plant, Cell and Environment, 2002, 25(8): 1039-1049.
- [18] KOPPITZ H, DEWENDER M, OSTENDORP W, et al. Amino acids as indicators of physiological stress in common reed *Phragmites australis* affected by an extreme flood [J]. Aquatic Botany, 2004, 79(4): 277-294.
- [19] ROS R, MUÑOZ-BERTOMEU J, KRUEGER S. Serine in plants: biosynthesis, metabolism, and functions [J]. Trends in Plant Science, 2014, 19(9): 564-569.
- [20] MEDINA C L, SANCHES M C, TUCCI M L S, et al. *Erythrina speciosa* (Leguminosae-Papilionoideae) under soil water saturation: morphophysiological and growth responses [J]. Annals of Botany, 2009, 104(4): 671-680.
- [21] NARSAI R, HOWELL K A, CARROLL A, et al. Defining core metabolic and transcriptomic responses to oxygen availability in rice embryos and young seedlings [J]. Plant Physiology, 2009, 151(1): 306-322.

(责任编辑: 张明霞)