

Cd²⁺胁迫诱导烟草悬浮细胞脯氨酸积累的生化途径及外源脯氨酸对Cd²⁺胁迫下H₂O₂产生的抑制作用

文锦芬^{1,2,3}, 杨双龙², 龚明^{2,*}

¹中国农业大学水利与土木工程学院, 北京100083; ²云南师范大学生命科学学院, 教育部生物能源持续开发利用工程研究中心, 云南省生物质能与环境生物技术重点实验室, 昆明650092; ³昆明理工大学现代农业工程学院, 昆明650224

摘要: Cd²⁺可提高烟草悬浮细胞脯氨酸的含量, 顺序上调脯氨酸合成关键酶鸟氨酸转氨酶(OAT)、精氨酸酶、 Δ^1 -吡咯啉-5-羧酸合成酶(P5CS)和谷氨酸脱氢酶(GDH)的活性, 降低脯氨酸降解关键酶脯氨酸脱氢酶(ProDH)的活性, 表明Cd²⁺胁迫诱导烟草细胞脯氨酸的积累是脯氨酸合成的鸟氨酸途径和谷氨酸途径顺序激活、而脯氨酸降解途径显著抑制的综合结果。此外, Cd²⁺能导致烟草细胞H₂O₂的快速产生及H₂O₂产生相关酶(质膜NADPH氧化酶、细胞壁多胺氧化酶及共价结合与离子结合细胞壁过氧化物酶)活性升高和脂质过氧化产物丙二醛(MDA)增加, 导致烟草细胞的氧化胁迫。外源脯氨酸预处理显著抑制了Cd²⁺诱导的烟草细胞H₂O₂的产生与MDA的增加, 减轻了Cd²⁺诱导的氧化胁迫。而脯氨酸抑制Cd²⁺诱导的H₂O₂产生可能是由于脯氨酸抑制了H₂O₂产生相关酶的活性所致。

关键词: Cd²⁺; 烟草悬浮细胞; 脯氨酸; 代谢途径; 过氧化氢

Biochemical Pathways of Cd²⁺ Stress-Induced Proline Accumulation and Inhibitory Effect of Exogenous Proline on Cd²⁺-Induced H₂O₂ Production in Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) Suspension Cells

WEN Jin-Fen^{1,2,3}, YANG Shuang-Long², GONG Ming^{2,*}

¹College of Water Conservancy & Civil Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China; ²Key Laboratory of Biomass Energy and Environmental Biotechnology, Yunnan Province; Engineering Research Center of Sustainable Development and Utilization of Biomass Energy, Ministry of Education; School of Life Sciences, Yunnan Normal University, Kunming 650092, China; ³College of Modern Agricultural Engineering, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650224, China

Abstract: Cd²⁺ treatment could lead to a significant accumulation of proline, sequential up-regulation of activities of the key enzymes (ornithine- δ -aminotransferase, arginase, Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase and glutamate dehydrogenase) for proline biosynthesis, and inhibition of activity of the key enzyme proline dehydrogenase for proline degradation in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) suspension cells. These results indicated that the Cd²⁺ stress-induced proline accumulation in the tobacco cells might be a combined result of the orderly activation of the ornithine pathway and the glutamate pathway of proline biosynthesis, and inhibition of proline degradation pathway. Furthermore, Cd²⁺ stress increased the production of H₂O₂, activities of the H₂O₂ producing-related enzymes (plasma membrane NADPH, cell wall polyamine oxidase, covalently and ionically-bound cell wall peroxidases), the product (MDA) of membrane lipid peroxidation and oxidation stress in the tobacco cells. Exogenous application of proline significantly decreased H₂O₂ production, MDA content and oxidation stress induced by Cd²⁺ stress. The inhibition of H₂O₂ production by exogenous proline might be due to the declined activities of the H₂O₂ producing-related enzymes under Cd²⁺ stress.

Key words: Cd²⁺; tobacco suspension cells; proline; metabolic pathways; H₂O₂

镉(Cd)被广泛地应用于机械、化工、电镀、印染等部门, 但它又是一种毒性高、迁移性大的重金属元素, 容易随这些工业排放的废弃物进入环境, 从而成为Cd的污染源(Alumaa等2002; Dinkar等2008)。Cd不是植物生长发育所必需的元素,

但易被植物吸收, 并且通过作物对其的吸收而进

收稿 2011-01-10 修定 2011-02-14

资助 国家自然科学基金(30460016)。

* 通讯作者(E-mail: gongming63@163.com; Tel: 0871-5516516)。

入人体,影响人们的健康(Metwally等2005)。Cd胁迫会影响植物的多种生理生化过程,抑制水稻光合作用,降低叶绿素含量(Hsu和Kao 2004),影响万寿菊(Uraguchi等2006)、豌豆(Sandalio等2001)的生长,促进过氧化氢的产生,诱导氧化胁迫。

脯氨酸是植物体内的渗透调节物质,在干旱、高盐、极端温度、冰冻、紫外线胁迫等条件下,脯氨酸合成的增加和降解的减少会导致植物体内脯氨酸大量累积,植物通过提高体内脯氨酸的含量保护细胞膜系统,维持胞内酶的结构,减少胞内蛋白质的降解(Kishor等2005; Ashraf和Foolad 2007; Yang等2009)。重金属Cu、Cd胁迫均可诱导植物体内脯氨酸含量的增加,由于脯氨酸可以螯合单线态氧,高效清除羟自由基,从而降低重金属胁迫诱发的氧化胁迫对植物的伤害(Zhang等2008; Dinakar等2009)。但Cd胁迫对脯氨酸代谢途径的影响却尚未见报道。本文以烟草悬浮细胞为材料,研究了Cd²⁺胁迫下烟草悬浮细胞脯氨酸含量及脯氨酸代谢途径关键酶活性的变化,试图揭示Cd²⁺胁迫下脯氨酸积累的生化机制;并用外源脯氨酸预处理烟草悬浮细胞,研究Cd²⁺胁迫下过氧化氢产生及其相关酶活性的变化,以确定脯氨酸预处理抑制Cd²⁺胁迫下过氧化氢产生的机制,以探讨Cd²⁺胁迫诱导烟草细胞脯氨酸积累的生理意义。

材料与方法

烟草(*Nicotiana tabacum* L.)品种‘Bright Yellow’的愈伤组织由其幼嫩的茎髓诱导而成,悬浮细胞的具体培养方法参照本实验室以前方法(李忠光等2005, 2009)。继代3代在26 °C、110 r·min⁻¹摇床中培养4 d的悬浮细胞用于下列实验。

Cd胁迫处理方法: CdCl₂用蒸馏水溶解,配制成0.5 mol·L⁻¹母液,以0.25 μm的滤膜过滤除菌。分别将Cd²⁺母液加到悬浮细胞培养液中,使其终浓度为0.1~3.0 mmol·L⁻¹,对照加入相同体积的无菌蒸馏水。

脯氨酸预处理方法: 脯氨酸用蒸馏水溶解,配制成1.0 mol·L⁻¹母液,以0.25 μm的滤膜过滤除菌。分别将脯氨酸母液加到悬浮细胞培养液中,使其终浓度为20~50 mmol·L⁻¹,预处理20~50 min,对照加入相同体积的无菌蒸馏水。

脯氨酸含量用酸性茚三酮法测定(Bates等1973); Δ¹-吡咯啉-5-羧酸合成酶(P5CS)的提取和活性测定参照之前(杨双龙和龚明2009; Yang等2009)的方法; 鸟氨酸转氨酶(OAT)和脯氨酸脱氢酶(ProDH)活性测定参考Sánchez等(2001)的方法; 谷氨酸脱氢酶(GDH)的提取与测定参考Robinson等(1991)的方法; 精氨酸酶(arginase)活性的测定按照Roubelakis和Kliwer (1978)的方法; 用荧光探针H₂DCF-DA测定过氧化氢含量变化及质膜NADPH氧化酶的测定参照Hao等(2008)的方法; 丙二醛(MDA)的测定参照赵世杰和李德全(2004)的方法; 细胞壁多胺氧化酶(PAO)的测定参照汪天等(2005)的方法; 细胞壁共价结合过氧化物酶(POD)和细胞壁离子结合过氧化物酶(POD)的提取参照Ranieri等(2001)的方法; 细胞壁共价结合过氧化物酶(POD)和细胞壁离子结合过氧化物酶(POD)的测定按照Jan等(2001)的方法。蛋白质的测定按照Bradford (1976)的方法,以牛血清蛋白为标准样品。

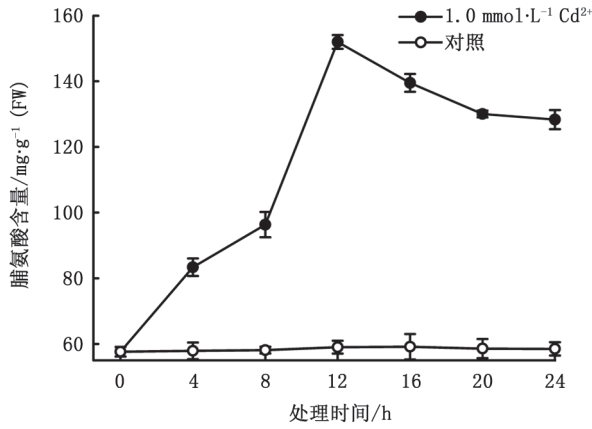
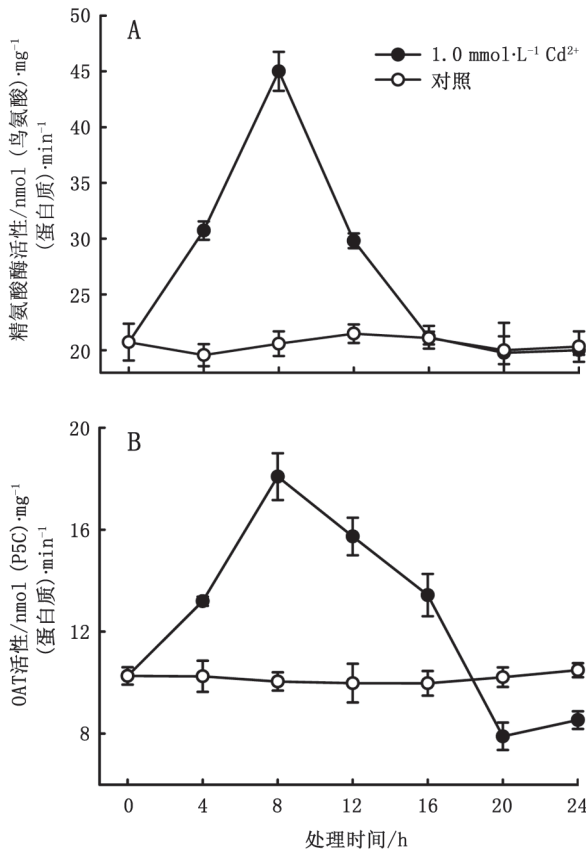
所有实验均重复3次,每次实验中取样重复3次。实验数据用SPSS 13.0分析,用Sigmaplot 10.0作图。数据均为平均值±标准误。

实验结果

1 Cd²⁺胁迫诱导烟草悬浮细胞内脯氨酸的积累及其生化途径

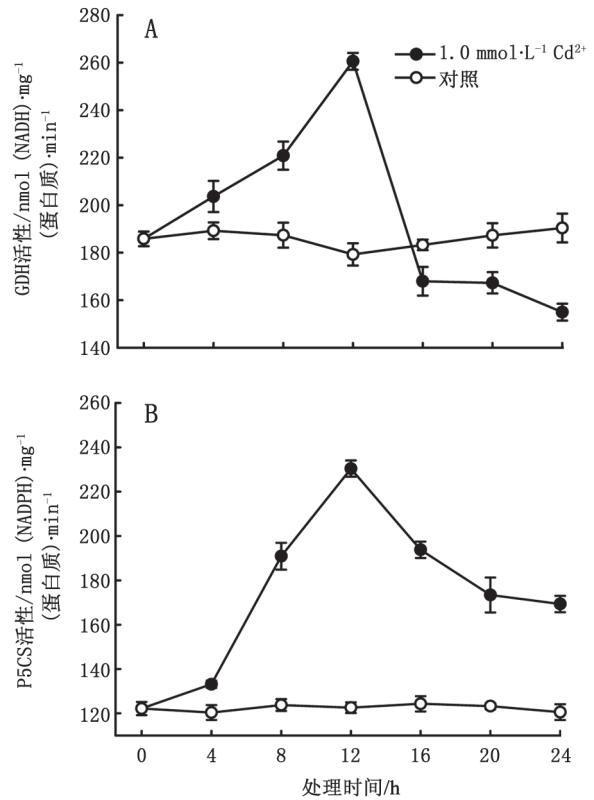
预备实验表明,0.1~3.0 mmol·L⁻¹ Cd²⁺处理均可显著诱导烟草细胞积累脯氨酸(结果未列出)。在1.0 mmol·L⁻¹ Cd²⁺胁迫下,烟草悬浮细胞脯氨酸的含量迅速上升,在12 h达到峰值,约为对照的2.7倍,随后略有下降,但仍极显著($P < 0.01$)高于对照(图1)。

植物体内脯氨酸合成有鸟氨酸和谷氨酸两条途径。鸟氨酸途径中的精氨酸酶(arginase)催化精氨酸到鸟氨酸的转化反应,控制鸟氨酸的含量。鸟氨酸转氨酶(ornithine-δ-aminotransferase, OAT)是该途径的核心调节酶,能将底物鸟氨酸转化为γ-谷氨酰半缩醛(glutamic-γ-semi-aldehyde, GSA),进一步生成Δ¹-吡咯啉-5-羧酸(Δ¹-pyroline-5-carboxylate, P5C) (Kishor等2005)。如图2所示,1.0 mmol·L⁻¹ Cd²⁺胁迫下烟草悬浮细胞内的精氨酸酶和鸟氨酸转氨酶活性都快速上升,在胁迫后8 h达到最高值,

图1 Cd²⁺胁迫下烟草细胞脯氨酸含量的变化Fig.1 Changes of proline content in the tobacco cells under Cd²⁺ stress图2 Cd²⁺胁迫下烟草细胞精氨酸酶(A)和鸟氨酸转氨酶(B)活性的变化Fig.2 Changes of arginase (A) and ornithine-δ-aminotransferase (B) activities in the tobacco cells under Cd²⁺ stress

分别是对照的2.18倍和1.8倍, 8 h后二者的活性开始下降。

谷氨酸途径中限速酶之一的谷氨酸脱氢酶 (glutamate dehydrogenase, GDH)具有双重作用, 一方面催化谷氨酸的降解反应, 另一方面在逆境下主要功能是催化游离氨基酸生成谷氨酸。谷氨酸合成途径的另一关键酶是 Δ^1 -吡咯啉-5-羧酸合成酶 (Δ^1 -pyroline-5-carboxylate synthetase, P5CS), P5CS以谷氨酸为底物, 催化其到 Δ^1 -吡咯啉-5-羧酸的合成反应, P5C再进一步生成脯氨酸(Kishor等2005)。1.0 mmol·L⁻¹ Cd²⁺胁迫下烟草细胞内的谷氨酸脱氢酶和 Δ^1 -吡咯啉-5-羧酸合成酶活性都快速上升, 在胁迫后12 h达到最高值, 分别是对照的1.45倍和1.7倍, 12 h后二者的活性开始下降(图3)。

图3 Cd²⁺胁迫下烟草细胞谷氨酸脱氢酶(A)和 Δ^1 -吡咯啉-5-羧酸合成酶(B)活性的变化Fig.3 Changes of glutamate dehydrogenase (A) and Δ^1 -pyroline-5-carboxylate synthetase (B) activities in the tobacco cells under Cd²⁺ stress

脯氨酸降解是由两个连续的线粒体酶催化, 即脯氨酸脱氢酶(proline dehydrogenase, ProDH)和 Δ^1 -吡咯啉-5-羧酸脱氢酶(Δ^1 -pyroline-5-carboxylate dehydrogenase, P5CDH), 其中脯氨酸脱氢酶(ProDH)是脯氨酸降解的限速酶(Sánchez等2001; Kishor等

2005)。如图4所示, 1.0 mmol·L⁻¹ Cd²⁺胁迫过程中烟草悬浮细胞内的ProDH活性连续极显著($P<0.01$)下降。

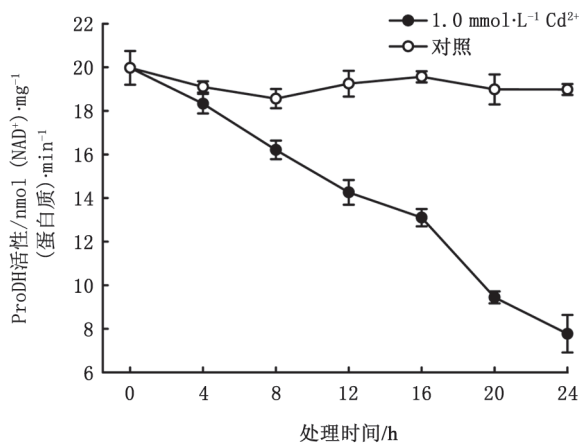


图4 Cd²⁺胁迫下烟草细胞脯氨酸脱氢酶活性的变化
Fig.4 Changes of proline dehydrogenase activity in the tobacco cells under Cd²⁺ stress

2 Cd²⁺胁迫诱导烟草细胞H₂O₂的产生及外源脯氨酸的抑制效应

已有报道Cd²⁺胁迫可促进植物细胞H₂O₂的产生(Olmos等2003; Kuo和Kao 2004)。我们用荧光探针H₂DCF-DA检测的结果表明, 在1.0 mmol·L⁻¹的Cd²⁺胁迫下, 烟草细胞H₂O₂的含量5 min内就有显著的上升, 30 min达到峰值, 为对照的4.6倍, 此后H₂O₂的含量逐步下降, 70 min后H₂O₂含量趋于平稳, 但仍为对照的3.5倍(图5)。

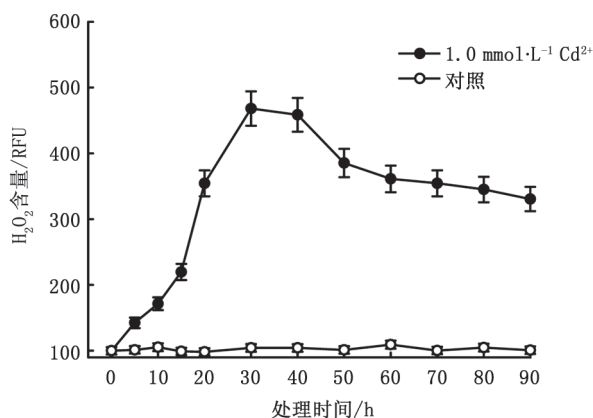


图5 Cd²⁺胁迫下烟草细胞中H₂O₂含量的变化
Fig.5 Change of H₂O₂ production in the tobacco cells under Cd²⁺ stress
RFU: 相对荧光单位。

当用20~50 mmol·L⁻¹不同浓度的脯氨酸预处理不同时间后, 再加入1.0 mmol·L⁻¹ Cd²⁺胁迫1.0 h, 检测烟草细胞中H₂O₂含量。结果表明, 脯氨酸预处理显著抑制了Cd²⁺胁迫诱导的H₂O₂产生。当用相同浓度的脯氨酸预处理时, 随着预处理时间的增加, 脯氨酸对Cd²⁺胁迫下烟草细胞H₂O₂产生的抑制作用增强; 而当预处理时间相同时(尤其在20 min和30 min), 则随着脯氨酸浓度的增加, 其对H₂O₂的产生的抑制作用也越显著($P<0.01$) (图6)。在后面的实验中均以30 mmol·L⁻¹脯氨酸预处理40 min为预处理条件。

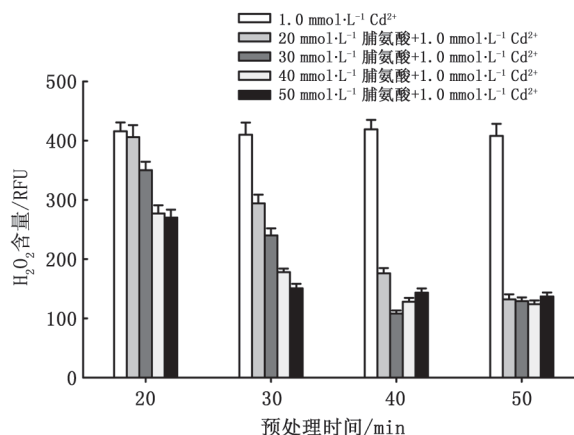


图6 脯氨酸预处理对Cd²⁺胁迫诱导的烟草细胞H₂O₂产生的抑制效应

Fig.6 Inhibitory effect of proline pretreatment on the Cd²⁺-induced H₂O₂ production in the tobacco cells

丙二醛(MDA)是不饱和脂肪酸的降解产物, 常被用来作为脂质过氧化的指标。在1.0 mmol·L⁻¹ Cd²⁺胁迫下, 烟草悬浮细胞丙二醛的含量逐渐上升, 并随时间的延长, 其含量一直增加。30 mmol·L⁻¹脯氨酸预处理40 min后, 再转入用1.0 mmol·L⁻¹ Cd²⁺胁迫, 细胞丙二醛含量总体比未经预处理的含量低(图7)。

3 Cd²⁺胁迫下与烟草细胞H₂O₂产生相关的酶活性变化及外源脯氨酸的效应

质膜NADPH氧化酶通过还原分子O₂而生成超氧阴离子自由基O₂⁻, 后者歧化成H₂O₂, 这被认为是各种环境刺激诱发H₂O₂产生的主要酶学途径之一(Hao等2008)。本实验结果表明, 1.0 mmol·L⁻¹ Cd²⁺处理在10~20 min内快速而显著地($P<0.01$)提高了质膜NADPH氧化酶活性(图8-A)。30 mmol·L⁻¹脯氨

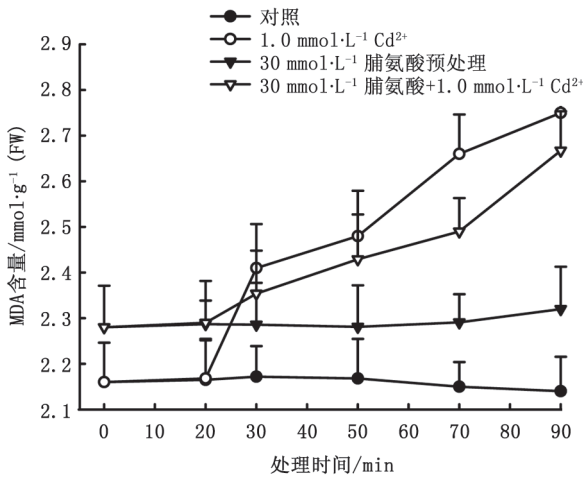


图7 脯氨酸预处理对Cd²⁺胁迫下烟草细胞中丙二醛含量的影响

Fig.7 Effect of proline pretreatment on MDA content in the tobacco cells under Cd²⁺ stress

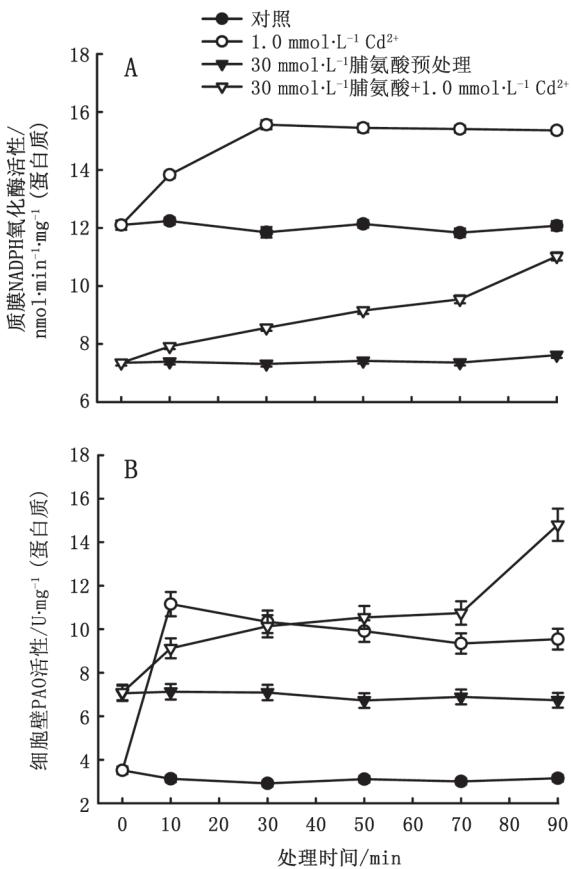


图8 Cd²⁺胁迫和脯氨酸预处理下烟草细胞质膜NADPH氧化酶(A)和细胞壁多胺氧化酶(B)活性的变化

Fig.8 Changes of plasma membrane NADPH oxidase (A) and cell wall polyamine oxidase (B) activities in the tobacco cells under Cd²⁺ stress and the proline pretreatment

酸预处理40 min显著($P<0.01$)降低了正常培养的烟草细胞质膜NADPH氧化酶活性; 在1.0 mmol·L⁻¹ Cd²⁺胁迫下, 脯氨酸预处理的烟草细胞质膜NADPH氧化酶活性也快速上升, 但均显著($P<0.05$)低于未经脯氨酸处理的细胞(图8-A)。

细胞壁多胺氧化酶(PAO)催化多胺氧化降解直接生成H₂O₂ (汪天等2005)。本实验结果表明, 1.0 mmol·L⁻¹ Cd²⁺处理在10 min内快速而显著地($P<0.01$)提高了细胞壁PAO活性(图8-B)。但30 mmol·L⁻¹脯氨酸预处理40 min使正常培养的烟草细胞细胞壁PAO活性升高; 在1.0 mmol·L⁻¹ Cd²⁺胁迫下, 脯氨酸预处理的烟草细胞细胞壁PAO活性也快速上升(图8-B)。

细胞壁过氧化物酶(POD)以还原型辅酶I (NADH)为还原剂, 通过还原分子O₂而生成超氧阴离子自由基O₂⁻, 然后歧化成H₂O₂, 这是植物细胞外生成H₂O₂的另一途径(Jan等2001)。图9表明, 1.0

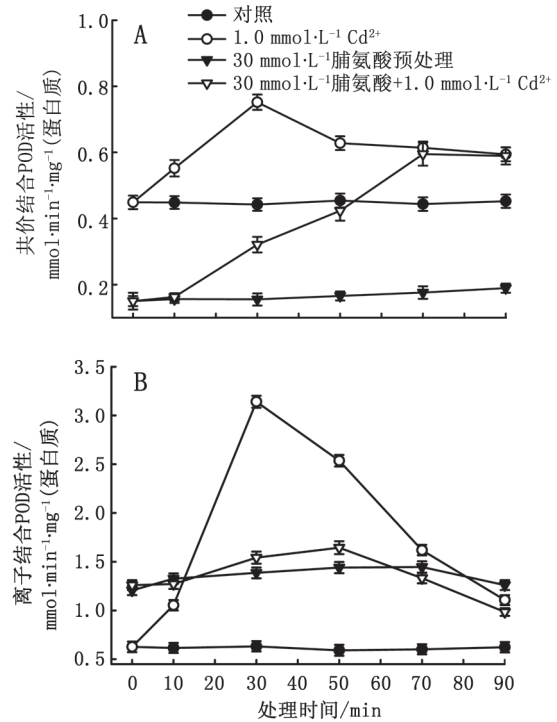


图9 Cd²⁺胁迫和脯氨酸预处理下烟草细胞细胞壁共价结合过氧化物酶(A)与细胞壁离子结合过氧化物酶(B)活性的变化

Fig.9 Changes of covalently-bound cell wall peroxidases (A) and ionically-bound cell wall peroxidases (B) activities in the tobacco cells under Cd²⁺ stress and the proline pretreatment

mmol·L⁻¹ Cd²⁺处理在30 min内快速而显著地 ($P < 0.01$) 提高了细胞壁共价结合POD和细胞壁离子结合POD活性。30 mmol·L⁻¹脯氨酸预处理40 min显著降低了正常培养的烟草细胞细胞壁共价结合POD活性, 但却使细胞壁离子结合POD活性升高; 在1.0 mmol·L⁻¹ Cd²⁺胁迫下, 脯氨酸预处理的烟草细胞细胞壁共价结合POD和细胞壁离子结合POD活性也快速上升, 但在70 min前均显著 ($P < 0.05$) 低于未经脯氨酸处理的细胞(图9)。

讨 论

植物细胞中脯氨酸合成有谷氨酸和鸟氨酸两条途径, 但两条途径在脯氨酸积累中的地位和作用往往因植物的种类、生理状态及环境胁迫因子的不同而不同(Kishor等2005; Ashraf和Foolad 2007; Yang等2009)。Delauney和Verma (1993)发现, 在渗透胁迫条件和低氮条件下谷氨酸途径占主导地位, 而在非胁迫条件及高氮条件下鸟氨酸途径又居于主导地位。Zhao等(2001)用200 mmol·L⁻¹ NaCl处理结合¹⁴C-Glu和¹⁴C-Arg叶面饲喂6 d龄大麦幼苗的研究发现, 盐胁迫前8 h脯氨酸的积累主要受到谷氨酸途径的控制, 随后鸟氨酸途径的贡献占主导地位。我们实验室对玉米的研究表明H₂O₂诱导的脯氨酸积累是先激活了脯氨酸合成的谷氨酸途径, 然后是鸟氨酸途径, 同时抑制了脯氨酸降解途径的综合结果(Yang等2009)。而NO诱导的玉米幼苗脯氨酸的积累结果是NO激活了鸟氨酸途径, 抑制了降解途径的结果(杨双龙和龚明2009)。本研究结果表明, Cd²⁺胁迫能诱导脯氨酸的积累, 其脯氨酸积累一方面由于合成途径的酶活性上升, 从酶的活性变化结果上看, 鸟氨酸途径两个关键酶精氨酸酶和OAT活性在8 h达到峰值, 而谷氨酸途径的GDH和P5CS活性在12 h达到峰值(图2、3), 表明Cd²⁺胁迫诱导导致鸟氨酸途径和谷氨酸途径的顺序激活。此外, Cd²⁺胁迫下脯氨酸降解途径的关键酶ProDH快速下降。这些结果表明, Cd²⁺胁迫诱导烟草细胞脯氨酸的积累是脯氨酸合成的鸟氨酸途径和谷氨酸途径顺序激活, 而脯氨酸降解途径显著抑制的综合结果。

一般认为脯氨酸除了作为渗透调节物质以外, 还具有保护蛋白质、生物膜、亚细胞结构和清除

活性氧等功能。因此, 脯氨酸在保护植物细胞免受逆境胁迫伤害中起到非常重要的作用(Kishor等2005; Ashraf和Foolad 2007)。Hoque等(2008)用外源脯氨酸预处理烟草悬浮细胞, 能降低盐胁迫下烟草悬浮细胞中蛋白质的羧基化, 提高谷胱甘肽氧化还原态从而降低盐胁迫诱发的氧化胁迫。Ozden等(2009)的研究则表明, 脯氨酸预处理葡萄叶片, 能降低其在H₂O₂胁迫下的H₂O₂和MDA含量。本研究结果表明, Cd²⁺胁迫促进H₂O₂的快速产生(图5)和细胞脂质过氧化产物丙二醛的增加(图7), 导致了烟草细胞氧化胁迫。脯氨酸预处理显著抑制了Cd²⁺诱导的烟草细胞H₂O₂的产生与丙二醛的增加(图6、7), 减轻了Cd²⁺胁迫诱导的氧化胁迫。应该指出的是, 脯氨酸与细胞H₂O₂之间的关系不只是单向的, 本实验结果表明脯氨酸能抑制H₂O₂的产生; 但另一方面, 我们以前的结果表明H₂O₂预处理能诱导植物细胞脯氨酸的积累(Yang等2009), 暗示着脯氨酸与H₂O₂有着多重复杂的关系。

已有一些研究表明脯氨酸能清除超氧阴离子(O₂⁻)和单线态氧(¹O₂) (Dinakar等2009), 但这些实验主要是基于体外的脯氨酸对活性氧的直接清除。而脯氨酸抑制植物细胞内H₂O₂产生的机制尚未见报道。已知在高等植物中, 质膜NADPH氧化酶(Hao等2008)、位于细胞壁的过氧化物酶(李忠光等2009)和质外体的多胺氧化酶(朱丹等2006)是活性氧产生的潜在来源。本实验结果表明, 在Cd²⁺胁迫下, H₂O₂快速产生, 同时三类酶活性显著升高; 用脯氨酸预处理抑制了正常细胞质膜NADPH氧化酶和细胞壁共价结合过氧化物酶活性; 在Cd²⁺胁迫下, 脯氨酸预处理的细胞质膜NADPH氧化酶和细胞壁过氧化物酶活性上升, 但显著低于未预处理的细胞(图8、9)。

这些结果表明, 脯氨酸预处理抑制了Cd²⁺胁迫诱导的烟草细胞H₂O₂的产生, 其机制可能不仅脯氨酸能清除活性氧, 同时还与H₂O₂产生相关的酶活性的降低有关, 但是这些酶活性的降低是由于脯氨酸作为信号分子引起的还是有其他原因则有待进一步研究。

参考文献

李忠光, 龚明, 陈秀娟(2009). 细胞壁中的过氧化物酶参与机械刺激

- 诱导的烟草悬浮培养细胞的氧化爆发. 植物生理学通讯, 45: 111~114
- 李忠光, 杨仕忠, 周滔, 龚明(2005). 烟草悬浮培养细胞的建立及其对机械刺激的敏感性研究. 云南师范大学学报, 25 (6): 43~46
- 汪天, 王素平, 郭世荣, 高洪波(2005). 低氧胁迫下黄瓜根系细胞壁结合态多胺氧化酶活性变化及测定方法的确定. 西北植物学报, 25: 503~506
- 杨双龙, 龚明(2009). 一氧化氮对玉米幼苗体内脯氨酸积累及其代谢途径的影响. 植物生理学通讯, 45: 781~784
- 赵世杰, 李德全(2004). 丙二醛的测定. 见: 中国科学院上海植物生理研究所, 上海市植物生理学会编. 现代植物生理学实验指南. 北京: 科学出版社, 305~306
- 朱丹, 蒋明义, 谭明谱(2006). ABA诱导玉米叶质外体 H_2O_2 积累的机制. 植物生理与分子生物学报, 32 (5): 519~526
- Alumaa P, Kirso U, Petersell V, Steinnes E (2002). Sorption of toxic heavy metals to soil. *Int J Hyg Environ Health*, 204: 375~376
- Ashraf M, Foolad MR (2007). Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environ Exp Bot*, 59: 206~216
- Bates LS, Waldren RP, Teare ID (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil*, 39: 205~217
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248~254
- Delauney AJ, Verma DPS (1993). Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant J*, 4: 215~223
- Dinakar N, Nagajyothi PC, Suresh S, Udaykiran Y, Damodharam T (2008). Phytotoxicity of cadmium on protein, proline and antioxidant enzyme activities in growing *Arachis hypogaea* L. seedlings. *J Envi Sci*, 20: 199~206
- Dinakar N, Nagajyothi PC, Suresh S, Damodharam T, Suresh C (2009). Cadmium induced changes on proline, antioxidant enzymes, nitrate and nitrite reductases in *Arachis hypogaea* L. *J Environ Biol*, 30: 289~294
- Hao F, Zhang J, Yu Z, Chen J (2008). Involvement of NADPH oxidase NtrbohD in the rapid production of H_2O_2 induced by ABA in cultured tobacco cell BY-2 line. *Prog Natl Sci*, 18: 267~271
- Hoque MA, Banu MNA, Nakamura Y, Shimoishi Y, Murata Y (2008). Proline and glycinebetaine enhance antioxidant defense and methylglyoxal detoxification systems and reduce NaCl-induced damage in cultured tobacco cells. *J Plant Physiol*, 165: 813~824
- Hsu YT, Kao CH (2004). Cadmium toxicity is reduced by nitric oxide in rice leaves. *Plant Growth Regul*, 42: 227~238
- Jan F, Yamashita K, Mastsumoto H, Maeda M (2001). Protein and peroxidase changes in various root-cell fractions of two upland rice cultivars differing in Al tolerance. *Environ Exp Bot*, 46: 141~146
- Kishor PBK, Sangam S, Amrutha RN, Laxmi PS, Naidu KR, Rao KRSS, Rao S, Reddy KJ, Theriappan P, Sreenivasulu N (2005). Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implication in plant growth and abiotic stress tolerance. *Curr Sci*, 88: 424~438
- Kuo MC, Kao CH (2004). Antioxidant enzyme activities are upregulated in response to cadmium in sensitive, but not in tolerant rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Bot Bull Acad Sin*, 45: 291~299
- Metwally A, Safronova VI, Belimov AA, Dietz KJ (2005). Genotypic variation of the response to cadmium toxicity in *Pisum sativum* L. *J Exp Bot*, 56: 167~178
- Olmos E, Martínez-Solano JR, Piqueras A, Hellín E (2003). Early steps in the oxidative burst induced by cadmium in cultured tobacco cells (BY-2 line). *J Exp Bot*, 54: 291~301
- Ozden M, Demirel U, Kahraman A (2009). Effects of proline on antioxidant system in leaves of grapevine (*Vitis vinifera* L.) exposed to oxidative stress by H_2O_2 . *Sci Hortic*, 119: 163~168
- Ranieri A, Castagna A, Baldan B, Soldatini GF (2001). Iron deficiency differently affects peroxidase isoforms in sunflower. *J Exp Bot*, 52: 25~35
- Robinson SA, Slade AP, Fox GG, Phillips R, Ratcliffe GR, Stewart GR (1991). The role of glutamate dehydrogenase in plant nitrogen metabolism. *Plant Physiol*, 95: 509~516
- Roubelakis KA, Kliewer WM (1978). Enzymes of Kerbs-Henseleit cycle in *Vitis vinifera* L: *In vivo* and *in vitro* studies of arginase. *Plant Physiol*, 62: 344~347
- Sánchez E, Lopez-Lefebvre LR, Garcia PC, Rivero RM, Ruiz JM, Romero L (2001). Proline metabolism in response to highest nitrogen dosages in green bean plants. *J Plant Physiol*, 158: 593~598
- Sandalio LM, Dalurzo HC, Gomez M, Romero-Puertas MC, del Rio LA (2001). Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *J Exp Bot*, 52: 2115~2126
- Uraguchi S, Watanab I, Yoshitomi A, Kiyono M, Kuno K (2006). Characteristics of cadmium accumulation and tolerance in novel Cd-accumulating crops, *Avena strigosa* and *Crotalaria juncea*. *J Exp Bot*, 57: 2955~2965
- Yang SL, Lan SS, Gong M (2009). Hydrogen peroxide-induced proline and metabolic pathway of its accumulation in maize seedlings. *J Plant Physiol*, 166: 1694~1699
- Zhang LP, Mehta SK, Liu ZP, Yang ZM (2008). Copper-induced proline synthesis is associated with nitric oxide generation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Physiol*, 49: 411~419
- Zhao FG, Cheng S, Liu YL (2001). Ornithine pathway in proline biosynthesis activated by salt stress in barley seedlings. *Acta Bot Sin*, 43: 36~40