

## 外源一氧化碳对小麦幼苗耐盐性以及根中脯氨酸含量的影响

袁星星, 王娟, 谢彦杰, 沈文飏\*

南京农业大学生命科学学院, 南京 210095

**摘要:** 小麦幼苗经饱和度为50%的一氧化碳(CO)溶液预处理24 h可以缓解随后以200 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl处理所导致的小麦幼苗生长的受抑程度和相对含水量的下降。CO预处理还可有效提高盐胁迫下小麦幼苗根中吡咯啉-5-羧酸合成酶(P5CS)活性及其基因的表达, 同时抑制脯氨酸脱氢酶(ProDH)活性, 从而诱导脯氨酸的大量合成, 缓解盐胁迫对小麦幼苗的伤害。

**关键词:** 盐胁迫; 小麦; 一氧化碳; 脯氨酸

## Effects of Carbon Monoxide on Salt Tolerance and Proline Content of Roots in Wheat Seedling

YUAN Xing-Xing, WANG Juan, XIE Yan-Jie, SHEN Wen-Biao\*

College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

**Abstract:** In present study, we discovered that wheat seedlings subjected to 50% CO aqueous solution pretreatment for 24 h, led to a significant reversal in dry weight and water loss caused by 200 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl treatment. Further analysis showed that CO pretreatment apparently up-regulated  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS) activity and its related transcripts, and inhibited proline dehydrogenase (ProDH) activity, thus resulting in the increase of proline content and the alleviation of salinity-induced damage in the root tissues.

**Key words:** salt stress; wheat (*Triticum aestivum*); carbon monoxide; proline

在动物体内, 一氧化碳(carbon monoxide, CO)是一种内源气体信号分子(Verma等1993; Dulak和Józkowicz 2003), 其生理作用与一氧化氮(nitric oxide, NO)有类似之处。例如, CO也可以结合可溶性鸟苷酸环化酶(guanylate cyclase, GC, EC 4.6.1.2)蛋白中的血红素铁原子, 并激活GC从而提高细胞内环鸟苷酸(cyclic guanosine monophosphate, cGMP)的含量。此外, CO还可能增强NO介导的GC活化作用(Dulak和Józkowicz 2003)。1997年, Thom等发现, 11~110 nmol·L<sup>-1</sup> CO可以渐进方式提高内皮细胞中NO的释放。另一方面, 早在1959年Wilks就已发现植物发育进程中有释放CO的现象。后来Siegel等(1962)又报道, 萌发的黑麦、豌豆、黄瓜和莴苣的种子都可以释放10~25  $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$  (CO), 而且上述过程并不依赖于光和叶绿素。最近我们的研究还发现, 150 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl也能引起小麦幼苗根部组织中CO释放(Xie等2008)。

一般来说, 植物盐害包括离子毒害、渗透胁迫和营养不平衡三个方面。植物耐盐性主要涉及3个方面, 即维持细胞内稳态(包括离子和渗透两个方面)、解毒(抗氧化防护等)和生长调节(细胞分裂

和伸展等)(Zhu 2001, 2003)。例如, 作为植物在盐胁迫下的渗透调节物质之一的脯氨酸不仅可以维持细胞的膨压, 防止质膜透性增大, 从而保护质膜的完整性, 而且还能稳定细胞质中酶分子的活性结构, 保护其不受盐离子的直接伤害。正常情况下, 脯氨酸含量往往很低, 在盐胁迫等逆境条件下才大量合成, 吡咯啉-5-羧酸合成酶( $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase, P5CS, EC 2.7.2.11)和脯氨酸脱氢酶(proline dehydrogenase, ProDH, EC 1.5.99.8)是控制脯氨酸合成和降解的关键酶(Yoshida和Kiyosue 1997)。

Xie等(2008)报道, 150 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl胁迫下的小麦幼苗采用饱和度为50%的CO溶液处理后其耐盐性明显提高。并认为CO的这种保护效应可能与其上调小麦幼苗根部的抗氧化防护系统和维持离子稳态有关。胡冰等(2008)也发现CO的供体高铁血红素可以削弱200 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl所导致的小麦

收稿 2009-03-13 修定 2009-04-23

资助 国家自然科学基金(30671248)。

\* 通讯作者(E-mail: wshenh@njau.edu.cn; Tel: 025-84396542)。

幼苗根部生长受抑程度,维持根部的离子稳态。但CO提高小麦耐盐性是否与其对渗透调节起作用有关还不太清楚。本文以小麦品种‘扬麦158’为材料,研究了外源CO预处理对盐胁迫下小麦幼苗根部脯氨酸累积及其代谢酶活性或基因表达的影响。

## 材料与方 法

采用浓硫酸与甲酸共热制备CO气体[ $\text{H}_2\text{SO}_4$ (液)+ $\text{HCOOH}$ (液) $\rightarrow$ CO(气)+ $\text{H}_2\text{SO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ (液)],得到的气体持续通入盛有Hoagland培养液的玻璃烧杯中15 min,以确保溶液达到饱和,然后立即用Hoagland培养液稀释至实验所需要的浓度(50%饱和度)(Xie等2008)。

植物材料为小麦(*Triticum aestivum* L.)品种‘扬麦158’。种子用2%NaClO消毒5 min后,用蒸馏水漂洗后转入25℃暗处催芽培养1 d。挑取大小一致的露白种子移入光照培养箱中培养(光照强度约为 $300\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,光暗周期为12 h/12 h,温度为25℃/18℃),用Hoagland溶液培养长至两叶一心期进行各种处理。处理有:(1)对照,一直用Hoagland溶液培养(Con→Con);(2)小麦幼苗用含50%饱和度CO的Hoagland溶液中预处理1 d后,转入Hoagland溶液中培养(CO→Con);(3)小麦幼苗用Hoagland溶液培养1 d后,转入含有 $200\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl的Hoagland溶液中培养(Con→S);(4)小麦幼苗用含50%饱和度CO的Hoagland溶液中预处理1 d后,转入含有 $200\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl的Hoagland溶液中继续培养(CO→S)。为保持药剂浓度每天更换处理液,各处理均重复3次。

小麦的总生物量和相对含水量(RWC)的测定参照Xie等(2008)文中方法,用干重(DW)表示小麦的总生物量。处理3 d后,取30株各个处理的苗并分成地上和地下部,75℃下烘至恒重后称重。脯氨酸含量测定参照Ruan等(2004)文中方法。P5CS活性测定参照赵福庚和刘友良(2000)文中方法,以 $0.5\Delta A_{435}\cdot\text{g}^{-1}(\text{FW})\cdot\text{h}^{-1}$ 为一个酶活力单位(U);ProDH活性测定参照赵福庚等(2002)文中方法,以 $0.01\Delta A_{600}\cdot\text{g}^{-1}(\text{FW})\cdot\text{min}^{-1}$ 为一个酶活力单位(U)。

总RNA的提取和半定量RT-PCR按照Trizol Reagent (Invitrogen, Gaithersburg, MD)说明书,提取各个不同处理的幼苗根部组织总RNA。cDNA第一条链的合成反应体系为:20 μL体系、5 μg

RNA样品、2.5 U AMV反转录酶(Takara)、 $1\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Oligo-dT引物。cDNA在-20℃中保存备用。PCR反应:20 μL体系,cDNA稀释2倍后取2 μL,各个引物终浓度为 $10\ \text{pmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,1 U Taq聚合酶(Takara);反应循环参数:预变性94℃5 min;94℃35 s,47~54℃30 s,72℃60 s,25~35个循环;72℃延伸5 min。引物设计如下:P5CS (GenBank登录号为AF022914)上游引物5' AGTTGTTATT-TATGGTGGG 3',下游引物5' CTCTGAATCGGGT-GCTGGC 3' (扩增片段长度为472 bp);18s rRNA (Genbank登录号为AJ272181)上游引物5' CAAGCCATCGCTCTGGATACATT 3',下游引物5' CCTGTTATTGCCTCAAACCTCC 3' (扩增片段长度为658 bp)。以18s rRNA的相对含量作为内参。在扩增26个循环和25~35个循环后,10 μL 18s rRNA和P5CS的扩增产物用1.2% (W/V)琼脂糖凝胶电泳,再经溴化乙锭染色后检测,并克隆测序验证。采用Quantity One软件对P5CS基因相对表达进行定量条带分析,为便于比较起见,还设定对照(Con→Con)表达量为1。

数据是至少3次独立实验结果的平均值,选择Tukey's 测验做显著性分析,不同的字母表示差异达到 $P<0.05$ 水平。

## 结果与讨论

### 1 外源CO对小麦幼苗耐盐性的影响

与不作处理的对照(Con→Con)相比,小麦幼苗受 $200\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl胁迫后(Con→S)生长明显受抑制并产生倒伏现象;而以50%饱和度的CO溶液预处理(CO→S)后上述现象则显著得到缓解( $P<0.05$ ),例如维持了较高水平的地上部和地下部的干重以及相对含水量,小麦幼苗的耐盐性也得到了提高(图1和表1)。

### 2 外源CO对小麦幼苗根部脯氨酸含量的影响

50%饱和度的CO溶液预处理24 h可有效提高小麦幼苗根中的脯氨酸含量( $P<0.05$ ) (图2)。盐胁迫处理(Con→S)后48 h之内脯氨酸含量呈现逐渐上升趋势,48 h与72 h之间相对比较稳定。而50%饱和度的CO溶液预处理24 h后转入 $200\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl胁迫条件下(CO→S)之后又进一步提高。这与已有报道中以NO供体硝普钠和盐胁迫共处理的结果(Ruan等2004)类似。

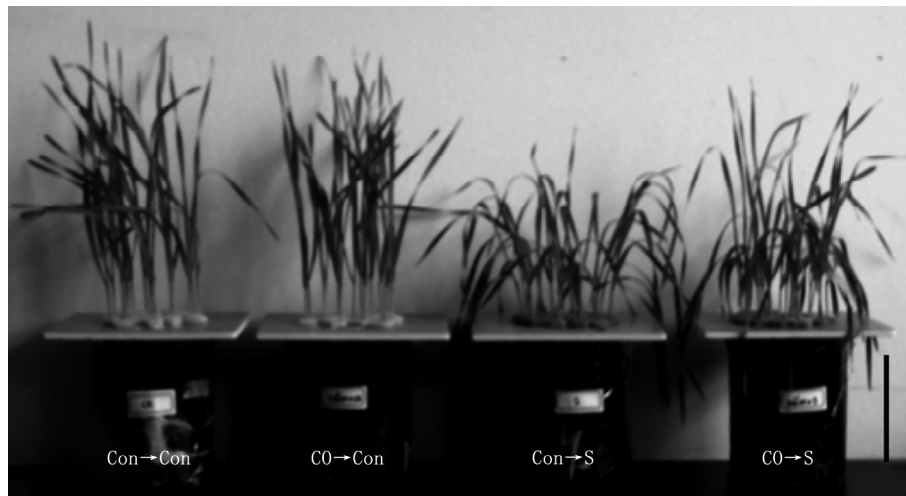


图1 CO溶液预处理对盐胁迫下小麦幼苗生长的影响

Fig.1 Effects of CO solution pretreatment on the growth of wheat seedlings under salt stress  
比例尺为 10 cm。

表1 CO溶液预处理对盐胁迫下小麦幼苗的干重和相对含水量的影响

Table 1 Effects of CO solution pretreatment on the dry weight and relative water content of wheat seedlings under salt stress

处理	小麦幼苗地上部		小麦幼苗地下部	
	干重/g·(30株) <sup>-1</sup>	相对含水量/%	干重/g·(30株) <sup>-1</sup>	相对含水量/%
Con → Con	3.45±0.015 <sup>a</sup>	86.8±1.0 <sup>a</sup>	0.264±0.006 <sup>a</sup>	82.2±0.5 <sup>a</sup>
CO → Con	3.38±0.003 <sup>a</sup>	85.6±0.9 <sup>a</sup>	0.248±0.015 <sup>a</sup>	80.6±0.7 <sup>a</sup>
Con → S	2.49±0.003 <sup>c</sup>	72.4±0.6 <sup>c</sup>	0.180±0.003 <sup>c</sup>	67.2±0.9 <sup>b</sup>
CO → S	3.18±0.012 <sup>b</sup>	83.9±1.1 <sup>b</sup>	0.237±0.019 <sup>b</sup>	79.3±1.0 <sup>a</sup>

不同小写字母表示差异达到  $P < 0.05$  水平。下图同此。

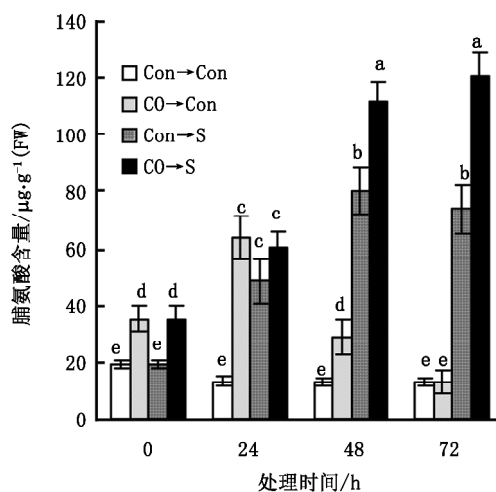


图2 CO溶液预处理对盐胁迫下小麦幼苗根中脯氨酸含量的影响

Fig.2 Effect of CO solution pretreatment on proline content of wheat seedling roots under salt stress

### 3 外源CO对P5CS活性和转录本表达以及ProDH活性的影响

小麦幼苗根部经外源CO溶液预处理24 h后转入200 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl胁迫条件下(CO → S) 12 h后的P5CS活性比盐胁迫条件下(Con → S)的高( $P < 0.05$ , 图3-a), P5CS基因表达也较强(图4), 48 h的P5CS活性达到最大值, 72 h时的其活性与48 h的相对比较稳定。另一方面, 200 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl (Con → S)明显抑制小麦幼苗根中ProDH活性, 并且随着时间进程而加剧(图3-b)。与盐胁迫下的(Con → S)相比, 50%饱和度的CO溶液预处理的ProDH活性明显受抑制( $P < 0.05$ )。据此, 可以推测, 这可能是50%饱和度的CO溶液预处理诱导小麦幼苗根中脯氨酸迅速累积(图2)的直接原因之一。

另外, Xie等(2008)曾报道, 外源NO的清除剂和合成抑制剂可阻断CO诱导的小麦幼苗耐盐性的

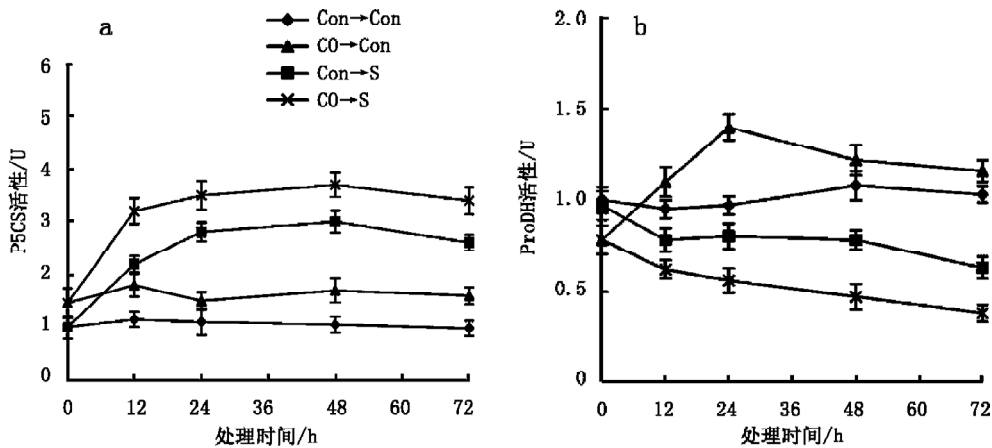


图3 CO溶液预处理对盐胁迫下小麦幼苗根中P5CS和ProDH活性的影响

Fig.3 Effects of CO solution pretreatment on the activities of P5CS and ProDH in wheat seedling roots

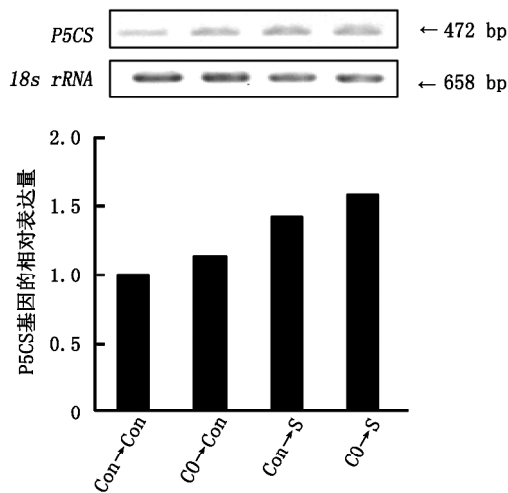


图4 CO溶液预处理对盐胁迫下的小麦幼苗根中P5CS基因表达的影响

Fig.4 Effect of CO solution pretreatment on the express of P5CS gene in wheat seedling roots under salt

提高, 并且CO能诱导NO的迸发, 因此他们推测NO很可能是CO提高植物耐盐性信号途径下游中的一个组分。Ruan等(2004)也报道, 低浓度NO可激活脯氨酸合成酶P5CS的活性而抑制降解酶ProDH的活性, 从而诱导盐胁迫下小麦幼苗叶中脯氨酸的累积, 并认为这可能是NO改善植物耐盐性的原因之一。由此看来, 在CO诱导小麦幼苗根中脯氨酸积累, 并进而提高其耐盐性的过程中, 是否也有NO信号的参与, 值得进一步研究。

## 参考文献

- 胡冰, 贺子义, 林国庆, 谢彦杰, 齐继艳, 江丹君, 沈文飏, 黄丽琴(2008). 高铁血红素对盐胁迫下小麦根部生长受抑的缓解和根尖中离子微域分布的影响. 植物生理学通讯, 44 (5): 865~868
- 赵福庚, 刘友良(2000). 大麦幼苗多胺合成比脯氨酸合成对盐胁迫更敏感. 植物生理学报, 26 (4): 343~349
- 赵福庚, 孙诚, 刘友良, 章文华, 刘兆普(2002). ABA和NaCl对碱蓬多胺和脯氨酸代谢的影响. 植物生理与分子生物学学报, 28 (2): 117~120
- Dulak J, Józkwicz A (2003). Carbon monoxide — a “new” gaseous modulator of gene expression. Acta Biochim Pol, 50: 31~47
- Ruan HH, Shen WB, Xu LL (2004). Nitric oxide involved in the abscisic acid induced proline accumulation in wheat seedling leaves under salt stress. Acta Bot Sinica, 46: 1307~1315
- Siegel SM, Renwick G, Rosen LA (1962). Formation of carbon monoxide during seed germination and seedling growth. Science, 137: 683~684
- Thom SR, Xu YA, Ischiropoulos H (1997). Vascular endothelial cells generate peroxynitrite in response to carbon monoxide exposure. Chem Res Toxicol, 10: 1023~1031
- Verma A, Hirsch DJ, Glatt CE, Ronnett GV, Snyder SH (1993). Carbon monoxide: a putative neural messenger. Science, 259: 381~384
- Wilks SS (1959). Carbon monoxide in green plants. Science, 129: 964~966
- Xie Y, Ling T, Han Y, Liu K, Zheng Q, Huang L, Yuan X, He Z, Hu B, Fang L et al (2008). Carbon monoxide enhances salt tolerance by nitric oxide-mediated maintenance of ion homeostasis and up-regulation of antioxidant defence in wheat seedling roots. Plant Cell Environ, 31: 1864~1881
- Yoshida Y, Kiyosue T, Nakashima K, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K(1997). Regulation of levels of proline as osmolyte in plants under water stress. Plant Cell Physiol, 38: 1095~1102
- Zhu JK (2001). Plant salt tolerance. Trends Plant Sci, 6: 66~71
- Zhu JK (2003). Regulation of ion homeostasis under salt stress. Curr Opin Plant Biol, 6: 441~445