

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

杨双龙^{1,2,3}, 龚明^{2,3,*}

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, 昆明 650092; ³ 教育部生物能源持续开发利用工程研究中心, 昆明 650092

摘要: NO供体硝普钠(SNP)可显著提高玉米幼苗体内脯氨酸含量和脯氨酸合成途径中关键酶鸟氨酸转氨酶(OAT)的活性, 而降低降解途径中关键酶脯氨酸脱氢酶(ProDH)的活性, 作为NO淬灭剂的c-PTIO, 其作用则相反。但不论是SNP或c-PTIO对玉米幼苗中 Δ^1 -吡咯啉-5-羧酸合成酶(P5CS)活性的影响均不显著。表明NO诱导的脯氨酸积累可能是NO激活了脯氨酸合成中的鸟氨酸途径、同时抑制了脯氨酸降解途径的综合结果。

关键词: 一氧化氮; 玉米幼苗; 脯氨酸; 代谢途径

Effects of Nitric Oxide on Proline Accumulation and Metabolic Pathways in Maize (*Zea mays* L.) Seedlings

YANG Shuang-Long^{1,2,3}, GONG Ming^{2,3,*}

¹College of Water Conservancy & Civil Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China; ²College of Life Sciences, Yunnan Normal University, Kunming 650092, China; ³Engineering Research Center of Sustainable Development and Utilization of Biomass Energy, Ministry of Education, Kunming 650092, China

Abstract: Treatment with the NO donor sodium nitroprusside (SNP) could lead to a significant accumulation of proline, a rapid increase of the activity of the key enzyme ornithine- δ -aminotransferase (OAT) of proline biosynthesis, and a decrease of the activity of the key enzyme proline dehydrogenase (ProDH) of proline degradation in maize (*Zea mays*) seedlings. Whereas treatment with the NO scavenger 2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide (c-PTIO) exhibited contrary results to the SNP treatment. In addition, both SNP and c-PTIO treatments had little effect on Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS) activity. These results showed that the NO-induced proline accumulation in the maize seedlings might be a combined result of the activation of ornithine pathways of proline biosynthesis and inhibition of proline degradation pathway.

Key words: nitric oxide; maize seedlings; proline; metabolic pathways

干旱、高温、高盐、冰冻、氧化胁迫等均会引起植物体内脯氨酸积累(Trovato等2008; Takagi 2008)。脯氨酸是植物体内的渗透调节物质, 除渗透调节作用以外, 还有保护蛋白质、生物膜、亚细胞结构以及清除活性氧等功能(Kishor等2005; Ashraf和 Foolad 2007)。已知植物中脯氨酸合成有谷氨酸途径和鸟氨酸两条途径, 两者的区别在于初始底物的不同, 分别为谷氨酸(Glu)和鸟氨酸(Orn)。 Δ^1 -吡咯啉-5-羧酸合成酶(Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase, P5CS)是谷氨酸合成途径中的限速和调节酶, 而调节鸟氨酸途径的核心关键酶是鸟氨酸转氨酶(ornithine- δ -aminotransferase, OAT)(Kishor等2005; Trovato等2008)。脯氨酸降解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 -pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase, P5CDH), 已有研究表明, ProDH是脯氨酸降解的限速酶(Sanchez等2001; Kishor等2005)。虽然脯氨酸积累在植物适应逆境胁迫中的作用已得到证实, 但是调节脯氨酸合成和降解的信号转导机制尚不清楚(Kishor等2005; Ashraf和 Foolad 2007)。已有的一些实验表明, 某些信号分子, 如ABA、Ca²⁺、磷脂酶D、H₂O₂等均参与脯氨酸代谢的调节(Kishor等2005; Ashraf和 Foolad 2007; Yang等2009)。

一氧化氮(nitric oxide, NO)是植物体内广泛存在的信号分子, 它在植物的生长发育、细胞程序性

收稿 2009-04-29 修定 2009-06-17

资助 国家自然科学基金(30660013)。

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

死亡以及对逆境胁迫响应和适应过程中均起作用(刘开力等 2004; Lamotte 等 2005)。已有的少量研究表明, 外源 NO 能够增强盐胁迫和金属离子胁迫下植物体内脯氨酸的积累。如 Ruan 等(2004)报道, NO 供体硝普钠(sodium nitroprusside, SNP)增强 NaCl 胁迫下小麦幼苗中脯氨酸的累积; $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SNP 预处理 30 min 后, 遭受 CuSO_4 胁迫的衣藻细胞中脯氨酸含量即上升约 50% (Zhang 等 2008)。但其相关机制尚不清楚, NO 是否参与正常生长条件下植物体内脯氨酸的代谢过程也不清楚。本文采用 NO 供体 SNP (Ederli 等 2008) 和 NO 淬灭剂 c-PTIO [2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazole-1-oxyl-3-oxide] (Maeda 等 1994) 处理玉米幼苗的方法, 研究 NO 对正常生长条件下玉米幼苗体内脯氨酸积累以及脯氨酸合成和降解途径的影响, 试图揭示 NO 在脯氨酸代谢中的作用。

材料与方法

玉米(*Zea mays* L.)品种‘晴三’种子购自昆明市种子公司, 以 0.1% 的 HgCl_2 消毒 15 min, 用无菌水充分漂洗干净, 于 26°C 下浸种 12 h, 吸胀后的种子播种于垫有 6 层湿润滤纸的培养盒中, 置于 26°C 恒温箱中暗萌发 60 h, 选取长势一致的幼苗分别转入垫有 6 层滤纸并加有 $0\sim 500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SNP 或 $0\sim 50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ c-PTIO 的培养盒中于 26°C 下暗处理 24 h, 以加无菌水的为对照。

实验测定时取用幼苗的地上部分(长度约 3 cm)。脯氨酸含量用酸性茚三酮法测定(Bates 等 1973); P5CS 的提取和活性测定参照 Garcia-Rios 等(1997)的方法, 并略做改进: 反应混合液为 $50 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Tris-HCl, 内含 $2 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2 、 $5 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ATP、 $50 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Glu, 加入 0.2 mL 酶液, 以 $0.4 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NADPH 启动反应, 用 Ultrospec 2000 分光光度计测定波长 338 nm 处 OD 值, 以单位时间内 NADPH 氧化量表示酶活性; OAT 和 ProDH 活性测定参考 Sanchez 等(2001)文中的方法, OAT 活性以单位时间内 NADPH 氧化量表示, ProDH 活性以单位时间内 NADP^+ 消耗量表示; 蛋白质的测定按照 Bradford (1976) 方法测定, 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, Sigmaplot 8.0 进

行作图。

结果与讨论

1 外源 NO 供体 SNP 和 NO 淬灭剂 c-PTIO 对玉米幼苗体内脯氨酸积累的效应

如图 1 和图 2 所示: (1) 玉米幼苗用不同浓度的 SNP 处理 24 h 后, 随着 SNP 浓度的增加, 幼苗体内脯氨酸含量逐渐上升, $150 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理的含量达到最高, 此后逐渐下降, 但以 $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SNP 处理的脯氨酸含量仍然略高于不作 SNP 处理的(图 1), 表明 SNP 可促进玉米幼苗中脯氨酸的积累。(2) 玉米幼苗经不同浓度 c-PTIO 处理 24 h 后, 随着

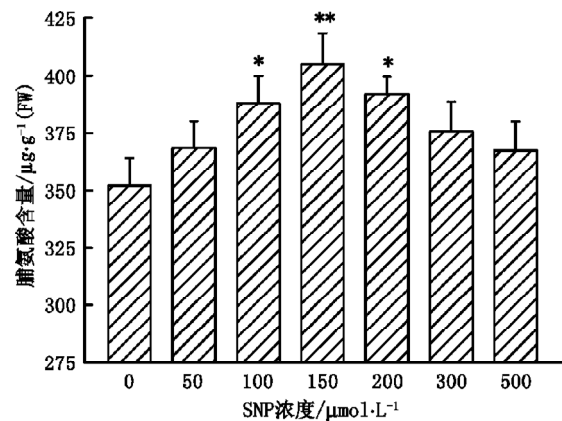


图 1 不同浓度 SNP 对玉米幼苗体内脯氨酸含量的影响
Fig.1 Effects of different SNP concentrations on proline content of maize seedlings
*: $P<0.05$; **: $P<0.01$ 。

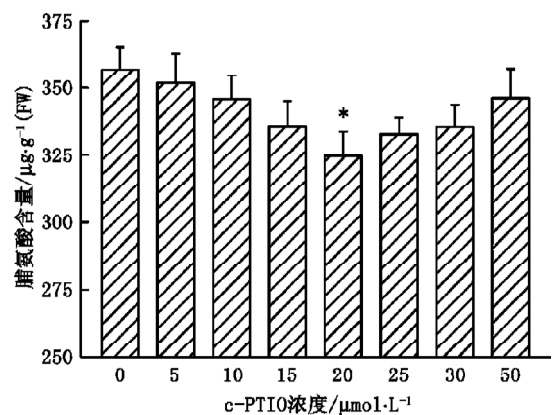


图 2 不同浓度 c-PTIO 对玉米幼苗体内脯氨酸含量的影响
Fig.2 Effects of different c-PTIO concentrations on proline content of maize seedlings
*: $P<0.05$ 。

c-PTIO 浓度的增加, 其体内脯氨酸含量逐渐下降, c-PTIO 的浓度高至 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时达到最低, c-PTIO 浓度进一步增加时又逐渐回升(图2)。之所以有这种变化趋势, 很可能是低浓度 c-PTIO 下玉米幼苗体内 NO 含量下降, 从而抑制了 NO 参与脯氨酸的积累过程。但是, 随着 c-PTIO 浓度的增加, 其本身可能作为一个胁迫因子而促进幼苗体内脯氨酸积累。SNP 处理的效应可能正好相反。此外, 我们在预备实验中曾观察到, 以 $50\sim 500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SNP 或 $5\sim 50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ c-PTIO 处理玉米幼苗 24 h 后, 幼苗生长受到的影响不显著, 植株表型正常。

此外, 根据图 1、2 的结果, 我们测定了以 $150 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SNP 和 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ c-PTIO 分别处理 24 h 的过程中玉米幼苗体内脯氨酸含量变化。如图3所示, 在 SNP 处理过程中, 玉米幼苗中脯氨酸含量逐渐上升, 而 c-PTIO 处理的则逐渐下降, 这似乎暗示 NO 参与玉米幼苗体内脯氨酸积累的调控。

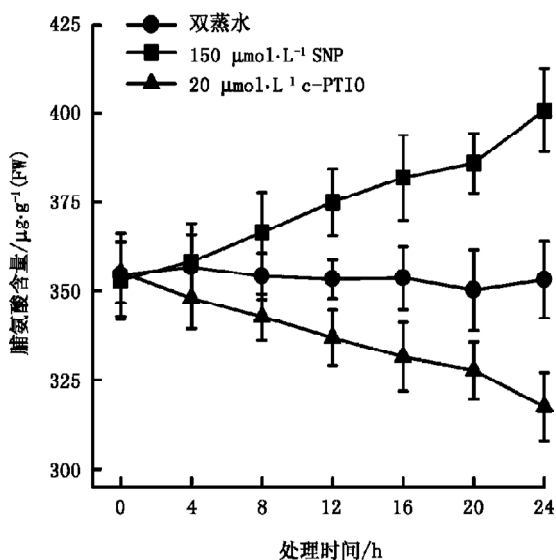


图3 SNP 和 c-PTIO 处理过程中玉米幼苗体内脯氨酸含量的变化

Fig.3 Changes of proline content in maize seedlings during SNP and c-PTIO treatments

2 SNP和c-PTIO对脯氨酸合成和降解途径中关键酶活性的效应

OAT 能将鸟氨酸转化为 γ -谷氨酰半缩醛 (glutamic- γ -semialdehyde, GSA), 进而生成 Δ^1 -吡咯啉-5-羧酸 (Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate, P5C) (Zhao

等 2001)。SNP 可提高 OAT 的活性, 经 SNP 处理 24 h 的玉米幼苗中 OAT 活性上升 18.8% ($P<0.01$); c-PTIO 处理的效应则与之相反, OAT 活性下降 13.6% ($P<0.05$) (图 4)。

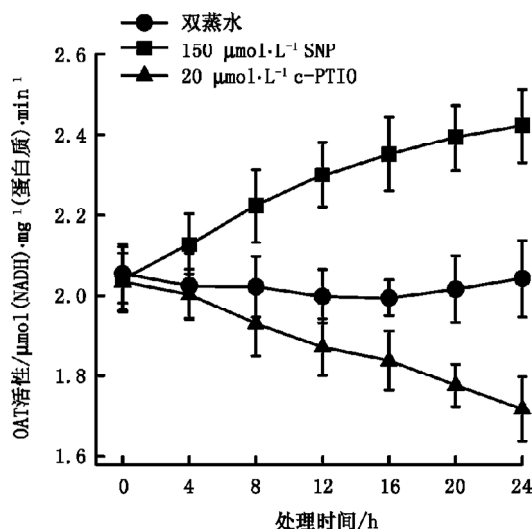


图4 SNP 和 c-PTIO 处理过程中玉米幼苗的 OAT 活性的变化

Fig.4 Changes of OAT activity in maize seedlings during SNP and c-PTIO treatments

P5CS 催化谷氨酸到 P5C 的合成反应, P5C 进而生成脯氨酸 (Hong 等 2000; Zhao 等 2001)。无论是 SNP 还是 c-PTIO, 都对玉米幼苗体内 P5CS 活性变化影响不大 ($P>0.05$) (图 5)。

脯氨酸降解是控制植物体内脯氨酸积累的因

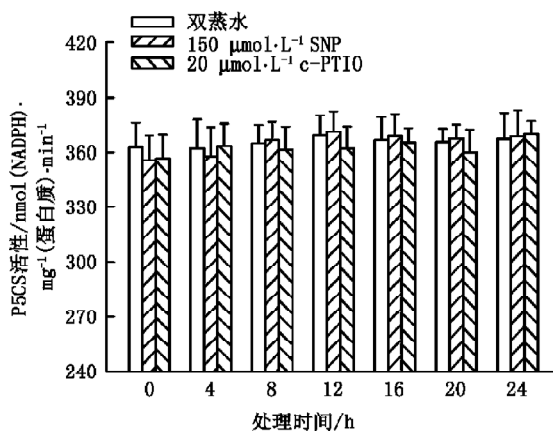


图5 SNP 和 c-PTIO 处理过程中玉米幼苗的 P5CS 活性变化

Fig.5 Changes of P5CS activity in maize seedlings during SNP and c-PTIO treatments

素, ProDH 是降解脯氨酸为 P5C 的关键酶(Sanchez 等 2001), SNP 降低 ProDH 的活性, 经 SNP 处理 24 h 后的玉米幼苗中 ProDH 活性下降($P < 0.01$), c-PTIO 处理的 ProDH 活性则上升($P < 0.05$) (图 6)。

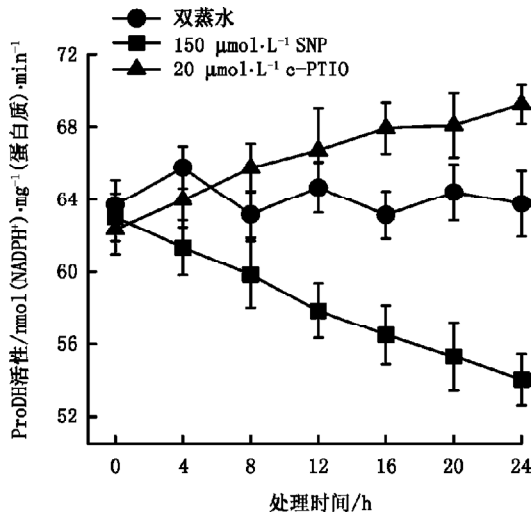


图 6 SNP 和 c-PTIO 处理过程中玉米幼苗的 ProDH 活性变化

Fig.6 Changes of ProDH activity in maize seedlings during SNP and c-PTIO treatments

总之, 外源NO可提高植物体内脯氨酸的含量, 但其间机制尚不清楚(肖强和郑海雷 2004; 郝岗平等 2007)。本文结果表明了三点: (1) NO 影响玉米幼苗体内脯氨酸的积累; (2) NO 参与脯氨酸合成和降解过程的调控, NO 诱导脯氨酸积累可能是其促进脯氨酸合成中的鸟氨酸途径、同时抑制了脯氨酸降解途径的综合结果。

参考文献

郝岗平, 杜希华, 史仁玖(2007). 干旱胁迫下外源一氧化氮促进银杏可溶性糖、脯氨酸和次生代谢产物合成. 植物生理与分子生物学学报, 33: 499~506

刘开力, 凌腾芳, 刘志兵, 花榕, 孙永刚, 沈文飏(2004). 外源 NO 供体 SNP 浸种对盐胁迫下水稻幼苗生长的影响. 植物生理学通讯, 40: 419~422

肖强, 郑海雷(2004). 一氧化氮与植物胁迫响应. 植物生理学通讯, 40: 379~384

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

Ederli L, Reale L, Madeo L, Ferranti F, Gehring C, Fornaciari M, Romano B, Pasqualini S (2008). NO release by nitric oxide donors *in vitro* and *in planta*. Plant Physiol Biochem, 47: 42~48

Garcia-Rios M, Fujita T, LaRosa PC, Locy RD, Clithero JM, Bressan RA, Csonka LN (1997). Cloning of a polycistronic cDNA from tomato encoding γ -glutamyl kinase and γ -glutamyl phosphate reductase. Proc Natl Acad Sci USA, 94: 8249~8254

Hong Z, Lakkineni K, Zhang ZG, Verma DPS (2000). Removal of feedback inhibition of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. Plant Physiol, 122: 1129~1136

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 implications in plant growth and abiotic stress tolerance. Curr Sci, 88: 424~438

Lamotte O, Courtois C, Barnavon L, Pugin A, Wendehenne D (2005). Nitric oxide in plants: the biosynthesis and cell signalling properties of a fascinating molecule. Planta, 221: 1~4

Maeda H, Akaike T, Yoshida M, Suga M (1994). Multiple functions of nitric oxide in pathophysiology and microbiology: analysis by a new nitric oxide scavenger. J Leukoc Biol, 56: 588~592

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 Sin, 46: 1307~1315

Takagi H (2008). Proline as a stress protectant in yeast: physiological functions, metabolic regulations, and biotechnological applications. Appl Microbiol Biotechnol, 81: 211~223

Trovato M, Mattioli R, Costantino P (2008). Multiple roles of proline in plant stress tolerance and development. Rendiconti Lincei, 19: 325~346

Sanchez 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 (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Strike). J Plant Physiol, 158: 593~598

Yang SL, Lan SS, Gong M (2009). Hydrogen peroxide-induced proline and metabolic pathway of its accumulation in maize seedlings. J Plant Physiol (accepted, DOI: 10. 1016/j. jplph. 2009. 04. 006)

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