

研究报告 Original Papers

NO 参与 γ -氨基丁酸促进白三叶种子的萌发过程

李杰, 窦晓月, 车永梅, 刘新*

青岛农业大学生命科技学院, 山东青岛 266109

摘要: 白三叶种子用不同浓度 γ -氨基丁酸(GABA)处理后, 低浓度GABA处理的白三叶种子萌发速率和一氧化氮(NO)含量显著提高; NO清除剂cPTIO和硝酸还原酶(NR)抑制剂叠氮钠(NaN_3)显著抑制GABA促进的白三叶种子萌发过程, 而一氧化氮合酶(NOS)抑制剂L-NAME对GABA促进白三叶种子萌发的影响不显著。据此推测, GABA促进白三叶种子萌发过程中可能有NO参与, 并且NO的产生主要依赖于硝酸还原酶途径。

关键词: 一氧化氮; γ -氨基丁酸; 白三叶; 种子萌发

Nitric Oxide Involved in Seed Germination of *Trifolium repens* L. Promoted by γ -Aminobutyric Acid

LI Jie, DOU Xiao-Yue, CHE Yong-Mei, LIU Xin*

College of Life Sciences, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109, China

Abstract: After treatment with different concentrations (0.1, 1 and 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) of γ -aminobutyric acid (GABA), the germination rate and NO content of *Trifolium repens* seed with low concentration of GABA were improved. The promotive effect of GABA on seed germination of *T. repens* were inhibited by a specific NO scavenger cPTIO and an nitrate reductase (NR) inhibitor NaN_3 , but the nitric oxide synthase (NOS) inhibitor L-NAME had little effect. It was presumed that NO involved in *T. repens* seed germination promoted by GABA, and NO mainly came from NR pathway.

Key words: NO; γ -aminobutyric acid; *Trifolium repens*; seed germination

γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)是一种广泛存在于原核生物和真核生物中的四碳非蛋白氨基酸, 各种植物以及植物的各个器官中都有存在。研究表明, GABA可作为一种信号物质参与植物生长发育及逆境适应等生理过程的调控。如GABA参与拟南芥花粉管的生长过程(Yu等2006); 能延缓水稻植株的衰老(Ansari等2005); 可诱导石竹属植物繁缕植株ACC合酶基因的表达(Kathiresan等1998); 还能促进盐胁迫下玉米种子的萌发(田小磊等2005)。但目前GABA调控植物生长发育过程中的下游信使及其信号转导机制还不清楚。

一氧化氮(nitric oxide, NO)也是植物体内重要的信号分子, 参与光形态建成、种子萌发和休眠、气孔运动及胁迫响应等生理过程的调节。许多研究表明, NO可以与植物激素、 H_2O_2 等信号分子相互作用影响植物的生长发育。如, NO参与调节盐胁迫诱导的玉米幼苗叶片中脱落酸(abscisic acid,

ABA)的积累(陈康等2006); 介导茉莉酸(jasmonic acid, JA)、乙烯(ethylene, ETH)和ABA诱导的气孔运动过程(Liu等2005; 李杰等2007; Garcia-Mata和Lamattina 2007); 参与调节番茄根中生长素(indoleacetic acid, IAA)的合成(Molina-Favero等2008)。NO还可以作为 H_2O_2 的下游信使诱导柳枝稷种子的萌发(Sarath等2007)。作为细胞内的重要信使, NO与GABA之间是否相互作用还未见报道。为此, 本文以白三叶种子为材料, 研究GABA对白三叶种子萌发的影响以及NO在GABA调控白三叶种子萌发中的作用, 为探明GABA的作用机制建立基础。

收稿 2008-07-21 修定 2008-10-29

资助 山东省教育厅基金(J04C13)和国家自然科学基金(30370141)。

* 通讯作者(E-mail: liuxin6080@yahoo.com.cn; Tel: 0532-88030224)。

材料与方法

选择籽粒饱满的白三叶(*Trifolium repens* L., 又称白车轴草)种子, 经 0.1% HgCl_2 消毒 3 min, 再用蒸馏水冲洗 3 次。然后分别用以下处理液处理: 0.1、1、10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ GABA, 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ cPTIO [2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide potassium salt], 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ N_0 -硝基-L-精氨酸-甲基酯 (N_0 nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride, L-NAME), 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaN_3 , GABA 分别与 cPTIO、L-NAME、 NaN_3 混合液 (GABA、cPTIO、L-NAME、 NaN_3 的终浓度分别为 0.1、200、100 和 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 均以蒸馏水处理为对照, 各处理液浓度根据相关文献(田小磊等 2005; Yu 等 2006)及预试确定。GABA、cPTIO、L-NAME 均购自 Sigma 公司; NaN_3 为国产分析纯。

取消过毒的白三叶种子播于铺有 4 层定性滤纸的培养皿内, 分别加入上述不同的处理液。每处理设 3 个重复, 每重复 100 粒种子, 在 25 °C 下暗催芽。催芽期间用处理液冲洗种子, 以保持处理液浓度基本不变和维持一定的湿度, 并于 9 h 后开始记录发芽率, 每 2 h 记录一次, 直到 19 h 为止。以胚根突破种皮 2 mm 为萌发。发芽率(%)= 萌发的种子数 / 供试种子数 $\times 100\%$ 。

采用试剂盒测定 NO 含量。取 0.1 g 处理过的白三叶种子加 0.9 mL 0.9% NaCl 研磨成匀浆; 12 000 $\times g$ 离心 10 min, 取上清液, 于沸水浴中 3 min; 12 000 $\times g$ 离心 5 min, 取上清液, 稀释 10 倍, 并参考试剂盒说明进行测定(试剂盒购自南京建成生物工程研究所), 每处理重复 3 次。

采用 DPS 统计软件对平均数用 Duncan's 新复极方差进行多重比较

实验结果

1 GABA 对白三叶种子发芽率的影响

由图 1 可知, GABA 处理和未作处理的白三叶种子在 19 h 时萌发基本完成, 0.1 和 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ GABA 处理的白三叶种子, 萌发速率显著加快, 13 h 和 15 h 时发芽率比未作处理的分别提高 36.9%、16.4% 和 33.3%、12.8% ($P < 0.05$); 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ GABA 对白三叶种子萌发的促进作用不显著 ($P > 0.05$)。表明低浓度外源 GABA 显著促进白三叶种子萌发, 提高萌发速率, 缩短萌发进程。

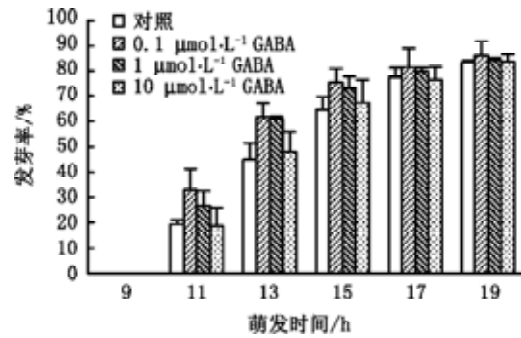


图 1 不同浓度 GABA 对促进白三叶种子萌发的影响
Fig.1 Effect of different concentrations of GABA on seed germination of *T. repens*

2 GABA 对白三叶种子萌发过程中内源 NO 含量的影响

图 2 表明, 未作处理的白三叶种子萌发过程中 NO 含量略有增加。GABA 处理的白三叶种子萌发过程中 NO 含量显著升高, 在 15 h 时 NO 含量达到高峰 ($P < 0.01$)。表明, GABA 处理能显著增加种子萌发过程中的 NO 含量。

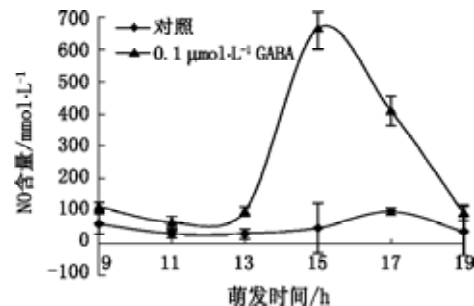


图 2 GABA 对白三叶种子萌发过程中 NO 含量的影响
Fig.2 Effect of GABA on NO content of *T. repens* in seed germination

3 NO 清除剂 cPTIO 对 GABA 促进白三叶种子萌发的影响

图 3 显示, 0.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ GABA 能显著提高白三叶种子的萌发速率, NO 清除剂 cPTIO 处理的白三叶种子发芽率与未作处理的相比稍有降低 ($P > 0.05$); cPTIO 和 GABA 共处理时, 白三叶种子发芽率比 GABA 单独处理的显著降低 ($P < 0.05$), 13 h 和 15 h 时发芽率分别降低 32.7% 和 19.7%。表明, GABA 促进白三叶种子萌发过程中可能有 NO 的参与。

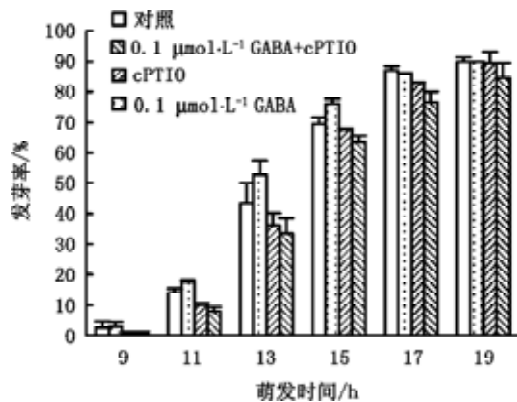


图3 cPTIO对GABA促进白三叶种子萌发的影响
Fig.3 Effect of cPTIO on seed germination of *T. repens* promoted by GABA

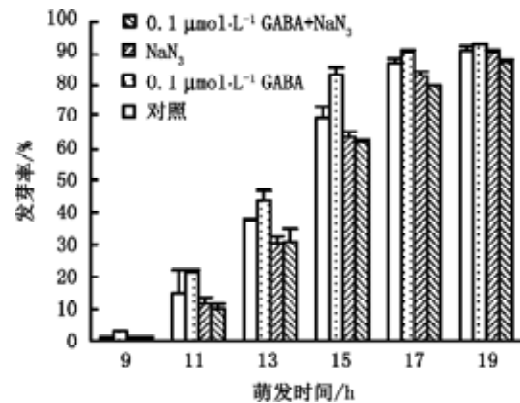


图5 NaN₃对GABA促进白三叶种子萌发的影响
Fig.5 Effect of NaN₃ on seed germination of *T. repens* promoted by GABA

4 NO合成抑制剂L-NAME和NaN₃对GABA促进白三叶种子萌发的影响

L-NAME是一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)的抑制剂。与未作处理的相比, 100 μmol·L⁻¹ L-NAME处理对白三叶种子萌发的影响不显著; L-NAME和GABA共处理的白三叶种子发芽率较GABA处理的稍有降低(图4)。NaN₃是硝酸还原酶(nitrate reductase, NR)的非专一性抑制剂。NaN₃能稍微降低白三叶种子的萌发速率; NaN₃和GABA共处理的白三叶种子发芽率较GABA单独处理的显著降低($P < 0.05$), 13 h和15 h时发芽率分别降低29.6%和25.2% (图5)。

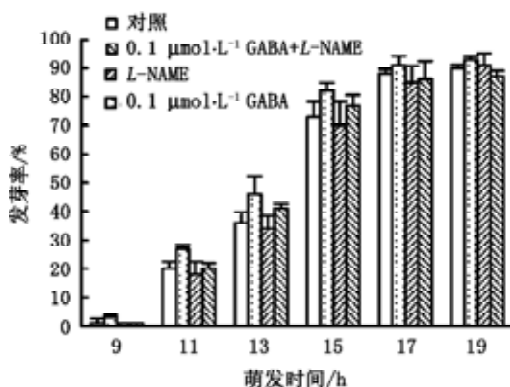


图4 L-NAME对GABA促进白三叶种子萌发的影响
Fig.4 Effect of L-NAME on seed germination of *T. repens* promoted by GABA

讨论

已有研究表明, GABA参与调节植物的生长发

育及逆境适应等多种生理过程。Shelp等(2006)报道, 低浓度GABA可通过质膜受体或吸收系统参与对花粉管生长的调控。Kinnersley和Lin(2000)发现, 将浮萍(*Lemna minor*)放在含有GABA的介质中培育, 浮萍体内矿物质元素含量随GABA浓度的增大而增加; Kathiresan等(1998)以不同浓度的GABA处理繁缕(*Stellaria longipes*)后, 发现外施低浓度的GABA能显著促进繁缕的生长。本文结果表明, 低浓度外源GABA能显著提高白三叶种子的萌发速率, 并以0.1 μmol·L⁻¹ GABA的作用最显著。

NO是植物体内广泛存在的信号分子, 参与植物体内多种生理过程的信号转导。Caro和Puntarulo(1999)的研究表明, 大豆种子萌发过程中NO含量随萌发进程上升, 说明NO参与大豆种子的萌发过程。在GABA促进白三叶种子的萌发过程中有无NO参与? NO与GABA之间有无相互作用? 本文研究GABA对白三叶种子萌发过程中内源NO含量的影响及cPTIO和GABA共处理对白三叶种子萌发影响的结果表明, GABA显著增加萌发的白三叶种子中NO含量; 而NO清除剂cPTIO和GABA共处理后, GABA促进白三叶萌发的作用被显著抑制, 表明NO参与外源GABA促进白三叶种子萌发过程, 并且NO位于GABA的下游。同时还表明未作处理的白三叶种子萌发后期NO含量稍有增加, 200 μmol·L⁻¹ cPTIO处理的白三叶种子萌发速率与未作处理的有所降低, 表明在其自然萌发过程NO有一定作用, 但对此还需进一步研究证实。

植物细胞中NO主要是由依赖于硝酸盐/亚硝

酸盐途径和依赖于 *L*-精氨酸途径产生。其中前者的关键酶主要是胞质的NR及根部特异性的亚硝酸盐NO还原酶(nitrite NO reductase, Ni-NOR); 后者相应的关键酶可能包括类NOS, 且在许多植物组织及细胞器中亦检测到其活性(Besson-Bard 等2008)。此外, 近期有研究报道, 植物细胞中可能还存在依赖多胺(polyamines, PAs)的NO合成途径, 但目前尚未鉴定出其中起关键作用的酶(Yamasaki和Chohen 2006)。Garcia和Lamattina (2003)的研究表明, 由NR途径产生的NO可介导ABA诱导拟南芥的气孔关闭过程; Liu等(2007)的研究表明, 在JA诱导蚕豆气孔关闭的过程中有NO的参与, 并且NO的产生主要依赖于NR途径。本文研究表明, NOS抑制剂*L*-NAME和GABA共处理, 对GABA促进白三叶种子萌发的抑制作用不显著; 而NR抑制剂NaN₃能显著抑制GABA对白三叶种子萌发的促进作用, 结合前述GABA显著增加萌发白三叶种子中NO含量的实验结果, 可以推测NO参与外源GABA促进的白三叶种子萌发过程, 它可能是主要通过NR途径产生。

至于GABA促进种子萌发与NO信使的关系及GABA促进种子萌发过程中NO是否通过NR途径还需进一步探讨, GABA促进种子萌发的信号转导过程中的其它信号组分以及下游靶蛋白或受体也有待进一步阐明。NO在植物中的生物效应和信号转导机制已有大量研究, 但NO合成的NR途径及NOS途径所需的条件和调节机制仍不清楚, 还需用生物化学和分子生物学手段进一步研究。

参考文献

- 陈康, 李杰, 唐静, 赵方贵, 刘新(2006). 一氧化氮参与调节盐胁迫诱导的玉米幼苗脱落酸积累. 植物生理与分子生物学学报, 32 (5): 577~582
- 李杰, 邱丽艳, 赵方贵, 侯丽霞, 刘新(2007). 一氧化氮在乙烯诱导蚕豆气孔关闭中的作用. 植物生理与分子生物学学报, 33 (4): 349~353
- 田小磊, 吴晓岚, 李云, 张蜀秋(2005). 盐胁迫条件下 γ -氨基丁酸对玉米幼苗SOD、POD及CAT活性的影响. 实验生物学报, 38 (1): 75~79
- Ansari MI, Lee RH, Chen SCG (2005). A novel senescence-associated gene encoding γ -aminobutyric acid (GABA): pyruvate transaminase is upregulated during rice leaf senescence. *Physiol Plant*, 123: 1~8
- Besson-Bard A, Pugin A, Wendehenne D (2008). New insights into nitric oxide signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 59: 21~39
- Garcia-Mata C, Lamattina L (2003). Abscisic acid, nitric oxide and stomatal closure-is nitrate reductase one of the missing links? *Trends Plant Sci*, 8 (1): 20~26
- Garcia-Mata C, Lamattina L (2007). Abscisic acid (ABA) inhibits light-induced stomatal opening through calcium- and nitric oxide-mediated signaling pathways. *Nitric Oxide*, 17 (3~4): 143~151
- Caro A, Puntarulo S (1999). Nitric oxide generation by soybean embryonic axes. Possible effect on mitochondrial function. *Free Radic Res*, 31: 205~212
- Kathiresan A, Miranda J, Chinnappa CC, Reid DM (1998). γ -aminobutyric acid promotes stem elongation in *Stellaria longipes*: the role of ethylene. *Plant Growth Regul*, 26: 131~137
- Kinnersley AM, Lin F (2000). Receptor modifiers indicate that 4-aminobutyric acid (GABA) is a potential modulator of ion transport in plants. *Plant Growth Regul*, 32: 65~76
- Liu X, Shi WL, Zhang SQ, Lou CH (2005). Nitric oxide involved in signal transduction of jasmonic acid-induced stomatal closure of *Vicia faba* L.. *Chinese Sci Bull*, 50 (6): 520~525
- Liu X, Wang YQ, Jia WS, Lou CH, Zhang SQ (2007). Localization of NOS-like protein in guard cells of *Vicia faba* L. and its possible function. *Chinese Sci Bull*, 52 (1): 84~90
- Molina-Favero C, Creus CM, Simontacchi M, Puntarulo S, Lamattina L (2008). Aerobic nitric oxide production by *Azospirillum brasilense* Sp245 and its influence on root architecture in tomato. *Mol Plant Microbe Interact*, 21 (7): 1001~1009
- Sarath G, Hou G, Baird LM, Mitchell RB (2007). Reactive oxygen species, ABA and nitric oxide interactions on the germination of warm-season C₄-grasses. *Planta*, 226 (3): 697~708
- Shelp BJ, Bown AW, Faure D (2006). Extracellular γ -aminobutyrate mediates communication between plants and other organisms. *Plant Physiol*, 142 (4): 1350~1352
- Yamasaki H, Cohen MF (2006). NO signal at the crossroads: polyamine-induced nitric oxide synthesis in plants? *Trends Plant Sci*, 11: 522~524
- Yu G, Liang J, He Z, Sun M (2006). Quantum dot-mediated detection of γ -aminobutyric acid binding sites on the surface of living pollen protoplasts in tobacco. *Chem Biol*, 13 (7): 723~731