

一氧化氮对盐胁迫下烟草细胞 渗透调节能力的影响

柯 学^{1,2}, 程在全¹, 李军营³, 马文广³, 龚 明^{2*}

(1 云南省农业科学院生物技术与种质资源研究所, 云南省农业生物技术重点实验室, 农业部西南作物基因资源与种质创制重点实验室, 昆明 650223; 2 云南师范大学 生命科学学院, 云南省生物质能与环境生物技术重点实验室, 生物能源持续开发利用教育部工程研究中心, 昆明 650092; 3 云南省烟草农业科学研究院, 云南玉溪 653100)

摘 要:一氧化氮(NO)作为信号分子广泛参与植物的生长发育、逆境胁迫响应过程。为了明确 NO 对细胞渗透调节作用, 该研究以 NaCl 为盐胁迫因子, 以烟草悬浮细胞为材料, 研究了 NO 对盐胁迫下细胞渗透调节能力的影响。结果显示: (1) NaCl 胁迫能诱发烟草细胞内源 NO 的生成, 且 100 mmol · L⁻¹ NaCl 诱发了细胞内源 NO 的快速产生, 在 1 h 达到峰值, NO 产生量约为对照的 2 倍, 之后 NO 产生量快速下降, 直至 3 h 才逐渐回升, 并在 48 h 内维持在较高水平。 (2) 外源 NO 显著增强了烟草细胞的抗渗透胁迫能力, 且 150 μmol · L⁻¹ NO 供体硝普钠(SNP)处理显著提高了 NaCl 胁迫下细胞的活力和再生能力(提高幅度分别为 78.6% 和 63.2%), 降低了细胞死亡率(降幅约为 48.5%); SNP 处理下的 NaCl 胁迫细胞能更大程度降低渗透势, 延缓水势的降低, 维持细胞压力势。 (3) 外源 NO 显著促进了 NaCl 胁迫细胞中脯氨酸的合成和积累, 且 150 μmol · L⁻¹ SNP 处理将 NaCl 胁迫细胞中的脯氨酸含量提高 25.9%; SNP 处理也影响了脯氨酸代谢关键酶的活性和基因表达水平, 即提高了谷氨酸脱氢酶(GDH)、精氨酸酶和鸟氨酸转氨酶(OAT)的活性, 降低了脯氨酸脱氢酶(PDH)的活性, 同时使 GDH、OAT 和 PDH 基因的表达表现出与酶活性相似的变化趋势。研究表明, NO 参与了盐胁迫下烟草细胞的渗透调节, 通过调控脯氨酸代谢可能是 NO 参与渗透调节的重要机制。

关键词:一氧化氮; 渗透调节; 脯氨酸; 烟草悬浮细胞; 耐渗透性

中图分类号: Q945.78 **文献标志码:** A

Effects of Nitric Oxide on Osmoregulation of Tobacco Cells under Salt Stress

KE Xue^{1,2}, CHENG Zaiquan¹, LI Junying³, MA Wenguang³, GONG Ming^{2*}

(1 Biotechnology & Genetic Germplasm Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Yunnan Provincial Key Lab of Agricultural Biotechnology, Key Lab of Southwestern Crop Gene Resources and Germplasm Innovation, Ministry of Agriculture, Kunming 650223, China; 2 School of Life Sciences, Yunnan Normal University, Key Laboratory of Biomass Energy and Environmental Biotechnology of Yunnan Province, Engineering Research Center of Sustainable Development and Utilization of Biomass Energy, Ministry of Education, Kunming 650092, China; 3 Yunnan Academy of Tobacco Agricultural Sciences, Yuxi, Yunnan 653100, China)

Abstract: As universal signaling properties, NO(nitric oxide) involves not only in plant growth and development, but also in plant response to abiotic and biotic stress. Until now, its function of osmoregulation is un-

收稿日期: 2013-12-23; 修改稿收到日期: 2014-06-18

基金项目: 云南省农业生物技术重点实验室开放项目(2013-03); 国家自然科学基金(30460016); 云南省烟草公司科技计划(2011YN10)

作者简介: 柯 学(1977-), 男, 博士, 助理研究员, 主要从事农作物逆境分子生理研究。E-mail: ke-xue@hotmail.com

* 通信作者: 龚 明, 教授, 博士生导师, 主要从事植物逆境生物学研究。E-mail: biochem312@163.com

known. The study, using NaCl as a stress factor and tobacco suspension cells as experimental material, we investigated the effects of NO on osmoregulation of tobacco cells under NaCl stress. The results showed that: (1) Endogenous NO of tobacco cells was induced by NaCl stress. During $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl stress, production of NO was rapidly induced in cultured cells *in vivo*, and reached at the peak (with 2 times of the control) in 1 h after the stress treatment, then the production was deduced rapidly until 3 h, from then on, the amount of NO was increased gradually and maintained at a high level until 48 h. (2) Exogenous NO significantly enhanced osmotic stress tolerance ability of tobacco cells. $150 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NO donor sodium nitroprusside (SNP) significantly improved vitality and regrowth of the cells by 78.6% and 63.2%, respectively, lowered cell death by 48.5%, when compared to that of non SNP treatments stress cells. Further study indicated that SNP treatments led to relatively lower cell solute potential and higher water potential, which was benefit for maintaining cell pressure potential under the stress. (3) Exogenous NO significantly improved the synthesis and accumulation of proline in tobacco cells under NaCl stress. $150 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SNP increased proline accumulation of the cells by 25.9% due to effecting the activity of proline metabolic key enzymes, including the activation of glutamate dehydrogenase (GDH), arginase and ornithine aminotransferase (OAT), and the inhibition of proline dehydrogenase (PDH). Meanwhile, SNP also had corresponding effects on the expression of *GDH*, *OAT* and *PDH* genes. Our results suggest that NO involved in osmotic adjustment of tobacco cells to enhance salty tolerance, in which NO regulated proline metabolism of the cells was an important mechanism.

Key words: nitric oxide; osmoregulation; proline; tobacco suspension cells; osmotic tolerance

盐害对植物细胞的伤害首先体现在渗透胁迫^[1],植物为此进化出的策略包括:合成脯氨酸和甜菜碱等渗透调节物质;增强抗氧化酶活性;启动信号调控途径,如 ABA 诱导的脯氨酸积累途径;表达特定蛋白,如水孔蛋白和胚胎发育晚期富集蛋白 (late embryogenesis abundant, *Lea*)^[2-4]。这些对渗透胁迫的响应与适应机制依赖于植物信号分子的功能,一氧化氮 (nitric oxide, NO) 就是其中之一,它作为植物信号分子广泛参与植物生长发育调控、生物和非生物逆境胁迫响应过程^[5-6]。尽管最近在藻类中发现类似一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS) 的 DNA 序列信息,但植物中的 NOS 还未得到证实^[7],NO 在植物中的研究瓶颈有待突破,但这并不妨碍人们对它各种生物学功能的关注度。

前人的研究间接地证明了渗透胁迫与 NO 有关^[8]。例如,在盐和干旱导致的渗透胁迫条件下,外源 NO 能诱导气孔关闭,增加小麦相对含水量和 *Lea* 蛋白积累^[9];提高芦苇质膜 H^+ -ATP 酶活性^[10],以及大豆中抗坏血酸过氧化物酶 (APX)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GPX) 和过氧化氢酶 (CAT) 的活性,从而减少丙二醛 (MDA) 和 H_2O_2 含量^[11];增强胡椒中超氧化物歧化酶 (SOD) 和过氧化物酶 (POD) 的活性,减少脂质过氧化^[12];增加谷胱甘肽 (GsH)、抗坏血酸 (AsA) 含量,缓解 NaCl 对黄瓜下胚轴和胚根生长的抑制^[13]。上述这些实验基本只是阐明 NO 在渗透胁迫中的抗氧化功能,但 NO 是

否能真正对植物细胞的渗透调节产生影响则缺乏直接证据。虽然在烟草中已检测到内源 NO 的产生和 NOS 活性,但 NO 参与细胞渗透调节的机制仍然不完全清楚^[14]。

植物细胞在渗透胁迫条件下会产生大量的渗透调节物质,如甘露醇、盐和干旱胁迫促使水稻^[15]、菊苣^[16]和桤柳^[17]中合成大量渗透调节物质,特别是脯氨酸。已有实验表明 NO 与脯氨酸代谢有关,如 NO 供体硝普钠 (SNP) 诱导脯氨酸在苜蓿中的积累是由于 Δ^1 -吡咯琳 5-羧酸合成酶 (Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase, P5CS) 活性提高所致^[18];干旱诱导了水稻内源 NO 和脯氨酸的积累^[19];在冷、冰冻进程中,NO 通过提高香蕉和拟南芥中 P5CS 活性,降低脯氨酸脱氢酶 (proline dehydrogenase, PDH) 的活性来影响脯氨酸的积累^[20-21];在 NaCl 胁迫下,卷心菜、黄瓜中脯氨酸的积累是 PDH 活性受抑制,而 P5CS 和鸟氨酸转氨酶 (ornithine aminotransferase, OAT) 活性受激活的结果^[22-23]。然而,先前关于渗透胁迫下 NO 诱导脯氨酸积累机制的研究,基本仅集中在 SNP 对脯氨酸代谢途径中 P5CS 和 PDH 两个酶的影响上,缺乏系统性研究。众所周知,高等植物中脯氨酸代谢受 5 个关键酶的控制,有两条合成途径和一条降解途径。合成途径中一条是由谷氨酸脱氢酶 (glutamate dehydrogenase, GDH) 和 P5CS 调控的谷氨酸途径,另一条是由精氨酸酶和 OAT 调控的鸟氨酸途径,降解途径由

PDH 调控^[24-25]。另外,由于导致渗透胁迫的环境因素复杂多样、难于控制,给研究工作带来了困难,因此,NO 对脯氨酸代谢的影响效应及调控机制需要系统研究。

本研究以 NaCl 为胁迫因子,对 NaCl 胁迫下 NO 参与的烟草细胞渗透调节及其可能机制进行了初探,试图探明 NO 是否参与渗透胁迫,NO 是否影响细胞的渗透调节能力,以及 NO 对脯氨酸积累的影响效应。

1 材料和方法

1.1 材料培养

烟草(*Nicotiana tabacum* L.)悬浮细胞的培养参见李忠光等^[26]的方法,生长 12 周的烟草植株取茎髓于 MS 培养基上暗培养 4 周,取白色疏松愈伤组织进行暗条件悬浮培养(25 °C, 110 r/min),7 d 后继代,继代后培养 4 d 的细胞用于实验。

1.2 材料处理

利用 NaCl 作渗透胁迫因子,利用 NO 释放剂 SNP 和 NO 清除剂 cPTIO(2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetra-methylimidazole-1-oxyl-3-oxide)调节细胞外源 NO 的含量。依据 NaCl 对细胞活力、细胞死亡率和细胞再生能力 3 个生理指标的影响程度来确定它的使用浓度,以 SNP 和 cPTIO 对细胞活力的影响程度确定 NO 释放剂和清除剂的使用浓度。上述 3 个生理指标以相对百分率表示,即处理细胞的测定值与未加任何药品的培养细胞测定值之比。根据 7 d 的继代周期,继代后需培养 4 d 增加细胞数量,NaCl 胁迫时间确定为 48 h。细胞经不同浓度 NaCl(60、80、100、120、140 mmol · L⁻¹)处理 48 h,发现 100 mmol · L⁻¹ NaCl 处理下细胞的上述 3 个生理指标约为对照的 50%,相当于“半致死剂量”,因此确定 NaCl 的胁迫浓度为 100 mmol · L⁻¹。在此胁迫条件下,不同浓度的 SNP(0、50、100、150、200、300 μmol · L⁻¹)和 cPTIO(0、20、40、60、80、100 μmol · L⁻¹)对细胞活力有影响,150 μmol · L⁻¹ 的 SNP 能使细胞活力得到很好的恢复,80 μmol · L⁻¹ cPTIO 能基本消除 150 μmol · L⁻¹ SNP 对细胞活力的影响,因此在后续实验中确定 SNP 的使用浓度为 150 μmol · L⁻¹,cPTIO 的使用浓度为 80 μmol · L⁻¹。

后续试验处理共包括对照、NaCl 处理、SNP 处理、NaCl+SNP 处理、NaCl+SNP+cPTIO 处理共 5 类。处理方法为:向悬浮培养基中加入 NaCl 进行

渗透胁迫处理;SNP 和 cPTIO 于渗透胁迫处理前 15 min 加入悬浮培养基,同时向对照样品中加入相等体积或重量的液体培养基。收集各处理下不同时间点的悬浮培养细胞进行过滤清洗后用于实验。

1.3 测定指标及方法

1.3.1 细胞 NO 含量 烟草细胞经 100 mmol · L⁻¹ NaCl 胁迫 0~48 h 后,参照 Planchet 等^[27]的方法采用 NO 荧光探针 DAF-2 DA(fluoro-phore 4,5-diaminofluorescein-2 diacetate),以及 Vitecek 等^[28]的方法采用改进的重氮化法(Griess)测定细胞 NO 含量。

(1)荧光法 收集胁迫处理的细胞 0.1 g 与 10 μmol · L⁻¹ DAF-2 DA 温浴 15 min 后,于荧光分光光度计(RF-5300PC; Shimadzu, Kyoto, Japan)上测定荧光强度,以未加 DAF-2 DA 染料的细胞样品的荧光强度作为背景值,扣除背景值的荧光强度代表细胞内的 NO 含量。

(2)重氮化法 参照 Vitecek 等^[28]的方法自制装置,测定细胞培养气相中的 NO。气泵将细胞悬浮培养三角瓶内的湿润空气以 40 mL · min⁻¹ 的流速泵入第一个试管,与其中的 Griess 试剂反应除去气相中的 HNO₂,气流继续通过装载强氧化剂 CrO₃ 的玻璃柱,气相中的 NO 被全部氧化成 NO₂,NO₂ 在流经第二个试管时被其中的 Griess 试剂吸收,测定第二个试管中 Griess 试剂的吸光度 OD₅₄₀ 值,根据制作的 NO₂ 标准曲线换算成 NO 含量。此方法可通过更换新的 Griess 试剂进行连续测定。

1.3.2 细胞耐渗透胁迫能力 通过测定经 100 mmol · L⁻¹ NaCl 胁迫及 SNP 和 cPTIO 预处理后 NaCl 胁迫 48 h 的烟草细胞活力、死亡率和再生能力来考察其耐渗透胁迫能力。其中,细胞活力的测定参照 Steponkus 等^[29]的方法采用 TTC(2,3,5-Tri-phenyltetrazolium chloride)染色测定;细胞死亡率参照 Yamamoto 等^[30]的方法采用 Evan's 染色测定;细胞再生能力采用 Ishikawa 等^[31]的方法略作修改,胁迫处理的细胞用 MS 液体培养基清洗 5 次后于 MS 固体培养基上生长,培养 7 d 后收集细胞称鲜重。细胞的活力、死亡率和再生能力 3 个指标最终均表示为对照样品的百分比。

1.3.3 细胞水势、渗透势和压力势 细胞水势(Ψ_w)用露点水势测定仪(Psypro Dew Point Microvolt-meter, Wescor, USA)测定,收集处理后的新鲜细胞迅速置于样品室(C-52, Wescor, USA),平衡 30 min 后读取记录数值。细胞渗透势(Ψ_s)用渗透仪

(FM-9J,上海医科大学,中国)测定,收集处理后的新鲜细胞研磨后离心,取上清测定渗透势。细胞压力势(Ψ_p)由公式 $\Psi_w = \Psi_s + \Psi_p$ 计算得出。

1.3.4 脯氨酸含量和酶活性 脯氨酸含量和酶活性均采用分光光度法测定,其中胞内脯氨酸含量的测定按照 Bates 等^[32]的方法,GDH 活性测定按照 Robinson 等^[33]的方法,P5CS 活性测定采用 Garcia-Rios 等^[34]的方法,精氨酸酶的活性测定按照 Alabadi 等^[35]的方法,对于 OAT,其酶提取按 Lutts 等^[36]的方法,其活性测定按 Charest 等^[37]的方法,PDH 的活性测定按 Sánchez 等^[38]的方法。其中涉及的蛋白质含量测定按照 Bradford^[39]的方法。

1.3.5 RT-PCR 按照试剂盒说明书进行细胞总 RNA 提取 (TRIZOL, Invitrogen) 和 RT-PCR (PCR Kit (AMV) Ver. 3.0, TaKaRa)。PCR 程序为:首先 94 °C 5 min,接着 94 °C 30 s,50 °C (GDH)[54 °C (OAT),52 °C (PDH),55 °C (ACTIN)] 30 s,72 °C 1 min,循环 30 次,之后 72 °C 5 min 并保持于 15 °C。PCR 产物琼脂糖凝胶电泳后其条带亮度用 Quantity One 软件 (Bio-Rad) 分析,条带相对强度 (ratio of band intensity, RBI) 为 GDH、OAT 和 PDH 与 ACTIN 的比值。引物设计见表 1。

2 结果与分析

2.1 NaCl 胁迫对烟草细胞内 NO 产生的影响

为了证实 NaCl 胁迫中是否有 NO 的参与,试验分别用荧光法和改良重氮化法检测了烟草胞内 NO 产生情况。图 1 中的荧光强度和 NO 含量均显示,NaCl 胁迫能诱导烟草细胞内 NO 的快速产生,并在 3 h 内有一个明显的产生峰,在 1 h 峰值处 NO 的荧光强度(图 1,A)和含量(图 1,B)分别是对照的 1.9 和 2.5 倍;在 NaCl 胁迫条件下,3 h 后细胞 NO 产生量持续上升,直到 48 h 都维持在一个较高水平,而对照则无显著变化。可见,NaCl 胁迫诱导了

表 1 基因及所用引物信息

Table 1 Genes and the primers used in RT-PCR

基因 Gene	引物序列 Primer	产物大小 Transcript
GDH	5'-TGAATGCCTTAGCACAGC-3' 5'-GCAACAATCTCCACCT-3'	463 bp
OAT	5'-AGGCTCAAACGCTCACTC-3' 5'-CAAGGGCAACAGCATCTC-3'	336 bp
PDH	5'-TTTTACGGCGTTTCTACC-3' 5'-TTCCATCTCAGCAAATCAC-3'	432 bp
ACTIN	5'-CGATTGAACACGGCATAG-3' 5'-ACCTCAGGACAGCGGAAC-3'	524 bp

烟草细胞内源 NO 的产生。

2.2 SNP 对烟草细胞耐渗透胁迫能力的影响

NaCl 的胁迫强度是依据不同浓度 NaCl 对烟草细胞的细胞活力、细胞死亡率和细胞再生能力的影响确定的。如图 2,A 显示,60~140 mmol · L⁻¹ NaCl 处理烟草细胞 48 h 后,随着 NaCl 浓度的增加,细胞活力(以 TTC 还原力表示)和细胞再生能力逐渐降低,细胞死亡率逐渐上升。在 100 mmol · L⁻¹ NaCl 处理下,上述 3 个生理指标的值均约为对照的 50%,100 mmol · L⁻¹ NaCl 相当于“半致死剂量”,是一个较合适的处理剂量。因此,后续实验使用 100 mmol · L⁻¹ 的 NaCl 作为胁迫强度,研究 SNP、

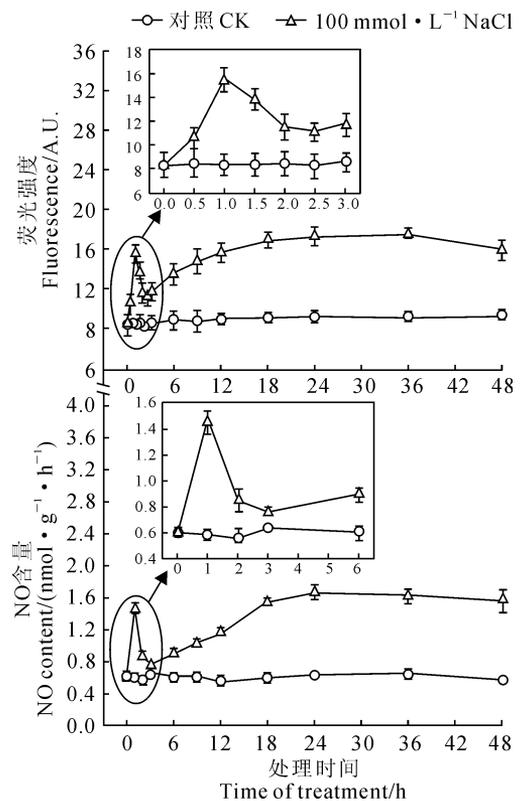


图 1 100 mmol · L⁻¹ NaCl 胁迫诱导的烟草细胞 NO 产生的动态变化

A. 荧光法检测,NO 荧光探针 DAF-2 DA 使用浓度为 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,箭头显示 0~3 h 内荧光强度的变化; B. 修改的重氮化法检测,箭头显示 0~6 h 内 NO 含量的变化;图中数值代表均值士标准差, $n \geq 6$;下同

Fig. 1 Time courses of NO in tobacco cultured cells induced by 100 mmol · L⁻¹ NaCl stress

A. The change of NO measured by 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NO sensitive detector DAF-2 DA, and the arrow shows the change within 0 to 3 h; B. The change of NO detected by modified Griess method, and the arrow shows the change within 0 to 6 h. Each bar represents means \pm SE of at least six measurements in two independent experiments; The same as below

cPTIO 及其复合处理的效应(图 2, B~D)。在此胁迫强度下, 50~200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NO 供体 SNP 均能显著提高烟草细胞的细胞活力, 并以 150 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SNP 效果最好, 并显著高于其余处理(图 2, B); 此时, 细胞活力和再生能力分别比对照显著增加 78.6% 和 63.2%, 细胞死亡率降低 48.5% (图 2, D); 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ cPTIO 能显著消除 SNP 的效应(图 2, C), 使 150 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SNP 预处理的细胞活力、再生能力、细胞死亡率均与对照无显著差异(图 2, D)。基于以上原因, 在后续实验中, SNP 的使用浓度确定为 150 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, cPTIO 的使用浓度确定为 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。实验结果显示, 外源 NO 能够提高盐胁迫下烟草细胞的细胞活力、细胞再生能力, 降低细胞死亡率, 这表明外源 NO 有助于提高烟草细胞的耐渗透胁迫能力。

2.3 SNP 对细胞渗透调节的影响

水势、渗透势和压力势是度量细胞渗透调节的 3 个重要生理指标, 为了证实 NO 是否影响烟草细胞的渗透调节能力, 我们对 150 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SNP 预处理细胞的水势、渗透势和压力势进行测定, 结果如图 3 所示。在正常培养条件下, 150 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SNP 处理能使烟草细胞的水势和渗透势降低, 而压力势基本维持不变, 处理时间与细胞水势 (R^2 为 0.939 8) 和渗透势 (R^2 为 0.944 3) 的变化呈明显正相关, 与压力势 (R^2 为 0.221 2) 的变化无明显相关性(图 3, A~C)。这说明外源 NO 能影响烟草细胞的渗透调节。在 100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 胁迫下, 细胞水势、渗透势和压力势均随胁迫时间的延长逐渐降低, 而 150 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SNP 预处理的细胞在胁迫 12 h 以后比 NaCl 胁迫细胞渗透势有更大幅度的降

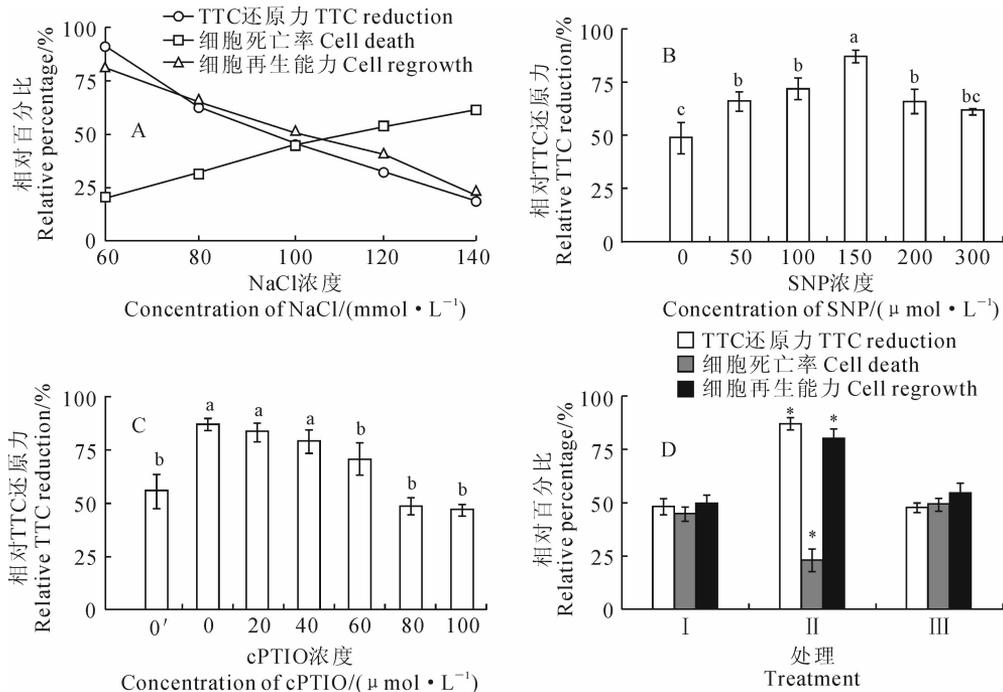


图 2 SNP 和 cPTIO 预处理对 100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 胁迫 48 h 后烟草细胞活力、死亡率和再生能力的影响
 相对百分率为各处理样品与对照样品的百分比, 细胞活力以 TTC 还原力表示; A. 不同浓度 NaCl 处理; B. 不同浓度 SNP 预处理; C. 不同浓度 cPTIO 和 150 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SNP 处理, 0' 表示无 SNP 处理(100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 单独处理);
 D. 150 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SNP 和 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ cPTIO 处理: I. NaCl; II. NaCl+SNP; III. NaCl+SNP+cPTIO。
 * 或不同字母标识表示处理与对照相比差异显著 ($P < 0.05$)

Fig. 2 Effects of SNP and cPTIO pretreatment on the vitality, death and regrowth of tobacco cells under 100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl stress for 48 h

Relative percentage was the ratio of values of treatment sample to control sample (the value as 100%). The vitality of cells showed as TTC(2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride) reduction; A. Effects of NaCl; B. Effects of NO donor sodium nitroprusside(SNP); C. Effects of NO scavenging agent cPTIO(2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetra-methylimidazole-1-oxyl-3-oxide) in 150 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SNP treatment cells, 0' means treatment without SNP(100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl only); D. Effects of 150 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SNP and 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ cPTIO; I. NaCl; II. NaCl+SNP; III. NaCl+SNP+cPTIO; * or different letters indicate significant difference between treatments and the control ($P < 0.05$)

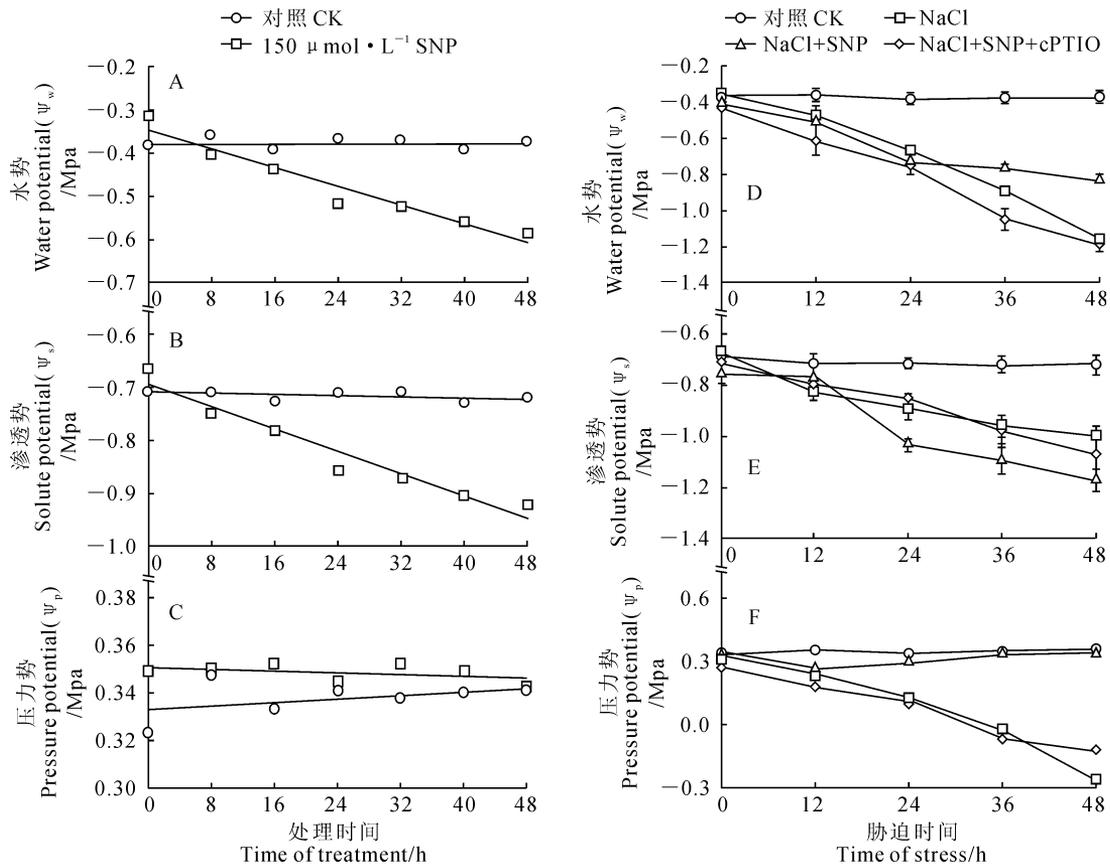


图 3 150 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SNP 和 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ cPTIO 对烟草细胞水势、渗透势和压力势的影响

A~C. 正常培养;D~F. 100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 胁迫

Fig. 3 Effects of 150 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SNP and 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ cPTIO pretreatments on water potential, solute potential and pressure potential of tobacco cultured cells

Water potential (Ψ_w , A and D), solute potential (Ψ_s , B and E) and pressure potential (Ψ_p , C and F) of tobacco cultured cells under normal culture condition (left part of the figure) and 100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl stress (right part of the figure)

低,延缓了水势降低,压力势得到了保持;SNP 影响烟草细胞渗透调节的效应能被 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ cPTIO 消除(图 3, D~F)。实验表明,外源 NO 能提高烟草细胞在盐胁迫下的渗透调节能力。

2.4 SNP 对细胞脯氨酸积累的影响

脯氨酸是重要的渗透调节物质,基于 SNP 能影响烟草细胞的渗透调节,我们对胞内脯氨酸含量进行了测定。结果显示,正常培养条件下,150 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SNP 促使烟草细胞渗透势的降低与胞内脯氨酸浓度增加呈正相关(R^2 为 0.980 3)(图 4, A)。在 NaCl 胁迫下,150 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SNP 预处理能显著提高烟草细胞脯氨酸积累量,48 h 时较未经 SNP 处理的 NaCl 胁迫细胞高出 25.9%。cPTIO 能消除 SNP 对细胞脯氨酸积累的增强效应(图 4, B)。以上结果说明,150 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SNP 预处理诱导了烟草细胞内脯氨酸的积累,这和细胞渗透势的降低密切相关,即增加胞内脯氨酸的积累是 NO 参与烟草细胞渗透调节的重要途径。

2.5 SNP 对脯氨酸代谢关键酶活性的影响

脯氨酸代谢受控于 5 个关键酶,即 GDH、P5CS、精氨酸酶、OAT 和 PDH^[24]。对于谷氨酸合成途径中的两个关键酶(GDH 和 P5CS),在 NaCl 胁迫下, GDH 活性快速上升,9 h 达到峰值;SNP 预处理能显著提高 GDH 活性,9 h 时较未经 SNP 处理的受胁迫细胞高 20.5%;cPTIO 对 SNP 诱导的 GDH 活性有抑制作用(图 5, A)。同时,NaCl 胁迫促使 P5CS 活性的增加,但 SNP 和 cPTIO 预处理对其活性没有显著影响($P > 0.05$)(图 5, B)。对于鸟氨酸合成途径中的两个关键酶(精氨酸酶和 OAT)活性都能被 NaCl 和 SNP 诱导,但在 0~12 h 内变化不显著,特别是 OAT 活性;但 12 h 后,两个酶的活性大幅上升,在 48 h 时精氨酸酶和 OAT 活性较未经 SNP 处理的受胁迫细胞分别高出 31.8%和 15.9%;NaCl 胁迫下受 SNP 增强的这两个酶的活性能被 cPTIO 消除(图 5, C, D)。另外,对于脯氨酸降解途径的关键酶(PDH),NaCl 胁迫下 PDH 的活性在 0

~12 h 内有一个小幅上升的过程,但在 12~48 h 一直呈下降的趋势;值得注意的是,SNP 处理的未胁迫细胞的 PDH 活性在 0~48 h 内均呈下降趋势;NaCl 胁迫下受 SNP 加强的 PDH 活性降低也能够被 cPTIO 消除(图 5, E)。以上结果说明,外源 NO 影响了烟草细胞脯氨酸代谢关键酶活性,除了 P5CS 外,总体上是提高合成酶活性,抑制降解酶活性;并且从被激活的酶活时序变化看,外源 NO 先后激活了谷氨酸合成途径和鸟氨酸合成途径,NO 通过对脯氨酸代谢酶活性的影响,进而促进盐胁迫下烟草细胞中脯氨酸的积累。

2.6 SNP 对脯氨酸代谢关键酶基因表达的影响

基于 SNP 对脯氨酸代谢关键酶活性的影响,为了进一步明确 SNP 是否对酶基因表达有影响,我们作了 RT-PCR 分析,结果如图 6 所示。在 NaCl 胁迫下,GDH 的表达量在胁迫前期高后期低,OAT 的

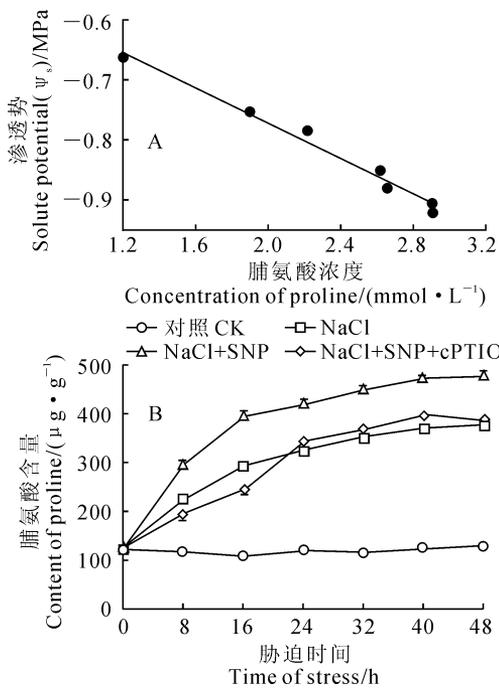


图 4 150 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SNP 和 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ cPTIO 对烟草细胞脯氨酸积累的影响

A. 正常培养条件;B. 100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 胁迫条件

Fig. 4 Effect of 150 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SNP and 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ cPTIO pretreatment on proline accumulation of tobacco cells under normal culture condition and

100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl stress

A. The positive correlation between the solute potential of cells and the SNP-induced proline accumulation under normal culture condition. B. Effects of SNP and 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ cPTIO pretreatments on proline accumulation in cells under 100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl stress

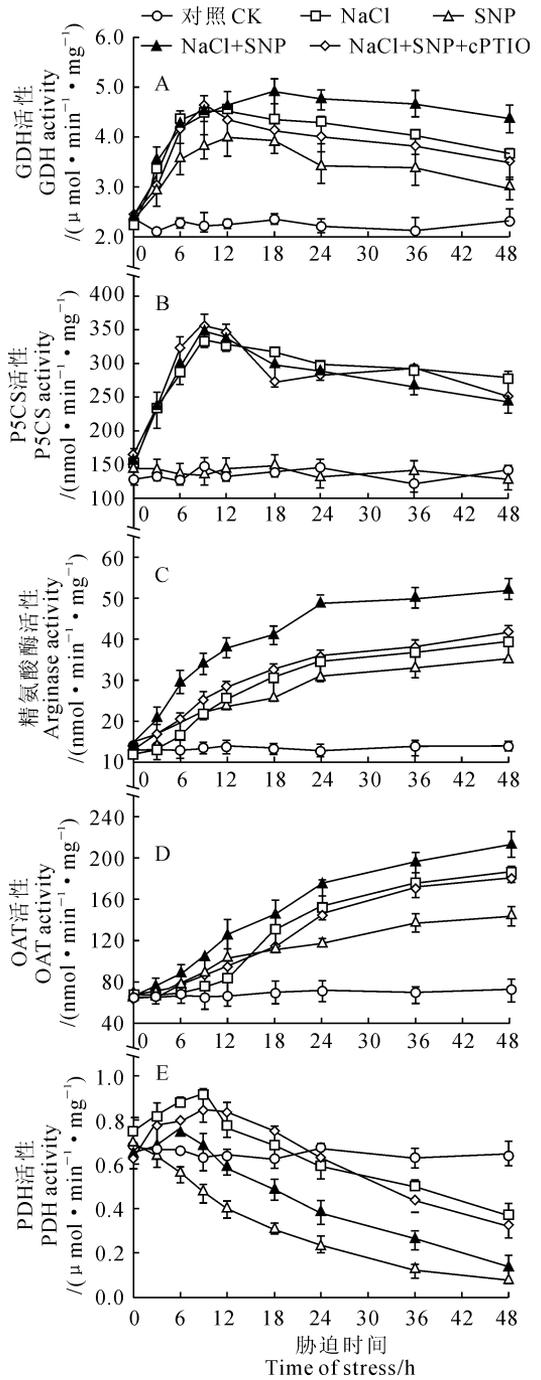


图 5 150 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ SNP 和 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ cPTIO 对 100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 胁迫下烟草细胞脯氨酸代谢关键酶活性的影响

GDH. 谷氨酸脱氢酶;P5CS. 吡咯啉-5-羧酸合成酶;OAT. 鸟氨酸转氨酶;PDH. 脯氨酸脱氢酶

Fig. 5 Effects of 150 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ SNP and 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ cPTIO pretreatment on the activity of proline metabolic enzymes in tobacco cultured cells under 100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl stress

GDH. Glutamate dehydrogenase;P5CS. Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase;OAT. ornithine aminotransferase; PDH. Proline dehydrogenase

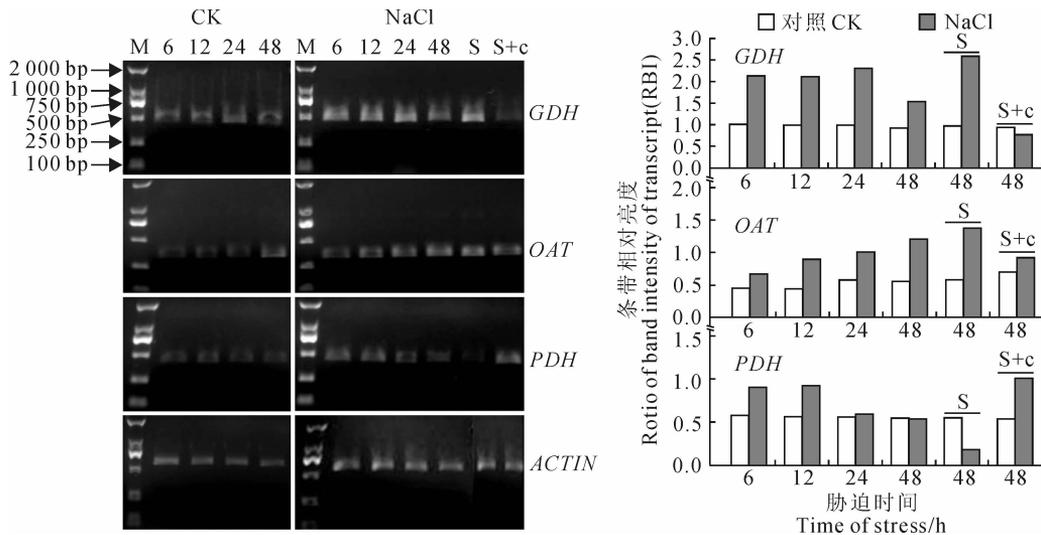


图 6 $150 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SNP 和 $80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ cPTIO 对烟草细胞 *GDH*、*OAT* 和 *PDH* 基因表达的影响
左边部分为 4 个基因(包括 *ACTIN* 基因)在正常培养条件和 $100 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 胁迫条件下的表达产物。

M. Marker; 6、12、24、48. 处理时间(h); S. SNP 预处理 48 h; S+c. SNP 和 cPTIO 预处理 48 h. 右边部分为 3 个基因表达产物的电泳条带相对亮度(RBI), 它们是 *GDH*、*OAT* 和 *PDH* 基因的表达产物亮度与 *ACTIN* 产物亮度的比值

Fig. 6 Effects of $150 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SNP and $80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ cPTIO pretreatment on expression of *GDH*, *OAT* and *PDH* in tobacco cultured cells under normal culture condition and $100 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl stress

The left part was the image of gel electrophoresis of transcripts. M. Marker; 6, 12, 24, 48. treatment time(h); S. SNP pretreatment for 48 h; S + c. both SNP and cPTIO pretreatment for 48 h. The right part was the ratio of band intensity of transcripts. (RBI), which was calculated as light intensity of *GDH*, *OAT* and *PDH* bands respectively divided by that of *ACTIN*

表达量前期低后期高, *PDH* 的表达量呈下降趋势, 这与它们的酶活性变化趋势相吻合(图 5, A、D、E)。SNP 预处理对脯氨酸代谢关键酶的基因表达有影响, 增强受胁迫细胞 *GDH* 和 *OAT* 的表达量, 减少 *PDH* 的表达量, 而 cPTIO 能抑制 SNP 对这 3 个基因表达的影响效应。实验结果表明, 外源 NO 对脯氨酸积累的影响是通过调控脯氨酸代谢关键酶活性及基因表达实现的。

3 讨 论

3.1 盐胁迫下烟草细胞内源 NO 的产生特征

作为信号分子, 应具备在需要时能迅速产生, 在不需时能迅速清除的特性, 从而起到信号传递的作用。NO 的 3 个生化特性恰好满足作为信号分子的条件, 一是产生途径的多样性, 有酶催化途径和非酶途径; 二是半衰期小于 6 s, 其直接作用的范围仅限于产生细胞及邻近部位^[40]; 三是高反应活性, 由于有 1 个未配对电子, 易与其它物质发生氧化反应形成氮氧化物, 因此, NO 又可间接地以氮氧化物形式作用于 DNA、蛋白质和脂膜^[41]。本实验结果显示, 在 NaCl 胁迫早期烟草细胞有一小的 NO 产生峰, 约为正常培养细胞的 2 倍; 随着胁迫时间的延

长, 出现第二个产生峰, 一直到 48 h 都保持较高水平(图 1)。这与已有文献报道的不同植物在不同逆境胁迫下 NO 的产生时间从几分钟到几小时^[42], 甚至数小时^[43]的结果相吻合。这反映在不同环境刺激下, NO 的产生表现出时序多样性特征, 通过这种多样性特征使植物体能识别不同的环境信号, 进而采取相应的策略。

植物中 NO 的来源可以分为两类, 精氨酸依赖途径和亚硝酸依赖途径^[44-45]。两类途径存在多条途径, 多种调控酶, 甚至无酶催化, 因此 NO 在植物中的产生方式远比动物中复杂得多。在精氨酸依赖途径中, 至今还未分离到植物的 NOS^[7]。而且近年来的研究又发现, 在精氨酸依赖途径中, 很可能还存在一条多胺途径^[8]。例如, 精胺、亚精胺能诱导拟南芥幼苗迅速产生 NO, 合成部位在根尖的伸长区和初生叶, 特别是叶脉和毛状体上, 腐胺对 NO 产生的影响很小^[46]; 而另外的实验结果表明腐胺能诱导南洋杉胚性细胞 NO 的合成, 对悬浮细胞影响很小; 不管是胚性细胞还是悬浮细胞, 精胺和亚精胺均抑制 NO 的生成^[47]。本实验中虽然证实了 NaCl 胁迫下能诱导烟草细胞内源性 NO 的产生, 但未对其中可能的途径和机制做进一步的研究。前人的研究表

明,烟草叶肉细胞经高渗及盐胁迫处理诱发了 NO 生成^[48],植物抗盐性的形成与 NO 合酶 NOS 有关^[49],由此推测精氨酸依赖途径中的 NOS 催化途径可能是盐胁迫下 NO 产生的重要机制。但 NO 的产生可能是一个多途径的结果,只是在某种条件下某一途径占优势。大多数情况下,NOS 活性主要与抗病反应相关,亚硝酸依赖途径主要与非生物胁迫相关,但亚硝酸依赖途径中的硝酸还原酶活性有时也会与抗病反应相关。因此,要弄清楚盐胁迫下 NO 的产生机制还有待系统性的研究。

NO 具有双重作用^[50],少量对植物起信号分子的作用,过量则有毒害作用。本实验结果显示 NaCl 胁迫下烟草细胞内源 NO 的产生呈现“双峰”模式。这一现象与早先本实验室关于 Cd²⁺ 胁迫诱导的 H₂O₂ 产生模式相类似^[51]。H₂O₂ 产生的“双峰”模式已被公认,但在植物中 NO 的产生是否具有典型的“双峰”模式还未见报道,这可能与先前研究中所关注的 NO 产生要么是短时间跨度,要么是长时间跨度有关,本实验结果还需要进一步证实。我们推测第一个产生峰可能与 NO 的信号功能有关,第二个产生峰可能代表随着 NaCl 胁迫时间延长产生氧化胁迫而导致的 NO 积累,两个产生峰可看作是 NO 双重作用的具体体现。

3.2 外源 NO 对烟草细胞渗透胁迫伤害的缓解作用

由于至今未分离到植物源 NOS,生物样品中 NO 的检测也较为困难,对植物 NO 功能的研究主要通过外施 NO 的手段^[7],SNP 常作为外源 NO 的良好释放剂^[52]。植物中 NO 有促进生长和抗衰老的作用,还能影响离子转运,如阻断细胞外向 K⁺ 通道^[53],加强 Fe 向叶绿体的转运,合成叶绿素 II,削除玉米 Fe 缺乏症。但是在高浓度的 Fe 离子胁迫下,NO 通过调控转铁蛋白使 Fe 区域化在线粒体和液泡中,以此来减轻 Fe 积累带来的氧化胁迫^[54]。本研究结果显示,SNP 预处理能显著提高烟草细胞活力和再生能力,降低细胞死亡率,缓解由 NaCl 导致的胁迫伤害,SNP 的这种影响效应能被 NO 专一清除剂 cPTIO 清除(图 2),这表明外源 NO 能增加细胞的渗透胁迫耐性,结果与前人报道的 NO 能减轻盐胁迫对植物的氧化性损伤结果相吻合^[10]。SNP 一方面具有很好的抗氧化功能,在逆境胁迫下能提高植物体内的抗氧化酶活性^[11-12],增加体内的抗氧化剂含量^[13],从而增强细胞的抗氧化能力;另一方面,在本实验中,150 μmol · L⁻¹ SNP 显著影响了

烟草细胞的渗透势和水势,表明 SNP 确实参与了盐胁迫导致的细胞渗透调节,这与我们之前的实验结果相一致^[55]。SNP 处理导致了细胞更低的渗透势,缓解细胞水势降低,这有利于细胞的膨压得到一定程度的保持以减轻渗透胁迫引发的质壁分离(图 3)。这表明烟草细胞的渗透胁迫耐性与其渗透调节能力的增强有关。

3.3 渗透胁迫下 NO 对细胞脯氨酸代谢的调控

脯氨酸在植物细胞中是一个主要的渗透调节物质。它一方面能够防止细胞失水,保持膨压;另一方面能在蛋白质周围形成水化层,防止功能蛋白的氧化降解;此外在胁迫条件下也作为底物供给氮代谢。多个研究表明脯氨酸参与植物渗透胁迫响应,而 NO 对脯氨酸代谢有调控作用^[56-58],本实验结果与之一致。但在 Xiong 等^[19]的实验中,虽然干旱诱导了水稻内源 NO 和脯氨酸的积累,但 SNP 和 cPTIO 处理不会影响脯氨酸积累,实验未证明 NO 与脯氨酸积累的必然性联系,但这也有可能是他们在进行 SNP 和 cPTIO 处理时采取叶面喷施的方式,叶片的吸收效率影响了药剂功效的发挥;López-carrión 等^[22]也报道 SNP 和 NaCl 处理导致蕃茄叶片脯氨酸含量的减少。而本实验结果表明,SNP 处理能使烟草细胞增加 20% 的脯氨酸积累,同时 cPTIO 能清除 SNP 的作用(图 4),与上述报道不一致。这有可能是 SNP 处理浓度不同所致,López-carrión 等^[22]的 SNP 使用浓度(250~1 000 μmol · L⁻¹)远高于本实验,事实上,本实验中的 200~300 μmol · L⁻¹ SNP 对烟草细胞活力(图 2, B)和脯氨酸积累(结果未显示)的促进作用就不如 150 μmol · L⁻¹ SNP。所以,SNP 增强细胞的抗渗透胁迫能力与脯氨酸积累有重要关系。

多个环境因子,如盐、干旱等导致的渗透胁迫会影响脯氨酸代谢酶活性和基因的表达水平。SNP 或者 NO 如何影响脯氨酸积累,情况较为复杂,原因是植物脯氨酸代谢由多条途径控制。先前的研究工作很少对代谢途径进行综合的分析和评价,有的表明 SNP 处理可同时提高 P5CS 活性和降低 PDH 活性^[20-21,23],有的表明 SNP 处理仅影响 P5CS 活性^[18]或 P5CS 基因表达^[15],López-carrión 等^[22]报道由 SNP 和 NaCl 处理引起的脯氨酸含量降低是 PDH 活性受抑制而 P5CS 和 OAT 活性受激活的结果。本试验在 SNP 对脯氨酸代谢酶影响方面的结果与上述研究一致,但还发现 SNP 对 NaCl 胁迫下烟草细胞 GDH、精氨酸酶活性也有促进作用。本实验中

SNP 处理能提高 20% 的 GDH 活性、50% 的精氨酸酶活性和 30% 的 OAT 活性,降低 50% 的 PDH 活性,而对 P5CS 活性几乎无影响,同时其对 GDH、OAT 和 PDH 基因表达的影响结果与酶活性表现相一致。并且本实验还发现,SNP 是顺序激活合成途径关键酶,谷氨酸合成途径在胁迫前期起作用,鸟氨酸合成途径在胁迫后期起作用,这与我们先前在烟草和玉米中的实验结果相类似^[55,59]。SNP 诱导的脯氨酸积累可能是顺序激活合成途径关键酶,包括谷氨酸途径的 GDH,鸟氨酸途径的精氨酸酶和 OAT,以及抑制降解途径的 PDH 活性的综合结果。NO 对脯氨酸积累的促进作用初步表明是通过调控代谢关键酶的基因表达实现的,但本实验中只对酶的体外活性做了分析,并未对相关酶在蛋白表达

水平上做检测,已有实验证明干旱等渗透胁迫处理能诱导 Leu 蛋白、水孔蛋白、组氨酸蛋白激酶的表达^[60]。蛋白质组分析表明,盐胁迫下离子通道蛋白大幅增加^[61]。因此,下一步值得分析 NO 对脯氨酸代谢关键酶蛋白表达的影响,进一步阐释 NO 对酶的调控是否有翻译后调控,或者比较基因水平调控和蛋白水平调控的侧重点和差异性。

综上所述,本研究揭示了 NO 通过影响烟草细胞的渗透调节能力来应对 NaCl 诱导的渗透胁迫,NO 对脯氨酸代谢的调控可能是烟草细胞应答和适应渗透胁迫的重要机制。将来的研究需要阐明 NO 调控脯氨酸代谢的信号传导途径,包括 NO 与渗透胁迫信号受体的相互作用等。

参考文献:

- [1] WAKEEL A, ASIF A R, PITANN B, *et al.* Proteome analysis of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) elucidates constitutive adaptation during the first phase of salt stress[J]. *J. Plant Physiol.*, 2011, 168: 519–526.
- [2] LIU Y H, XU S, LING T F, *et al.* Heme oxygenase/carbon monoxide system participates in regulating wheat seed germination under osmotic stress involving the nitric oxide pathway[J]. *J. Plant Physiol.*, 2010, 167: 1 371–1 379.
- [3] WANG Y C, GAO C Q, LIANG Y N, WANG C, *et al.* A novel bZIP gene from *Tamarix hispida* mediates physiological responses to salt stress in tobacco plants[J]. *J. Plant Physiol.*, 2010, 167: 222–230.
- [4] MARCINSKA I, CZYCYLO-MYSZA I, SKRZYPEK E, *et al.* Alleviation of osmotic stress effects by exogenous application of salicylic acid or abscisic acid on wheat seedlings[J]. *Int. J. Mol. Sci.*, 2013, 14: 13 171–13 193.
- [5] ARASIMOWICZ M, FLORYSZAK-WIECZOREK J. Nitric oxide as a bioactive signalling molecule in plant stress responses[J]. *Plant Sci.*, 2007, 172: 876–887.
- [6] SIDDIQUI M H, MOHAMED H, AL-WHAIBI M H, *et al.* Role of nitric oxide in tolerance of plants to abiotic stress[J]. *Protoplasma*, 2010, DOI:10.1007/s00709-010-0206-9.
- [7] HANCOCK J T. NO synthase? Generation of nitric oxide in plants[J]. *Periodicum Biologorum*, 2012, 114(1): 19–24.
- [8] BESSON-BARD A, PUGIN A, WENDEHENNE D. New insights into nitric oxide signaling in plants[J]. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 2008, 59: 21–39.
- [9] MATA C G, LAMATTINA L. Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress[J]. *Plant Physiol.*, 2001, 126: 1 196–1 204.
- [10] ZHAO L, ZHANG F, GUO J, *et al.* Nitric oxide functions as a signal in salt resistance in the calluses from two ecotypes of reed[J]. *Plant Physiol.*, 2004, 134: 849–857.
- [11] SIMAEI M, KHAVARI-NEJAD R A, SAADATMAND S, *et al.* Effects of salicylic acid and nitric oxide on antioxidant capacity and proline accumulation in *Glycine max* L. treated with NaCl salinity[J]. *Afri J. Agri. Res.*, 2011, 6(16): 3 775–3 782.
- [12] NALOUSHI A M, AHMADIYAN S, HATAMZADEH A, *et al.* Protective role of exogenous nitric oxide against oxidative stress induced by salt stress in bell-pepper (*Capsicum annum* L.) [J]. *American-Eurasian J. Agric. Environ Sci.*, 2012, 12(8): 1 085–1 090.
- [13] LIN Y, LIU Z Z, SHI Q H, *et al.* Exogenous nitric oxide (NO) increased antioxidant capacity of cucumber hypocotyl and radicle under salt stress[J]. *Sci. Horticult.*, 2012, 142: 118–127.
- [14] GOULD K S, LAMOTTE O, KLINGUER A, *et al.* Nitric oxide production in tobacco leaf cells: a generalized stress response[J]. *Plant Cell Environ.*, 2003, 26: 1 851–1 862.
- [15] HIEN D T, JACOBS M, ANGENON G, *et al.* Proline accumulation and Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase gene properties in three rice cultivars differing in salinity and drought tolerance[J]. *Plant Sci.*, 2003, 165: 1 059–1 068.

- [16] GU W Y(谷文英), LI X ZH(李兴正), QI X M(祈新梅), *et al.* Effects of exogenous nitric oxide on the growth and osmotic regulation substances of *Cichorium intybus* L. under salt stress[J]. *Chin. J. Ecol.* (生态学杂志), 2013, **32**(3): 615–620(in Chinese).
- [17] ZHU J F(朱金方), LU ZH H(陆兆华), XIA J B(夏江宝), *et al.* Changes of osmotic adjusting substances in leaves of *Tamarix chinensis* seedlings under salt and drought stress[J]. *Acta Bot. Boreal.-Occident. Sin.* (西北植物学报), 2013, **33**(2): 357–363(in Chinese).
- [18] FILIPPOU P, ANTONIOU C, FOTOPOULOS V. The nitric oxide donor sodium nitroprusside regulates polyamine and proline metabolism in leaves of *Medicago truncatula* plants[J]. *Free Radic. Biol. Med.*, 2013, **56**: 172–183.
- [19] XIONG J, ZHANG L, FU G F, *et al.* Drought-induced proline accumulation is uninvolved with increased nitric oxide, which alleviated drought stress by decreasing transpiration in rice[J]. *J. Plant Res.*, 2011, DOI:10.1007/s10265-011-0417-y.
- [20] WANG Y S, LUO Z S, DU R X, *et al.* Effect of nitric oxide on antioxidative response and proline metabolism in banana during cold storage[J]. *J. Agric. Food Chem.*, 2013, DOI:10.1021/jf401447y.
- [21] ZHAO M G, CHEN L, ZHANG L L, *et al.* Nitric reductase-dependent nitric oxide production is involved in cold acclimation and freezing tolerance in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiol.*, 2009, **151**: 755–767.
- [22] LOPEZ-CARRION A I, CASTELLANO R, ROSALES M A, *et al.* Role of nitric oxide under saline stress: implications on proline metabolism[J]. *Biol. Plantarum*, 2008, **52**: 587–591.
- [23] FAN H F, DU C X, GUO S R. Effect of nitric oxide on proline metabolism in cucumber seedlings under salinity stress[J]. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 2012, **137**: 127–133.
- [24] SZABADOS L, SAVOURE A. Proline: a multifunctional amino acid[J]. *Trends Plant Sci.*, 2009, **15**: 89–97.
- [25] VERSLUES P E, SHARMA S. Proline metabolism and its implications for plant-environment interaction[J]. *Arabidopsis Book*, 2010, DOI:10.1199/tab.0140.
- [26] LI ZH G(李忠光), GONG M(龚明). Mechanical stimulation-induced heat tolerance of suspension culture cells in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) and its relation to H₂O₂[J]. *Plant Physiol. Communi.* (植物生理学通讯), 2008, **44**: 42–44(in Chinese).
- [27] PLANCHET E, KAISER W M. Nitric oxide(NO) detection by DAF fluorescence and chemiluminescence: a comparison using abiotic and biotic NO sources[J]. *J. Exp. Bot.*, 2006, **57**: 3 043–3 055.
- [28] VITECEK J, REINOHL V, JONES R L. Measuring NO production by plant tissues and suspension cultured cells[J]. *Mol. Plant*, 2008, **1**: 270–284.
- [29] STEPONKUS P L, LANPHEAR F O. Refinement of the triphenyl tetrazolium chloride method of determining cold injury[J]. *Plant Physiol.*, 1976, **42**: 1 423–1 426.
- [30] YAMAMOTO A, KATOU S, YOSHIOKA H, *et al.* Involvement of nitric oxide generation in hypersensitive cell death induced by elicitor in tobacco cell suspension culture[J]. *J. Gen. Plant Pathol.*, 2004, **70**: 85–92.
- [31] ISHIKAWA M, ROBERTSON B A J, GUSTA L V. Comparison of viability tests for assessing cross-adaptation to freezing, heat and salt stresses induced by abscisic acid in bromegrass (*Bromus inermis* Leyss) suspension cultured cells[J]. *Plant Sci.*, 1995, **107**: 83–93.
- [32] BATES L S, WALDREN R P, TEARE I D. Rapid determination of free proline for water stress studies[J]. *Plant Soil*, 1973, **39**: 205–207.
- [33] ROBINSON S A, SLADE A P, FOX G G, *et al.* The role of glutamate dehydrogenase in plant nitrogen metabolism[J]. *Plant Physiol.*, 1991, **95**: 509–516.
- [34] GARCIA-RIOS M, FUJITA T, LAROSA P C, *et al.* Cloning of a polycistronic cDNA from tomato encoding gamma-glutamyl kinase and gamma-glutamyl phosphate reductase[J]. *PNAS*, 1997, **94**: 8 249–8 254.
- [35] ALABADI D, AGUERO M S, PEREZ-AMADOR M A, *et al.* Arginase, arginine decarboxylase, ornithine decarboxylase, and polyamines in tomato ovaries[J]. *Plant Physiol.*, 1996, **112**: 1 237–1 244.
- [36] LUTTS S, MAJERUS V, KINET J M. NaCl effects on proline metabolism in rice (*Oryza sativa*) seedlings[J]. *Physiol. Plantarum*, 1999, **105**: 450–458.
- [37] CHAREST C, PHAN C T. Cold acclimation of wheat (*Triticum aestivum*): properties of enzymes involved in proline metabolism[J]. *Physiol. Plantarum*, 1990, **80**: 159–168.
- [38] SÁNCHEZ E, LOPEZ-LEFEBRE L R, GARCIA P C, *et al.* Proline metabolism in response to highest nitrogen dosages in green bean plants (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Strike)[J]. *J. Plant Physiol.*, 2001, **158**: 593–598.
- [39] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Anal. Biochem.*, 1976, **72**: 248–254.
- [40] NEILL S J, DESIKAN R, HANCOCK J. Nitric oxide signaling in plants[J]. *New Phytol.*, 2003, **159**: 11–35.

- [41] BETHKE P C, BADGER M R, JONES R L. Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues[J]. *Plant Cell*. 2004, 16:332–341.
- [42] PARIS R, LAMATTINA L, CASALONGUE CA. Nitric oxide promotes the wound-healing response of potato leaflets[J]. *Plant Physiol. Biochem.*, 2007, 45:80–86.
- [43] ZHAO L, HE J X, WANG X M, *et al.* Nitric oxide protects against polyethylene glycol-induced oxidative damage in two ecotypes of reed suspension cultures[J]. *J. Plant Physiol.*, 2008, 165:182–191.
- [44] WILSON I D, NEILL S J, HANCOCK J T. Nitric oxide synthesis and signalling in plants[J]. *Plant Cell Environ.*, 2008, 31(5):622–631.
- [45] COURTOIS C, BESSON A, DAHAN J, *et al.* Nitric oxide signaling in plants; interplays with Ca^{2+} and protein kinases[J]. *J. Exp. Bot.*, 2008, 59(2):155–163.
- [46] TUN N N, SANTA-CATARINA C, BEGUM T, *et al.* Polyamines induce rapid biosynthesis of nitric oxide(NO) in *Arabidopsis thaliana* seedlings[J]. *Plant Cell Physiol.*, 2006, 47(3):346–354
- [47] SILVEIRA V, SANTA-CATARINA C, *et al.* Polyamine effects on the endogenous polyamine contents, nitric oxide release, growth and differentiation of embryogenic suspension cultures of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze[J]. *Plant Sci.*, 2006, 171:91–98.
- [48] GOULD K S, LAMOTTE O, KLINGUER A, *et al.* Nitric oxide production in tobacco leaf cells; a generalized stress response[J]. *Plant Cell Environ.*, 2003, 26:1 851–1 862.
- [49] ZHAO M G, TIAN Q Y, ZHANG W H. Nitric oxide synthase-dependent nitric oxide production is associated with salt tolerance in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiol.*, 2007, 144(1):206–217.
- [50] BELIGNI M V, LAMATTINA L. Nitric oxide in plants; the history is just beginning[J]. *Plant Cell Envir*, 2001, 24:267–278.
- [51] WEN J F, DENG M H, GONG M. Cd^{2+} stress induces two waves of H_2O_2 accumulation associated with ROS-generating system and ROS-scavenging system in cultured tobacco cells[J]. *Austra. J. Crop Sci.*, 2012, 6(5):846–853.
- [52] MURGIA I, DE PINTO M C, DELLEDONNE M, *et al.* Comparative effects of various nitric oxide donors on ferritin regulation, programmed cell death, and cell redox state in plant cells[J]. *J. Plant Physiol.*, 2004, 161:777–783.
- [53] SOKOLOVSKI S, BLATT M R. Nitric oxide block of outward-rectifying K^+ channels indicates direct control by protein nitrosylation in guard cells[J]. *Plant Physiol.*, 2004, 136:4 275–4 284.
- [54] GRAZIANO M, BENIGNI M V, LAMATTINA L. Nitric oxide improves internal iron availability in plants[J]. *Plant Physiol.*, 2002, 130:1 852–1 859.
- [55] KE X, CHENG Z Q, MA W G, *et al.* Nitric oxide enhances osmoregulation of tobacco(*Nicotiana tobacum* L.) cultured cells under phenylethanoic glycosides(PEG) 6000 stress by regulating proline metabolism[J]. *Afr. J. Biotech.*, 2013, 12(11):1 257–1 266.
- [56] PEREZ-ALFOCEA F, LARHER F. Sucrose and proline accumulation and sugar flux in tomato leaf discs affected by NaCl and polyethylene glycol 6000 iso-osmotic stresses[J]. *Plant Sci.*, 1995, 107:9–15.
- [57] YANG SH L(杨双龙), GONG M(龚 明). Effects of nitric oxide on proline accumulation and metabolic pathways in maize(*Zea mays* L.) seedlings[J]. *Plant Physiol. Communi.* (植物生理学通讯), 2009, 45(8):781–784(in Chinese).
- [58] SUCRE B, SUAREZ N. Effect of salinity and PEG-induced water stress on water status, gas exchange, solute accumulation, and leaf growth in ipomoeaes-caprae[J]. *Environ Exp. Bot.*, 2011, 70:192–203.
- [59] YANG S L, LAN S S, GONG M. Hydrogen peroxide-induced proline and metabolic pathway of its accumulation in maize seedlings[J]. *J. Plant Physiol.*, 2009, 166:1 694–1 699.
- [60] UEHLEIN N, LOVISOLO C, SIEFRITZ F, *et al.* The tobacco aquaporin NtAQP1 is a membrane CO_2 pore with physiological functions[J]. *Nature*, 2003, 425:734–736.
- [61] WAKEEL A, ASIF A R, PITANN B, *et al.* Proteome analysis of sugar beet(*Beta vulgaris* L.) elucidates constitutive adaptation during the first phase of salt stress[J]. *J. Plant Physiol.*, 2011, 168:519–526.