

外源脯氨酸对盐胁迫下甜瓜脯氨酸代谢的影响

颜志明^{1,2,3}, 冯英娜^{1,3}, 韩艳丽¹, 魏跃^{1,3}, 郭世荣²

(1 江苏农林职业技术学院, 江苏镇江 212400; 2 南京农业大学 园艺学院, 南京 210095; 3 江苏现代园艺工程技术中心, 江苏镇江 212400)

摘要:为探明外源脯氨酸对盐胁迫下甜瓜脯氨酸代谢的影响,以甜瓜品种‘雪美’为材料采用营养液栽培,对盐胁迫(100 mmol · L⁻¹ NaCl)、盐胁迫下添加外源脯氨酸(100 mmol · L⁻¹ NaCl + 0.2 mmol · L⁻¹ Proline)以及对照 3 种处理后甜瓜幼苗叶片脯氨酸(Pro)含量、吡咯啉-5-羧酸合成酶(P5CS)、鸟氨酸转氨酶(OAT)和脯氨酸脱氢酶(ProDH)活性进行测定,并对 OAT 和 ProDH 基因进行克隆及半定量表达分析。结果显示:与对照相比较,盐胁迫条件下甜瓜幼苗叶片内 Pro 含量显著增加, P5CS 活性增幅大于 OAT 活性, OAT 基因表达量大部分时段内没有增加, ProDH 活性下降, ProDH 基因表达量减少;盐胁迫下添加外源脯氨酸进一步使幼苗叶片内 Pro 含量增加、OAT、ProDH 活性提高、P5CS 活性降低,并且使 OAT 基因表达量迅速增加、ProDH 基因表达量先增加后回落。研究表明,盐胁迫条件下,甜瓜幼苗体内脯氨酸积累主要是通过增强脯氨酸的谷氨酸合成途径和抑制脯氨酸降解来实现;适量外源脯氨酸可以增强盐胁迫幼苗脯氨酸的鸟氨酸合成途径,但对谷氨酸合成途径有一定的抑制作用;通过调节合成和降解 2 种代谢途径进一步提高了脯氨酸含量,从而增强甜瓜幼苗耐盐胁迫能力。

关键词:脯氨酸;盐胁迫;甜瓜;谷氨酸途径;鸟氨酸途径

中图分类号: Q945.78; Q789

文献标志码: A

Effects of Exogenous Proline on Proline Metabolism of *Cucumis melo* under Salt Stress

YAN Zhiming^{1,2,3}, FENG Yingna¹, HAN Yanli¹, WEI Yue¹, GUO Shirong²

(1 Jiangsu Polytechnic College of Agriculture and Forestry, Zhenjiang, Jiangsu 212400, China; 2 College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 3. Jiangsu Engineering and Technology Center for Modern Horticulture, Zhenjiang, Jiangsu 212400, China)

Abstract: The melon (*Cucumis melo* L.) variety ‘Xuemei’ was nutrient solution cultured to investigate the effect of exogenous proline on proline metabolism under salt stress. The content of proline, Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthase (P5CS) enzyme activity, ornithine-oxo-acid transaminase (OAT) enzyme activity, proline dehydrogenase (ProDH) enzyme activity in leaves were measured under salt stress, addition of exogenous proline under salt stress and the control respectively, cloning and semi-quantitative expression analysis of OAT and ProDH gene were also undertaken. The results showed that compared with the control, the content of proline in the leaves of the seedlings increased significantly under salt stress. The increase of P5CS enzyme activity was larger than that of OAT enzyme, the amount of OAT gene expression did not increase in the majority of time period. ProDH enzyme activity decreased and the amount of ProDH gene expression also decreased in the leaves of melon seedling under salt stress. With the addition of exogenous proline under salt stress. The content of proline further increased, the activities of OAT and ProDH enzyme improved and activity of P5CS enzyme decreased, the amount of OAT expression increased rapidly, the amount of ProDH expression increased at first and then fell. This result suggested that proline accumulation

收稿日期: 2015-06-10; 修改稿收到日期: 2015-08-21

基金项目: 江苏省自然科学基金(BK20131243); 江苏省农业三新工程(SXGC[2015]311); 青蓝工程(苏教师[2014]23)

作者简介: 颜志明(1977—), 男, 博士, 副教授, 主要从事蔬菜栽培与分子生理研究。E-mail: yanzming@sohu.com

in the melon seedlings was mainly through the increase of glutamate pathway and inhibition of proline degradation under salt stress. The adequate exogenous proline under salt stress could enhance the ornithine pathway but had a certain inhibitory effect on the glutamate pathway, and proline was further accumulated to enhance salt tolerance of melon seedling by regulating the synthesis and degradation, two kinds of metabolism ways.

Key words: proline; salt stress; *Cucumis melo* L.; glutamate pathway; ornithine pathway

甜瓜(*Cucumis melo* L.)又名香瓜,为葫芦科一年生蔓性植物,果实香甜富含糖、淀粉、矿物质及维生素等营养物质,是一种深受人们喜爱、种植面积较大瓜果。由于多在温室采用无土栽培技术,易导致栽培基质中盐分含量增加,而甜瓜是对盐敏感植物,盐渍化造成的盐胁迫伤害能极大地抑制甜瓜生长,造成甜瓜产量和品质降低^[1]。研究表明植物受到盐渍时体内会合成较高含量的脯氨酸(Pro),这些积累的内源脯氨酸可以减轻盐胁迫对植物的伤害^[2]。植株体内脯氨酸合成途径主要有两条,分别为谷氨酸(Glu)途径和鸟氨酸(Orn)途径,其中吡咯啉-5-羧酸合成酶(P5CS)是谷氨酸途径的关键酶,鸟氨酸转氨酶(OAT)是鸟氨酸途径的关键酶,而脯氨酸脱氢酶(ProDH)则是脯氨酸降解反应的限速酶^[3]。许多研究^[4-7]表明当植物本身产生的脯氨酸不足以消除逆境伤害时,可以使用外源脯氨酸来缓解逆境伤害,外源脯氨酸在增强作物对于干旱、盐、高温等逆境胁迫耐性方面具有重要的作用。

作者曾在 $1\times$ Hoagland 营养液中培养甜瓜幼苗,生长正常(图 1, A),添加 $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{NaCl}$ 的 $1\times$ Hoagland 营养液中的甜瓜幼苗植株矮小、生长不良,受盐害症状较为严重(图 1, B),而在添加

$100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{NaCl}+0.2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 脯氨酸的 $1\times$ Hoagland 营养液中的甜瓜幼苗生长基本正常、受盐害症状明显减轻(图 1, C)。针对这种现象,作者进一步研究了外源脯氨酸对盐胁迫下甜瓜幼苗生长、光合作用、光合荧光参数、叶绿素含量及活性氧物质含量的影响^[8-10],初步探讨了外源脯氨酸缓解水培甜瓜盐胁迫伤害的生理机制。在以上研究的基础上,本试验拟探讨盐胁迫下添加外源脯氨酸后甜瓜幼苗叶片内脯氨酸含量和 P5CS、OAT、ProDH 活性及相关基因表达的变化,旨在阐明外源脯氨酸对盐胁迫下甜瓜脯氨酸代谢的影响,进一步了解外源脯氨酸缓解甜瓜盐胁迫伤害的生理和分子调节机制,为植物耐盐胁迫研究提供重要信息。

1 材料和方法

1.1 试验材料及处理

试验于 2014 年 5 月在江苏农林职业技术学院园艺试验基地连栋温室内进行,供试甜瓜品种为‘雪美’^[9]。试验以 $1\times$ Hoagland 营养液为基础,共设置盐胁迫($100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{NaCl}$)、外源脯氨酸($100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{NaCl}+0.2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ proline)2 个处理和对照($1\times$ Hoagland 营养液),甜瓜幼苗定植于相应栽植槽中,均采用气泵间歇通气培养,每 2 d 换 1 次营养液。分别取各处理和对照植株第 0、2、4、6、8 天真叶进行各项指标的测定,试验 3 次重复。

幼苗嫩叶于液氮中速冻保存用于总 RNA 提取。Trizol 试剂盒、DNaseI 分别为美国 Invitrogen 和 BI-PEC 公司产品, M-MLV 反转录酶、pMD19-T 载体、Taq 酶等为 TaKaRa 公司产品, DNA 纯化试剂盒、宿主菌大肠杆菌 TOP10 购自天根生化科技公司。

1.2 脯氨酸含量和 P5CS、OAT、ProDH 活性测定

脯氨酸含量采用酸性茚三酮法测定^[11]。P5CS 活性测定参照 Song 等^[12]方法,以 $0.1\Delta A_{440}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ 为一个酶活力单位(1 U)。OAT 活性测定参照 Kim 等^[13]方法,以 $0.01\Delta A_{510}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ 为一个酶活力单位(1 U)。ProDH 活性测定参照赵福庚等^[14]方法,以 $0.01\Delta A_{600}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ 为一个酶活力单位(1 U)。



图 1 3 种情况下甜瓜幼苗生长情况的比较

A. $1\times$ Hoagland 营养液(CK); B. 盐胁迫($1\times$ Hoagland 营养液 + $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{NaCl}$); C. 外源脯氨酸处理($1\times$ Hoagland 营养液 + $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{NaCl}+0.2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Proline)

Fig. 1 Growth comparison of *Cucumis melo* seedling under three different treatments

A. $1\times$ Hoagland solution(CK); B. Salt stress($1\times$ Hoagland + $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{NaCl}$); C. Exogenous proline ($1\times$ Hoagland + $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{NaCl}+0.2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Proline)

1.3 OAT、ProDH 基因的克隆及表达分析

1.3.1 OAT、ProDH 基因的克隆 以 1×Hoagland 营养液培养(对照)的甜瓜幼苗嫩叶为材料,采用 Trizol 试剂盒按照说明书提取总 RNA,DNaseI 处理去除基因组 DNA,再以 Oligo(dT)为反转录引物 M-MLV 反转录酶合成单链 cDNA。根据已报道的甜瓜 OAT 序列(GenBank 登录号为 XM_008446277)和 ProDH 序列(GenBank 登录号为 XM_008461224)利用 Primer Premier 5.0 软件分别设计引物(表 1),PCR 反应体系均为 cDNA 1 μL、上下游引物(10 μmol·L⁻¹)各 1 μL、10×buffer 2.5 μL、dNTP 1 μL、Taq 酶 0.2 μL,加 ddH₂O 至 25 μL。OAT 扩增反应参数为:94℃预变性 3 min;94℃变性 30 s,50.7℃退火 30 s,72℃延伸 1 min,共 35 个循环;最后 72℃延伸 10 min,4℃保存,目的片段长度为 690 bp;ProDH 退火温度为 52.8℃,其余扩增参数相同,目的片段长度为 1 035 bp。PCR 产物以 1%的琼脂糖凝胶电泳检测和分离,目的片段用 DNA 纯化试剂盒纯化后连接到 pMD19-

T 载体中,转化到 TOP₁₀感受态细胞。挑取单菌落放大培养,相同条件下进行 PCR 扩增检测,挑取阳性克隆由上海生工生物工程有限公司完成序列测定,在 NCBI 网站进行 BLAST 比对。

1.3.2 OAT、ProDH 基因表达分析 分别从盐胁迫处理、外源脯氨酸处理和对对照第 0、2、4、6、8 天的甜瓜幼苗嫩叶中提取总 RNA,经 DnaseI 处理去除基因组 DNA,再以 Oligo(dT)为反转录引物 M-MLV 反转录酶合成单链 cDNA。以甜瓜 *Profilin* 基因(GenBank 登录号为 AY292386)为内参基因,根据序列设计 1 对引物(表 1),扩增反应参数为:94℃预变性 3 min;94℃变性 30 s,52℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,共 35 个循环;最后 72℃延伸 10 min,4℃保存,目的片段长度为 366 bp。PCR 扩增产物用 1%琼脂糖凝胶电泳检测,根据扩增结果调整 cDNA 模板浓度。分别以表 1 中 OAT、ProDH 引物进行 PCR 扩增,反应体系和扩增参数同 1.3.1,进行半定量 PCR 表达分析。

表 1 甜瓜 OAT、ProDH 和内参 Profilin 基因的 PCR 引物

Table 1 PCR primers of OAT, ProDH and reference Profilin genes in melon(*Cucumis melo* L.)

基因 Gene	正向引物 Forward primer(5'→3')	反向引物 Reverse primer(5'→3')
OAT	AATCTTTATAGAGCACGGTGAC	AGATCAATTTCCAGCACATC
ProDH	CGAGTTGTTTCGTGATGTGGTT	ACAGGTCCAAATGGCATGTATT
Profilin	GTCGTGGCAAGTTTACGT	CCAAGCCTTTCAACAATC

1.4 数据分析

试验数据结果采用 SAS 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 外源脯氨酸对盐胁迫下甜瓜幼苗叶片脯氨酸含量的影响

脯氨酸是一种重要的渗透调节剂,其含量的增加对提高逆境下植物细胞液浓度、降低细胞水势、增强吸水功能等起着重要的促进作用,逆境胁迫下植株常通过增加脯氨酸含量提高渗透势以缓解胁迫引起的伤害^[15]。图 2 显示,盐胁迫处理(T₁)甜瓜幼苗叶片脯氨酸含量随处理时间呈现先上升后稍下降趋势,并在处理 4 d 时达到最大值(117.42 μg/g),且在处理期间(2~8 d)脯氨酸含量始终极显著高于对照(CK),增幅分别为 33.1%、65.8%、60.6%和 38.0%;在盐胁迫下添加脯氨酸(T₂)进一步提高了甜瓜幼苗叶片脯氨酸含量,也同样随处理时间呈现先上升后稍下降变化趋势,在处理 6 d 时达到最大

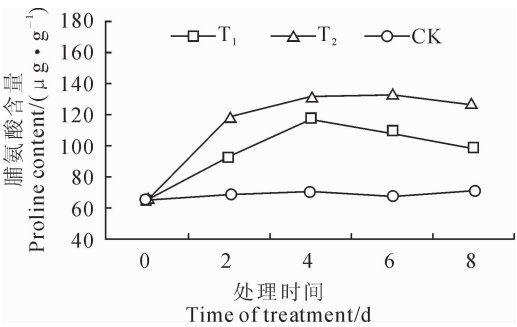


图 2 外源脯氨酸对盐胁迫下甜瓜幼苗叶片脯氨酸含量的影响
CK. 对照(1×Hoagland 营养液); T₁. 盐胁迫(1×Hoagland 营养液 + 100 mmol·L⁻¹ NaCl); T₂. 外源脯氨酸处理(1×Hoagland 营养液 + 100 mmol·L⁻¹ NaCl + 0.2 mmol·L⁻¹ Proline); 下同
Fig. 2 Effect of exogenous proline on proline content in leaves of *C. melo* seedlings under salt stress
CK. Control(1×Hoagland); T₁. Salt stress(1×Hoagland + 100 mmol·L⁻¹ NaCl); T₂. Exogenous proline(1×Hoagland + 100 mmol·L⁻¹ NaCl + 0.2 mmol·L⁻¹ proline); The same as below.

值($132.73 \mu\text{g/g}$)且各时期含量均始终高于同期 T_1 处理,升幅分别为 28.1%、12.1%、22.7% 和 29.2%,其中第 2、6、8 天差异达到显著水平。以上结果表明盐胁迫下甜瓜叶片内会产生较高含量的脯氨酸以缓解逆境胁迫,盐胁迫下添加适量外源脯氨酸能进一步增加植株内脯氨酸含量,从而增强植株抗盐胁迫能力。

2.2 外源脯氨酸对盐胁迫下甜瓜幼苗叶片 P5CS、OAT、ProDH 活性的影响

图 3,A 显示,甜瓜幼苗叶片 P5CS 活性在 T_1 处理下随时间延长呈现先上升后稍下降的变化趋势,在处理 4 d 时活性达最高(8.174 U),其在处理期间(2~8 d)均极显著高于对照,增幅分别为 59.7%、87.9%、56.6% 和 49.0%;P5CS 活性在 T_2 处理下随时间延长也呈现先上升后稍下降的相似变化趋势,也在处理 4 d 时活性达最高值(6.93 U),其在处理期间(2~8 d)均低于同期 T_1 处理,其中第 4 天时差异达到显著水平,但其在整个处理期间始终极显著高于同期对照,增幅分别为 54.2%、59.3%、41.7% 和 46.6%。这表明盐胁迫下甜瓜幼苗叶片内 P5CS 活性会明显增加,能通过增强谷氨酸途径促进 Pro 合成,但盐胁迫下添加外源脯氨酸对叶片 P5CS 活性和谷氨酸途径具有一定抑制作用。

由图 3,B 可知,甜瓜幼苗叶片 OAT 活性在 T_1 处理下随时间延长呈现上升-小幅回落-再上升趋势,并始终显著高于同期对照水平,增幅分别为 22.3%、24.0%、19.4% 和 31.3%,但增幅小于 P5CS;叶片 OAT 活性在 T_2 处理下进一步提高,随时间的变化趋势与 T_1 处理相同,但处理期间(2~8 d)OAT 活性均明显高于 T_1 处理,与 T_1 相比增幅分别为 18.0%、27.5%、24.3% 和 16.7%,其中第 4、6 天时差异达到显著水平。可见,盐胁迫诱导甜瓜幼苗叶片内 OAT 活性增强,在促进脯氨酸合成中鸟氨酸途径也发挥重要作用;盐胁迫下添加脯氨酸能更加明显提高叶片 OAT 活性、进一步增强鸟氨酸途径促进脯氨酸合成。

由图 3,C 可以看出,甜瓜幼苗叶片 ProDH 活性在 T_1 处理 2 d 后就迅速下降,在胁迫 4 d 时达到最低(5.91 U)随后略有所回升,但各处理时期(2~8 d)ProDH 活性与对照相比均极显著降低,降幅分别为 44.64%、47.52%、41.92% 和 40.33%;与对照相比较,处理时期(2~8 d) T_2 处理幼苗叶片中 ProDH 活性也显著降低但降幅均小于 T_1 处理,其中处理第 2 和 4 天时分别比同期 T_1 处理显著高出

20.0% 和 23.7%。可见,盐胁迫能显著地降低甜瓜幼苗叶片 ProDH 活性、抑制 Pro 的降解,而添加外源脯氨酸可使盐胁迫幼苗叶片 ProDH 活性增加,这可能是叶片内脯氨酸含量增加引起反馈调节。

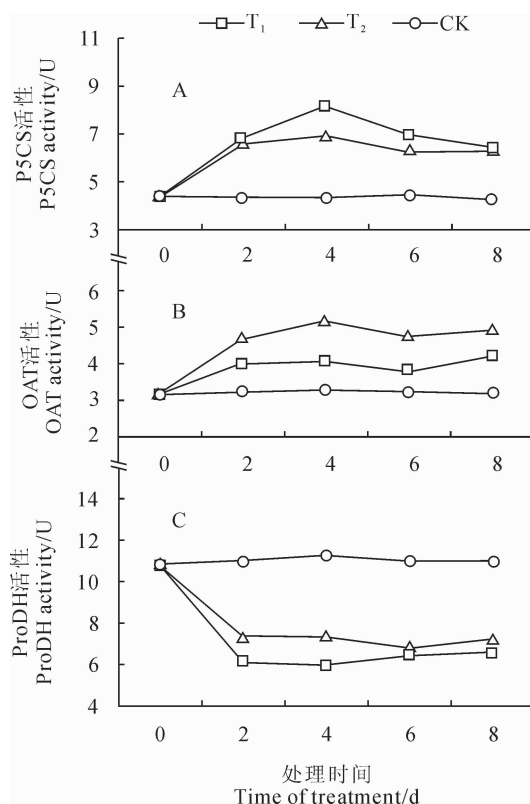


图 3 外源脯氨酸对盐胁迫下甜瓜幼苗叶片 P5CS、OAT 和 ProDH 活性的影响

Fig. 3 Effect of exogenous proline on P5CS, OAT and ProDH activities in leaves of *C. melo* seedlings under salt stress

2.3 OAT、ProDH 基因克隆及 RT-PCR 半定量表达分析

2.3.1 OAT、ProDH 基因的克隆

反转录单链 cDNA 后进行 PCR 扩增,分别获得与 OAT、ProDH 预期长度相吻合片段(图 4),参考黄志等^[26] *MeP5CS* 基因序列设计引物但未能扩增出 *P5CS* 片段。测序后在 NCBI 网站进行 BLAST 比对,其中,690bp 片段与甜瓜 OAT 基因(GenBank 登录号为 XM_008446277)只有 1 个碱基不同,相似性达 99.86% (图 4,A);1035 bp 片段与甜瓜 ProDH 基因(GenBank 登录号为 XM_008461224)有 7 个碱基不同,相似性达到 99.32% (图 4,B)。表明克隆到的均为目的基因片段。

2.3.2 OAT 和 ProDH 表达分析

如图 5 所示,对照幼苗叶片中 OAT、ProDH 基因在 0~8 d 阶段的

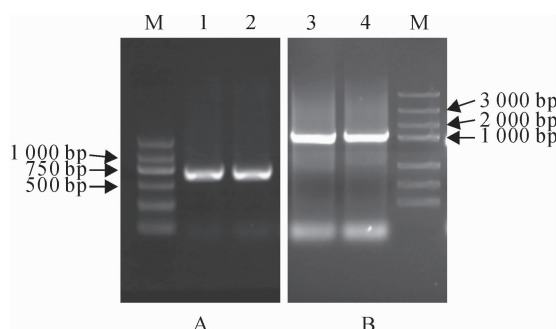


图4 甜瓜 OAT(A)和 *ProDH*(B)基因克隆

M. DL 2 000;1,2. OAT 基因片段;3,4. *ProDH* 基因片段

Fig. 4 Cloning of OAT(A) and *ProDH*(B) genes in *C. melo* seedling

M. DL 2 000;1,2. Fragment of OAT;3,4. Fragment of *ProDH*

表达量基本相同,变化较小(图5,A)。T₁处理幼苗

叶片 OAT 表达量在盐胁迫 2~6 d 与处理前(0 d)基本相同,直到处理 8 d 时表达量才明显增加;而其叶片 *ProDH* 表达量在处理 2 d 就降低,于处理 4 d 时表达量最小,虽在处理 6、8 d 时表达量有所回升但仍然小于处理前(图 5, B)。T₂ 处理幼苗叶片 OAT 表达量在添加脯氨酸后能迅速增加,在处理 2~8 d 的 OAT 表达量均明显高于处理前;而其相应的 *ProDH* 表达量随处理时间呈现先升后降趋势,并在处理 2 d 时表达量最大值,此后表现为逐步减少,处理 6、8 d 时表达量与处理前基本相同(图 5, C)。可见,甜瓜幼苗叶片中 *ProDH* 基因在盐胁迫下转录受到抑制,脯氨酸的降解在转录水平上受到调控,而盐胁迫下添加脯氨酸能迅速增强 OAT 转录。

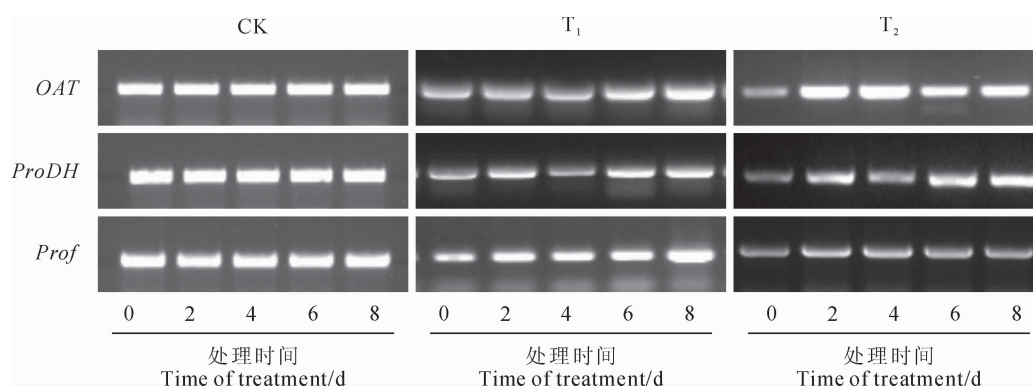


图5 OAT、*ProDH* 在对照(CK)、盐胁迫(T₁)和盐胁迫添加脯氨酸(T₂)处理甜瓜叶片中的表达

Fig. 5 Expression of OAT, *ProDH* in leaves of *C. melo* seedling under contrast, salt stress(T₁) and salt stress with exogenous proline(T₂)

3 讨论

许多研究表明,逆境胁迫下植物体可以通过积累脯氨酸来增强其抗逆性。脯氨酸是一种重要的渗透保护剂,不但能够防止水分散失,而且还可提高抗氧化酶活性、清除盐胁迫产生的活性氧保护细胞膜结构^[16-18]。本试验也表明盐胁迫下甜瓜幼苗叶片内会产生较高含量的脯氨酸以缓解逆境胁迫,盐胁迫下添加适量外源脯氨酸能进一步增加植株内脯氨酸含量从而增强植株抗盐胁迫能力,这与石榴、樱桃^[19]、草坪草^[20]、黄瓜^[21]、大豆^[5]和菊花^[22]等结果较为一致。

有学者^[23]认为植物体内游离脯氨酸积累量的变化在一定程度上可以反映植物抵抗逆境胁迫的能力,盐胁迫下游离脯氨酸多集中于植物代谢旺盛的光合器官叶片和生殖器官,其含量是其他部位的数倍到数十倍^[24]。因此本试验以甜瓜叶片为试验材

料较能集中反映盐胁迫下甜瓜脯氨酸的代谢调节规律。

本试验中,盐胁迫(T₁处理)甜瓜幼苗叶片内脯氨酸含量显著增加,同时 P5CS 活性增幅显著,而 OAT 活性增幅相对较小,OAT 表达量在大部分处理时段里没有增加,因此推断在盐胁迫开始阶段甜瓜幼苗体内脯氨酸积累主要途径是谷氨酸合成途径,这与 Lei^[25]和曹芳^[26]结论相同。同时,盐胁迫降低了甜瓜幼苗叶片内 *ProDH* 活性,减少 *ProDH* 表达量,从而使脯氨酸降解受到抑制,这也导致植株体内脯氨酸进一步积累,与段九菊^[21]对黄瓜的研究结果较为相似。

许多研究表明当植物本身产生的脯氨酸不足以消除逆境伤害时,可以使用外源脯氨酸清除活性氧^[27]和保护酶活性^[6,28]以缓解逆境伤害。作者前期研究表明在盐胁迫下添加 0.2 mmol · L⁻¹ 外源脯氨酸能够缓解甜瓜幼苗的盐伤害^[9-10],本研究结果

进一步说明这与叶片内脯氨酸含量增加有关。本试验中外源脯氨酸降低了盐胁迫下甜瓜幼苗叶片 P5CS 活性的增幅,说明外源脯氨酸可以在一定程度上抑制 P5CS 活性和谷氨酸合成途径;同时,叶片 OAT 活性进一步增加,OAT 表达量也迅速增加,又表明外源脯氨酸可以促进鸟氨酸合成途径,这可能与外源脯氨酸能够保护 OAT 有关^[8]。

另外,也有研究表明施用过高浓度外源脯氨酸,不但不能缓解胁迫危害,反而会抑制植物的生长,对植物造成伤害。如在绿豆细胞培养基中加入 $20 \sim 33 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 脯氨酸可以减缓 NaCl 胁迫引起的不良反应,当浓度达到 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 或者更高时,细胞生长反而受到抑制^[29];在苜蓿愈伤组织培养过程中, $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的外源脯氨酸对于缓解盐胁迫的效果明显,但当浓度过高超过 $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时则抑制愈伤组织生长甚至有毒害作用^[30]。因此,外源脯

氨酸作为抗逆增强剂使用须慎重,须先做预备试验确定施用浓度范围避免发生伤害。盐胁迫下甜瓜叶片内脯氨酸浓度始终都受合成和降解 2 种代谢途径共同调节,使脯氨酸浓度保持在一定适宜范围内避免过高浓度的脯氨酸可能造成的伤害。在本试验盐胁迫条件下添加外源脯氨酸提高了甜瓜幼苗叶片 ProDH 活性和阶段性增加 ProDH 表达量,促进了体内脯氨酸的降解,正是这种代谢调节的体现。

综上所述,盐胁迫条件下甜瓜幼苗体内主要是通过增强脯氨酸的谷氨酸合成途径和抑制脯氨酸降解以增加脯氨酸含量从而缓解盐胁迫,添加适量外源脯氨酸可增强鸟氨酸合成途径进一步增加脯氨酸含量,从而提高甜瓜幼苗耐盐胁迫能力。下一步将继续对盐胁迫下添加脯氨酸对脯氨酸代谢关键基因的互作、时空表达等影响进行研究,并对盐胁迫下甜瓜植株生长保护剂进行进一步试验和发掘。

参考文献:

- [1] MENDLINGER S. Effect of increasing plant density and salinity on yield and fruit quality in muskmelon[J]. *Scientia Hort.*, 1994, **57**(1): 41—49.
- [2] YAMADA M, MORISHITA H, URANO K, *et al.* Effects of free Proline accumulation in petunias under drought stress[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2005, **56**(417): 1 975—1 981.
- [3] DELAUNEY A J, VERMA D P S. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants[J]. *Plant J.*, 1993, **4**(2): 215—223.
- [4] LIU SH R(刘书仁), GUO SH R(郭世荣), SUN J(孙 锦), *et al.* Effects of proline on reactive oxygen metabolism and content of osmotic adjustment substances of cucumber under high temperature stress[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica* (西北农业学报), 2010, **19**(4): 127—131(in Chinese).
- [5] H YAN(贺 岩), LI ZH G(李志刚), CHEN Y ZH(陈云昭), *et al.* Effects of exogenous proline on the physiology of soyabean plantlets regenerated from embryos *in vitro* and on the ultrastructure of their mitochondria under NaCl stress[J]. *Soybean Science* (大豆科学), 2000, **19**(4): 314—319(in Chinese).
- [6] SHRUTI M, RAMA S D. Inhibition of ribonuclease and protease activities in arsenic exposed rice seedlings; role of proline as enzyme protectant[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2006, **163**(9): 927—936.
- [7] MANSOUR M. Protection of plasma membrane of onion epidermal cells by glycine betaine and proline against NaCl stress[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 1998, **36**: 767—772.
- [8] 颜志明. 外源脯氨酸提高甜瓜幼苗耐盐性的生理调节功能[D]. 南京: 南京农业大学, 2011.
- [9] YAN ZH M(颜志明), SUN J(孙 锦), GUO SH R(郭世荣), *et al.* Effects of exogenous proline on growth and reactive oxygen substance metabolism of melon seedlings under salt stress[J]. *Jiangsu J. of Agr. Sci.* (江苏农业学报), 2011, **27**(1): 141—145(in Chinese).
- [10] YAN ZH M(颜志明), SUN J(孙 锦), GUO SH R(郭世荣), *et al.* Effects of exogenous proline on seedling growth, photosynthesis and photosynthetic fluorescence characteristics in leaves of melon under salt stress[J]. *Jiangsu J. of Agr. Sci.* (江苏农业学报), 2011, **27**(1): 141—145(in Chinese).
- [11] 侯彩霞. 游离脯氨酸的测定[M]//中国科学院上海植物生理研究所, 上海市植物生理学会. 现代植物生理学实验指南. 北京: 科学出版社, 1999: 303—304.
- [12] SONG S Q, LEI Y B, TIAN X R. Proline metabolism and cross-tolerance to salinity and heat stress in germinating wheat seeds[J]. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2005, **52**(6): 793—800.
- [13] KIM H R, RHO H W, PARK J W, *et al.* Assay of ornithine aminotransferase with ninhydrin[J]. *Analytical Chemistry*, 1994, **223**: 205—

- 207.
- [14] ZHAO F G(赵福庚),SUN CH(孙 诚),LIU Y L(刘友良),*et al.* Effects of ABA and NaCl on metabolism of polyamines and proline in *Suaedaglauca* Bunge[J]. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*(植物生理与分子生物学学报),2002,**28**(2):117—120(in Chinese).
- [15] QUAN X Q(全先庆),ZHANG Y J(张渝洁),SHAN L(单 雷),*et al.* Advances in proline metabolism researches of higher plants[J]. *Biotechnology Bulletin*(生物技术通讯),2007,(1):14—18(in Chinese).
- [16] SARADHI P,ALIA P,ARORA S,*et al.* Proline accumulates in plants exposed to UV radiation and protects them against UV induced peroxidation[J]. *Biochemistry Biophysics Resource Communication*,1995,**209**(1):1—5.
- [17] HARE P D,CRESS W A. Metabolic implications of stress-induced Proline accumulation in plants [J]. *Plant Growth Regul*,1997,**21**(2):79—102.
- [18] SIRIPORNADULSIL S,TRAIN S,VERMA D P S,*et al.* Molecular mechanisms of proline-mediated tolerance to toxic heavy metals in transgenic microalgae [J]. *Plant Cell*,2002,**14**(11):2 837—2 847.
- [19] ZHANG J F(张金凤),SHUN M G(孙明高),XIA Y(夏 阳),*et al.* Salt stresses affect proline contents,nitrate reductase activities and electrical conductivity of seedling leaves of megranate and cherry [J]. *Journal of Shandong Agricultural University*(Nat. Sci. Edo.)(山东农业大学学报·自然科学版),2004,**35**(2):164—168(in Chinese).
- [20] LU J J(卢静君),DUO L A(多立安),LIU X J(刘祥君). Changes in SOD and POD activity and free proline content of *Lolium perenne* and *Festuca elatensis* leaves under different levels of salt stress [J]. *Bulletin of Botanical Research* (植物研究),2004,**24**(1):115—119(in Chinese).
- [21] DUAN J J(段九菊),GUO SH R(郭世荣),FAN H F(樊怀福),*et al.* Effects of salt stress on proline and polyamine metabolisms in the roots of cucumber seedlings[J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.* (西北植物学报),2006,**26**(12):2 486—2 492(in Chinese).
- [22] GUAN ZH Y(管志勇),CHEN F D(陈发棣),CHEN S M(陈素梅),*et al.* Morphological and physiological changes of chrysanthemum inflorescence under NaCl stress[J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.* (西北植物学报),2009,**29**(8):1 624—1 629(in Chinese).
- [23] TANG ZH CH(汤章城). The probable significance of proline accumulation under stress [J]. *Plant Physiology Communications*(植物生理学通讯),1984,1:15—21(in Chinese).
- [24] CHEN T X(陈托兄),ZHANG J L(张金林),LU N(陆 妮),*et al.* The characteristics of free proline distribution in various types of salt resistant plants[J]. *Acta Prataculturae Sinica*(草业学报),2006,**15**(1):36—41(in Chinese).
- [25] LEI Y,YIN C. Effect of osmotic stress and sodium nitroprusside pretreatment on proline metabolism of wheat seedlings[J]. *Biologia Plantarum*,2007,**51**(2):386—390.
- [26] CAO F(曹 芳),WEI Y SH(魏永胜). Effect of potassium nitrate on proline metabolism in tobacco(*Nicotiana tabacum* L.) under osmotic stress[J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica* (西北农业学报),2010,**19**(9):144—148(in Chinese).
- [27] HOQUE M A,BANU M N A,NAKAMURA Y,*et al.* Proline and glycinebetaine enhance antioxidant defense and methylglyoxal detoxification systems and reduce NaCl-induced damage in cultured tobacco cells [J]. *Journal of Plant Physiology*,2007,**165**(8):813—824.
- [28] YAN ZH M(颜志明),SUN J(孙 锦),GUO SH R(郭世荣),*et al.* Effects of exogenous Proline on the ascorbate-glutathione cycle in roots of cucumismelo seedlings under salt stress[J]. *Plant Science Journal*(植物科学学报),2014,**32**(5):502—508(in Chinese).
- [29] KUMAR V,SHARMA D K. Isolation and characterization of sodium chloride resistant callus culture of *Vigna radiata* (L.) Wilczek var. *radiata* [J]. *Journal of Experimental Botany*,1989,**40**(1):143—147.
- [30] EHSANPOUR A A,FATAHIAN N. Effects of salt and proline on *Medicago sativa* callus [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*,2003,**73**(1):53—56.

(编辑:裴阿卫)