

DOI: 10.5846/stxb201204030467

王新宇, 王丽华, 于萍, 李楠, 吴惠丰, 阎秀峰. 基于核磁共振波谱的盐芥盐胁迫代谢组学分析. 生态学报 2012, 32(15): 4737-4744.

Wang X Y, Wang L H, Yu P, Li N, Wu H F, Yan X F. NMR spectroscopy based metabolomic analysis of *Thellungiella salsuginea* under salt stress. Acta Ecologica Sinica 2012, 32(15): 4737-4744.

## 基于核磁共振波谱的盐芥盐胁迫代谢组学分析

王新宇<sup>1</sup>, 王丽华<sup>1</sup>, 于萍<sup>1</sup>, 李楠<sup>1</sup>, 吴惠丰<sup>2</sup>, 阎秀峰<sup>1\*</sup>

(1. 温州大学生命与环境科学学院, 温州 325035; 2. 中国科学院烟台海岸带研究所, 烟台 264003)

**摘要:** 以甲醇/水(1:1)作为溶剂, 利用高分辨核磁共振氢谱分析了盐生模式植物盐芥(*Thellungiella salsuginea*)代谢组对盐胁迫的响应。根据<sup>1</sup>H核磁共振(NMR)波谱, 在盐芥莲座叶中准确鉴定出23种代谢产物, 包括11种氨基酸、4种糖类、6种有机酸和2种其他代谢产物。主成分分析表明, 150、300 mmol/L NaCl处理盐芥的代谢组与对照均有显著差异( $P < 0.05$ ), 两种浓度的NaCl处理对盐芥代谢组的影响也不相同。盐胁迫处理以后, 盐芥23种代谢产物含量均发生显著变化, 除天冬氨酸、延胡索酸受盐胁迫诱导含量下降以外, 其余代谢物含量均不同程度升高。这些代谢物主要参与了糖类代谢途径、氨基酸合成途径、三羧酸循环和甜菜碱合成途径, 这些代谢途径在盐芥响应盐胁迫过程中有重要作用。

**关键词:** 盐芥; 代谢组; 盐胁迫; 核磁共振

## NMR spectroscopy based metabolomic analysis of *Thellungiella salsuginea* under salt stress

WANG Xinyu<sup>1</sup>, WANG Lihua<sup>1</sup>, YU Ping<sup>1</sup>, LI Nan<sup>1</sup>, WU Huifeng<sup>2</sup>, YAN Xiufeng<sup>1\*</sup>

1 College of Life and Environmental Science, Wenzhou University, Wenzhou 325035, China

2 Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003, China

**Abstract:** Soil salinity is a critical environmental problem that disrupts plant metabolic homeostasis and requires adjustment of metabolic pathways in plant cells, a process that is usually referred to as acclimation. Metabolomics technologies have made significant contributions to the study of plant stress biology through identification of different compounds, such as signaling molecules and metabolic by-products in response to stress conditions, as well as small molecules involved in the plant acclimation processes. *Thellungiella salsuginea* is a close relative of *Arabidopsis thaliana*. It has been proposed as an ideal model for studying molecular mechanisms of salinity tolerance in plants because of its 'extremophile' characteristics manifested by extreme tolerance to high salt conditions. To obtain a better understanding of the molecular mechanisms underlying the response of *T. salsuginea* to salt stress, an Nuclear Magnetic Resonance (NMR)-based metabolic profiling approach was used to profile metabolite changes in *T. salsuginea* after treatment with 150 mmol/L or 300 mmol/L NaCl for 24 h. In general, metabolomic studies should be designed to detect as many metabolites as possible in an organism, and a solvent that can extract a diverse group of metabolites should be employed. In our experiments, metabolites were extracted from the leaf tissues using a solvent system of methanol/water (1/1), known to extract many different metabolites. <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy of samples from control, 150 mmol/L and 300 mmol/L NaCl treatment was performed separately. Spectral data were analyzed and interpreted using multivariate statistical analyses. Overall, the original NMR spectra were dominated by one of the organic acids, malate ( $\delta$  2.38 and 2.68), which is a *T. salsuginea* metabolite to maintain the

基金项目: 国家自然科学基金(31170368, 31070351)

收稿日期: 2012-04-03; 修订日期: 2012-06-19

\* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: yanxiufeng@wzu.edu.cn

<http://www.ecologica.cn>

osmotic balance in the cells and was approx. 10—100 times higher than other metabolites found in the  $^1\text{H-NMR}$  spectra. Principal components analysis (PCA) was used in this work for the separation of control from different concentrations of NaCl-treated groups. PCA is an exploratory unsupervised pattern recognition method since it calculates inherent variation within the data sets without use of the class membership. Following PCA, the PC scores plot indicated highly significant separations ( $P < 0.05$ ) between control and salt treatments, suggesting huge differences in metabolite profiles between control and NaCl-treated samples. In order to understand the origin of the differences between the control and NaCl treatments, the metabolites were identified and quantified. A total of 23 intracellular metabolites, comprising 11 amino acids, 4 sugars, 6 organic acids and 2 others were identified in leaf extracts of *T. salsuginea*. All of the 23 metabolites showed reproducible and statistically significant changes in NaCl-treated samples compared to control samples. Most metabolites exhibited significant increases in response to NaCl treatment except aspartate and fumarate. To evaluate the connections of these metabolic changes under salt stress, the measured metabolite variations were mapped onto the plant biosynthetic pathways. Metabolites involved in carbohydrate metabolism, amino acid biosynthesis, TCA cycle and betaine biosynthesis played an important role in response to salt stress. It is notable that a potentially powerful strategy of salt tolerance in the halophyte *T. salsuginea* is to increase the TCA cycle intermediates and accumulate the osmoregulatory solute proline. This information, together with quantitative kinetic indices, can be used to model and simulate metabolic pathways. This study has further highlighted the value of the metabolic profiling approach in discovering and validating plant metabolic mechanisms in response and acclimation to salt stress.

**Key Words:** *Thellungiella salsuginea*; metabolomics; salt stress; NMR

十字花科植物盐芥(*Thellungiella salsuginea*)具有很强的耐盐能力(可在 300 mmol/L NaCl 的生境中完成生活史)且与模式植物拟南芥的亲缘关系非常近,因此作为盐生模式植物引起研究者关注并开展了大量研究<sup>[1-2]</sup>。比较基因组学研究发现大部分胁迫诱导基因在盐芥中是组成型表达的,如 *Fe-SOD*、*P5CS*、*PDF1.2*、*AtNCED*、*P-protein*、 $\beta$ -*glucosidase*、*SOS1* 等基因非胁迫条件下在盐芥中就以高水平表达,并可能与盐芥高度的耐盐性密切相关<sup>[3-4]</sup>。Pang 等<sup>[5]</sup>进一步利用双向电泳(2-DE)、同位素标记相对和绝对定量(iTRAQ)蛋白质组学技术分别鉴定了盐芥盐胁迫差异表达的可溶性蛋白和疏水膜蛋白,推测了盐芥应答盐胁迫的主要生理代谢途径。

植物在响应和适应盐胁迫的过程中,需要不断调节自身复杂的代谢网络来维持系统内部的动态平衡。对这种动态进行监测与全面分析,可以揭示植物对环境因子或胁迫的应答机制,代谢组学技术的出现和发展为这方面的研究提供了一个新的平台。核磁共振波谱(NMR)是代谢组学研究的主要工具之一<sup>[6-7]</sup>。利用高分辨核磁共振技术分析盐生模式植物——盐芥代谢组对盐胁迫的应答,总结了盐芥耐盐相关的典型代谢特征和特异代谢途径。

## 1 材料和方法

### 1.1 植物材料培养及处理

所用盐芥(*Thellungiella salsuginea*)为山东生态型(ecotype Shandong, China)种子由山东师范大学张慧教授惠赠。采用 Hoagland 营养液水培,人工气候室培养(8 h/16 h 光周期 25 °C/20 °C,光强 150  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,湿度 50%—70%)。生长至 4 周时,分别以含 150、300 mmol/L NaCl 的 Hoagland 营养液进行盐胁迫处理,正常 Hoagland 营养液培养的植株作为对照,处理 24 h 后采样。

### 1.2 盐芥代谢组样品提取

称取 200 mg 盐芥莲座叶,液氮中研磨成粉末后悬浮于甲醇/水(1:1)提取液(3.33 mL/g),加入磁珠利用高通量匀浆机(Qiagen TissueLyser, USA)振荡匀浆。匀浆 30 000 g、4 °C 离心 10 min,上层极性溶剂相经冷冻离心浓缩系统干燥后于超低温冰箱保存用于 NMR 分析。在 NMR 仪器分析前,需要对样品进行预处理。将

上述冻干样品加入 600  $\mu\text{L}$  100 mmol/L 重水磷酸盐缓冲液(  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  和  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  , 含 0.5 mmol/L TSP , pH 值 7.0) 充分溶解, 以 30 000 g、4  $^\circ\text{C}$  离心 10 min。取上清液 550  $\mu\text{L}$  置于 5 mm 核磁管待测。

### 1.3 核磁共振检测和 $^1\text{H}$ -NMR 波谱数据处理

代谢组样品分析在 Bruker AV 500 NMR 谱仪( Bruker BioSpin , Canada) 上进行,  $^1\text{H}$  观察频率为 500.18 MHz 测试温度为 298 K。谱宽 6009.6 Hz 混合时间 0.1 s 弛豫延迟时间 0.3 s 在弛豫延迟和混合期间采用预饱和方式抑制水峰, 1D NOESY 脉冲序列以保证在预饱和压制水峰的情况下得到较平整的图谱基线。累加次数 128 次, 每个样本核磁扫描均收集到 16384 个数据点, 采用线宽为 0.3 Hz 的指数窗函数进行傅里叶变换, 获得 $^1\text{H}$ -NMR 谱图。将 $^1\text{H}$ -NMR 谱图载入 TopSpin 软件( version 2.1 , Bruker BioSpin , Canada) , 对所有的 $^1\text{H}$ -NMR 谱图进行细致的相位校正和基线调整, 并以内标 TSP 为化学位移参考峰。

利用 Matlab ProMetab 软件( ver 7.0; MathsWorks , Natick , MA , USA) 将  $\delta$  0.2—10.0 内的谱图以 0.01 谱宽进行分段并积分, 除去水峰所在的化学位移区域(  $\delta$  4.70—5.20) 。将  $\delta$  8.32—8.35、 $\delta$  8.26—8.28、 $\delta$  8.24—8.26、 $\delta$  8.18—8.20、 $\delta$  7.97—8.01、 $\delta$  7.70—7.85、 $\delta$  7.52—7.56、 $\delta$  6.53—6.58 合并成单一的峰, 以消除 pH 导致的谱峰偏差。归一化剩余总的谱峰面积以便比较谱峰之间的强度差异。多元统计分析之前, 先将所有的核磁谱对数化处理, 以增加低强度峰的权重, 其中转化参数为  $10^{-8}$ 。通过 Chenomx Suite 软件( Chenomx Inc. , Canada) 分析代谢物的化学位移完成各种主要代谢产物的鉴定并进行定量。

## 2 结果与分析

从植株外部形态看, 经 150 mmol/L NaCl 处理的盐芥受盐胁迫影响不明显, 基本与对照无异。经 300 mmol/L NaCl 处理的盐芥大部分植株出现不同程度的萎蔫。

### 2.1 盐芥代谢组 $^1\text{H}$ -NMR 波谱分析

$^1\text{H}$ -NMR 谱峰与样品中各代谢产物中氢原子一一对应, 样品中每一个氢原子在图谱中都有其相关谱峰, 图谱中信号的相对强弱反映样品中各组分的相对含量。盐芥中准确鉴定出 23 种代谢产物, 包括 11 种氨基酸、4 种糖类代谢物、6 种有机酸和 2 种其他代谢产物( 图 1) 。

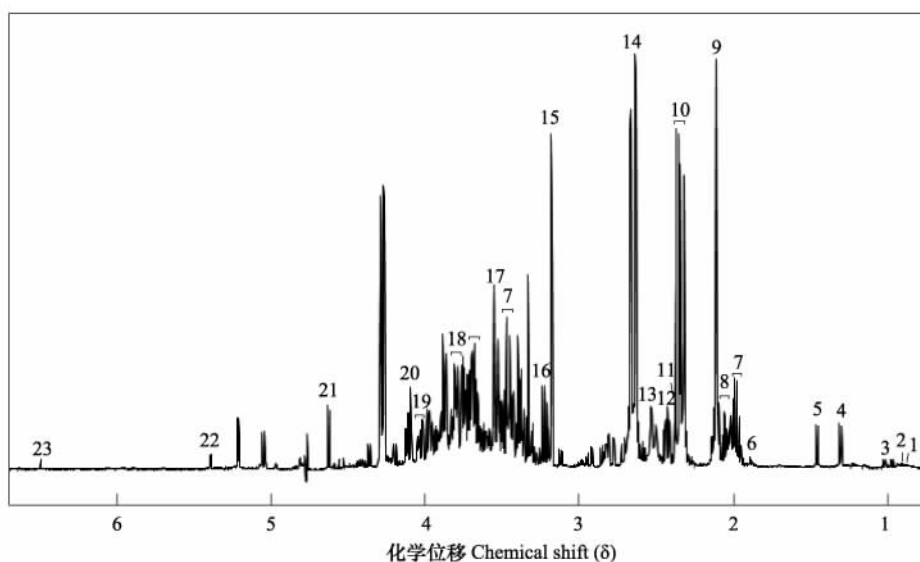


图 1 盐芥莲座叶代谢物 500 MHz 核磁共振一维氢谱

Fig.1  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of the metabolites identified in *Thellungiella salsuginea* leaves

(1) 亮氨酸 Leucine; (2) 异亮氨酸 Isoleucine; (3) 缬氨酸 Valine; (4) 苏氨酸 Threonine; (5) 丙氨酸 Alanine; (6) 乙酸 Acetate; (7) 脯氨酸 Proline; (8) 谷氨酸 Glutamate; (9) 谷氨酰胺 Glutamine; (10) 苹果酸 Malate; (11) 琥珀酸 Succinate; (12) 酮戊二酸 2-oxoglutarate; (13) 柠檬酸 Citrate; (14) 天冬氨酸 Aspartate; (15) 胆碱 Choline; (16) 甜菜碱 Betaine; (17) 甘氨酸 Glycine; (18) 丝氨酸 Serine; (19) 蔗糖 Sucrose; (20) 果糖 Fructose; (21) 葡萄糖 Glucose; (22) 麦芽糖 Maltose; (23) 延胡索酸 Fumarate

### 2.2 盐芥响应盐胁迫的代谢组主成分分析

主成分分析(PCA)是代谢组学研究中一种常用的无监督模式识别方法。PCA的特点是将分散在一组变量上的所有信息集中到几个综合指标即主成分(PC)上,利用这些PC来描述数据集内部结构,实际上起着数据降维的作用。本研究中,对<sup>1</sup>H-NMR谱变化影响最大的2个主成分(PC1和PC2)的贡献率分别为58.86%和20.16%。由图2可见,处理组与对照组能完全分离开,150 mmol/L NaCl处理组、300 mmol/L NaCl处理组与对照均有显著差异( $P < 0.05$ ),150 mmol/L NaCl处理组在得分图中的数据点在PC2上偏离对照组,而300 mmol/L NaCl处理组在得分图中的数据点在PC1上显著偏离对照组。两种浓度NaCl处理对盐芥代谢组的影响也不相同,两个处理组在PC1上发生明显偏离。

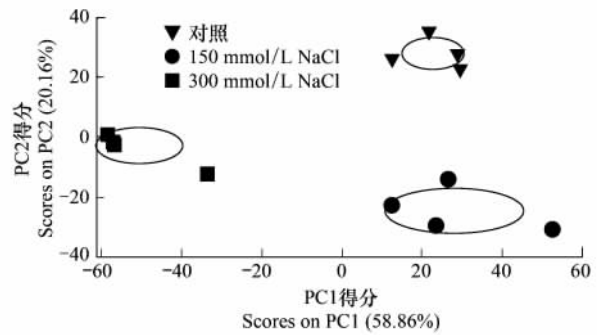


图2 盐芥盐处理后代谢组<sup>1</sup>H-NMR谱峰积分值的PCA得分图  
Fig. 2 PCA score plots derived from <sup>1</sup>H-NMR spectra of *Thellungiella salsuginea* samples

### 2.3 盐芥响应盐胁迫的主要代谢物含量变化

盐芥莲座叶检测到的23种代谢物中,苹果酸含量最高,其次是葡萄糖和脯氨酸。除天冬氨酸、延胡索酸受盐胁迫诱导含量下降以外,其余代谢物含量受盐胁迫诱导均不同程度升高。盐胁迫可能抑制了天冬氨酸和延胡索酸的合成或加速其转化。受盐胁迫诱导含量升高的代谢物可以大致分为两类,一类是含量随盐浓度的增加而显著升高,如亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、苏氨酸、丙氨酸、脯氨酸、甘氨酸、蔗糖、琥珀酸、酮戊二酸。盐胁迫可能诱导这些物质的积累,使盐生植物表现出较高的耐盐性。另一类是在150 mmol/L NaCl处理组显著高于对照水平,而在300 mmol/L NaCl处理组高于对照水平但低于150 mmol/L NaCl处理组,如谷氨酸、谷氨酰胺、丝氨酸、葡萄糖、果糖、麦芽糖、苹果酸、柠檬酸、胆碱、甜菜碱。较低的盐浓度诱导这些物质的积累,而较高的盐浓度却没有进一步促进这些物质的合成(表1)。

表1 盐胁迫盐芥莲座叶主要代谢物含量变化(μmol/g)

Table 1 The content of the main metabolites in *Thellungiella salsuginea* samples after salt treatment

代谢物 Metabolites	亮氨酸 Leucine	异亮氨酸 Isoleucine	缬氨酸 Valine	苏氨酸 Threonine	丙氨酸 Alanine	脯氨酸 Proline	谷氨酸 Glutamate	谷氨酰胺 Glutamine
对照 Control	0.03±0.01a	0.03±0.01a	0.05±0.00a	0.24±0.03a	0.31±0.01a	2.83±0.19a	1.66±0.17a	1.67±0.15a
150 mmol/L	0.05±0.00b	0.07±0.00a	0.13±0.01b	0.49±0.04b	0.35±0.07ab	4.74±0.58b	2.92±0.40b	2.88±0.46b
300 mmol/L	0.14±0.01c	0.23±0.04b	0.35±0.05c	0.55±0.08b	0.43±0.05b	4.83±1.14b	2.31±0.47b	1.60±0.16a
代谢物 Metabolites	天冬氨酸 Aspartate	甘氨酸 Glycine	丝氨酸 Serine	蔗糖 Sucrose	葡萄糖 Glucose	果糖 Fructose	麦芽糖 Maltose	醋酸盐 Acetate
对照 Control	0.90±0.10a	0.14±0.02a	0.47±0.17a	0.46±0.06a	3.22±0.66a	0.80±0.05a	0.43±0.08a	0.04±0.01a
150 mmol/L	0.88±0.08a	0.33±0.07b	1.51±0.09b	1.89±0.28b	7.65±0.49b	5.87±0.88b	1.71±0.21b	0.04±0.00a
300 mmol/L	0.66±0.14b	0.32±0.05b	0.89±0.07c	2.24±0.51b	4.09±0.59a	3.27±0.76c	1.18±0.09c	0.07±0.00b
代谢物 Metabolites	琥珀酸 Succinate	苹果酸 Malate	柠檬酸 Citrate	延胡索酸 Fumarate	胆碱 Choline	甜菜碱 Betaine	酮戊二酸 2-oxoglutarate	
对照 Control	0.10±0.01a	12.11±1.81a	0.51±0.07a	0.05±0.01a	0.505±0.04a	0.105±0.02a	0.06±0.01a	
150 mmol/L	0.13±0.01b	30.42±1.78b	1.44±0.31b	0.03±0.01b	0.685±0.06b	0.225±0.02b	0.07±0.01a	
300 mmol/L	0.16±0.04b	17.89±4.99a	0.93±0.11c	0.03±0.01b	0.535±0.09a	0.115±0.03a	0.13±0.02b	

表中数据为平均值±标准差(n=4),同一组比较中不同字母表示差异显著( $P < 0.05$ )

### 3 讨论

代谢物是细胞调控过程的终产物,它们的种类和数量变化被视为生物系统对基因或环境变化的最终响

应<sup>[8]</sup>。对盐胁迫条件下盐芥主要代谢物进行了系统的定量分析后,利用 VANTED 软件<sup>[9]</sup>刻画了盐芥主要代谢途径对盐胁迫的响应,主要包括糖类代谢途径、氨基酸合成途径、三羧酸循环和甜菜碱合成途径(图 3),下面分别进行讨论。

### (1) 糖类代谢途径

碳水化合物代谢是植物的基础代谢之一,参与调解很多重要的生理过程如光合作用、呼吸作用。大量研究表明,在盐胁迫下碳水化合物可以作为渗透调节物质而积累,比如糖类物质(蔗糖、果糖、葡萄糖、果聚糖等),因此也常用植物体内糖代谢水平来衡量环境对植物胁迫的程度及植物对环境的适应性<sup>[10]</sup>。检测到盐芥糖类代谢途径中非还原性糖(蔗糖)和 3 种还原性糖(果糖、葡萄糖、麦芽糖)的含量都受到盐胁迫的影响。植物适应盐胁迫过程中,蔗糖对于维持脂双层膜结构中磷脂的液晶态、防止可溶性蛋白质结构上的改变有重要作用,而葡萄糖作为多数植物呼吸作用的直接底物,对于植物适应盐胁迫过程中能量代谢、氧自由基的形成有重要作用<sup>[11]</sup>。非还原性糖的含量随着盐浓度的增加而显著增加,而还原性糖含量却无一例外的在 300 mmol/L NaCl 高盐浓度下略高于对照水平,但低于 150 mmol/L NaCl 处理组样品。关于盐处理后盐芥莲座叶中糖类物质含量的提高,究竟是由于淀粉水解作用加强,还是由于糖分利用的下降,目前还难下定论。还有研究表明,植物可溶性碳水化合物含量的提高,不仅在于可溶性碳水化合物参与细胞的渗透调节作用,更重要的原因可能在于许多可溶性碳水化合物是植物适应环境的信号物质<sup>[12]</sup>。

### (2) 氨基酸合成途径

植物在适应盐胁迫过程中,维持一个合适的  $K^+/Na^+$  比对缓解盐胁迫的危害至关重要。游离氨基酸可以调节跨膜的  $K^+$  转运,从而提高植物对盐胁迫的适应性<sup>[13]</sup>。观察到盐芥的氨基酸合成途径受到盐胁迫诱导,一些氨基酸的含量发生显著变化。除了天冬氨酸,其余 10 种氨基酸含量受盐胁迫诱导均有不同程度的增加,推测这与盐芥较高的耐盐能力有关。植物在盐胁迫等逆境条件下积累脯氨酸是一种较普遍的现象<sup>[14]</sup>,脯氨酸是检测到的 11 种氨基酸中含量最高的,且受盐胁迫诱导含量增加显著。作为可溶性渗透物质,脯氨酸的积累有助于盐胁迫条件下细胞膜的稳定<sup>[15]</sup>,有利于叶绿素的合成。在渗透胁迫和氮素缺乏的情况下,谷氨酸途径是合成脯氨酸的主要来源<sup>[16]</sup>。在盐芥莲座叶中,谷氨酸和谷氨酰胺含量也很高,仅次于脯氨酸。已有研究指出,在干旱和盐胁迫条件下谷氨酸和谷氨酰胺的水平对于维持细胞渗透性的动态平衡具有重要意义<sup>[17]</sup>。在蛋白组学研究中,盐芥叶片中谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase)受低浓度盐胁迫诱导显著上调,高浓度盐胁迫蛋白表达接近对照水平<sup>[5]</sup>,这与代谢组学研究中谷氨酰胺的含量变化一致,在一定程度上,代谢组学的结果印证了蛋白组学的研究结果。

### (3) 三羧酸循环

有机酸是一类具有缓冲作用的酸性化合物,在盐胁迫下大量积累有机酸,可与液泡中的  $Na^+$  结合,从而降低毒害作用,是维持体内离子平衡和 pH 值稳定的关键<sup>[18]</sup>。盐芥莲座叶中检测到 6 种有机酸,并且都是三羧酸循环中重要的中间产物(图 3)。三羧酸循环是糖类、氨基酸的最终代谢通路,又是糖类、氨基酸代谢联系的枢纽,植物可以根据需要通过自身调节来改变代谢流的方向,进而积累或降解某种小分子,达到适应环境、保持内环境稳态的目的。与三羧酸循环相关的有机酸含量变化说明,盐芥在应对盐胁迫过程中,物质代谢和能量代谢都受到了影响,盐芥通过调节有机酸的含量,使细胞恢复稳态。

在盐芥莲座叶中检测到的苹果酸,不仅在 6 种有机酸代谢产物中含量最高,而且在所有检测到的 23 种代谢产物中也是含量最高的。苹果酸是三羧酸循环和乙醛酸循环的中介,是维持细胞渗透压与电荷平衡的关键代谢物,还参与调节植物气孔开度,因此苹果酸在植物适应逆境胁迫的生命活动中起着重要作用<sup>[19]</sup>。发现,盐胁迫促进了盐芥莲座叶中苹果酸的积累,但并没有与盐浓度呈现出显著的正相关。与苹果酸含量变化趋势一致的有机酸代谢物还有柠檬酸。早在 1986 年,人们就在干旱的棉花中发现柠檬酸的积累<sup>[20]</sup>。水分胁迫、矿物营养缺乏、盐胁迫也能够诱导植物中柠檬酸的积累<sup>[21-22]</sup>。研究表明,在盐胁迫条件下,柠檬酸和琥珀酸在根中大量积累,但地上部分的柠檬酸和酮戊二酸含量却显著下降,地上部分三羧酸循环可能受到抑

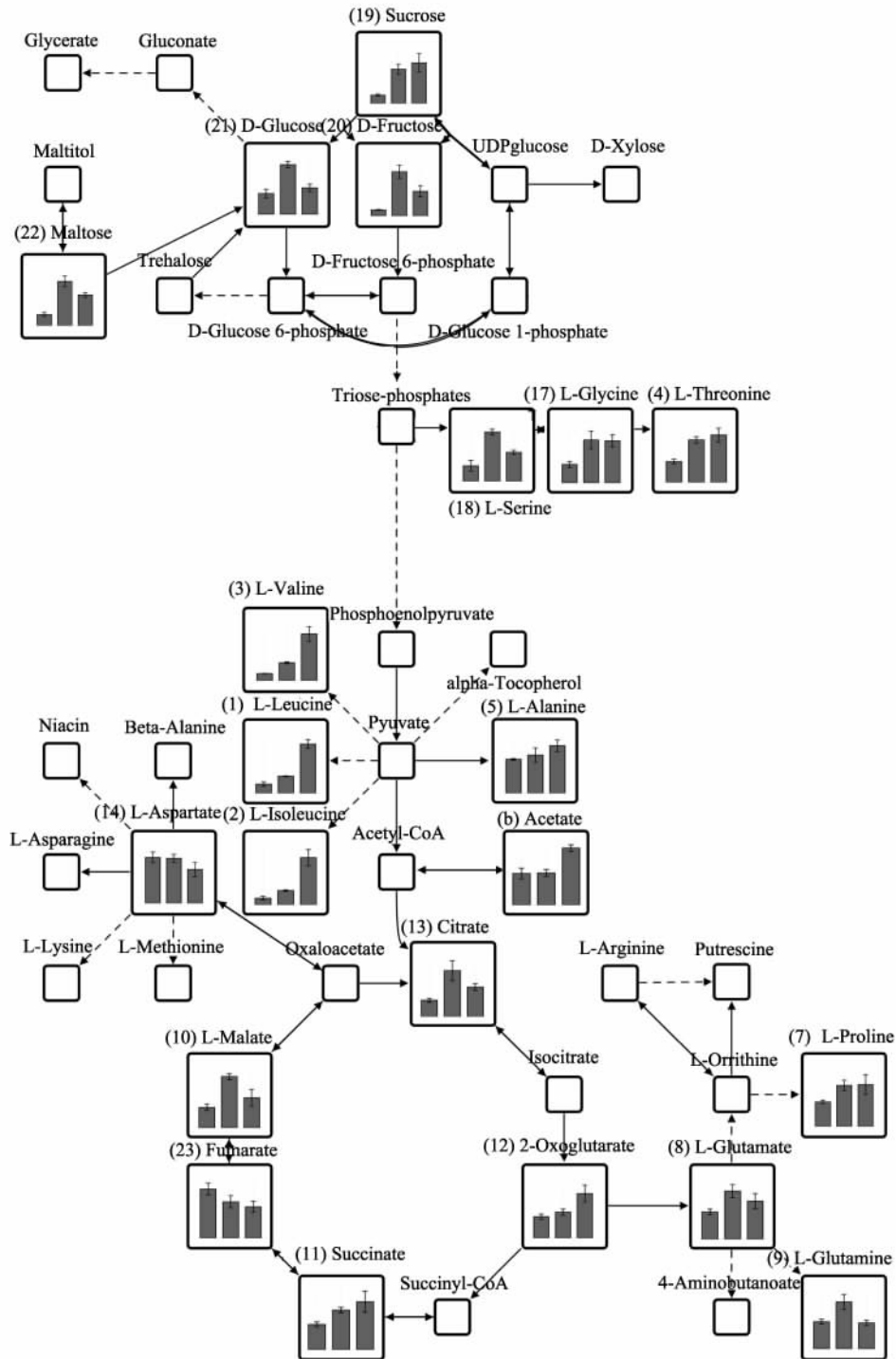


图 3 盐芥响应盐胁迫的主要代谢途径

Fig. 3 The main metabolic pathway in *Thellungiella salsa* response to salt stress

每一个方框代表一种代谢物 编号与图 1 对应,白方框表示代谢途径中未在核磁谱中检测到的代谢物;代谢物之间的实线表示通过一步反应实现,虚线表示通过多步反应实现

制<sup>[23]</sup>。目前 柠檬酸在植物对抗非生物胁迫中的功能还不是特别清楚。盐芥中乙酸、酮戊二酸、琥珀酸的含量都受盐胁迫诱导增加。尽管研究中并没有检测到脂类物质,但根据以往文献推测,乙酸含量的增加可能与胁迫条件下脂类代谢的加强有关,胁迫条件下三羧酸循环过程中乙酰辅酶 A 的利用率下降也可能造成乙酸的积累<sup>[6]</sup>。酮戊二酸是谷氨酸合成途径必需的底物也是植物氮同化过程中重要的有机酸,酮戊二酸的积累

对胁迫条件下谷氨酸的合成有着积极的影响。三羧酸循环中这些关键的中间产物在植物应对非生物胁迫中的作用,以及合成途径中关键酶的调控值得深入研究,研究结果将为阐明植物物质代谢和能量代谢的胁迫应答机制奠定基础。

#### (4) 甜菜碱合成途径

作为对不良环境的一种适应性防御反应,植物通过在体内积累高浓度小分子量的有机渗透调节物质来降低细胞内渗透势,提供植物在低水势下的吸水能力,稳定膜结构和大分子的构象,从而维持植物正常的代谢和生存。甜菜碱一般在叶绿体中积累,是高等植物中最常见也是最重要的非毒性渗透调节物质之一,能够参与稳定复杂蛋白质的高级结构,调节和保护类囊体膜功能,使植物在应对非生物胁迫过程中维持正常的光合效率,在植物抗逆生理中起重要作用<sup>[24-25]</sup>。研究中,检测到甜菜碱及其合成底物胆碱受低盐浓度诱导积累,但在较高盐浓度条件下并没有显著影响。盐芥在盐胁迫条件下并没有积累典型的植物渗透调节物质,比如很多盐生植物中大量积累的甜菜碱和多元醇<sup>[26-28]</sup>。相比之下,盐芥积累了大量的脯氨酸,在非处理条件下脯氨酸的含量就是甜菜碱含量的 28.8 倍,150 mmol/L NaCl 和 300 mmol/L NaCl 处理后分别是甜菜碱含量的 21.5 倍、43.9 倍,脯氨酸的积累是盐芥对抗盐胁迫的主要策略之一。

每一个方框代表一种代谢物,编号与图 1 对应,白方框表示代谢途径中未在核磁谱中检测到的代谢物。代谢物之间的实线表示通过一步反应实现,虚线表示通过多步反应实现。

#### References:

- [1] Wang Z, Li P, Fredricksen M, Gong Z, Kim C S, Zhang C, Bohnert H J, Zhu J K, Bressan R A, Hasegawa P M, Zhao Y X, Zhang H. Expressed sequence tags from *Thellungiella halophila*, a new model to study plant salt-tolerance. *Plant Science*, 2004, 166(3): 609-616.
- [2] Amtmann A. Learning from evolution: *Thellungiella* generates new knowledge on essential and critical components of abiotic stress tolerance in plants. *Molecular Plant*, 2009, 2(1): 3-12.
- [3] Taji T, Seki M, Satou M, Sakurai T, Kobayashi M, Ishiyama K, Narusaka Y, Narusaka M, Zhu J K, Shinozaki K. Comparative genomics in salt tolerance between *Arabidopsis* and *Arabidopsis*-related halophyte salt cress using *Arabidopsis* microarray. *Plant Physiology*, 2004, 135(3): 1697-1709.
- [4] Gong Q, Li P, Ma S, Indu Rupassara S, Bohnert H J. Salinity stress adaptation competence in the extremophile *Thellungiella halophila* in comparison with its relative *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 2005, 44(5): 826-839.
- [5] Pang Q Y, Chen S X, Dai S J, Chen Y Z, Wang Y, Yan X F. Comparative proteomics of salt tolerance in *Arabidopsis thaliana* and *Thellungiella halophila*. *Journal of Proteome Research*, 2010, 9(5): 2584-2599.
- [6] Bailey N J, Oven M, Holmes E, Nicholson J K, Zenk M H. Metabolomic analysis of the consequences of cadmium exposure in *Silene cucubalus* cell cultures via <sup>1</sup>H NMR spectroscopy and chemometrics. *Phytochemistry*, 2003, 62(6): 851-858.
- [7] Le Lay P, Isaure M P, Sarry J E, Kuhn L, Fayard B, Le Bail J L, Bastien O, Garin J, Roby C, Bourguignon J. Metabolomic, proteomic and biophysical analyses of *Arabidopsis thaliana* cells exposed to a caesium stress. Influence of potassium supply. *Biochimie*, 2006, 88(11): 1533-1547.
- [8] Fiehn O. Metabolomics—the link between genotypes and phenotypes. *Plant Molecular Biology*, 2002, 48(1/2): 155-171.
- [9] Junker B H, Klukas C, Schreiber F. VANTED: a system for advanced data analysis and visualization in the context of biological networks. *BMC Bioinformatics*, 2006, 7(1): 109-120.
- [10] Parida A K, Das A B. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2005, 60(3): 324-349.
- [11] Kerepesi I, Galiba G. Osmotic and salt stress-induced alteration in soluble carbohydrate content in wheat seedlings. *Crop Science*, 2000, 40(2): 482-487.
- [12] Sheen J, Zhou L, Jang J C. Sugars as signaling molecules. *Current Opinion in Plant Biology*, 1999, 2(5): 410-418.
- [13] Cuin T A, Shabala S. Compatible solutes reduce ROS-induced potassium efflux in *Arabidopsis* roots. *Plant, Cell & Environment*, 2007, 30(7): 875-885.
- [14] brahm E, Rig G, Szkely G, Nagy R, Koncz C, Szabados L. Light-dependent induction of proline biosynthesis by abscisic acid and salt stress is inhibited by brassinosteroid in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*, 2003, 51(3): 363-372.
- [15] Mansour M M F. Protection of plasma membrane of onion epidermal cells by glycinebetaine and proline against NaCl stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 1998, 36(10): 767-772.

- [16] Xu X M , Ye H C , Li G F. Progress in synthesis and metabolism of proline and its relationship with osmotolerance of plants. *Chinese Bulletin of Botany* ,2000 ,17( 6) : 536–542.
- [17] Brugière N , Dubois F , Limami A M , Lelandais M , Roux Y , Sangwan R S , Hirel B. Glutamine synthetase in the phloem plays a major role in controlling proline production. *Plant Cell* ,1999 ,11( 10) : 1995–2011.
- [18] Liu J , Shi D C. Photosynthesis , chlorophyll fluorescence , inorganic ion and organic acid accumulations of sunflower in responses to salt and salt-alkaline mixed stress. *Photosynthetica* ,2009 ,48( 1) : 127–134.
- [19] Emmerlich V , Linka N , Reinhold T , Hurth M A , Traub M , Martinoia E , Neuhaus H E. The plant homolog to the human sodium/dicarboxylic cotransporter is the vacuolar malate carrier. *Proceedings of the National Academy of Sciences* ,2003 ,100( 19) : 11122–11126.
- [20] Timpa J D , Burke J J , Quiseberry J E , Wendt C W. Effects of water stress on organic acid and carbohydrate composition of cotton plant. *Plant Physiology* ,1986 ,82( 3) : 724–730.
- [21] Luetttge U. Nocturnal citrate accumulation and its response to environmental stress in the CAM plant *Kalanchoe pinnata* ( Lam. ) Pers. *Plant , Cell & Environment* ,1990 ,13( 9) : 977–982.
- [22] Fougère F , Le Rudulier D , Streeter J G. Effects of salt stress on amino acid , organic acid and carbohydrate composition of roots , bacteroids and cytosol of alfalfa ( *Medicago sativa* L. ) . *Plant Physiology* ,1991 ,96( 4) : 1228–1236.
- [23] Gavaghan C L , Li J V , Hadfield S T , Hole S , Nicholson J K , Wilson I D , Howe P W A , Stanley P D , Holmes E. Application of NMR-based metabolomics to the investigation of salt stress in maize ( *Zea mays* ) . *Phytochemistry Analysis* ,2011 ,22( 3) : 214–224.
- [24] Robinson S P , Jones G P. Accumulation of glycinebetaine in chloroplasts provides osmotic adjustment during salt stress. *Australian Journal of Plant Physiology* ,1986 ,13( 5) : 659–668.
- [25] Genard H , Le Saos J , Hillard J , Tremolieres A , Boucaud J. Effect of salinity on lipid composition , glycine betaine content and photosynthetic activity in chloroplasts of *Suaeda maritima*. *Plant Physiology and Biochemistry* ,1991 ,29( 5) : 421–427.
- [26] Bohnert H J , Nelson D E , Jensen R G. Adaptations to environmental stresses. *Plant Cell* ,1995 ,7( 7) : 1099–1111.
- [27] Hare P D , Cress W A , Van Staden J V. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant , Cell & Environment* ,1998 ,21( 6) : 535–553.
- [28] Tipirdamaz R , Gagneul D , Duhazé C , Aïnouche A , Monnier C , Özkum D , Larher F. Clustering of halophytes from an inland salt marsh in Turkey according to their ability to accumulate sodium and nitrogenous osmolytes. *Environmental and Experimental Botany* ,2006 ,57( 1/2) : 139–153.

#### 参考文献:

- [16] 许祥明,叶和春,李国凤. 脯氨酸代谢与植物抗渗透胁迫的研究进展. *植物学通报*,2000,17(6): 536–542.