分类号： 密 级：公 开

学 号：2005201014 单位代码：10759

**石河子大学**

**博** 士 学 位 论 文



棉花幼苗γ–氨基丁酸代谢及对干旱胁迫的响应

|  |  |
| --- | --- |
| 学 位 申 请 人 | **曹** 让 |
| 指 导 教 师 | **张旺锋教授** |
|  | **梁宗锁教授** |
| 申请学位门类级别 | **农学博士** |
| 学 科 、 专 业 名 称 | **作物栽培学与耕作学** |
| 研 究 方 向 | **作物高产生理生态** |
| 所 在 学 院 | **农 学 院** |

中国·新疆·石河子

2013 年 6 月

**Effect of cotton（*Gossypium* spp.） seedling gamma aminobutyric acid metabolic response to drought stress**

A Dissertation Submitted to

**Shihezi University**

In Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of

Doctor of Agriculture

By Cao Rang

**（Crop Cultivation and Farming System）**

Dissertation Supervisor: Zhang Wang Feng

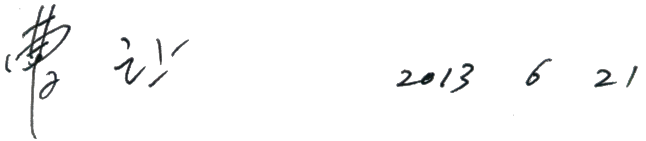
Liang Zong Suo

June, 2013

**石河子大学学位论文独创性声明及使用授权声明** 学位论文独创性声明

本人所呈交的学位论文是在我导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知， 除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示谢意。

研究生签名： 日

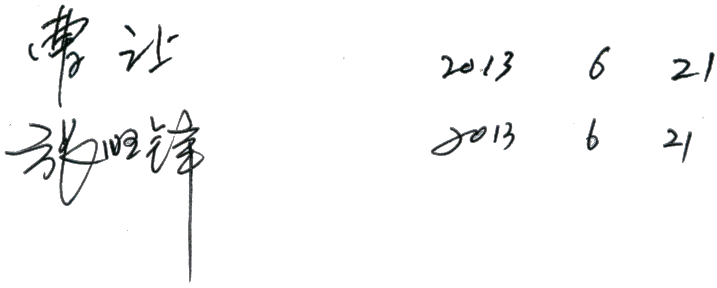


时间：

年

月

使用授权声明

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文在学校图书馆保存并允许被查阅。有权自行或许可他人将学位论文编入有关数据库提供检索服务。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 研究生签名： | 时间： | 年 | 月 | 日 |
| 导师签名： | 时间： | 年 | 月 | 日 |

摘 要

干旱缺水对作物生产造成的危害超过了其他非生物因子胁迫的总和，因此，提高作物抗旱性已成为干旱缺水地区农业可持续发展急需解决的关键问题。新疆是我国典型的干旱区，棉花是新疆最重要的经济作物，研究棉花适应干旱逆境的能力，探讨棉花抗逆生理生态机制，培育耐旱品种，已成为新疆现代植棉业迫切需要解决的重要问题。

植物体内糖代谢途径主要是通过糖酵解和三羧酸循环（TCA）进行，γ–氨基丁酸（GABA）支路和TCA循环密不可分。GABA支路对C / N分配和氨基酸代谢具有一个中心调节作用。植物中GABA被认为是一种信号传导分子，在生物和非生物逆境胁迫条件下，植物会迅速积累大量GABA。外源GABA具有缓解植物非生物胁迫的作用。所以，研究棉花幼苗GABA代谢对干旱胁迫的响应，了解棉花对干旱胁迫下的氮代谢过程，对生产中调控棉花碳氮代谢，实现棉花高产很有必要。本试验采用土培和水培的方式，在人工气候室条件下，研究抗旱性不同的2个棉花幼苗品种GABA代谢对干旱胁迫的响应，研究结果如下：

1.在持续干旱胁迫下，新陆早7号（耐旱品种）和新陆早24号（不耐旱品种）的叶水势、叶片相对含水量、根系含水量和根系活力逐渐下降，在胁迫5d降到最低，与同期处理的对照组相比较，差异达到显著水平（*p<0.05*）。谷氨酸脱羧酶（GAD）活性在处理4d达到最大值，5d及复水后随之下降；GABA含量随着干旱胁迫天数的增加而增加，在胁迫5d上升到最大值，此时新陆早7号和新陆早24号叶片GABA含量分别比对照增加290.56%和200.31%；根系GABA 含量分别比对照增加320.63%和

243.81%；叶片GABA转氨酶（GABA-T）活性在胁迫前期高，随着胁迫时间的延长而下降，在胁迫3d较对照显著降低，5d下降到最低。2个品种根系的GABA-T活性变化趋势和叶片相似。复水后，2个品种叶片和根系GAD活性、GABA-T活性、GABA含量均有所恢复，其中新陆早7号比新陆早24号恢复速度快，说明耐旱型棉花品种具有较强的恢复能力。

2.棉花叶片和根系中至少存在3种内肽酶，即巯基蛋白酶、丝氨酸蛋白酶及金属蛋白酶。其中最活跃的是巯基蛋白酶。外源GABA能够显著降低棉花叶片和根系的内肽酶活性。

3. Ca(NO3) 2、W7和TFP对棉花幼苗处理组，不同有机酸和氨基酸对棉花幼苗处理GAD活性的作用效果表现为：-1.0MPa PEG处理使棉花叶片GAD活性显著降低，

10 mM Ca(NO3) 2处理使棉花叶片GAD活性显著高于对照；在-1.0 MPa PEG+100mMW7+10 mMCa(NO3) 2处理下，棉花叶片GAD活性显著低于对照，证明W7对GAD活性的抑制效果最显著；在5 mM谷氨酸、5 mM丙氨酸、5 mM甘氨酸、5 mM天门冬氨酸和5 mM铵离子处理组，以谷氨酸处理的棉花叶片GAD活性最高，其他氨基酸处理GAD活性略低于对照，铵离子处理的GAD活性最低；在10 mM丁酸、10 mM柠檬酸、10 mM苹果酸和100 mM草酸处理组，棉花叶片GAD活性均高于对照，GAD

活性变化顺序是草酸>柠檬酸>苹果酸>丁酸。棉花叶片中的草酸含量虽然远远高于其他有机酸，但对GAD活性影响不如苹果酸和柠檬酸显著。在钙试剂和氨基酸处理组棉花根系中GAD活性和GABA含量变化趋势和棉花叶片变化趋势相似，所不同的是变化幅度降低缓慢。

4.在-0.5 MPa、-1.0 MPa和-1.5 MPa三种水势的PEG溶液胁迫下，棉花叶片腐胺

（Put）、亚精胺（Spd）和精胺（Spm）含量均随着胁迫水势的降低而增加，增加量的幅度大小为Put> Spd> Spm，且抗旱品种新陆早7号增加的幅度大于不抗旱品种新陆早24号。在-1.5MPa水势的PEG溶液胁迫下，Put的含量上升最显著，Spd次之，Spm变化幅度最小；在加入二胺氧化酶（DAO）活性抑制剂氨基胍（AG）后，棉花叶片Put、Spd和精胺Spm含量都随着胁迫水势的降低而略有上升，上升幅度最大的也是Put. Spd次之。Spm变化幅度最小；在-0.5 MPa、-1.0 MPa和-1.5 MPa PEG溶液胁迫下，棉花叶片DAO活性在-1.0 MPa时最高，在-0.5 MPa最低。加入AG后，棉花叶片DAO活性几乎完全被抑制；在-1.5 MPaPEG溶液胁迫下，GABA含量最高，-1.0 MPa PEG溶液胁迫下的棉花叶片GABA含量次之，-0.5 MPa PEG溶液胁迫下的棉花叶片GABA含量最低。

在三种水势PEG胁迫下，棉花根系的Put、Spd、Spm、GABA含量、DAO活性变化与相同水势PEG胁迫下的叶片变化基本相似，不同的是Put、Spd、Spm和GABA含量比叶片低的多，DAO活性则略低于叶片。-1.0 MPa PEG溶液胁迫下的棉花叶片和根系的多胺降解途径可提供30%到40%GABA形成。

5.在持续干旱胁迫及复水条件下，新陆早7号和新陆早24号叶片和根系氮代谢关键酶活性、可溶性蛋白质含量、总氮含量、纯氮含量和游离氨基酸含量发生了较大的变化。具体表现为：在干旱胁迫下，2个品种叶片含水量逐渐降低，其中新陆早7号下降较为明显；与对照正常供水相比，新陆早7号和新陆早24号叶片和根系谷氨酰胺合成酶（GS）活性和硝酸还原酶（NR）活性都比对照显著降低。叶片和根系内肽酶活性、谷氨酸脱氢酶（GDH）活性都比对照显著增加。可溶性蛋白质含量、总氮含量和铵离子含量也都比对照显著增加；持续干旱胁迫增加了2 个品种叶片和根系游离氨基酸含

量，新陆早7号在胁迫前期游离氨基酸含量增加慢，后期增加快，新陆早24号游离氨

基酸含量的变化趋势与新陆早7号相反。复水后，新陆早7号叶片和根系含水量和硝酸还原酶活性及谷酰胺合成酶活性恢复较快，谷氨酸脱氢酶活性和内肽酶活性与游离氨基酸、铵离子、可溶性蛋白质和总氮含量下降的速度也较新陆早24号快。2个品种棉花幼苗的GABA含量与谷氨酸、脯氨酸、总游离氨基酸含量存在显著或极显著相关关系。关键词：棉花；幼苗；γ–氨基丁酸；干旱胁迫；谷氨酸脱羧酶；多胺；氮代谢

**论文类型**：B（应用研究）

**Abstract**

Drought influence crop production greatly more than the sum of other stress factors. Therefore, improving crop drought resistance has become a critical issue of agricultural sustainable development in arid areas. Xinjiang is a typical arid area in China and cotton is the most important economic crops in this area. Research on the ability to adapt to drought stress in cotton, discuss physiological and ecological mechanism in drought resistance and cultivate varieties which are drought resistant, these have become the urgent question to resolve in Xinjiang.

The metabolism of sugar mainly through glycolysis and the TCA cycle in plants. Gamma aminobutyric acid (GABA) branch is closely linked to TCA cycle. The GABA branch has a central control role in C/N distribution and amino acid metabolism GABA is considered to be a signaling molecule in plant. Under biotic and abiotic stress conditions, plants will accumulate a large number of GABA rapidly. Exogenous GABA can weak the plant abiotic stress. Hence, it is necessary to study GABA metabolism in cotton seedlings response to drought stress, it will help us understand the nitrogen metabolism and improve cotton production under drought stress. In this experiment, we studied the response of two cotton varieties seedlings with different drought stress under soil culture and hydroponics in artificial climate chamber. Some results as follows:

1. Under sustaining drought stress," Xinluzao No. 7 (drought-resistant variety)" and" Xinluzao No. 24" (sensitive to variety) leaf water potential, the relative water content of leaves, roots water content and activity decreased gradually. After 5d treatment, it decreased to lowest level, compared with the control group, the difference reached a significant level. The activity of glutamic decarboxylase (GAD) reached the maximum value after 4d treatment, but it decreased after 5d treatment and re-watering. With the extension of drought stress time, the content of GABA increased, and reached to maximum after 5d stress. The GABA content increased by 290.56% and 200.31% in" Xinluzao No. 7" and" Xinluzao No. 24" leaves, respectively; and in roots, GABA content increased by 320.63% and 243.81%. Leaf GABA-T has higher activity in the early stress period, but it decreased with the stress time prolonged in" Xinluzao No. 7" and" Xinluzao No. 24". Compared with the control, the 3d decreased significantly and 5d reached the lowest level. GABA-T activity of roots and leaves had the similar trend in two varieties. After re-watering, the GAD activity, GABA-T activity and GABA content recover in leaves and roots of two varieties, but" Xinluzao No. 7" was recover faster than" Xinluzao No. 24". It was suggested that drought-tolerant species cotton has stronger recover ability.

2. There are at least 3 kinds of endopeptidase in cotton leaves and roots, namely the thiol protease, serine protease and metalloprotease. The thiol protease is most active among them. Exogenous GABA can decrease significant endopeptidase activity in cotton leaves and roots.

3. The results of GAD activity are as follows after treated by Ca(NO3) 2、W7、TFP and different organic

Acid and amino acid:

Under -1.0MPa PEG treatment, GAD activity increased significantly in cotton leaves. But under 10M Ca(NO3) 2 treatment, GAD activity was lower than the control in cotton leaf. Under -1.0MPa PEG+100mMW7+10M Ca(NO3) 2 treatment, GAD activity was significantly higher than that of control in cotton leaf, which suggested that GAD activity was restrained obvious under W7 treatment. For 5mM alanine, 5mM glycine, 5mM glutamic acid, 5mM aspartic acid and 5mM ammonium ion treatment, GAD activity of cotton leaves reached to the highest under alanine treatment. GAD activity was slightly lower than that of control under other amino acids treatment. Under 5mM ammonium ion treatment, GAD

Activity of cotton leaves was the lowest. For 10 mM butyric acid、citric acid、malic acid and oxalic acid treatment, GAD activity of cotton leaf was slightly higher than that of control, oxailc acid> citric acid> malic acid> butyric acid. The activity of GAD and GABA content in cotton roots has the similar trends

With leaves under Ca(NO3) 2、W7、TFP、different amino acid treatment, but which reduced slowly.

4. Under -0.5MPa, -1.0MPa and -1.5MPa water stress conditions, putrescine (Put), spermidine (Spd) and spermine (Spm) contents in cotton leaf increased with decreasing stress potential, among them Put> Spd> Spm. The increase range of" Xinluzao No. 7" is higher than" Xinluzao No. 24". Under -1.5MPa PEG water stress condition, Put content increased significantly, Spd and Spm changed slightly. After adding aminoguanidine (AG), which was DAO activity inhibitor, Put, Spd and spermine Spm contentin cotton leaf increased slightly with the decrease of water potential, the most change extent is Put, then Spd, and Spm changed slightly. DAO activity was highest under -1.0MPa, but lowest under -0.5MPa stress. After joining the AG, DAO activity in cotton leaf was almost completely inhibited. Under -1.5MPa PEG stress, GABA content reached the highest and it was the lowest under -0.5MPa PEG stress.

Under three kinds of PEG potential stress, Put, Spd, Spm, DAO activity and GABA content in cotton roots are similar trend with leaves. But the Put, Spd, Spm and GABA content was much lower than the leaves, and DAO activity was slightly lower than the leaves. The polymine degradation pathway can provide 30% to 40% GABA product under -1.0MPaPEG stress both in cotton leaves and roots.

5. Under the continuous drought stress and re-watering, nitrogen metabolism key enzyme activity, soluble protein, total nitrogen, pure nitrogen and free amino acid content major for" Xinluzao No. 7" and" Xinluzao No. 24" leaves and roots. Under PEG stress, two varieties leaves water content decreased gradually," Xinluzao No. 7" decreased more obviously; Compared with the control water condition, glutamine synthetase (GS) activity and nitrate reduction enzyme (NR) activity in leaves and roots decreased significantly in" Xinluzao No. 7" and" Xinluzao No. 24", The endopeptidase activity, glutamate dehydrogenase (GDH) activity of leaves and roots increased markedly. The content of soluble protein, total nitrogen and ammonium ion content also increased markedly than that of control. In addition, free amino acid content increased under continuous water stress in leaves and roots for two varieties of cotton. Free amino acid content of" Xinluzao No. 7" increased slowly in the early stage under stress and then increased quickly. Free amino acids change trend of" Xinluzao No. 24" was opposite to" Xinluzao No. 7 ". After re-watering, water content, activity of nitrate reductase and glutamine synthetase activity recover faster for" Xinluzao No. 7" roots and leaves. Glutamate dehydrogenase activity, endopeptidase activity, free amino acid, ammonium ion, soluble protein and total nitrogen content decreased faster than the" Xinluzao No. 24". The correlation analysis showed that the GABA content of cotton seedling was significantly or extremely significantly related to glutamic acid, proline and total amino acid content.

Keywords: cotton seedling; GABA; Drought stress; GAD; PAs; Nitrogenous metabolism

目 录

[摘 要](#_Toc686831156) 3

**[Abstract](#_Toc686831157)** 4

[缩略词表](#_Toc686831158) 6

[第一章 文献综述](#_Toc686831159) 11

[1 谷氨酸脱羧酶（GAD）](#_Toc686831160) 11

[1.1 不同植物GAD的特性](#_Toc686831161) 11

[1.2 植物GAD可能存在pH和钙两个水平调节](#_Toc686831162) 12

[1.3 调节CaMBD关键残基](#_Toc686831163) 13

[2 GABA转氨酶（GABA-T）](#_Toc686831164) 13

[3 琥珀酸半醛脱氢酶（SSADH）](#_Toc686831165) 13

[4 多胺与GABA代谢](#_Toc686831166) 14

[5 GABA对植物的作用](#_Toc686831167) 14

[6 植物其他游离氨基酸在干旱胁迫中的作用](#_Toc686831168) 15

[7 本研究的意义](#_Toc686831169) 15

[第二章 棉花GABA含量变化对干旱胁迫的响应](#_Toc686831170) 16

[第一节 棉花GABA含量及相关酶活性变化对干旱胁迫的响应](#_Toc686831171) 16

[1 材料与方法](#_Toc686831172) 16

[1.1 材料与试验设计](#_Toc686831173) 16

[1.2 GABA含量的测定](#_Toc686831174) 16

[1.2.1 GABA提取](#_Toc686831175) 16

[1.2.2 GABA分析试剂](#_Toc686831176) 16

[1.2.3 GABA分析色谱条件与仪器](#_Toc686831177) 16

[1.2.4 GABA分析图谱](#_Toc686831178) 16

[mV 100](#_Toc686831178)

[90](#_Toc686831178)

[80](#_Toc686831178)

[70](#_Toc686831178)

[60](#_Toc686831178)

[50](#_Toc686831178)

[40](#_Toc686831178)

[30](#_Toc686831178)

[20](#_Toc686831178)

[10](#_Toc686831178)

[0](#_Toc686831178)

[-10](#_Toc686831178)

[8](#_Toc686831178)

[16](#_Toc686831178)

[24](#_Toc686831178)

[32](#_Toc686831178)

[40](#_Toc686831178)

[48](#_Toc686831178)

[56](#_Toc686831178)

[64](#_Toc686831178)

[72](#_Toc686831178)

[80](#_Toc686831178)

[min](#_Toc686831178)

[1.3 GAD活性测定](#_Toc686831179) 17

[1.4 GABA-T活性测定](#_Toc686831180) 17

[1.5 根系活力测定](#_Toc686831181) 17

[2 结果与分析](#_Toc686831182) 17

[2.1 干旱胁迫及复水过程中土壤相对含水量的变化](#_Toc686831183) 17

[2.2 干旱胁迫对叶片相对含水量和叶水势的影响](#_Toc686831184) 19

[2.3 干旱胁迫对根系含水量和根系活力的影响](#_Toc686831185) 20

[2.4 干旱胁迫对谷氨酸脱羧酶（GAD）活性的影响](#_Toc686831186) 21

[2.5 干旱胁迫对GABA含量变化的影响](#_Toc686831187) 23

[2.6 干旱胁迫对GABA-T活性的影响](#_Toc686831188) 24

[3 讨论](#_Toc686831189) 25

[第二节 外源GABA及不同内肽酶抑制剂对干旱胁迫下棉花内肽酶活性的影响](#_Toc686831190) 26

[1 材料与方法](#_Toc686831191) 26

[1.1 试验材料](#_Toc686831192) 26

[1.2 水培试验](#_Toc686831193) 26

[1.3 测定方法](#_Toc686831194) 26

[2. 结果与分析](#_Toc686831195) 26

[2.1 GABA对PEG胁迫下棉花叶片和根系中内肽酶活力的影响](#_Toc686831196) 26

[2.2 不同蛋白酶抑制剂和激活剂对棉花叶片和根系内肽酶活力的影响](#_Toc686831197) 28

[3. 讨论](#_Toc686831198) 31

[第三章 棉花GABA代谢的主要酶GAD活性对不同调节物质的响应](#_Toc686831199) 31

[1 材料与方法](#_Toc686831200) 32

[1.1 试验材料培养与处理](#_Toc686831201) 32

[1.1.1 土培试验](#_Toc686831202) 32

[1.1.2 水培试验](#_Toc686831203) 32

[1.2 分析方法](#_Toc686831204) 32

[1.2.1 GABA含量和谷氨酸脱羧酶活性的测定](#_Toc686831205) 32

[1.2.2 有机酸含量分析](#_Toc686831206) 32

[2 结果与分析](#_Toc686831207) 33

[2.1 棉花幼苗叶片和根系中的有机酸含量](#_Toc686831208) 33

[2.2 干旱胁迫对棉花幼苗草酸含量的影响](#_Toc686831209) 33

[2.3 不同有机酸对棉花叶片和根系GAD活性作用的效果](#_Toc686831210) 34

[2.4 Ca2+和CaM抑制剂浓度对棉花叶片和根系GAD活性作用的效果](#_Toc686831211) 35

[2.5 不同浓度氨基酸和铵离子对棉花叶片和根系CAD活性作用的效果](#_Toc686831212) 36

[2.6 不同浓度有机酸对棉花叶片和根系GABA含量的影响](#_Toc686831213) 38

[2.7 Ca2+和CaM抑制剂浓度对棉花叶片和根系GABA含量的影响](#_Toc686831214) 39

[2.8 不同浓度氨基酸和铵离子对棉花叶片和根系GABA含量的影响](#_Toc686831215) 40

[3 讨论](#_Toc686831216) 41

[第四章 与多胺代谢相关的GABA代谢对干旱胁迫的响应](#_Toc686831217) 42

[1 材料与方法](#_Toc686831218) 42

[1.1 幼苗Th长](#_Toc686831219) 42

[1.2 幼苗胁迫处理](#_Toc686831220) 42

[1.3 测定内容与方法](#_Toc686831221) 42

[1.3.1 腐胺（Put）、亚精胺（Spd）和精胺（Spm）含量的测定](#_Toc686831222) 42

[1.3.1.1 腐胺、亚精胺和精胺含量的提取](#_Toc686831223) 42

[1.3.1.2 腐胺、亚精胺和精胺含量分析试剂](#_Toc686831224) 42

[1.3.1.3 腐胺、亚精胺和精胺含量分析的色谱条件与仪器](#_Toc686831225) 42

[1.3.2 二胺氧化酶（DAO）活性测定](#_Toc686831226) 45

[2 结果与分析](#_Toc686831227) 45

[2.1 PEG胁迫对棉花游离态Put含量的影响](#_Toc686831228) 45

[2.2 PEG胁迫对棉花游离态Spd含量的影响](#_Toc686831229) 46

[2.3 PEG胁迫对棉花游离态Spm含量的影响](#_Toc686831230) 48

[2.4 PEG胁迫对棉花DAO活性的影响](#_Toc686831231) 49

[2.5 PEG胁迫对棉花GABA含量的影响](#_Toc686831232) 50

[3 讨论](#_Toc686831233) 51

[第五章 干旱胁迫下棉花氮代谢与GABA含量变化的关系](#_Toc686831234) 51

[第一节 干旱胁迫下棉花叶片氮代谢与](#_Toc686831235)**[GABA](#_Toc686831235)**[含量变化的关系](#_Toc686831235) 52

[1 材料与方法](#_Toc686831236) 52

[1.1 材料与试验设计](#_Toc686831237) 52

[1.2 测定指标与方法](#_Toc686831238) 52

[1.2.1 叶片总氮含量测定](#_Toc686831239) 52

[1.2.2 叶片内肽酶活性测定](#_Toc686831240) 52

[1.2.3 叶片谷氨酰胺合成酶活性测定](#_Toc686831241) 52

[1.2.4 叶片谷氨酸合成酶活性测定](#_Toc686831242) 52

[1.2.5 叶片氨基酸和铵离子含量测定](#_Toc686831243) 52

[1.2.5.1 叶片氨基酸和铵离子提取](#_Toc686831244) 52

[1.2.5.2 氨基酸分析色谱条件与仪器](#_Toc686831245) 52

[1.3 数据处理](#_Toc686831246) 53

[2 结果与分析](#_Toc686831247) 53

[2.1 干旱胁迫及复水对棉花幼苗叶片中内肽酶酶活性的影响](#_Toc686831248) 53

[2.2 干旱胁迫及复水对棉花幼苗叶片总氮含量和可溶性蛋白含量的影响](#_Toc686831249) 53

[2.3 干旱胁迫及复水对棉花幼苗叶片NR活性、GS活性、GOGAT活性和](#_Toc686831250) 55

[2.4 干旱胁迫及复水对棉花幼苗叶片中铵离子含量的影响](#_Toc686831251) 57

[2.5 干旱胁迫及复水对棉花幼苗叶片中游离氨基酸含量的影响](#_Toc686831252) 58

[2.6 干旱胁迫及复水棉花幼苗叶片中游离氨基酸含量与GABA含量变化的](#_Toc686831253) 79

[3 讨论](#_Toc686831254) 79

[第二节 干旱胁迫下棉花幼苗根系氮代谢与](#_Toc686831255)**[GABA](#_Toc686831255)**[含量变化的关系](#_Toc686831255) 80

[1 材料与方法](#_Toc686831256) 80

[1.1 材料与试验设计](#_Toc686831257) 80

[1.2 分析方法](#_Toc686831258) 80

[1.3 数据处理](#_Toc686831259) 80

[2 结果与分析](#_Toc686831260) 80

[2.1 干旱胁迫及复水对棉花幼苗根系中内肽酶活性的影响](#_Toc686831261) 80

[2.2 干旱胁迫及复水对棉花幼苗根系总氮含和可溶性蛋白含量的影响](#_Toc686831262) 81

[2.2 2.2](#_Toc686831263) 81

[A](#_Toc686831263)

[B](#_Toc686831263)

[干 旱 Drought](#_Toc686831263)

[对 照 Control](#_Toc686831263)

[2.3 干旱胁迫及复水对棉花幼苗根系NR、GS、GOGAT、GDH活性的影响](#_Toc686831264) 81

[2.4 干旱胁迫及复水对棉花幼根系铵离子含量的影响](#_Toc686831265) 83

[2.5 干旱胁迫及复水对棉花幼苗根系中游离氨基酸含量的影响](#_Toc686831266) 84

[2.6 干旱胁迫及复水棉花幼苗根系中游离氨基酸含量与GABA含量变化的相关性分析](#_Toc686831267) 105

[3 讨论与结论](#_Toc686831268) 106

[第六章 研究结论与展望](#_Toc686831269) 106

**[1](#_Toc686831270)** [研究结论](#_Toc686831270) 106

**[1.1](#_Toc686831271)** [棉花](#_Toc686831271)**[GABA](#_Toc686831271)**[含量及其代谢的主要酶](#_Toc686831271)**[GAD](#_Toc686831271)**[活性对干旱胁迫的响应](#_Toc686831271) 106

**[1.2](#_Toc686831272)** [棉花](#_Toc686831272)**[GABA](#_Toc686831272)**[代谢的主要酶](#_Toc686831272)**[GAD](#_Toc686831272)**[活性对不同调节物质的响应](#_Toc686831272) 106

**[1.3](#_Toc686831273)** [与多胺代谢相关的](#_Toc686831273)**[GABA](#_Toc686831273)**[代谢对干旱胁迫的响应](#_Toc686831273) 106

**[1.4](#_Toc686831274)** [干旱胁迫下棉花幼苗叶片和根系氮代谢与](#_Toc686831274)**[GABA](#_Toc686831274)**[代谢的关系](#_Toc686831274) 106

[2 研究的创新点](#_Toc686831275) 107

**[3](#_Toc686831276)** [展望](#_Toc686831276) 107

[参考文献](#_Toc686831277) 107

[作者简介](#_Toc686831278) 113

[导师评阅表](#_Toc686831279) 113

# 缩略词表

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 英文缩写 | 英文全称 | 中文名称 |
| 2-OG | 2-ketoglutaric acid | 2-酮戊二酸 |
| AG | aminoguanidine | 氨基胍 |
| Ala | alanine | 丙氨酸 |
| ALDH | Aldehyde dehydrogenase | 醛脱氢酶 |
| AR | Analytical reagent | 分析纯 |
| Arg | arginine | 精氨酸 |
| Asp | Aspartic acid | 天门冬氨酸 |
| CaM | calmodulin | 钙调素 |
| CaMBD | CaM binding domain | CaM 结合域 |
| Cys | cysteine | 胱氨酸 |
| DAO | Diamine oxidase | 二胺氧化酶 |
| DTT | dithiothreitol | 二硫苏糖醇 |
| EDTA | Ethylene diamine tetraacetic acid | 乙二胺四乙酸 |
| EDTA | Ethylene Diamine Tetraacetic Acid | 乙二胺四乙酸 |
| GABA | γ-aminobutyric acid | γ-氨基丁酸 |
| GABA-T | GABA transaminase | γ-氨基丁酸转氨酶 |
| GAD | Glutamate decarboxylase | 谷氨酸脱羧酶 |
| GDH | Glutamate dehydrogenase | 谷氨酸脱氢酶 |
| GFP | Green fluorescent protein | 绿色荧光蛋白 |
| GHB | Gamma-hydroxybutyric acid | γ-羟基丁酸 |
| Glu | Glutamic acid | 谷氨酸 |
| Gly | glycine | 甘氨酸 |
| GOGAT | Glutamate synthase | 谷氨酸合成酶 |
| GR | Guaranteed reagent | 优级纯 |
| GS | Glutamine synthetase | 谷氨酰胺合成酶 |
| His | histidine | 组氨酸 |
| IA | Iodoacetic acid | 碘乙酸 |
| Ileu | isoleucine | 异亮氨酸 |
| IPTG | isopropyl-beta-D-thiogalactoside | 异丙基硫代半乳糖苷 |
| Leu | leucine | 亮氨酸 |
| Lys | lysine | 赖氨酸 |
| Met | methionine | 蛋氨酸 |
| NADH | Nicotinamide adenine dinucleotide | 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 |
| NADPH | Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate | 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 |
| NR | Nitrate reductase | 硝酸还原酶 |
| PAO | Polyamine oxidase | 多胺氧化酶 |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 英文缩写 | 英文全称 | 中文名称 |
| PAs | polyamines | 多胺 |
| PEG | Polyethylene glycol | 聚乙二醇 |
| Phe | phenylalanine | 苯丙氨酸 |
| PLP | Pyridoxal 5′-phosphate | 磷酸吡哆醛 |
| PMSF | phenylmethylsulfonylfluoride | 苯甲基磺酰氟 |
| Pro | proline | 脯氨酸 |
| Put | putrescine | 腐胺 |
| PAs | polyamines | 多胺 |
| PVP | polyvinylpyrrolidone | 聚乙烯吡咯烷酮 |
| Rubisco | ribulosebisphosphatecarboxylaseoxygenase | 核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧  酶 |
| Ser | Serine | 丝氨酸 |
| Spd | speridine | 三胺亚精胺 |
| Spm | spermine | 精胺 |
| SSA | Succinic semialdhyde | 琥珀酸半醛 |
| SSADH | Succinate semialdehyde dehydrogenase | 琥珀酸半醛脱氢酶 |
| SSAR | Succinic semialdehyde reductase | 琥珀酸还原酶 |
| TCA cycle | Tricarboxylic acid cycle | 三羧酸循环 |
| TFP | trifluoperazine | 三氟拉嗪 |
| Thr | threonine | 苏氨酸 |
| Tyr | tyrosine | 酪氨酸 |
| Val | valine | 缬氨酸 |
| W7 | N-(6-Aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulf  onamide |  |

# 第一章 文献综述

γ–氨基丁酸（GABA）是一个广泛存在于原核生物和真核细胞中的4碳非蛋白质氨基酸（Satyanarayan et al, 1990; Shelp et al, 1999）。1949年首次确认了马铃薯块茎的GABA. GABA在动物中作为中枢神经系统神经递质或神经调节物质（Fait et al, 2006; Shelp et al, 2009）。相当多的证据表明，GABA在植物中积累以响应生物和非生物胁迫，此积累是C/N网络和各种信号途径与发育进程及植物和其它生物之间通信相关的应激反应的一部分（Narayan et al, 1990; Shelp et al, 1999, 2006, 2009, 2012; Kinnersley et al, 2000; Bouchéet al, 2003a; Bouchéet al, 2004; Bown et al, 2006;）。长期以来，已知GABA来自谷氨酸脱羧，然后转换成琥珀酸半醛（SSA），再琥珀酸盐进入三羧酸循环。这三个反应被认为是分别由谷氨酸脱羧酶（GAD），丙酮酸盐和2– 酮戊二酸依赖GABA转氨酶（GABA–T）和SSA的脱氢酶（SSADH）催化，统称为的GABA支路。在前拟南芥时代，研究GABA支路细胞内区隔的模型，发现GAD位于细胞质中，GABA–T和SSADH定位于线粒体，这暗示GABA的运输穿过线粒体膜。最近，这个模型的各个方面已证实和延伸，通过对拟南芥的研究，包括为GABA–T 和SSADH线粒体靶向信号的表征，以及涉及叶绿体和细胞质亚型的SSA还原酶（SSAR）的分支点SSA的分解代谢。



Possible schemes ofγ-aminobutyric acid (GABA) metabolism and related glutamate metabolic pathways. Enzymes are indicated in italics. GAD, glutamate decarboxylase; GDH, glutamate dehydrogenase; SSADH, succinic semialdehyde dehydrogenase; TCA, tricarboxylic acid. (Shawn M et al，

2009)

本文将重点论述GABA 支路中心代谢过程中参与谷氨酸脱羧酶（GAD）、GABA

转氨酶（GABA–T）和琥珀酸半醛脱氢酶（SSADH）的定位和底物专一性，以植物及

GABA在响应逆境环境的作用。

## 1 谷氨酸脱羧酶（GAD）

GAD存在于细胞质，对谷氨酸具有专一性。已报道的细菌、植物、昆虫和哺乳动物的GADs结构不同。细菌的GADs，大肠杆菌谷氨酸脱羧酶提供了一些有意义的信息，克隆的E.大肠杆菌谷氨酸脱羧酶已显示有两种形式的谷氨酸脱羧酶，与哺乳动物的酶相比具有低序列标识。虽然哺乳动物的脱羧反应和大肠杆菌GADs相同，但亚基组成和分子质量有显著不同。细菌GADs结构信息表明细菌酶的多样性。植物谷氨酸脱羧酶的基本结构是类似大肠杆菌酶；然而，结构分析表明一些植物GADs的C– 端相连一条额外的区域。谷氨酸脱羧酶活性通过C–端的Ca2+水平调节。

### 1.1 不同植物GAD的特性

由于GAD是形成GABA的关键酶，其活性变化对调节GABA支路很重要，对它的研究越来越重视，近年来的主要发现如下。Yang R等（2013）对纯化从5天发芽蚕豆的GAD进行表征。用十二烷基硫酸钠凝胶电泳观察到存在单一58 kDa的带。40℃条件下，GAD最佳活性在pH 6，对谷氨酸（Glu）的Km值为2.63mM。酶受Ca2+、Fe3+、

Mg2+、Ba22+、氨氧基乙酸、EGTA、Na-EDTA、L-半胱氨酸和β-巯基乙醇抑制显著，对

0.2mM低浓度Ca2+具有活性。采用RT-PCR分析和cDNA测序表明其含有1787 bp，包含1527 bp的开放阅读框（ORF），编码509个氨基酸的多肽，分子量为57.74 kDa，PI为5.41。

Zhang等（2007）对大米胚芽的GAD经过硫酸铵分级，葡–琼脂糖凝胶FF离子交换层析，Superdex-200凝胶过滤和Glu–琼脂糖凝胶CL4B亲和层析结合使用得到纯化186倍的GAD，对其进一步分析发现在SE-HPLC上出现单峰，近似分子质量为78

kDa，单波段上SDS–PAGE的亚基单带为40 kDa。这证明大米胚芽谷GAD为同源亚基组成的二聚体。该GAD具有5.5和5.8之间的最佳pH值范围内，其最佳生长温度为

40℃，对谷氨酸和PLP的Km值分别为32.3mM和1.7µM. 化学试剂如HgCl2、KI 和

AgNO3分别使该酶的活性下降68.5％、44.9％和32.4％，但500µM CaCl 2在最佳pH值可以使该酶的活性增加145％。

Akama等（2001）分离全长水稻GAD的cDNA两个不同的亚型，水稻cDNA文库指定为OsGAD1与OsGAD2。开放阅读框OsGAD2在OsGAD2的cDNA编码推测由501（56.7 kDa的）和500个氨基酸组成的蛋白（55.6 kDa），彼此显示与确定对应双子叶植物的序列至少分别有69%和67 -78%的同源性。比较分析从这些基因的水稻基因组文库中获得相应的基因组克隆作为探针，推导出这两个基因的内含子的数目和大小相差很大。有意义是，在对应的植物的钙调素结合域被称为C-端30-氨基酸肽的推测存在基因产物GADs，OsGAD1拥有典型的模体，而OsGAD2包含几个主要由于钙调蛋白(CaM)结合的氨基酸替代物。体外对CaM结合实验分析这些蛋白在大肠杆菌中的表达显示，

OsGAD1实际上可以特异性结合牛CaM，而OsGAD2不能。RNA分析表明，OsGAD1与OsGAD2转录呈现在各种组织中，但它们至少在根和成熟的种子表达不同。

Pittmana等（2005）认为拟南芥Ca2+ / H+反向运输体阳离子交换器(CAX) 1和(CAX) 2，电化学梯度运输Ca2+到液泡帮助调解Ca2+稳态。CAX1和CAX2运输Ca2+由胞浆pH调节，且每个转运蛋白有着各自不同的细胞胞质pH值模式。CAX1/CAX2嵌合体的筛选确定了在其氨基酸域内改变pH依赖Ca2+运输的模式，它与CAX1是几乎完全相同的pH值模式。从一个特定的诱变组氨酸（His）残基在此域内的结果，表明此残基在pH值调节的作用（Pittmana et al, 2005）。

Ngoc等（2013）认为细菌谷氨酸脱羧酶（GAD）转化谷氨酸为GABA也伴随着质子的消耗，该酶只在酸性环境下有活性，pH接近中性时由于结构变形迅速失去。Ngoc等（2013）的一系列的GAD定点突变体予以研究表明，至少这Glu89和his465两个残基的协同作用保持完整，其中Glu89是新鉴定的具GAD协同系统性的残基。具有这些双突变体不仅打破了活性变化的协同性，也产生了GAD的新突变体，这种突变体中性

pH值具有活性。以不受控制的方式转换成胞内谷氨酸生成GABA，抑制甘油基质的细胞生长。

Nisreen等（2011）以拟南芥钙调素基因的T-DNA插入突变体七（CAM）确定在植物抗CaM的具体作用，用过氧化氢（H2O2）和百草枯氧化胁迫诱导处理，研究拟南芥钙调素（CaM）突变体从种子萌发，幼苗生长，诱导的氧化损伤，和GABA支路代谢产物筛选，发现只有*cam*5–4和*cam*6–1突变体在种子萌发和幼苗生长期表现出敏感性增加。在响应于3µM百草枯和1 mM H2O2处理，只有*cam*5–4，*cam*6–1突变体中丙二醛（MDA）水平发生显著变化，在根和茎组织中具有高度的MDA增加水平；在GABA支路代谢方面，在百草枯处理下，根和茎组织中GABA含量与丙氨酸和谷氨酸含量相比显著提高；在H2O2处理下，增加根组织中但不是茎组织中的GABA支路代谢物的水平。*cam*1、*cam*4、*cam*5–4和cam6–1突变体响应百草枯（0.5, 1.0和3.0µM）处理，其GABA、alanine和glutamate含量显著增加；*cam*1、*cam*4、*cam*5–4和*cam*6–1突变体响应于H2O2处理（200µM、500µM和1 mM），GABA、alanine 和glutamate 含量只在根组织中增加。这些数据表明，*cam*5–4和*cam*6–1突变体在种子萌发和幼苗生长阶段对氧化胁迫诱导氧化损伤敏感。GABA支路和GABA代谢产物的积累可能有助于与活性氧有关的抗氧化机制，使拟南芥幼苗获得对诱导氧化胁迫的耐性。

Bouché等（2004）认为拟南芥基因组包含五个谷氨酸脱羧酶基因，这些基因之一

（例如glutamate decarboxylase1, GAD1）在根系中特异表达。他们通过分离和分析三个来自两个生态型的*gad*1 T–DNA插入基因，调查了GAD1 GABA形成中的潜在作用。发现GAD1基因的启动子区域及融合基因在根系中特异性的表达。*gad*1插入突变体的表型分析表明，与那些在野生型相比，根系中的GABA水平大幅度减少。野生型根系的GABA含量约为突变体的7倍。除去GAD1基因也妨碍了热胁迫时根系中GABA 的

积累。由此认为根系特异性Ca2+/calmodulin调控GAD1在正常增长条件和响应胁迫反应中的GABA合成发挥着重要作用。

Deewatthanawong等（2010）研究破裂和浅红色成熟阶段“Tricia”西红柿暴露在空气中或10%的空气中二氧化碳13℃12 d储存期间的GABA代谢，探讨不同成熟期果实

GABA对CO2浓度升高的不同响应发现，在收获时红色的水果GABA浓度约为破裂水果的三分之一。从色调和色度值来判断，破裂阶段果实成熟在更大程度上比红色果实受

CO2抑制的影响。但红色水果的发育对水浸泡更敏感，点蚀和腐烂程度超过破裂果实。在贮藏期间，CO2处理的破裂果实比空气处理破裂果实的GABA浓度较高。CO2处理的果红色水果GABA浓度增加，而空气处理果实GABA浓度随着时间的推移又下降。当

CO2处理的果实被转移到空气中，GABA的浓度则又下降到类似存放在空气中的果实水平；尽管采收的红色果实比破裂果实GAD活性较高，但空气和CO2处理果实的GAD活性相似；CO2处理不影响GAD1表达，但导致了比破裂果实比红色果实GAD2和GAD3更高的表达。

Turano和Fang（1998）拟南芥两个不同的cDNA克隆编码GAD同工酶GAD1 和

GAD2鉴定。在大肠杆菌中表达GAD1和GAD2开放阅读框，并通过亲和层析纯化重组蛋白，十二烷基磺酸钠– 聚丙烯酰胺凝胶电泳和免疫印迹分析重组蛋白的分析表明，

GAD1和GAD2分别编码58 kD和56kD的肽。纯化的重组GAD1的GAD2蛋白的酶活性分别增加35–13倍，由Ca2+/calmodulin刺激，而不是由单独Ca2+或calmodulin刺激。基因组DNA的Southern印迹分析表明，每个基因在拟南芥中只有一个拷贝。检测到仅在根GAD1转录和相应的58 kD的肽，相反，与10 mM KNO3处理比较，检测到

GAD2转录和相应的56 kD的肽存在于10 mM NH4Cl、5 mM NH4NO3、5 mM谷氨酸和5 mM谷酰胺作为唯一氮源的所有器官中。这些实验结果表明，叶片GAD活性受基因表达或RNA稳定性的部分控制。在不同组织中的初步分析结果也暗示，茎和花GAD活性变化趋势不同，表明在这些器官中可能还有其他因素控制GAD活性。Turano和Fang

（1998）研究结果表明，叶片GAD活性以不同氮处理而改变，而GAD2可能在氮代谢中发挥着独特的作用。

Fait等（2011）认为种子中GAD通过催化谷氨酸脱羧形成GABA，操纵碳/氮代谢之间的连接。他们以拟南芥转基因植株表达截断的GAD，失去调控矮牵牛Ca2+-钙调素

-结合域C-末端，在种子成熟时特定转录调控下菜豆子蛋白启动子。转基因植物的干种子积累了相当数量的GABA，在干燥过程中的几种氨基酸含量增加，虽然不是谷氨酸或脯氨酸。干燥的转基因种子比野生型的种子有较高的蛋白质含量，但糖酵解中间体--甘油和苹果酸的含量较低。转基因种子总脂肪酸含量较野生型低50%，而转基因种子积累乙酰辅酶A。标记实验显示转基因种子呼吸被改变。对分离物的研究表明，转基因种子减少了糖和脂质组分的标记物纳入在转录水平上调的细胞过程包括三羧酸循环，脂肪酸碳链伸长，莽草酸途径，色氨酸代谢，氮碳的运转和细胞程序性死亡。这些结果表明

GAD介导谷氨酸转化为GABA，在种子发育过程中的发挥平衡碳氮代谢和存储的储备积累重要作用。

### 1.2 植物GAD可能存在pH和钙两个水平调节

植物GAD与钙调蛋白的结合能力具有生物学意义，因为GABA可能被认为会响应胁迫，即缺氧、机械刺激、热休克、冷休克反应及水分胁迫。这种胁迫是已知的诱导细胞内的瞬态Ca2+信号，由此推知Ca2+参与GABA合成调控。

Ca2+是广泛存在真核细胞中多种功能的细胞内的调节信号。信号是介导以增加细胞内Ca2+浓度100 nM〜1mM之间由静态到激活状态，转导的Ca2+信号以Ca2+结合蛋白启用，其中一个共同的钙离子结合基序被称为EF手，由一个螺旋–环–螺旋模块结合一个单一的Ca2+。钙调素（calmodulin, CaM）是最典型的钙离子结合蛋白，是由两个球状结构域（lobes）灵活的α–螺旋连接体连接，每个有两个EF手。钙离子结合时，

CaM经历了一个显著的疏水区的lobe，使暴露溶剂的部分构象发生了变化。目标蛋白的CaM结合域（CaMBD）通常形成10–30残基的两性α–螺旋，与Ca2+相互作用加载CaM（Vetter et al, 2003）。

植物细胞通过钙信号调节广泛的生命进程，并似乎拥有独特Ca2+/CaM信号网络调节植物特定生命进程，如对生物和非生物胁迫、生长和发育（Bouchéet al, 2003; 2005;）。依赖酶谷氨酸脱羧酶（GAD）的5′–磷酸吡哆醛的反应（PLP）的信号网络可能是植物中最佳被Ca2+ / CaM介导的特异调节的代谢酶。在原核生物和真核生物中发现，GAD催化L–谷氨酸的α–脱羧的生成GABA。在大多数脊椎动物中，谷氨酸脱羧酶存在于两个二聚异构体GAD65和GAD67，其不同的功能和结构已被鉴定（Fenalti et al，

2007）。在大肠杆菌及其他肠内细菌，谷氨酸脱羧最适pH 为酶酸性，形成316kDa 六聚体（Sukhareva et al, 1994），其表达响应环境胁迫（Blankenhorn et al, 1999; De Biase et al, 1999）。GADB（Capitani et al, 2003; Dutyshev et al, 2005）的酶晶体结构显示六聚体的结构细节，辅酶结合模式及其活性位点环境的详细信息。构象变化导致酶的催化活性也被详细分析（Capitani et al, 2003）。GADs属于脱羧酶家族group II，依赖PLP的酶。在脊椎动物（GAD65）和细菌（GADB）蛋白质之间，具有低序列标识（12%）。拟南芥（*Arabidopsis thaliana* Gad1）和肠道细菌酶（GADB）更相似。

CaM–target多肽复合物结构分析揭示了巨大的多样性结合方式。CaM许多具有目标肽的不同复合物已清楚，CaM在目标识别中的构象灵活性已阐明（Hoeflich et al，

2002）。在这些肽研究的基础上，罕见的全部CaM–target 复合物晶体结构（Drum et al，

2002）和CaM 依赖酶激活的功能分类已被确定（Bouchéet al, 2005）。

拟南芥GAD1的pH-依赖性活性具有钟形的轮廓，最大活性在pH6类似矮牵牛GAD

（Snedden et al, 1996）。CaM刺激作用也被观察到，尽管在整个pH范围内不统一。最高至pH6，酸性条件只轻微的影响CaM结合，在碱性条件影响最大。在生理pH值，

GAD1活性是低的，CaM导致酶活性的大幅增加，从而提供了一种酶的活化的紧密耦合，在生理pH值改变Ca2+浓度。活化效果也作用于GAD2亚型，GAD2与GAD1有81％的序列同源性和89％的序列相似性。

一个缺乏CaMBD的GAD1突变体（residues 471–502, GAD1–ΔCaMBD）在pH5.0–8.5的吸收光谱显示出GAD1–CAM1的pH非依赖性的行为，并且其特征在415nm的吸收超过整个pH范围内。GAD1–CAM1和GAD1–ΔCaMBD的pH–依赖性吸光度光谱的光谱损失，可以通过残基调节删除的C–末端区的互变异构平衡说明。该残基位于活性位点附近的受CaMBD影响的位置（Heinz et al, 2009）。

高等植物细胞的主要区隔在细胞质是微碱性（pH7.4–7.5），液泡是酸性（pH4.5–6）

（Gout et al, 1992）。植物GADs 表现出两个水平的调节：一种是pH值依赖性，即GAD的酸性活性最大值（pH值为6），另一个是Ca2+依赖的CaM结合介导的，这是最有效的，其相对活性的pH值约为7.5。GAD–CaM复合物比GAD单独在酸性pH稍微有效。但在胞质pH值，更关系到CaM激活的影响。从功能的角度来看，这2种调控机制是独立的，而不是加合的。pH值下降时，Ca2+/CaM的影响可以忽略；而在中性pH值，显著提高了GAD活性（Heinz et al, 2009）。胞质酸化迅速启动持续的GABA合成，已被在大豆叶片响应于冷胁迫或机械胁迫条件下观察到，这种快速和持续的GABA合成需要一种基于L-谷氨酸脱羧消耗H+代谢的pH条件（Reggiani et al, 1988）。

矮牵牛GAD是第一个显示受CaM调节的谷氨酸脱羧酶（Arazi et al, 1995；Baum et al, 1993）。许多植物，如大豆（Snedden et al, 1995），烟草（Baum G et al, 1996），牵牛（Snedden W A et al, 1996）和拟南芥（Turano et al 1998; Zik et al, 1998）表达的

GAD蛋白比细菌序列多30 - 50残基的C– 端延伸。额外区域已被鉴定为CaMBD（Baum et al, 1993），缺少自动抑制Ca2+/ CaM谷氨酸脱羧酶蛋白，而Ca2+/ CaM谷氨酸脱羧酶活性被上调。使用异常表达谷氨酸脱羧酶或截断的谷氨酸脱羧酶缺乏C–端CaMBD转基因植物的烟草，首次明确依赖GAD的谷氨酸脱羧酶激活的相关性（Baum et al, 1996）。CaMBD 的去除导致Ca2+独立于谷氨酸脱羧酶，其活性异常，表现高水平的

GABA和低水平的谷氨酸。改变这些代谢物的浓度在体内导致严重的发育问题，如造成短茎软组织细胞未能伸长（Baum et al, 1996）。GAD在GABA 支路中具有重要作用，Ca2+/ CaM 调节支路响应非生物胁迫（Bouchéet al, 2004）。

两个月季谷氨酸脱羧酶同时结合到非洲爪蟾蟾GAD的CaMBD多肽的核磁共振结构被分析（Yap et al, 2003）。结构显示为全新模式CaM–target 肽，以1: 2化学计量学相互作用。导致CaM可能协助的谷氨酸脱羧酶亚基发生二聚，并有助于高功能大分子GAD–CaM复合物的形成（Bouchéet al, 2005）。为了解结构层面上的GAD 依赖谷氨酸脱羧酶激活形成的假说，用x射线晶体学和这些结果与野生型突变GAD1的光谱数据，以及预先存在的核磁共振模型分析，以及利用广泛诱变C–端延伸研究查明残基，发现使它能够调节GAD1活性。突变的两个关键的残基使酶对两个正常水平

的调节（pH–dependent和CaM–mediated）不敏感，表明这两个水平依靠共同的分子基础（依赖于自动抑制）。

Heinz等（2009）认为GAD1的AID折叠成的活性部位中的pH依赖的方式，与K496和K497离子化状态影响PLP的互变异构平衡。AID活性位点的亲和力在pH值为6.9以上时增强，导致烯胺互变异构体和自动抑制在338 nm的吸收较大。这种自动抑制不只是由于简单的空间位阻及几个Ca2+/CaM依赖性激酶。事实上，该机制似乎是更复杂的，在生理pH值范围GAD1不是完全失活，其残留活性对正常植物的发育必不可少。相反，可能是这两个Lys残基可以微调酮胺互变异构体和烯胺形式之间的比率的催化活性。pH值低于6.9破坏折叠的CaMBD并导致展开此域与转向PLP酮胺形式415 nm吸收，这是由于亲水性的环境的结果。GAD1–CAM1复合物，415 nm处的吸收酮胺形式本在整个pH范围：CaM1被两个CaMBDs围绕，保持2个AIDs远离各自的活性位点。这样，CaM结合上GAD1行使类似低pH值的效果，保持酮胺形式的辅助因子在中性和高pH值。

C–末端截断突变体GAD1–ΔCaMBD显示整个pH范围内具有415 nm波长吸收

（ketoenamine），与实验得出的K496和K497在烯胺互变异构体的稳定作用完全一致。更换这些2–赖氨酸残基为一个非离子化残基，如GAD1–KK496–497AA，通过对PLP的活性位点创建一个更大的疏水性环境，大幅改变的CaMBD的属性，并通过除去一个重要的Ca2+/CaM结合位点所需激活的GAD1。这也解释了CaM1在中性pH值更有效地增强了GAD1活性。在酸性pH下，大多数的AIDs被从活性位点释放，CaM–binding导致平衡进一步适度转移向催化活性位点更强的部分。在中性和碱性的pH值，C–末端被折叠在活性位点上方，加强CaM结合，释放AIDs，导致平衡急剧转变及酶的活化。

### 1.3 调节CaMBD关键残基

Gut等（2009）对突变的CaMBD进行了分析，找出了关键的其调控残基，Cys502和10的C末端（残基471–502）保持带电的氨基酸突变为丙氨酸（Ala）。同时，带电荷的残基中存在的一个集成群改变两个残基为Ala（KK474–475AA；KK489–490AA，

KK496–497AA）。当这些双重突变影响GAD1的属性时，对这两个残基突变成Ala单独作进一步分析，并对所有突变体结合Ca2+ / CaM的能力，和pH–依赖性的UV–可见光谱进行分析，发现他们都有KK496–497AA，K496A，K497A异常与野生型类似的属性。在双突变体缺乏烯胺和酮胺的pH–依赖相互转换，在低和高pH值的338 nm的吸收都大。这表明GAD1的K496和/或K497离子化的残基影响互变异构体的平衡。此外，与野生型GAD不同，增加的Ca2+ /CaM并没有导致在紫外–可见光谱的变化，表明的CaM结合被消除或折衷。pH值变化和CaM添加不能转移对酮胺形式催化活性的互变异构平衡。这反映在整个pH值范围内的酶活性的巨大损失：在最佳pH值，双突变体的活性降低约三倍。值得注意的，GAD1–KK496–497AA双突变体仍显示出pH依赖

性活性，表明两个Lys残基不直接参与催化反应。更换K496和K497非极性残基，最有可能增加CaMBD活性位点的亲和力，创造一个更疏水环境，稳定烯胺互变异构体的338 nm的吸收。事实上，GAD1–KK496–497AA的荧光发射光谱，在390 nm处的发光强度显示八倍的下降，揭示了生色团的周围环境不同于野生型（Heinz et al, 2009）。

单突变体K496A和K497A的光谱特性的介于野生型和双突变体蛋白之间，从烯胺到酮胺的pH 依赖性的相互转换，并在390 nm 处的荧光发射减少强烈， 而

GAD1–KK496–497AA较小程度被观察到。这表明其中的两个被突变为丙氨酸，两个相邻的Lys残基能够恢复彼此的功能（Heinz et al, 2009）。

## 2 GABA转氨酶（GABA-T）

与大豆（*Glycine max*）线粒体定位的基于亚细胞GABA–T一致，对拟南芥线粒体基质GABA–T的定位信号进行预测，预设在该蛋白质N–末端的第36个氨基酸，这与拟南芥GABA–T–绿色荧光蛋白（GFP）融合体内定位分析相一致（Babu et al, 1988）。重组拟南芥GABA–T活性的最适pH值在9.0和9.5之间，并对GABA的正向反应具高度特异性。但是，与来自非植物系统的GABA–Ts不同，它似乎使用丙酮酸和乙醛酸作为氨基供体，而不是2– 酮戊二酸（Babu et al, 1988）。有趣的是，依赖乙醛酸的反应是不可逆的，甘氨酸作为该反应的竞争性抑制剂。在绿叶乙醛酸的主要源于光呼吸通路氧化核酮糖–1，5–二磷酸和氧化所得的乙醇酸。因此，认为光呼吸可能与GABA代谢相互作用（Babu et al, 1988）。

早期的研究表明，GABA转换到SSA在细菌和动物需要a–酮戊二酸作为氨基受体，而植物是利用丙酮酸作为氨基受体（Shelp et al., 1999）。Van Cauwenberghe等（2002）研究表明，拟南芥拥有一个和三个GABA–T基因，合成蛋白质用乙醛酸，以及丙酮酸做氨基酸受体。拟南芥GABA–T定位于线粒体。研究表明GABA代谢和光呼吸之间有潜在的生化相互作用（Clark et al, 2009a b; Shelp et al, 2012b）。Clark等（2009）报告

N–末端截断的拟南芥GABA–T增加可溶性分数大肠杆菌表达系统。

Clark等（2009）认为番茄和拟南芥一样，也拥有一个和三个GABA–T基因，合成蛋白质用乙醛酸以及丙酮酸做氨基酸受体。番茄GABA–T1 定位于线粒体，GABA–T

2和GABA–T3分别位于细胞质和叶绿体。Akihiro等（2008）研究番茄（*Solanum lycopersicum*）品种“Micro-Tom”和“DG03-9”果实与GABA合成和代谢相关性，基因和蛋白表达水平及相关酶的活性，发现在GABA积累过程中，GABA浓度和SlGAD2和SlGAD3表达水平之间呈正相关。这2个基因都编码GAD. GABA的代谢过程中，2 -酮戊二酸依赖的GABA转氨酶（GABA-TK）活性和GABA含量呈很强的相关性，谷氨酸和天门冬氨酸含量随GABA-TK 酶活性升高而增加。GABA-TK 是动物主要

GABA转氨酶，但在植物中以活性小的形式出现。在“DG03-9”果实GAD酶活性延长

至成熟阶段，且GABA-TK活性很低。因此，Akihiro T等（2008）认为GAD和GABA-TK分别在番茄果实在GABA的积累和分解代谢中发挥着至关重要的作用。有关研究发现破裂果实GABA转氨酶（GABA–T）活性比红色果实更低，CO2处理比空气处理果实

GABA–T活性下降幅度更大（Deewatthanawong et al, 2010）。

Trobachera等（2013）确定了两个苹果基因编码GABA转氨酶（GABA-T）（GABA-T苹果基因），该酶负责GABA分解为琥珀酸半醛代谢。推导两个MdGABA-T 酶的氨基酸序列，发现彼此相同的93%，与已知的拟南芥和番茄gaba-ts有74–83%的同源性。个体全长融合蛋白在烟草悬浮培养细胞的绿色荧光蛋白的瞬时表达发现，mdgaba-t1和mdgaba-t2定位于线粒体。去除N-末端靶向导肽在大肠杆菌产生的可溶性重组蛋白质恢复良好，当他们共同表达GroES / EL分子伴侣复合体。通过连续监测一个细菌NADP+依赖琥珀酸半醛脱氢酶联法建立两个gaba-ts苹果果实的重组GABA-T活性，如拟南芥线粒体GABA-T和番茄线粒体、质体和胞浆内GABA -TS，发现它们利用丙酮酸和乙醛酸，而不是2-酮戊二酸。因此，这两个苹果GABA -TS底物特异性是类似于拟南芥和番茄的GABA- TS。然而，在苹果果实线粒体发现的两个GABA -TS不同于其他物种中存在类型，这提供了植物亚细胞GABA- TS分布的另一个变化类型（Trobachera et al, 2013）。

基因组数据库加入数字AK102306（或AF297651）、AK103274、AK100259 和

AF324485被暂时分别指定为GABA–T1、GABA–T2、GABA–T3和GABA–T4. 预测

它们的氨基酸序列具有73–82%同源性，保守的PLP结合域（Ser/Thr X X Lys）。这些水稻蛋白有68–75%的氨基酸鉴定与已知的拟南芥和番茄直接同源。比较水稻蛋白质与番茄GABA–T2，其中缺乏N终端穿越信号，被定位于细胞质液（Clark et al., 2009b），表明水稻GABA–T1、GABA–T2、GABA–T3和GABA–T4分别有67、62、48和35

氨基酸延伸。使用TargetP的硅分析（Emanuelsson et al, 2000）和PSORT（Nakai et al, 1992）与拟南芥和番茄蛋白质比较预测水稻GABA–T1和GABA–T2定位于线粒体，

GABA–T3定位于质体，GABA–T4定位于细胞质。

Van Cauwenberghe等（1999）从烟草（*Nicotiana tabacum* L. cv Samsun N. N.）叶粗提物或溶解的线粒体制剂活性的丙酮酸依赖GABA-T（EC 2.6.1.19），经FPLC的阴离子交换色谱分离，发现GABA-T活性依赖2 -酮戊二酸。丙酮酸依赖GABA-T的部分纯化1530倍被相结合的线粒体分离和FPLC的阴离子交换色谱法。这种酶制剂对GABA和丙酮酸表观Km分别为1.2 - 0.2 mM和0.24 - 0.05 mM。部分纯化制剂的2-酮戊二酸依赖GABA-T活性没有检测到。他们的数据表明，一个专一性丙酮酸*gaba*-t存在于线粒体。

两个水稻GABA–T基因已经被鉴定，一个被爆发真菌感染诱导，另一个在衰老叶子高度表达，但是这些基因和它们相应的蛋白质没有全面被表征。Shimajiri Y等（2013）研究发现水稻（*Oryza sativa*）基因组有四个GABA-T基因，表现出较高的氨基酸序列

同源性（73–82%），但N-末端区域的长度不同。在洋葱表皮细胞中瞬时表达绿色荧光的GABA-T融合蛋白证明，四种酶的其中两个定位于线粒体，三分之一在叶绿体，四分之一在细胞质。三种细胞器定位GABA TS酶分析显示，它们用丙酮酸和乙醛酸氨基受体，作用于线粒体和叶绿体两种酶活性类似水平，而第二种线粒体酶显示出很低的酶活性。转录分析表明，四个基因在营养器官中高度表达，但在种子成熟过程中表现出不同的模式。总之，这些结果表明，水稻GABA-T基因家族成员在许多方面有所不同，如细胞内定位，酶活性和基因表达的调控。Yasuka等（2013）对水稻GABA–T蛋白表达载体建造了使用全长cDNA扩增。每个cDNA克隆入pET32a。载体被引入大肠杆菌

BL21（DE3）。蛋白诱导是由IPTG 以补充开始的。然而，只有GABA–T3是获得的可溶性部分；其他蛋白质GABA–T1和GABA–T2是不溶物。不同的因素如孵化温度、孵化时间、IPTG浓度和振动速度会对其溶解性造成影响。

## 3 琥珀酸半醛脱氢酶（SSADH）

大豆线粒体SSADH定位被一个推测为线粒体识别前序列N–末端的33–氨基酸，被在拟南芥SSADH的定位鉴定所支持。有关亚细胞部分研究表明，其蛋白专一定位在线粒体基质。拟南芥SSADH活性的最适pH值在9.0和10.0之间，基本上是不可逆的，对SSA和NADH具有高度特异性，受NADH / NAD+的比例调节。

人类和大肠杆菌SSADHs的三维结构（分别为HsaSSADH和EcoSSADH）最近也由x射线晶体学确定。利用HsaSSADH的NAD+被证明存在氧化形式和还原形式，在一个“催化循环”涉及到一个分子内二硫键的催化半胱氨酸残基之间（Cys340）和相邻半胱氨酸残基（Cys342）。硫醇氧化和二硫形成的催化敏感性被解释为一个潜在的氧化还原开关。也就是说一旦氧化，催化循环关闭活性位点，只允许NAD +结合在一个不允许催化构象。二硫还原时，这个相同的催化循环重新定位，使NAD +承担一个富有成效的构象。虽然活性位点的HsaSSADH和EcoSSADH非常相似，有相同取向的大部分催化残基，催化循环额外的半胱氨酸残基，EcoSSADH被发现对氧化敏感。然而，观察到人类的同系物，对添加DTT的改变是不可逆的。此外，分子排阻色谱法和晶体数据证明了HsaSSADH和EcoSSADH低聚态是四聚物。正如所预期的，两个SSADHs结构共享一个一般折叠的类1和类2醛脱氢酶（ALDH）。HsaSSADH只有两个残基为最佳催化活性位点Glu306和Cys340. SSA具有的活性部位主要由其羧酸盐决定的，通过氢键和

/或静电学和Arg213, Arg334和Ser498相互作用。NAD +的一部分ADP的稳定是由几个残基包括一组疏水残基。其中Ile201、Ala 264、Gly268和Leu292，为腺嘌呤做一个疏水口袋，Lys228、Glu231和Thr288稳定核糖和二磷酸与Ser285和Thr288的氢键，剩下的一部分NAD +不能被正确地按此模式运行。

在大肠杆菌，编码基因*gab*D定位于*gab*操纵子，其中包括*gab*T（r–aminobutyrate

转移酶）、*gab*D(SSADH)、*gab*P（GABA permease）和*gab*C（调控基因a regulator gene），和涉及GABA降解的*gab*操纵子的产物。E. coli的SSADH（EcSSADH）缺乏N终端信号序列，与人类SSADH有54%氨基酸同源性。EcSSADH位于细胞质，在GABA支路功能是大肠杆菌利用GABA为唯一氮源。

Deewatthanawong等（2010）研究发现高CO2浓度条件对GABA–T或琥珀酸半醛脱氢酶（SSADH）基因表达没有一致的影响，只有在CO2处理的红色果实中发现琥珀酸半醛还原酶1（SSR1）基因的表达下降，而CO2处理导致在破裂果实和红色果实的

SSR2表达快速下降。这表明SSR可能与果实成熟有关。

## 4 多胺与GABA代谢

腐胺、亚精胺、精胺是植物中主要的多胺（PAs）。以游离形式，共轭与酚酸类和核酸结合形式（即可溶形式）和蛋白质结合形式（即不溶性的形式）存在（Bagni et al，

2001）。多胺刺激DNA 复制，转录和翻译，稳定细胞膜，清除自由基，与植物色素和激素相互作用，对植物的生长发育产生了广泛的影响，包括抗环境胁迫，抗感染真菌和病毒感染等（Gill et al, 2010）。

多胺的产生过程是由精氨酸被转换为腐胺经过多个多步骤：精氨酸脱羧酶、胍丁胺亚氨基水解酶和N–氨基甲酰基-腐胺水解酶，精氨酸酶，鸟氨酸脱羧酶。腐胺又是通过亚精胺合成酶和精胺合成酶分别转化为亚精胺和精胺，能催化从蛋氨酸氨基丙基衍生的基团，通过S–腺苷甲硫氨酸和脱羧的S–腺苷甲硫氨酸的连续转移。O2依赖的多胺氧化酶催化氧化或精胺和亚精胺的转换，形成亚精胺、腐胺和3–氨基3–戊酮醛。它们分别降解为1–（3–氨基丙基）–吡咯啉，1，3–二氨基丙烷和4–氨基丁醛。O2依赖二胺氧化酶分别催化降解的腐胺和1，3– 二氨基丙烷为4– 氨基丁醛/Δ-1 – 吡咯啉和3– 氨基丙醛，这反过来又被转换为GABA和β–丙氨酸。由于4–氨基丁醛和Δ-1–吡咯啉是在非酶促的快速均平衡，它们的氧化通常被认为是用相同的酶，这通常被称为NAD +依赖的4–氨基丁醛脱氢酶催化。谷氨酸也可以通过脱羧酶（GAD）被代谢为GABA。腐胺和谷氨酸形成的GABA通过丙酮酸-和乙醛酸-调节的GABA转氨酶转换琥珀酸半醛，琥珀酸半醛通过一个NAD+–依赖型琥珀酸半醛脱氢酶被转换成琥珀酸盐，或通过一个NADPH依赖性的乙醛酸/琥珀酸半醛还原酶生成γ– 羟基丁酸。

从外源提供的放射性标记的腐胺生成放射性标记的γ–氨基丁酸的直接证据，可以从根系完整的玉米（Ditomaso et al, 1992）补血草和苦荞麦（Duhazéet al, 2002），番茄果皮的花盘（Rastogi et al, 1989）研究得到。加入二胺氧化酶抑制剂氨基胍（AG）放射性标记抑制GABA的积累（Duhaze et al, 2002），加入GABA转氨酶抑制剂二氢苯甲酸（gabaculine）则刺激GABA的积累（Ditomaso et al, 1992），也是直接证据。Yang

R等（2013）对缺氧条件下的发芽蚕豆的GABA积累和多胺降解途径的关系进行了研

究，发现在缺氧条件下，GABA含量、GAD和DAO活性明显增加，Glu和多胺含量大幅提高，从而为GABA形成提供了足够的基质。相反，解除低氧胁迫主要使胚GABA含量减少，DAO活性、Glu和多胺含量下降，但GAD上升，胚生长快速。因而认为

GAD活性不受低氧条件调节。当氨基胍处理发芽蚕豆时，处理后3–5天的DAO活性几乎被完全抑制，GABA含量分别降低32.96％和32.07％。所以他们推断，在缺氧条件下多胺降解途径提供给发芽蚕豆约30％的GABA. Su等（2007）对盐胁迫下大豆根系研究的结果表明，腐胺、尸胺和亚精胺的水平随着盐浓度的增加显著下降。他认为出现这种因为盐胁迫大力促进DAO活动来刺激多胺的降解。他们还发现GABA含量累随着氯化钠浓度的增加而增加，比控制植物增加11–17倍。AG处理显著降低DAO活性而增加内源性多胺含量，减少了GABA积累。1/2 Hoagland含有100 mM NaCl胁迫6d导致DAO活性降低、多胺水平上升反弹和GABA含量同时减少。所以，DAO活性变化和GABA积累之间有着密切的相关性，盐胁迫诱导多胺降解能够形成约39%GABA含量增加，暗示在盐胁迫下，多胺可能通过GABA执行其生物学功能。

多胺与GABA的水平可以改变操纵相关酶的多胺生物合成（Alcázar et al, 2010; Mattoo et al, 2010）。例如，燕麦精氨酸脱羧酶基因在烟草中的诱导表达增加结合态腐胺水平，其严重性与改变的表型相关（即，短的节间，薄的茎和叶，叶黄化和坏死，并减少根系生长）（Masgrau et al, 1997）。组成过表达拟南芥精氨酸脱羧酶基因有一个矮化和晚开花表型，能够被赤霉酸恢复，且含腐胺水平，显著高于野生型植株，对亚精胺和精胺水平没有任何影响（Alcázar et al, 2005）。拟南芥精氨酸脱羧酶缺失突变体只含有25％的腐胺水平，但含有与野生型一样的正常水平的亚精胺和精胺（Urano et al，

2004）。这些数据表明，精氨酸脱羧酶基于路径限制在烟草和拟南芥中的腐胺的生物合成。基于多胺和它们的结合物上的水平，它被认为是有害影响表型源于腐胺积累的结果，而从腐胺的结合态到可溶态控制其水平在无毒的范围内使植物得以生存，并防止亚精胺和精胺水平的变化（Alcázar et al, 2005）。

Duca S D等（1995）用标记的腐胺和/或亚精胺培养菊芋叶绿体，发现被三氯乙酸沉淀不可溶性和未沉淀可溶性蛋白质，经过蛋白水解消化显示，存在的N–（γ–谷氨酰基）–腐胺，N1，N4–bis–（γ–谷氨酰基）–腐胺和N'，N8–bis–（γ-谷氨酰）亚精胺。这可能是存在于叶绿体中的转谷氨酰胺酶活性的明确证明。此外，Duca S D 等

（1995）用叶绿体与[3H]腐胺或[3H]亚精胺分别培养则恢复乙酰精胺、亚精胺和腐胺，表示亚精胺合成和氧化途径的存在。这些结果表明，叶绿体中的多胺可具有游离形式，且通过共价结合的蛋白质行使其功能。

在非转基因植物中一个或多个非生物胁迫强烈诱导的多胺生物合成中所涉及的几个基因的表达，然而，这些增加通常不与所有多胺的积累相关（Alcázar et al, 2006）。例如，在干旱，盐或冷胁迫下，拟南芥和水稻中对此响应的精氨酸脱羧酶基因上调与腐胺积累相关，但腐胺积累和S–腺苷甲硫氨酸脱羧酶，亚精胺合成酶和精胺合成酶基因

的上调，而不会增加亚精胺和精胺的浓度（Urano et al, 2003; Alcázar et al, 2006; Cuevas et al, 2008）。Kaplan等（2004; 2007）发现当拟南芥在4℃下12 h，腐胺积累增加或持续至少84 h，同时稳定地伴随着亚精胺、精胺水平的缓慢下降，和精氨酸和精氨酸脱羧

酶1和2以及一个推测的二胺氧化酶（At1g31690）的表达水平的不断提高。值得一提的是，24小时后GABA有瞬态峰值，他认为这是之前表达谷氨酸脱羧酶升高的原因。

Narsai等（2009）研究发现水稻发芽种子在缺氧条件下比在含氧条件下，腐胺水平持续降低。超过12个小时的缺氧，GABA水平稳步提高，随后在接下来的36小时内，有一

个暂短的下降；表达这两个谷氨酸脱羧酶基因的丰度在第一个24小时瞬时增加，在12

h达峰值。腐胺水平的提高与二胺氧化酶活性和GABA在大豆根中增加的盐胁迫浓度有关。而氨基胍只对亚精胺和精胺水平有小的影响。总体而言，这些研究表明，非转基因植物GABA水平响应非生物胁迫深受胁迫过程的影响，而不是腐胺的效用。这可能包括谷氨酸脱羧酶活性受两个基因依赖和独立的调节机制，它还可能涉及到调节酶参与腐胺分解代谢。

## 5 GABA对植物的作用

GABA可以作为小分子渗透调节物质，降低细胞质的水势，增强细胞保水性从而缓解细胞缺水造成的伤害（宋红苗等，2010；施征等，2007）。GABA 支路在植物抵御氧化胁迫上也起着重要作用。在对拟南芥*ssadh*突变体的研究中发现，*ssadh*对环境胁迫很敏感，胁迫条件下其体内活性氧积累量远远高于野生型，致使细胞加速坏死（Bouchéet al, 2003），说明GABA 支路能够抑制活性氧的积累。这被Yang等（2013）试验缺氧能够增加二胺氧化酶活性和GABA含量所证实。其原因可能是由于GABA支路为

TCA循环供应NADH和琥珀酸等反应底物，GABA支路受阻会消弱线粒体的呼吸作用，致使活性氧大量积累（Fait A et al., 2003）。利用转基因敲除GABA 支路中的基因会引起植物对氧化胁迫敏感，而过量表达这些基因能够提高转基因植物对氧化胁迫的耐受性（Coleman et al, 2003）。罗黄颖等（2011）研究发现，NaCl 胁迫下，外源添加GABA通过促进抗氧化酶活性和抗氧化剂含量的提高，降低H2O2和MDA的积累，保护了细胞膜结构的稳定性，从而减轻盐胁迫对番茄光系统Ⅱ的伤害，增强番茄的耐盐性。

丙氨酸和GABA作为碳和氮的储存库也是植物在低氧胁迫下一种重要的适应机制。低氧胁迫下，野生型拟南芥中GABA和丙氨酸含量会大量积累，而突变体*gad1*和*gaba*-t1中不仅GABA合成受到影响，丙氨酸的积累也受到抑制，说明GABA支路影响着低氧条件下丙氨酸的积累（Miyashita et al, 2003）。外源GABA能够提高植物的抗逆性。夏庆平等（2011）发现，外源GABA能显著提高正常通气和低氧胁迫下甜瓜幼苗的光合色素含量、净光合速率、气孔导度、胞间CO2浓度、CO2羧化效率、最大光化学效率、光化学猝灭系数、表观光合电子传递速率和PSⅡ光合电子传递量子效率，而气孔限制值、初始荧光和非光化学猝灭系数显著降低，GABA 在低氧胁迫下的提高

效果更明显。盐胁迫也能够增加植物GABA含量。Su等（2007）发现盐胁迫能够增加二胺氧化酶活性和GABA含量。李岩岩等（2011）发现，外源GABA可以减轻盐胁迫对小麦幼苗造成的伤害，具有一定的生理保护作用。周翔等（2005）推测盐胁迫下ABA通过调控GAD的活性而导致GABA积累。Akçay 等（2012）发现拟南芥WT植株和

CMSII植株GABA含量在盐胁迫下增加，但是变化趋势不同。这证明GABA在一定条件下能够增加植物的抗逆性。

植物内源GABA含量可能与植物体内的激素代谢有关，能够影响植物的生长与衰老，及果实成熟。Kathiresan A等（1998年）繁缕茎对GABA的反应在较低浓度的GABA是双向的，高浓度（500 mM）促进茎的伸长，但高浓度的GABA抑制茎的伸长。250 mM最佳GABA浓度产生最大茎伸长。较高的GABA的浓度也刺激了1-氨基环丙烷- 1-carboxylate（ACC）合成酶（EC 4.4.1.14）mRNA的积累和乙烯生产。结果表明，较高GABA浓度对茎伸长抑制作用是通过乙烯部分介导的。

Trobachera C P等（2013）研究发现苹果（*Malus*×*domestica Borkh*. cv. Empire）贮藏在正常的大气条件下GABA含量增加。从气调贮藏（3℃，2.5 kPa O2, 2.5 kPa CO2）

3小时后转移到正常环境条件，GABA水平明显下降。

Cao S等（2012年）以枇杷果实在20℃，以10µM茉莉酸甲酯（MeJA）预处理24小时，然后在1℃储藏35天，观察MeJA处理在冷害条件下（CI）对脯氨酸和GABA含量影响的变化。发现在处理的21天CI使对照果实表现出严重的肉质化现象---特有的

CI症状，而MeJA处理的果实出现这种症状比例较小。在储藏期间，脯氨酸和GABA含量随储藏时间积累而上升，而MeJA处理提高了脯氨酸和GABA含量，且MeJA处理过的水果比控制组具有较高的d1-吡咯啉-5-羧化合成酶（P5CS），鸟氨酸d-转氨酶

（OAT）和谷氨酸脱羧酶（GAD），和较低的脯氨酸脱氢酶（PDH）的活性。Cao S 等

（2012年）的结果表明，MeJA处理枇杷果实减少CI可能是由于增加脯氨酸和GABA的含量的原因。Oh S H和Choi W G（2001）研究发育的大豆幼苗GABA，谷氨酸（Glu），钙离子和钙调素（calmodulin）以及GAD活性水平变化显示，根尖GABA水平为总游离氨基酸12.3％，而在子叶只有游离氨基酸总量的4.2％。与子叶和成熟的基本组织相比，根尖还含更高水平GAD。谷氨酸水平子占叶中游离氨基酸总量的13％，而在根尖只约占游离氨基酸总量0.2％。与幼苗的其他部分相比，钙离子和钙调素在子叶和根尖的含量均较高。这些数据表明，发育大豆幼苗的GABA含量和GABA合成水平在幼嫩组织中最高。Han K L等（2012）用日光温室生长的“Subong”桑树(M. *bombycis* K.)植株叶片研究GABA积累发现，衰老叶子较幼叶增加20倍以上的GABA。相比之下，在衰老过程中更多的成熟叶片比幼叶片检测到更多的芸香苷。

另外，植物内源GABA含量可能与植物体硝酸盐吸收有关。Beuve N等（2004年）对硝酸盐流量、硝酸盐转运蛋白基因BnNrt2的表达与氨基酸组成的韧皮部渗出物之间的关系进行了调查，发现甘蓝型油菜（*Brassica napus* L.）在N-缺失（短期实验）期间

和的生长周期（长期实验）数据显示GABA在韧皮部渗出物和硝酸盐吸收之间呈正相关性。GABA的影响与Gln、Glu和Asn，每个已知的硝酸吸收抑制剂的影响进行比较。结果表明外源GABA处理诱导了BnNrt2基因表达显著增加，但对硝酸流影响较少。与控制植物相比，外源Gln、Glu和Asn大大减少硝酸盐流和BnNrt2 mRNA表达。Beuve

N等（2004年）研究证明GABA可作为一个器官之间推测的长途信号分子结合在植物中，受谷氨酰胺负调控的证据。

GABA 作为一种信号分子在植物中也有一定作用，如花粉管的生长和指导依赖于

GABA的水平。也有迹象表明，GABA受体存在于植物（Palanivelu et al, 2003; Wilhelmi et al 1996）。此外，根特异性拟南芥异构体GAD1 在正常增长条件下的GABA 合成中起主要作用，并在响应热胁迫（Bouchéet al, 2004）。

## 6 植物其他游离氨基酸在干旱胁迫中的作用

Rai（2002）认为积累在植物体内的氨基酸所起的作用不同。氨基酸作为渗透调节物质，调节离子运输、气孔开放、重金属解毒等。氨基酸也会影响某些酶活性和酶蛋白的合成，基因表达和氧化还原动态平衡。

研究干旱胁迫与脯氨酸关系的文献较多，而对干旱胁迫与植物其他游离氨基酸的关系研究的文献相对较少。干旱胁迫也是一些其他游离氨基酸积累如：精氨酸、丙氨酸

（*Phaseolus mungo*, Rai and Bapat, 1977）精氨酸（*cryptomeria*, Mori 1971）谷氨酸、谷酰胺和天门冬氨酸于棉花（Hanower和Brzozowska, 1975），天门冬氨酸、天门冬酰胺、丝氨酸和甘氨酸在玉米（Slukhai和Shvedova, 1972；Thakur和Rai, 1982）。脯氨

酸、鸟氨酸、精氨酸和谷氨酸在离体的水稻叶片（Yang et al, 2000），Thakur和Ra（i 1982）

研究发现，抗旱的玉米品种的脯氨酸含量增加4倍，天门冬酰胺含量增加4.5倍，天门冬氨酸含量增加1.5倍，丝氨酸和甘氨酸含量均增加2.2倍。Thakur和Rai（1985）研究发现，在干旱胁迫下对玉米幼苗外源使用脯氨酸、丙氨酸、丝氨酸和天门冬酰胺以外的氨基酸，能够延迟玉米幼苗的萎蔫。Rai和Sharma（1991）研究蚕豆（Vicia faba）外表皮发现，脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸、亮氨酸、苏氨酸、赖氨酸、精氨酸、色氨酸和苯丙氨酸能够抑制气孔的开放，而组氨酸、蛋氨酸、天门冬氨酸、天门冬酰胺、谷氨酸和谷酰胺能够促进气孔开放。他们还发现氨基酸促进气孔开放的结果能够被ABA逆转；进一步发现，能够促进气孔开放的氨基酸种类，也能够促进K+流进入保卫细胞，相反，抑制气孔开放的氨基酸种类能够拟制K+流进入保卫细胞。这反映了气孔调节的平衡机

制，也提出了氨基酸影响离子跨膜运输的问题。Rai和Kumar（i 1983）研究长春藤（*Vinca*）

花瓣发现，外源氨基酸能够影响H+和OH-的跨膜运输，其中脯氨酸、精氨酸、天门冬酰胺、谷酰胺、丙氨酸和亮氨酸能够降低膜透性一倍，苯丙氨酸、苏氨酸、丝氨酸和

GABA能够降低40%的膜透性，而甘氨酸、谷氨酸和天门冬氨酸对膜透性没有影响。

Rana和Rai（1996）研究发现，外源组氨酸、脯氨酸、谷酰胺、蛋氨酸和甘氨酸能够促

进菜豆幼苗对Ca2+的吸收，而丙氨酸、天门冬氨酸、谷氨酸、色氨酸则抑制其对Ca2+的吸收。Khanna（1998）发现外源脯氨酸能够增加萝卜（*Raphanus*）幼苗15%的K+吸收，组氨酸、GABA、羟脯氨酸、亮氨酸、谷酰胺和苯丙氨酸也有同样的效果。外源的氨基酸能够调节离子吸收和膜透性可能在于氨基酸能够减轻胁迫条件对植物的影响

（Rai, 2002）。

Rhodes和Handa（1989）研究悬浮培养的烟草（*Nicotiana tabacum* L. var Wisconsin

38）适应0 mM和428 mM氯化钠氨基酸代谢，使用[15N]确定主要游离氨基酸库和总可溶性蛋白的氨基酸残基的通量。结果显示，适应428 mM氯化钠的培养显示80倍游离

脯氨酸积累，这涉及到通过可以忽略不计库中间体谷氨酸合成脯氨酸至少11倍增加。

1000 nmol/h. gFw脯氨酸合成用于细胞的盐适应，只有296 nmol/h. gFw脯氨酸被需要保持细胞生长，仅9 nmol/h. gFw用于维持蛋白质的合成。多达695 nmol/h. gFw脯氨酸可能用于分解代谢以适应盐培养。

Khanna S等（1998）研究外源氨基酸在正常和渗透胁迫下对萝卜幼苗内源脯氨酸水平的变化的影响，发现外源脯氨酸只有在较高浓度(1mM)才能被收检测到。然而，脯氨酸在所有浓度（1µM到1000µM）都会促进吸收，包括在渗透胁迫条件下应用L-脯氨酸浓度。L-亮氨酸L-谷氨酸，L-并氨酸和L-组氨酸均能增强内源性水平的脯氨酸，而外源羟基脯氨酸、GABA含量则减少。

Santos等（2009）用容量10升盆在温室中种植菜豆（*Phaseolus vulgaris* L.）两个基因型“Carioca”和“Ouro Negro”，对叶片可溶性糖、淀粉和游离氨基酸含量进行了评价。对“Carioca”在一天之内，两种基因型在十天期间进行水分缺失处理，在6: 00和18:00 h观察。在白天中午，所有参数均增加，在下午，碳水化合物含量变化与氨基酸含量变化相反。水分胁迫下，叶片可溶性糖在18: 00 h和它们的日常平衡（含量在18: 00

h到第二天6: 00h减少）在第二天增加。同时，淀粉和氨基酸含量增加，它们各自的每日余额减少；在8d和10d，可溶性糖每日余额是负值和淀粉每日余额接近零或为负值，而氨基酸每日余额是正值。在复水以后，可溶性糖每日余额是零和淀粉每日余额增加，而氨基酸每日余额是负。由此认为碳水化合物每日余额，强烈有关游离氨基酸每日余额，是评估水分亏缺时菜豆对胁迫反应和代谢能力好指标（Santos et al, 2009）。

Showler A（2002）研究陆地棉受水分胁迫、减少夏时制和杂草的竞争，或用高岭土可湿性粉剂配方处理，用反相液相色谱法分析了叶片的17种游离氨基酸，发现水分胁迫造成了游离脯氨酸含量显著增加（49.9倍, *P*＜0.001），与扩散阻力相关（秒/厘米）。5种其他游离氨基酸含量增加，且游离氨基酸总量也增加（*P*<0.05）。

Yan H等（2012）研究发现在盐胁迫下，柠条叶片游离氨基酸的积累，游离氨基酸初期积累缓慢，低于临界水平，但迅速高于临界水平。此外，在所有游离氨基酸中，脯氨酸含量最丰富。Simon–Sarkadi L等（2006）在最适温度对转基因大豆（T *Glycine max*

L）进行干旱胁迫，发现植株超量表达Pro生物合成的酶编码的基因，L–Δ1–吡咯啉–5–

甲酸还原酶是远远大于野生型（W）植物（105倍与19倍，处理7 d后）。在控制条件下，精氨酸约占60%的总游离氨基酸含量。胁迫处理后，T和W基因型Pro浓度约占

50%以上。在胁迫恢复的后期，W和T基因型植株GABA含量分别达到27%和53%。无胁迫处理W和T基因型植株只有2倍的酪氨酸浓度差异。然而，在胁迫过程期间和随后的恢复过程中，分别找到许多类似的氨基酸。目前的结果表明操纵单个氨基酸的含量会影响大豆中的整个游离氨基酸组成。

## 7 本研究的意义

GABA支路对C / N分配和氨基酸代谢具有一个中心调节作用，在多个转氨基反应中，谷氨酸转换为2–OG是用做氨基的供体。因此，谷氨酸脱羧生成GABA，然后转氨基生成SSA，伴随2–OG到谷氨酸的转换，链接支路到多个亚细胞代谢网络的交叉，并紧密相关胁迫条件。它可能是谷氨酸转化为GABA伴随其他胁迫与谷氨酸代谢途径相关的重要调节。例如，渗透胁迫强烈地影响谷氨酸转化为GABA和Pro，这意味着密切的调控连接这些代谢。在正常生长条件下，谷氨酸转换为蛋氨酸（Met）、苏氨酸（Thr）、异亮氨酸（Ileu）和赖氨酸（Lys），在胁迫条件下，赖氨酸– 酮戊二酸还原酶

（Lys–ketoglutarate reductase LKR）和酵母氨酸脱氢酶（saccharopine dehydrogenase

SDH），这两种酶表达形成的双官能团的多肽LKR/ SDH 的参与诱导Lys 分解代谢

（Stepansky et al, 2006）。此酶将赖氨酸恢复成谷氨酸，它可以被重新组合到胁迫引起的代谢重排。此外，谷氨酸是几个生长相关的代谢反应的一个积极调节因子

（López–Bucio et al, 2006）。因此，可以想象其转化为GABA可能微调植物生长，以响应不断变化的环境条件；根据最新的数据的分析，甚至可能被认为是胁迫和非胁迫条件下的TCA循环的一个整体的组成部分。多胺（PAs）是低分子的脂肪族含氮有机阳离子，包括腐胺（Put）、三胺亚精胺（Spd）和精胺（Spm）。多胺主要存在于活细胞中，以游离，或者以共轭小分子如酚酸（共轭形式）和各种生物大分子如蛋白质结合（结合态）。植物在各种非生物胁迫条件下，PAs可稳定细胞膜，清除自由基，调节和控制某些离子通道的活动。此外，在干旱胁迫下PAs与DNA、RNA和蛋白质周转率密切关联，

PAs也是形成GABA的前体。

干旱缺水对作物生产造成的危害超过了其他逆境因子的总和，因此，提高作物抗旱性已成为干旱缺水地区农业可持续发展急需解决的关键问题。新疆是我国典型的干旱区，棉花是新疆最重要的经济作物，研究棉花适应干旱逆境的能力，探讨棉花抗逆生理生态机制，培育耐旱品种，已成为新疆现代植棉业迫切需要解决的重要问题。

氮代谢是植物最基本的生理过程之一。谷氨酰胺合成酶（GS）是氮同化途径的第一个酶，是调节植物氮代谢途径的关键酶，氨的积累在很大程度上决定于胁迫期间GS和谷氨酸合成酶（GOGAT）转氨活动。谷氨酸脱氢酶（GDH）活性被认为可能是在盐

胁迫和渗透胁迫下GS/GOGAT系统同化效率较低时利用积累的氨的一种措施（Surabhi et al, 2008）。干旱引起的氮营养缺乏往往成为解除干旱胁迫即复水后植物生长的主要限制因子之一，而这一过程与氨的同化密切相关（张慧娜等，2009）。干旱胁迫也导致植物水解酶活性增强，大分子蛋白质降解，可溶性蛋白质含量发生变化，使植物积累了一系列含氮渗透调节物质，如氨基酸和酰胺等。这些小分子化合物累积可反映水分胁迫程度，是植物适应干旱、增强抗旱性的重要方式，对植物生长具有重要意义。

基于以上研究背景，对棉花幼苗在干旱胁迫条件下提出一下有关问题：

（ⅰ）干旱胁迫条件下抗旱性不同的棉花品种叶片和根系GABA含量及其相关酶做出何种响应。

（ⅱ）GABA代谢的主要酶GAD与TCA循环的主要有机酸及谷氨酸代谢有关的氨基酸关系如何。

（ⅲ）干旱胁迫条件下抗旱性不同的棉花品种叶片和根系GABA代谢与多胺的关系如何。

（iv）干旱胁迫条件下抗旱性不同的棉花品种叶片和根系GABA代谢与其中的游离氨基酸含量关系如何。

以上问题的研究对棉花幼苗采取何种栽培措施能度过干旱胁迫时期，以及在栽培中采取什么方法进行干旱胁迫处理，调节棉花的碳氮代谢，获得高产具有重要意义。

# 第二章 棉花GABA含量变化对干旱胁迫的响应

γ–氨基丁酸（GABA）是四碳非蛋白氨基酸，存在于包括细菌、植物和动物不同的生物体中（Shelp et al., 1995; Fait et al., 2006），也被认为在植物中的一种信号传导分子（Fait et al., 2006, 2008）。在植物中，GABA代谢代谢具有不同的功能，包括调节渗透压和pH值，C: N平衡，氮代谢，指导花粉管生长，参与三羧酸循环（TCA）支路，并防止不同环境胁迫下活性氧的积累（Snedden et al, 1996; Kinnersley et al, 2000; Ansari et al, 2009; Barbosa et al., 2010; Renault et al., 2010）的作用。

一定程度的水分亏缺使植物的呼吸作用增强，水解酶活性增强，合成酶活性降低，细胞内可溶性呼吸底物积累，而随着水分亏缺程度加剧，氧化磷酸化的解偶联、ATP产出减少，呼吸能量多以热的形式散失，呼吸速率逐渐降到正常水平以下（秦嗣军等，

2011）。植物体内糖代谢途径主要是通过糖酵解和TCA 循环进行，GABA 支路和TCA循环密不可分（宋红苗等，2010）。拟南芥也可以在仅有GABA 做氮源的培养基上有效生长，说明其涉及氮代谢的整个过程（Breitkreuz et al, 1999）。研究发现给大麦的叶子施用14C标记的谷氨酸，检测缺氧条件下的谷氨酸代谢，当植物体中谷氨酰胺合成受阻、蛋白质合成减少及降解加速的条件下，谷氨酸向GABA的转化量会增加（施征等，2007）。25~200 mmol. L-1的GABA 可稳定和保护离体类囊体膜免受有盐存在时的冰冻损伤，超过脯氨酸所具有的防冻作用（Schwacke et al, 1999; Fischer et al, 2003）。由此推之，干旱胁迫必然会影响棉花幼苗的GABA代谢，本章的第一节对此予以研究。

夏庆平等（2011）发现，外源GABA能显著提高正常通气和低氧胁迫下甜瓜幼苗的光合色素含量、净光合速率、气孔导度、胞间CO2浓度、CO2羧化效率、最大光化学效率、光化学猝灭系数、表观光合电子传递速率和PSⅡ光合电子传递量子效率。李岩岩等（2011）发现，外源GABA可以减轻盐胁迫对小麦幼苗造成的伤害，具有一定的生理保护作用。此外，蛋白质的降解需要蛋白水解酶的参与(Huffaker, 1990)。植物体蛋白质的降解普遍认为是先由内肽酶（肽链内切酶）起作用，将蛋白质水解成小肽，再由外肽酶起作用将小肽彻底水解成氨基酸，然后被贮存或运输到其他部位。但外源GABA对干旱胁迫下的棉花内肽酶活性效果未有报道，本章的第二节对此予以研究。

#### 第一节 棉花GABA含量及相关酶活性变化对干旱胁迫的响应

在水分胁迫条件下，GABA可以作为小分子渗透调节物质，降低细胞质的水势，增强细胞保水性从而缓解细胞缺水造成的伤害（宋红苗等，2010）。GABA 已被证明对不同的胁迫包括盐积累的响应在不同的植物（Kinnersley et al,, 2000），如盐处理烟草

（Zhang et al, 2011）和拟南芥（Renault et al, 2010），而有关对棉花对不同的胁迫方面的响应研究鲜有报道。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试验设计

对新疆北疆棉区不同年代推广的16个棉花主栽品种采用苗期反复干旱法筛选得到

抗旱性差异较大的新陆早7号（抗旱品种）和新陆早24号（不抗旱品种）作为供试棉花（Gossypium spp）品种。试验塑料盆长、宽、高为50cm×25cm×15cm，装土10kg。取农田耕层垆土，过筛，与干净河沙按3∶1（体积比）混匀。土壤养分为：全氮0.71g/kg，碱解氮51.03 mg/kg，速效磷22.61mg/kg，速效钾161.59 mg/kg；土壤含水量24.3%。按纯N 0.15g/kg, P2O5 0.10g/kg, K2O 0.15g/kg施硝酸钾和磷酸氢二铵作底肥。种子于沙土中萌发，出土3d后移栽于盆内，每盆定植14株，每天光暗时间14h/10h，光照强度750μmol·m-2·s -1，昼夜温度为28℃/ 20℃。

试验组设持续干旱-复水处理和正常灌水处理的对照组。每个处理5盆，重复3次。

待幼苗真叶完全展开后（生长30d 左右）进行干旱胁迫处理。处理时，对照组每天8: 00

和18: 00用称重法和美国PSΨPRO土壤水分仪测量土壤含水量，以确定补水量使其达到土壤相对含水量80%左右，处理组停止供水进行持续干旱胁迫，并以对照组同样的方法测定土壤含水量，确定其干旱状态。处理的当天上午10: 00取两片完全展开真叶作为实验用样，每个处理取样量约46 g左右，每天在同时间取样，连续取样5d（经多次试验发现，5d抗旱性差品种的两片真叶萎蔫，子叶用手指轻动掉落），以液氮快速冷冻，

-80℃冰箱中保存。干旱处理5d采完样后复水，复水后24h和48h各取样1次，总共取样7次。

### 1.2 GABA含量的测定

#### 1.2.1 GABA提取

依据GABA极易溶于水的性质，精确量取新鲜棉花幼苗的叶片2.0000 g加入含有加入6%磺基水杨酸溶液研磨成糊状，提取1小时，用该溶液定溶于25 ml。取该溶液

12.5 ml置于25 ml容量瓶中，用柠檬酸钠调至pH2.20，然后定溶摇匀。再取5ml于相对离心力12000 g 离心15 min，上清液用于上机分析。

#### 1.2.2 GABA分析试剂

柠檬酸钠（AR）、氯化钠（AR）、盐酸（GR）、苯酚（AR）、氢氧化钠（AR）和重蒸水，配制成pH4.90的洗脱缓冲液，显色剂为自配pH5.20茚三酮溶液，0.2 mol·L -1 NaOH为再生液。GABA标准液：浓度均为1 mmol·L -1。

#### 1.2.3 GABA分析色谱条件与仪器

色谱柱：2.8×80 mm，柱温：54℃，缓冲液流速：10 ml / min，茚三酮溶液流速：5 ml / min，检测波长：570 nm，进样量：50 uL。

GABA分析仪器为Beckman 121 MB型氨基酸自动分析仪。

#### 1.2.4 GABA分析图谱

mV 100

90

80

70

60

50

40

30

20

10

0

-10

8

16

24

32

40

48

56

64

72

80

min

10.176' Glu

图1 GABA标样色谱图

11..254698'' Asp

6.593' Thr

8.794' Ser

13.875'

18.223' Ala

Fig. 1 chromatographic chart of standard sample of GABA

注：色谱图中保留时间在10.17min为GABA

mV 56

49

42

35

28

21

14

7

0

-7

8

16

24

32

40

48

56

64

72

80

min

Note: GABA peak in the chromatographic chartamino retention time is 10.17 min

6.838'Thr

图2 棉花叶片的GABA分析色谱图

5.175'Asp

8.358'Ser

10.173'Glu

1123..998038''

17.510'Ala

Fig. 2 chromatographic chart of standard sample of GABA of cotton leaves

注：色谱图中保留时间在10.17min为GABA

Note: GABA peak in the chromatographic chartamino retention time is 10.17 min

### 1.3 GAD活性测定

称取1. 0000 g棉花叶片样品，在冰浴条件下加入3 mL pH5. 8的磷酸缓冲液，用提取缓冲液（含50 mmol/L pH5.7的磷酸缓冲液、0.2 mmol/L磷酸吡哆醛、2 mmol/L EDTA、0.2%β-巯基乙醇）研磨匀浆，并定容至50 mL，于30℃水浴浸提2 h后，在15000 g离心10 min，上清液即为粗酶液。取0.3 mL粗酶液与0.2 mL底物反应液（含50 mmol/L

的磷酸缓冲液（pH5.7）、0.2mmol/L PLP, 100 mmol/L L-谷氨酸）于30℃水浴保温2 h后迅速冰浴终止反应。研磨成均浆后转入离心管，置于离心机内在4℃、12000 g条件下离心15 min，上清液作为粗酶提取液。取1 mL底物溶液（1% Glu, pH 5.8）与1 mL粗酶液于40 ℃的水浴中反应1 h。加入0.2 mL的0.2 mmol/L 硼酸缓冲液（pH 9.0），1 mL 6g/100 mL重蒸苯酚溶液，0.4 mL有效氯含量10% NaClO溶液，充分振荡，置于沸水浴10min，再立即置于冰水浴中20 min 并不断振荡，待溶液出现蓝绿色后，加2 mL 体积分数60%乙醇溶液，再次振荡均匀，静置后于645 nm波长处测定其吸光度。以每分钟生成1 molγ- 氨基丁酸所需要的酶量为一个谷氨酸脱羧酶活力单位 为

µmol/mg. protein. h（丁俊胄等，2011）。

### 1.4 GABA-T活性测定

GABA-T活性测定按照Ansari等（2005）方法。酶活性测定500µL反应混合物含有50 mM Tris-HCl（pH8.2）中的，1.5 mM DTT, 0.75 mM EDTA, 0.1 mM PLP，10％

（v/v）甘油，16 mM GABA, 4 mM丙酮酸和200µL粗提物。该混合物在30℃的培养箱中孵育60 min，并通过加入50µL 40 mM磺基水杨酸终止反应。丙氨酸（Ala）在培养过程中形成的量，测定使用丙氨酸脱氢酶的酶反应进行，在1 mL含有终止样品的混合物中，含有碳酸钠缓冲液50 mM(pH10)，1.5 mM NAD+和0.02单位升-丙氨酸脱氢

酶。该反应液在25℃进行10 min，然后使用日立3型分光光度计在340 nm读取吸光度。酶活性以丙氨酸产生率计算，活性单位为µmol/mg. protein. h 。

### 1.5 根系活力测定

采用TTC法，叶水势采用压力室法，叶片相对含水量和根系含水量采用烘干法（高俊凤等，2006）

## 2 结果与分析

### 2.1 干旱胁迫及复水过程中土壤相对含水量的变化

持续干旱胁迫和复水过程中土壤相对含水量的变化如表1，在试验过程中，对照组的土壤相对含水量始终保持在田间最大持水量80%左右。处理组土壤相对含水量显著下降，至干旱胁迫5d时，新陆早24号和新陆早7号的土壤相对含水量降到田间最大持水量26.17%和27.03%。

表1 土壤相对含水量的变化

Table 1 The changes of relative water content in the soil（%）

| 品种  genotype | 处理  treatment |  |  | 处理天数 treatment days(d) | | |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| 新陆早 7 号  Xinluzao 7 | CK | 80.93±0.35a | 80.57±0.18a | 80.87±0.41a | 80.80±0.26a | 80.90±0.23a | 80.30±0.20a | 80.37±0 .12ab |
| 干旱  drought | 80.80±0.45a | 59.03±0.18b | 45.23±0.24b | 33.47±0.18b | 27.03±0.18b | 80.40±0.47a | 80.73±0.44a |
| 新陆早 24 号  Xinluzao 24 | CK | 80.77±0.42a | 80.47±0.15a | 80.50±0.31a | 80.37±0.12a | 80.73±0.18a | 80.30±0.15a | 80.40±0.10ab |
| 干旱  drought | 80.27±0.09a | 57.93±0.24c | 43.33±0.15 c | 32.27±0.26c | 26.17±0.20c | 80.30±0.06a | 79.63±0.26b |

注：不同字母表示Duncan's显著性检验，小写字母表示差异显著（*p* ＜0.05），下表同。

Note: Different letters indicate significant difference by Duncan's test, small letters indicate significant difference at 5% level, the same as following table.

### 2.2 干旱胁迫对叶片相对含水量和叶水势的影响

图1表明干旱胁迫过程中，2个棉花品种叶片的相对含水量皆呈下降的趋势，下降的幅度和速率不同（见表1）。从表1可以看到，叶片相对含水量在干旱胁迫的第3天开

始明显下降，胁迫5d，新陆早7号和新陆早24号叶片的相对含水量较对照降低7.65%

和9.74%，复水以后2个棉花品种棉花叶片的相对含水量逐渐上升，新陆早7号较快。

A

B

干 旱 Drought

对 照 Control

100 100

95 95

叶片相对含水量

Leaf relative water content （%）

叶片相对含水量

Leaf relative water content （%）

90 90

85 85

80

1 2 3 4 5 6 7

80

1 2 3 4 5 6 7

处理天数Treatment days (d)

1−5d为持续干旱胁迫，6−7d为复水。下同

1 - 5d is drought stress, 6 -7d is rewatering. The same as below

图1 干旱胁迫对棉花叶片相对含水量的影响

Fig. 1 Effects of drought stress on relative water content of cotton leaves

注：A区表示新陆早7号的数据图，B区表示新陆早24号的数据图，下图同。

Note: Area A represents the data map of Xinluzao 7, Area B represents the data map of Xinluzao 24, with the following figure.

由图2可以看出在干旱胁迫条件下，2个棉花品种的叶水势变化趋势均随着胁迫时

间的延长而降低，5d时降到最低，此时新陆早7号和新陆早24号叶水势比各自对照降低335.33%和425.97%，两者差异达到显著水平（*p <0. 05*）；2个品种受胁迫的叶水势随着胁迫天数的延长均显著低于CK。随着复水的进行，两个品种叶水势均明显恢复，

6d不同品种叶水势差异显著，7d2个品种的值接近；对照叶水势基本没有变化。



干 旱 Drought

对 照 Control

A

B

0.0 0.0

-0.5 -0.5

叶水势

Leaf water potential (MPa)

叶水势

Leaf water potential (MPa)

-1.0 -1.0

-1.5

1 2 3 4 5 6 7

1 2 3 4 5 6 7

-1.5

处理天数Treatment days (d)

图2 干旱胁迫对棉花叶水势的影响

Fig. 2 Effects of drought stress on leaf water potential of cotton

### 2.3 干旱胁迫对根系含水量和根系活力的影响

根系含水量对土壤干旱的反应见图3。随着土壤干旱程度的加剧，新陆早7号和新陆早24号根系含水量呈逐渐下降趋势，从3d开始下降加快，至胁迫5d达到最低点，此时2个品种的根系含水量分别比对照降到了12.67%和13.79%。复水后根系含水量增

加，新陆早7号较新陆早24号增加较快。整体来看，2个品种根系含水量变化趋势相似，且差异不显著。

A

B

干 旱 Drought

对 照 Control

100 100

95 95

根系含水量

Root water content (%)

根系含水量

Root water content (%)

90 90

85

1 2 3 4 5 6 7

85

1 2 3 4 5 6 7

处理天数Treatment days (d)

图3 干旱胁迫对棉花根系含水量的影响

Fig. 3 Effects of drought stress on water content of cotton roots

图4表明，2个棉花品种的根系活力都随着土壤干旱程度的加剧呈逐渐下降趋势，至胁迫5d 降到最低点，新陆早7 号叶和新陆早24 号的根系活力分别比对照降到了

64.65%和72.27%。复水以后，2个棉花品种的根系活力都恢复，新陆早7号叶水势比新陆早24号恢复的速度快。

A

B

干 旱 Drought

对 照 Control

250 250

200 200

根系活力

Root vigour (μg g-1FW h-1)

根系活力

Root vigour (μg g-1FW h-1)

150 150

100 100

50 50

1 2 3 4 5 6 7 1 2 3 4 5 6 7

处理天数Treatment days (d)

图4 干旱胁迫对根系活力的影响

Fig. 4 Effects of drought stress on root vigor

### 2.4 干旱胁迫对谷氨酸脱羧酶（GAD）活性的影响

图5表明，在干旱胁迫下，新陆早7号叶片具有较高的基本和诱导的GAD活性水平。在干旱胁迫前2d，2个品种叶片的GAD活性变化不明显。胁迫3d，新陆早2 4号叶片在的GAD的活性较新陆早7号高。胁迫4d，2个品种叶片GAD的活性最高，分别比对照组高出近238.89%和154.24%。胁迫5d，2个品种叶片GAD活性开始下降，但仍高于对照组。复水后2个品种叶片GAD活性开始上升，新陆早7号的上升速度快于新陆早24号。



A

B

干 旱 Drought

对 照 Control

100 100

叶片谷氨酸脱羧酶活性

Leaf GAD activity (μmol mg-1 protein h-1)

80 80

叶片谷氨酸脱羧酶活性

Leaf GAD activity (μmol mg-1 protein h-1)

60 60

40 40

20 20

0

1 2 3 4 5 6 7

0

1 2 3 4 5 6 7

处理天数Treatment days (d)

图5 干旱胁迫对叶片GAD活性的影响

Fig. 5 Effects of drought stress on leaf GAD activity

图6表明在干旱胁迫下，2个品种根系的GAD活性变化较叶片小，且和叶片的变化趋势不同，其最高活性都出现在胁迫5d。在胁迫5d，新陆早7号和新陆早24号的活性分别比对照组高出274.02%和173.27%。复水后2个品种根系GAD活性开始下降，新陆早7号的下降速度快于新陆早24号。

70 70

A

B

60

干旱 Drought Drought

对照 Control Control 40

30

20

10

0

根系谷氨酸脱羧酶活性

Root GAD activity (μmol mg protein h )

-1 -1

60

根系谷氨酸脱羧酶活性

Root GAD activity (μmol tein h-1)

50

ro

50 p

-1

g m

40

30

20

10

0

1 2 3 4 5 6 7

1 2 3 4 5 6 7

处理天数Treatment days (d)

图6 干旱胁迫对棉花根系GAD活性的影响

Fig. 6 Effects of drought stress on cotton root GAD activity

### 2.5 干旱胁迫对GABA含量变化的影响

图7表明在干旱胁迫下，新陆早7号和新陆早24号GABA水平接近。在干旱胁迫前2d，新陆早7号GABA含量增加较慢，在胁迫的3d和4d GABA含量快速增加，5d时新陆早7号的GABA含量达到最高，新陆早24号开始下降，此时2个品种分别高于对照植株290.56%和200.31%。胁迫5d，2个品种叶片GABA含量开始下降，但仍高于对照组。复水后2个品种叶片GABA含量开始上升，新陆早7号的上升速度快于新陆早24号。



A

B

干 旱 Drought

对 照 Control

50 50

40 40

叶片GABA含量

Leaf GABA content (μmol g-1 FW)

叶片GABA含量

Leaf GABA content (μmol g-1 FW)

30 30

20 20

10 10

0

1 2 3 4 5 6 7

0

1 2 3 4 5 6 7

处理天数Treatment days (d)

图7 干旱胁迫对棉花叶片GABA含量变化的影响

Fig. 7 Drought stress on changes of GABA content in cotton leaves

图8表明在干旱胁迫下，2个品种根系的GABA含量比叶片低，在干旱胁迫下的变化速度也较慢，最高含量都出现在5d。胁迫5d，新陆早7号和新陆早24号的GABA含量分别比对照组高出320.63%和243.81%。复水后2个品种根系GABA含量开始下降，新陆早7号的下降速度快于新陆早24号。

40

A B

Root GABA content (μmol g FW)

干旱Drought

对照Control

-1

30

40

Drought Control

)

W F

-1

30 g

l

20 20

根系GABA含量

根系GABA含量

Root GABA content (μmo

10 10

0

1 2 3 4 5 6 7

0

1 2 3 4 5 6 7

处理天数Treatment days (d)

图8 干旱胁迫对棉花根系GABA含量变化的影响

Fig. 8 Drought stress on changes of GABA content in cotton roots

### 2.6 干旱胁迫对GABA-T活性的影响

图9表明在干旱胁迫下，2个品种叶片的GABA-T活性在干旱胁迫2d稍有上升，新陆早7号叶片具有较高的GABA-T活性（图5）。在干旱胁迫3-5d，2个品种叶片的GABA-T活性逐渐降低，胁迫5d，2个品种叶片GABA-T活性下降到最低，此时新陆早7号和新陆早24和分别比对照组降低了66.08%和71.39%。复水后2个品种叶片

GABA-T活性开始上升，新陆早7号的上升速度快于新陆早24号。

8 8

A

B

干 旱 Drought

对 照 Control

叶片GABA-T活性

Leaf GABA-T activity (μmol mg-1 protein h-1)

叶片GABA-T活性

Leaf GABA-T activity (μmol mg-1 protein h-1)

6 6

4 4

2 2

0

1 2 3 4 5 6 7

0

1 2 3 4 5 6 7

处理天数Treatment days (d)

图9 干旱胁迫对棉叶片GABA-T活性的影响

Fig. 9 Effects of drought stress on cotton leaves GABA-T activity

图10表明在干旱胁迫下，2个品种根系的GABA-T活性变化也较叶片慢，最低活性都出现在5d.5d时，新陆早7号和新陆早24号的活性分别比对照组降低了64.43%和67.74%。复水后2个品种根系GABA-T活性开始上升，新陆早7号的上升速度也快于新陆早24号。

A

B

干旱 Drought

对 照 Control

Drought Control

2

0

6 6

4

y )

t -1 i h v

4 性 t n

i

c i

根系GABA-T活性

Root GABA-T activity (μmol mg-1 protein h-1)

根系GABA-T活

Root GABA-T a (μmol mg-1 prote

2

0

1 2 3 4 5 6 7

1 2 3 4 5 6 7

处理天数Treatment days (d)

## 3 讨论

图10 干旱胁迫对棉花根系GABA-T活性的影响

Fig. 10 Effects of drought stress on cotton root GABA-T activity

在干旱胁迫下棉花根系的生理活性发生了改变，根系活力也发生了改变，使根系对水分的吸收、利用能力受到影响，进一步使植物叶组织的相对含水量降低。叶片相对含水量和叶水势反映了植物叶片的保水能力。干旱胁迫下，抗旱性强的棉花品种比抗旱性弱的品种叶片含水量和叶水势下降要迟缓，以维持体内生理生化的正常运转。叶片相对含水量和叶水势测定结果表明，新陆早7号叶片具有较强的保水能力，在减少失水、保

持膨压等方面比新陆早24号强。

拟南芥CMSII和WT植物的GAD活性显示了在短期和长期盐胁迫下的差异，WT植物的GAD活性和GABA积累有很好的相关性，GAD活性增强导致GABA含量增加

（Renault et al, 2010）。本研究结果也观察到棉花幼苗GAD的活性增加对干旱胁迫的响应。在干旱胁迫下，棉花叶片GAD活性于胁迫的2d首先降低，而于3d和4d增加，5d又降低；复水1d上升，2d稍有下降。其中新陆早7号在胁迫4d增加幅度大于新陆早

24号。谷氨酸是GAD转化GABA的底物，其含量高时GAD活性也高。在根系中GAD活性的变化趋势和叶片相似，只是GAD活性略低于叶片，但在胁迫的5d增加幅度最大，且新陆早7号的增幅高于新陆早24号。这说明抗旱品种在胁迫条件下具有较高的GAD活性。

前人研究发现拟南芥在长期盐胁迫下，GABA增加，是胁迫诱导GABA转氨酶活性逆转的结果，GABA转氨酶转化SSA成GABA，不只是GAD活动生成GABA. GABA转氨酶也是GABA代谢的关键组成部分，其合成率是由细胞内的GABA的水平决定的。

GABA转氨酶缺失的拟南芥突变体对NaCl处理特别敏感（Renault et al., 2010）。此外，

GABA支路对TCA循环提供NADH和/或琥珀酸盐（Bouche et al, 2003）。本试验发现，在干旱胁迫2d，2个品种棉花叶片和根系的GABA-T活性略有上升，然后至5d逐渐下降，复水后又上升。其中新陆早7号叶片在3-5d低于新陆早24号，在根系中新陆早7号于4-5d低于新陆早24号。这说明抗旱品种在胁迫较严重时的GABA-T活性稍低，有

利于GABA的积累，以增加其抗旱性。

有关研究发现，2-OG依赖的GABA-T（GABA-TK）活性显著大于GABA-TP的活性（Akihiro et al., 2008），研究发现GABA-TK在西红柿GABA代谢发挥了重要作用。本研究中也测定了丙酮酸依赖GABA-T（GABA-TP）的活性，只用了比色法测定了活性，没有用色谱法验证，本文没有列出实验数据。

Kinnersley等（2000）研究发现，在不同的胁迫，如热休克胁迫或冷休克胁迫诱导出不同的GABA含量趋势，被认为是GABA积累胁的迫特异性。在盐、硒、干旱和热增加等不同的胁迫下，GABA 在芝麻（*Sesame indicum*）中积累，长期盐胁迫增加了

GABA 含量（Bor et al, 2009）。盐胁迫也增加了拟南芥的茎和根GABA的积累（Renault et al, 2010）及大豆GABA 含量（Xing et al., 2007）。盐胁迫敏感和抗盐胁迫的番茄品种表现出不同的GABA积累模式。Allan等（2008）发现拟南芥和烟草在盐，干旱和温度胁迫下GABA含量增加。本试验发现，干旱胁迫诱导新陆早7号和新陆早24 号

GABA含量逐渐增加，在胁迫4d达到最高，此时新陆早7号叶片GABA含量高于新陆早24号，而在胁迫5d后又下降。而根系的GABA含量在胁迫5d达到最高，和叶片并不同步，这可能与根系和叶片对干旱胁迫的响应不同有关，也说明抗旱品种在严重的干旱胁迫下能够积累较多的GABA，以抵抗干旱胁迫。

总之，在干旱胁迫条件下新陆早7号和新陆早24号之间的差异可能是其不同代谢反应的一部分。新陆早7号在长期干旱胁迫下有较好地生长，这可能与GABA积累的代谢有关。正如在以前的研究表明，GABA在不同植物不同水平不同含量，与TCA循环酶损害有关（Beuve et al, 2004; Studart-Guimarães et al, 2007）。GABA代谢由参与

TCA循环的酶调控，完整性通过琥珀酸生成调控（Renault et al, 2010）。氮代谢GS /

GOGAT途径紊乱导致2-OG水平降低（Lea et al, 2003; Noctor et al, 2004）。在环境胁迫条件下，当碳短缺成为生长发育的限制因子时，植物进化的几种能将氨基酸，酰胺，酮酸作为碳源供给TCA循环（Miflin et al, 2002）。几种次要氨基酸的生物合成的调节涉及到不同的代谢功能之间的协调。

另外，多胺降解途径也可以诱导GABA形成。多胺中的精胺和腐胺通过多胺氧化酶和二胺氧化酶可以转换成GABA（Turano et al, 1997; Bhatnagar et al, 2001）。盐胁迫相关多胺氧化在番茄（Aziz et al, 1998）和大豆（Su et al, 2007）被报道。在CMSII突变体中，长期盐胁迫通过二胺氧化酶活动可诱导多胺降解。Su等（2007）报告，在盐胁迫的大豆植株上，较高GABA水平与多胺降解相关。进一步分析这一途径，需要植物知之甚少的多胺降解和GABA代谢的相互作用，将在第三章予以分析讨论。

#### 第二节 外源GABA及不同内肽酶抑制剂对干旱胁迫下棉花内肽酶活性的影响

γ-氨基丁酸（GABA）作为一种非蛋白质氨基酸，联系着植物体内碳素和氮素两大代谢途径，已被确定为一种对植物的生长和发育有重要影响的信号物质（Bouche et al，

2003），能够对生物和非生物逆境胁迫作出反应，GABA 与抗氧化系统之间有关（罗黄颖等，2011），参与低氧胁迫（Breitkreuz et al, 2003）、低温胁迫（Mazzucotelli et al, 2003）等多种生理过程。

一定程度的水分亏缺使植物的呼吸作用增强，水解酶活性增强，合成酶活性降低，细胞内可溶性呼吸底物积累，而随着水分亏缺程度加剧，氧化磷酸化的解偶联、ATP产出减少，呼吸能量多以热的形式散失，呼吸速率逐渐降到正常水平以下（秦嗣军等，

2011）。植物体内糖代谢途径主要是通过糖酵解和TCA 循环进行，GABA 支路和TCA循环密不可分（宋红苗等，2010）。拟南芥也可以在仅有GABA 做氮源的培养基上有效生长，说明其涉及氮代谢的整个过程（Breitkreuz et al, 1999）。研究发现给大麦的叶子施用14C标记的谷氨酸，检测缺氧条件下的谷氨酸代谢，当植物体中谷氨酰胺合成受阻、蛋白质合成减少及降解加速的条件下，谷氨酸向GABA的转化量会增加（施征等，2007）。25~200 mmol. L-1的GABA 可稳定和保护离体类囊体膜免受有盐存在时的冰冻损伤，超过脯氨酸所具有的防冻作用（Schwacke et al, 1999; Fischer et al, 2003）。

蛋白质的分解是适应环境必不可少的条件（Vierstra, 1993），蛋白酶可以去除，灭活或变性异常蛋白，以便在生长要求的条件下改变代谢状态。也与蛋白修饰、降解及生物的应急反应密切相关。在信号转导，氨基酸再利用，植物的生长、发育、抗逆过程中有重要作用（张为民等, 2000; Hilt et al, 1992）。水分缺失是引起细胞区隔化紊乱中断，导致不受控制的蛋白质水解的一个必须考虑的因素。而双子叶植物和单子叶植物的抗旱机理不同，双子叶植物在中度干旱胁迫下部分叶子中的养分发生转移，并脱落，在此过程中发生蛋白质的降解可再利用。棉花为双子叶木本植物，有关水分胁迫过程中蛋白酶的变化以及内肽酶种类的相关报道相对较少，特别是外源GABA对干旱胁迫下棉花内肽酶的作用机理未见报道。本试验以水培棉花幼苗为材料，分析棉花内肽酶的类型，研究外源GABA处理对PEG 模拟干旱胁迫下幼苗叶片和根系内肽酶活性的影响，探讨

GABA增强棉花耐旱的生理调节机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验材料同于第二章，以棉花新陆早7号和新陆早24号幼苗为试材。

### 1.2 水培试验

幼苗培养在1/2强度的Hoagland营养液中用石英砂培的方式。石英砂装于一20×15×6 cm具多孔的塑料方盒中，盒下方再套装一装有30×20×15 cm营养液的塑料方盒，构成一套幼苗砂培系统。萌发后的种子被播种在石英砂上，在28℃/20℃、光强为350μmol·m-2·s -1的植物生长箱内培养15d后，pH6.8左右的处理溶液中。在培养过程中，每天用微型加氧泵给营养液通气两次每次5 h。处理分为：

CK，即1 /2强度Hoagland营养液处理；

1/2强度Hoagland加入-1.0 MPa PEG；

1/2强度Hoagland加入-1.0 MPa PEG再加入5 mM GABA；

1/2强度Hoagland加入5 mM GABA；

对于培养液中含有GABA 的处理每日上午10 时用喷雾器再给叶片喷施一次

5mMGABA。培养4d后采样放入-80℃冰箱备用。

### 1.3 测定方法

酶液的提取和活力测定 参照曹慧等（2002）方法，将 1.0000g 叶片置于研钵内加入 5 ml 5mmol·L-1 的 HEPES 缓冲液[含 1 mmol·L-1 EDTA, 2 mmol·L-1 DTT 及 1 %(w/

v） PVP, pH8.0]冰浴研磨成匀浆，15 000g 离心 30 min（4℃）。取 2 ml 上清液加入已平衡好的 Sephadex G225（1. 0 cm×25 cm）层析柱，用 HEPES 缓冲液洗脱，收集的洗脱液用于蛋白质含量和内肽酶活性的测定。

酶反应体系 1.4 mL 200 mmol·L-1 pH5.2 柠檬酸缓冲液，0. 4 mL 酶提取液，0. 2 mL 底物，于 38℃保温 1 h 后用 12 %三氯乙酸（TCA）终止反应（对照在反应前加 TCA 终止反应）。在 4℃下放置 30 min, 4000g 离心（10 min）2 次后，上清液用于氨基酸的茚三酮反应。反应结束后，用分光光度计测定在 570 nm 处增加的吸光值（△A570），酶活力则以比活力△A570・mg-1·h-1 表示。

以曹慧等（2002）的方法测定二硫苏糖醇（DTT）、碘乙酸（IA）、苯甲基磺酰氟

（PMSF）、乙二胺四乙酸（EDTA）对内肽酶活力的影响。IA、PMSF、DTT、EDTA 于反应开始前分别溶于200 mmol·L-1的pH5.2柠檬酸缓冲液中。其中IA在酶反应体系中终浓度为2 mmol·L-1，PMSF，DTT为1 mmol·L-1, EDTA为2. 5 mmol·L-1，于

37 ℃保温1 h。终止反应后测定其内肽酶活力。

## 2. 结果与分析

### 2.1 GABA对PEG胁迫下棉花叶片和根系中内肽酶活力的影响

比较图1、2和图3、4可以看出，在棉花叶片和根系中，以血红蛋白为底物的内肽酶活性高于以酪蛋白为底物的内肽酶活性。在PEG胁迫下的棉花叶片内肽酶活力略低于根系。图1、2表明，以酪蛋白为底物时，PEG胁迫下的新陆早7号的叶片和根系分别比对照提高了200.78%和198.82%，新陆早24 号的叶片和根系分别比对照提高了

198.28%和211.94%。在PEG+GABA处理下，PEG胁迫下的新陆早7号的叶片和根系分别比对照提高了166.59%和141.64%，新陆早24 号的叶片和根系分别比对照提高了

153.49%和151.51%；图3、4表明，以血红蛋白为底物时，PEG胁迫下的新陆早7号的叶片和根系分别比对照提高了142.36%和216.79%，新陆早24号的叶片和根系分别比对照提高了147.11%和233.08%；以血红蛋白为底物时，PEG胁迫下的新陆早7号的叶片和根系分别比对照提高了120.01%和172.23%，新陆早24号的叶片和根系分别比对照提高了122.35%和182.42%。这表明PEG + GABA处理显著降低2个品种的内肽酶活性。

新陆早7号 Xinluzao7

新陆早24号 Xinluzao24

60

50

40

叶片内肽酶活性

Leaf endopeptidase activity (△ 570 mg-1 protein h-1)

30

20

10

0

CK PEG PEG+GABA GABA

处理Treatment

图1 外源GABA对PEG胁迫下棉花叶片内肽酶活性的影响（以血红蛋白为底物）

Fig. 1 Effects of exogenous GABA on peptidase activity in the leaves of cotton under PEG stress(with hemoglobin as substrate)



新陆早7号 Xinluzao7

新陆早24号 Xinluzao24

100

80

60

根系内肽酶活性 Root endopeptidase activity (△ 570 mg-1 protein h-1)

40

20

0

CK PEG PEG+GABA GABA

处理Treatment

图2 外源GABA对PEG胁迫下棉花根系内肽酶活性的影响（以血红蛋白为底物）

Fig. 2 Effects of exogenous GABA on peptidase activity in the roots of cotton under PEG stress(with hemoglobin as substrate)

新陆早7号 Xinluzao7

新陆早24号 Xinluzao24

50

40

30

叶片内肽酶活性

Leaf endopeptidase activity (△ 570 mg-1 protein h-1)

20

10

0

ck PEG PEG+GABA GABA

处理Treatment

图3 外源GABA对PEG胁迫下棉花叶片内肽酶活性的影响（以酪蛋白为底物）

Fig. 3 Effects of exogenous GABA on peptidase activity in the leaves of cotton under PEG stress(with casein as substrate)



新陆早7号 Xinluzao7

新陆早24号 Xinluzao24

80

60

根系内肽酶活性

Root endopeptidase activity (△ 570 mg-1 protein h-1)

40

20

0

ck PEG PEG+GABA GABA

处理Treatment

图4 外源GABA对PEG胁迫下棉花根系内肽酶活性的影响（以酪蛋白为底物）

Fig. 4 Effects of exogenous GABA on peptidase activity in the roots of cotton under PEG stress(with casein as substrate)

### 2.2 不同蛋白酶抑制剂和激活剂对棉花叶片和根系内肽酶活力的影响

由表1可以看出，酶的提取液与一定浓度的激活剂或抑制剂一起保温1h后，与对照相比DTT显著提高内肽酶的活力，而IA在以酪蛋白和血红蛋白为底物时对棉花叶片和根系内肽酶活力的抑制效果最显著的，都低于对照50%以下，PMSF在以酪蛋白和血红蛋白为底物时对棉花叶片和根系内肽酶活力的抑制效果次之，两种底物的内肽酶活力均低于对照40%以下，EDTA对棉花叶片和根系内肽酶活力的抑制效果最低，两种底物的内肽酶活力均低于对照10%左右。

表1 .不同蛋白酶抑制剂和激活剂对内肽酶活力的影响

Table 1. Effects of activation and inhibition on endopeptidases activity（△A570·mg - 1protein·h - 1）

| 抑制剂名称 Inhibitor | CK | IA | PMSF | DTT | EDTA |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 7 号根系以酪蛋白为底物酶活性(casein as substrate) | 21.61±1.45 | 9.99±1.78 | 12.43 ±1.06 | 32.94±2.07 | 18.63±1.07 |
| 7 号相 对活性 (%) enzyme  Relative activity |  | 46.22 | 57.54 | 152.45 | 86.22 |
| 24 号根系以酪蛋白为底物酶  活性(casein as substrate) | 23.01±1.60 | 10.54 ±1.08 | 12.93±1.59 | 35.76±2.31 | 20.40±1.09 |
| 24 号相对活性(%) enzyme  Relative activity |  | 45.80 | 56.19 | 155.47 | 88.67 |
| 7 号根系以血红蛋白底物酶  活性(hemoglobin as substrate) | 25.87 +1.51 | 11.80 ±1.92 | 14.43±1.92 | 39.95±2.61 | 23.24±2.08 |
| 7 号相 对活性 (%) enzyme relative activity |  | 45.61 | 55.78 | 154.39 | 89.81 |
| 24 号根系以血红蛋白底物酶  活性(hemoglobin as substrate) | 26.14 ±2.19 | 11.78±1.63 | 14.49±0.99 | 41.10±2.71 | 23.06±2.02 |
| 24 号相对活性(%) enzyme relative activity |  | 45.08 | 55.45 | 157.24 | 88.24 |
| 7 号叶片以酪蛋白为底物酶  活性(casein as substrate) | 15.70 ±1.59 | 7.51 ±0.74 | 9.18 ±1.43 | 24.47±1.81 | 14.40±0.85 |
| 7 号相 对活性 (%) enzyme  Relative activity |  | 47.87 | 58.50 | 155.89 | 91.72 |
| 24 号叶片以酪蛋白为底物酶  活性(casein as substrate) | 17.30 ±1.18 | 8.29±1.19 | 9.98 ±1.32 | 26.51±2.53 | 15.71 ±1.78 |
| 24 号相对活性(%) enzyme  Relative activity |  | 47.93 | 57.66 | 153.23 | 90.79 |
| 7 号叶片以血红蛋白底物酶  活性(hemoglobin as substrate) | 22.02±1.80 | 10.59 ±1.05 | 12.20 +1.33 | 34.01 +2.55 | 19.84 +1.38 |
| 7 号相 对活性 (%) enzyme relative activity |  | 48.09 | 55.40 | 154.50 | 90.12 |
| 24 号叶片以血红蛋白底物酶  活性(hemoglobin as substrate) | 22.89 ±1.87 | 10.91 ±1.31 | 12.46±0.89 | 35.60±1.63 | 20.67±1.80 |
| 24 号相对活性(%) enzyme relative activity |  | 47.68 | 54.43 | 155.56 | 90.30 |

注：表1的数据为：平均值± 标准偏差（Note: the data in Table 1: mean ±standard deviation）；7

号和24号分别表示“新陆早7号”和“新陆早24号”棉花品种。

## 3. 讨论

水分胁迫使多种植物的水解酶类活力增强，并因此损害植物正常代谢过程，导致植

物的衰败或死亡（覃凤云等，2004）。水分胁迫可诱发植物体内水分代谢失调，引起组织膜结构的破坏，导致蛋白质降解，加速叶片老化（曹慧等，2001）。Srivali等（1998）研究认为，水分胁迫能促进小麦老化，同时提高内肽酶和外肽酶的活性，从而导致一些蛋白质的水解。本试验发现，在PEG胁迫下2个品种的棉花叶片和根系内肽酶活性显著升高，其中新陆早24号上升的幅度大于新陆早7号。根系的内肽酶活性大于叶片。外源GABA有降低棉花叶片和根系内肽酶活性的作用，对干旱敏感的新陆早24号的降低效果更为明显，也表明了抗旱性强的新陆早7号维持生理代谢稳定的能力较干旱敏感

的新陆早24号强。

水分胁迫使棉花叶片的蛋白酶活性升高，而外源GABA处理，新陆早7号和新陆早24号在两种底物下的内肽酶活性下降，变化趋势也相似。其中耐旱的品种下降较慢，但GABA如何参与生物体内酶活性的调节，目前其作用机制还不太清楚。有可能是通过离子化作用参与酶的调节，但还得进一步试验研究证实。

目前普遍认为植物体蛋白质的降解先是由内肽酶的作用，将蛋白质水解成小肽，再由外肽酶起作用将小肽彻底水解成氨基酸，然后这些终产物被用于贮存或运输。根据内肽酶活性中心的催化机理分为巯基蛋白酶（thiolproteinases）、丝氨酸蛋白酶（serine

proteinases）、天冬氨酸蛋白酶（aspartic proteinases）、金属蛋白酶（metalloproteinases）以及类型未确定的蛋白酶（unclassified proteinases）。因此，和其它酶不同，鉴别蛋白酶的种类时，抑制剂的专一性效应比底物和pH等更为重要。试验结果表明，DTT（巯基蛋白酶的保护剂）可显著提高蛋白水解酶的活力，而IA（巯基蛋白酶的专一性抑制剂），

PMSF（丝氨酸蛋白酶的专一性抑制剂）和EDTA（金属蛋白酶的专一性抑制剂）使内肽酶活力比对照均有不同程度的降低，其中IA抑制内肽酶的活力最显著。由此看来，水分胁迫下棉花叶片和根系中至少存在3种内肽酶，即巯基蛋白酶、丝氨酸蛋白酶及金属蛋白酶，其中最活跃的是巯基蛋白酶。

通过以上分析，可以认为棉花叶片和根系在干旱胁迫下以丝氨酸内肽酶和巯基内肽酶为主，同时还存在有金属型内肽酶。另外，本实验是以酪蛋白和血红蛋白作为底物测得的结果，许多研究文献指出植物内肽酶活性测定最好是电泳纯化的Rubisco作为内肽酶作用的底物。在本试验中没有购买到电泳纯化的Rubisco，以后应予以补做，以便测定出更接近于植物体内状态下内肽酶活性。

# 第三章 棉花GABA代谢的主要酶GAD活性对不同调节物质的响应

γ-氨基丁酸（GABA）是一种普遍存在于植物体内的非蛋白氨基酸，植物响应各种胁迫如在热击和缺氧条件下积累（Shelp et al., 1999）。胁迫诱导快速的GABA植物中合成涉及激活谷氨酸脱羧酶（GAD）的Ca2+ /钙调素（CaM）的信号转导途径。GAD有4个结构域：1-57氨基酸残基的N端结构域对形成和稳定GAD的二聚和六聚体非常重要；58-347氨基酸残基组成大结构域，该结构域包含了辅因子结合位点和一个磷酸吡哆醛（pyridoxal 5′-phosphate, PLP）酶类特有的α/β折叠；小结构域由348-448氨基酸残基组成，其特征是4个反平行的β片层和3个α螺旋；最后是C端结构域，包含钙调素（calmodulin, CaM）结合结构域（CaM binding domain, CaMBD）和pH感应位点（Gut H et al., 2009）。GAD定位于细胞质中，可以不可逆地催化谷氨酸脱去羧基生成GABA和CO2，其活性受细胞环境pH和Ca2+ /CaM调节，在GAD碳末端有一个结构域可以感知细胞环境pH的变化或与CaM结合（Bouchéet al., 2009）。当细胞环境处于正常生理pH范围内时，GAD酶活性很低，但也足够维持细胞正常生长发育所需；当pH大于生理pH时，GAD酶活性主要靠CaM来调控，这时GAD可以与CaM紧密结合释放自动抑制结构域，从而激活其酶活性；当细胞环境为酸性（pH <6）条件下，

GAD碳端的CaMBD不能稳定地CaM结合，GAD酶活性主要依赖pH调节（Gut et al.，

2009）。因此，在植物细胞中，由pH和Ca2+ /CaM 协同调控GAD，使GABA 能有效地响应外界逆境胁迫，尤其是在非生物逆境胁迫条件下更是如此。

TFP（三氟拉嗪）和W7[N-(6-aminohexyl) -5-chloro-1-naphthalene sulfonamide]作为CaM拮抗剂，可导致Ca2+ - CaM信号功能发生障碍，利用TFP、W7和Ca2+处理阻碍或增强Ca2+ / CaM信号传导是目前研究植物Ca2+/ CaM信号功能的重要手段（陈贵林，贾开志，2005）。因此，在本章的一个方面是研究调控GAD的Ca2+与CaM及其相关抑制剂W7和TFP对棉花幼苗叶片和根系GABA含量和GAD活性变化的影响。

有关报道缺氧增加GABA水平的响应（Reggiani et al, 1988；Menegus et al, 1989）和H+ /L-Glu 同向运输（Chung et al, 1992；Snedden et al, 1992），认为在这两种情况下增加GABA水平可能会导致细胞内pH值降低。缺氧减少胞质pH值下降0.4到0.8 pH单位（Kurkdjian et al, 1989）。重要的是L-Glu脱羧酶最适pH值约为6.0（Tsushida et al, 1987；Snedden et al, 1992），其位于细胞质液（Satyanarayan et al，1985；Tsushida et al，

1987）。因此，细胞pH值从正常生理值被降低可以由刺激GAD活性，而提高提升GABA水平。这种机制可能是低pH值激活代谢产物如苹果酸和L -Glu脱羧而消耗H+的部分代谢（Guern et al, 1986; Mathieu et al, 1986; Reggiani et al, 1988; Menegus et al, 1989; Snedden et al, 1992）。而干旱胁迫下植物的pH值很难降低到6以下，与pH值的有机酸变化是否影响GAD活性。本章研究的第二个方面是先测定干旱胁迫下棉花幼苗叶片

和根系有机酸含量，确定其变化，再研究外施与TCA循环有关有机酸对棉花幼苗叶片和根系GABA含量和GAD活性变化的影响。

有越来越多的证据表明在植物中，GABA支路在主要的C/ N代谢中起到了的重要作用，根据最新的数据，甚至可能被认为是胁迫和非胁迫条件下的TCA循环的一个整体的组成部分。从以往的研究所知，TCA循环，碳、氮代谢和GABA之间有密切联系。干旱胁迫下与氮代谢相关的氨基酸含量发生了变化（第五章详述），这些变化可能涉及

GABA代谢及相关的主要酶GAD的变化，进而影响植物GABA代谢。因此，本章研究的第三个方面是外施有关对GAD 活性变化的氨基酸和铵离子对棉花幼苗叶片和根系

GABA含量和GAD活性变化的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料培养与处理

#### 1.1.1 土培试验

同第一章干旱胁迫处理，但没有做复水处理。

#### 1.1.2 水培试验

幼苗培养在1/2强度的Hoagland营养液中，用石英砂培的方式。石英砂装于20×15

×6cm具多孔的塑料盒方中，盒下方再套装一个30×20×15cm营养液的塑料方盒，构成一套幼苗砂培系统。萌发后的种子被播种在石英砂上，在28℃/20℃、光强为350μmol·m-2·s -1 的植物生长箱内培养15 d 后，幼苗被转移到不含或含不同浓度的Ca（NO3）

2、TFP、W7、谷氨酸、丙氨酸、甘氨酸、天门冬氨酸、丁酸、柠檬酸、草酸和苹果酸

营养液中再培养，同时调整营养液pH，使其保持在6.8左右。在培养过程中，每天用微型加氧泵给营养液通气两次每次5 h。处理分为：

CK，即1/2 Hoagland 营养液处理；

-1.0 MPa PEG＋1/2 Hoagland营养液；

-1.0 MPa PEG＋1/2 Hoagland营养液＋10 mM Ca(NO3) 2; 10 mM Ca(NO3) 2＋1/2 Hoagland营养液；

-1.0 MPa PEG＋100 mM TFP＋10 mMCa(NO3) 2＋1/2 Hoagland营养液；

-1.0 MPa PEG＋100 mMW7＋10 mMCa(NO3) 2＋1/2 Hoagland营养液；

（2）1/2 Hoagland分别加入5mM谷氨酸、5mM丙氨酸、5mM甘氨酸、5mM天门冬氨酸和5mM铵离子处理；

-1.0 MPa PEG＋1/2 Hoagland营养液＋5 mM谷氨酸；

-1.0 MPa PEG＋1/2 Hoagland营养液＋5 mM丙氨酸；

-1.0 MPa PEG＋1/2 Hoagland营养液＋5 mM甘氨酸；

-1.0 MPa PEG＋1/2 Hoagland营养液＋5 mM天门冬氨酸；

-1.0 MPa PEG＋1/2 Hoagland营养液＋5 mM铵离子处理；

（3）1/2 Hoagland营养液＋10 mM丁酸；1/2 Hoagland营养液＋10 mM柠檬酸；1/2 Hoagland营养液＋100 mM草酸；1/2 Hoagland营养液＋10 mM苹果酸；

-1.0 MPa PEG＋1/2 Hoagland营养液＋10 mM丁酸；

-1.0 MPa PEG＋1/2 Hoagland营养液＋10 mM柠檬酸；

-1.0 MPa PEG＋1/2 Hoagland营养液＋100 mM草酸；

-1.0 MPa PEG＋1/2 Hoagland营养液＋10 mM苹果酸；

5d 后采样供分析使用。

### 1.2 分析方法

#### 1.2.1 GABA含量和谷氨酸脱羧酶活性的测定

同第二章分析方法。

#### 1.2.2 有机酸含量分析

有机酸标准溶液：分别称取草酸0.005 g，酒石酸0.05 g，苹果酸0.15 g，乳酸0.2 g，

乙酸0.2 g，柠檬酸0.12 g，琥珀酸0.18 g，加到10 mL流动相中制成有机酸储备液，从其中取1 mL溶液用流动相定容到20 mL容量瓶中作为实验标准液。

液相色谱仪流动相：称取13.205 g磷酸氢二铵溶于超纯水中定容到100 mL，混合

均匀，配制成1.00 mol/L磷酸氢二铵储备液；将1.00 mol/L磷酸氢二铵储备液通过0.45

μｍ滤膜过滤后，用超纯水稀释至0.01 mol/L，并用1.0 mol/L磷酸调节pH至2.80得缓冲溶液，再与CH30H（色谱纯）配成97/3的流动相，混合均匀，超声除气。

高效液相色谱仪（Waters公司，510型泵，481型紫外可见光检测器，HW-2000色谱工作站）

## 2 结果与分析

### 2.1 棉花幼苗叶片和根系中的有机酸含量

表1表明，用高效液相色谱仪共检测出新陆早7号叶片和根系中的有机酸含量分别为草酸、苹果酸、乙酸、乳酸和柠檬酸。叶片和根系中草酸含量远远高于其他有机酸，其次为柠檬酸。因为草酸含量高，在相同浓度的标准样品条件下必须稀释5-10倍检测才准确，但其他有机酸检测误差变大，本实验只测定了草酸在干旱胁迫条件下的变化。

表1 棉花叶片和根系中的有机酸含量

Table 1 Organic acid content in leaves and roots of cotton

| 名称 | 草酸  oxalate | 苹果酸  malate | 乙酸  Acetic acid | 乳酸  Lactic acid | 柠檬酸  Citrate acid | 琥珀酸  Succinic acid |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 根系 root | 2.121 | 0.392 | 0.376 | 0.185 | 0.778 | 未检出 |
| 叶片 leaf | 4.000 | 0.631 | 0.511 | 0.294 | 1.066 | 未检出 |

### 2.2 干旱胁迫对棉花幼苗草酸含量的影响

图1表明，在干旱胁迫条件下新陆早7号和新陆早24号叶片的草酸含量都随着胁迫时间的延长而下降，其中新陆早7号在胁迫的2d、4d和5d草酸含量显著高于新陆早

24号。根系中新陆早7号在胁迫的2d草酸含量上升，3d下降，4d和5d又上升，新陆早24号的变化趋势则和其叶片相似。



A

B

叶片 Leaf

根系 Root

5 5

4 4

3 3

草酸含量

Oxalate content (%)

草酸含量

Oxalate content (%)

2 2

1 1

0

1 2 3 4 5

0

1 2 3 4 5

处理天数Treatment Days (d)

图1 PEG胁迫对棉花游离态草酸含量的影响

Fig. 1 Effect of osmotic stress on the oxalate content in cotton

### 2.3 不同有机酸对棉花叶片和根系GAD活性作用的效果

图2和图3表明在100mM草酸处理下，GAD活性是本处理组中最高的。新陆早7号和新陆早24号叶片GAD活性分别比对照上升37.99%和22.89%，根系GAD活性分别比对照上升56.13%和68.54%; 100 mM草酸再加-1.0 MPa PEG处理下，新陆早7号和新陆早24号叶片GAD活性分别比对照降低19.43%和25.18%，根系GAD活性分别比对照降低33.54%和34.25%；

10mM苹果酸的作用下，新陆早7号和新陆早24号叶片GAD活性分别比对照上升13.59%和3.33%，根系GAD活性分别比对照上升14.90%和20.37%; 10 mM苹果酸再加-1.0 MPa PEG处理下，新陆早7号和新陆早24号叶片GAD 活性分别比对照降低

25.39%和33.96%，根系GAD活性分别比对照降低48.40%和46.75%。

在10 mM柠檬酸作用下，新陆早7号和新陆早24号叶片GAD活性分别比对照上

升14.55%和8.73%，根系GAD活性分别比对照上升32.33%和25.24%; 10 mM柠檬酸再加-1.0 MPa PEG处理下，新陆早7号和新陆早24号叶片GAD 活性分别比对照降低

22.67%和27.75%，根系GAD活性分别比对照降低44.30%和42.66%。

在10 mM丁酸作用下，新陆早7号和新陆早24号叶片GAD活性分别比对照上升

3.06%和2.63%，根系GAD活性分别比对照上升6.29%和8.30%；10 mM丁酸再加-1.0 MPa PEG处理下，新陆早7号和新陆早24号叶片GAD活性分别比对照降低38.30%和42.81%，根系GAD活性分别比对照降低59.63%和61.36%。

新陆早7号 Xinluzao7

新陆早24号 Xinluzao24

40

30

叶片GAD活性

Leaf GAD activity (μmol mg-1 min-1 p)

20

10

0

Ck -1.0MPa Oxalate -1.0MPa+Oxalate Malate -1.0MPa+Malate Citrate -1.0MPa+Citrate Butyrate -1.0MPa+Butyrate

处理Treatment

图2 不同有机酸对棉花叶片GAD活性的影响

Fig. 2 Effects of different organic acids on the activity of GAD in cotton leaves



新陆早7号 Xinluzao7

新陆早24号 Xinluzao24

30

25

根系GAD活性

Root GAD activity (μmol mg-1 min-1 p)

20

15

10

5

0

Ck -1.0MPa Oxalate -1.0MPa+Oxalate Malate -1.0MPa+Malate Citrate -1.0MPa+Citrate Butyrate -1.0MPa+Butyrate

处理Treatment

图3 不同有机酸对棉花根系GAD活性的影响

Fig. 3 Effects of different organic acids on the activity of GAD in cotton roots

### 2.4 Ca2+和CaM抑制剂浓度对棉花叶片和根系GAD活性作用的效果

图4和图5不同浓度的钙试剂处理下，新陆早7号和新陆早24号叶片和根系的各处理GAD活性变化趋势相似，均在硝酸钙处理组活性高，W7处理和TFP处理组低。在-1.0 MPa PEG胁迫下，新陆早7号和新陆早24号叶片GAD活性分别比对照降低

38.91%和47.66%，根系GAD活性分别比对照降低59.51%和60.97%；

在10 mM Ca(NO3) 2处理下，2个品种的叶片和根系的GAD活性都达到本组处理的最高值，新陆早7号和新陆早24号叶片GAD活性分别比对照升高100.49%和77.51%，

根系GAD活性分别比对照升高72.84%和71.19%；

在-1.0 MPa PEG加10 mM Ca(NO3) 2；处理下，新陆早7号和新陆早24号叶片

GAD 活性比对照略有降低，分别降低了16.10%和26.40%，根系GAD 活性分别降低了

16.10%和26.40%; 5.80%和7.74%；

在100 mM TFP加10mM Ca(NO3) 2处理下，新陆早7号和新陆早24号叶片和根系GAD活性比100 mM W7加10mM Ca(NO3) 2处理稍高，叶片分别降低了56.29%和63.64%，根系分别降低了60.18%和60.38%；



新陆早7号 Xinluzao7

新陆早24号 Xinluzao24

60

50

叶片GAD活性

Leaf GAD activity (μmol mg-1 min-1 p)

40

30

20

10

0

Ck -1.0MPa Ca -1.0MPa+Ca -1.0MPa+Ca+W7 -1.0MPa+Ca+TFP

处理Treatment

图4 Ca2+和CaM 抑制剂对棉花叶片GAD活性的影响

Fig. 4 Effects of Ca2+and CaM inhibitors on the activity of GAD of cotton leaves



新陆早7号 Xinluzao7

新陆早24号 Xinluzao24

30

25

根系GAD活性

Root GAD activity (μmol mg-1 min-1 p)

20

15

10

5

0

Ck -1.0MPa Ca -1.0MPa+Ca -1.0MPa+Ca+W7 -1.0MPa+Ca+TFP

处理Treatment

图5 Ca2+和CaM 抑制剂对棉花根系GAD活性的影响

Fig. 5 Effects of Ca2+ and CaM inhibitors on the activity of GAD of cotton roots

### 2.5 不同浓度氨基酸和铵离子对棉花叶片和根系CAD活性作用的效果

图6 和图7表明在不同浓度的谷氨酸、天门冬氨酸、甘氨酸、丙氨酸和铵离子的作

用下，GAD表现出不同的活性。在10 mM谷酰酸作用下，新陆早7号和新陆早24号叶片GAD 活性分别比对照上升26.49 和13.78%，根系GAD 活性分别比对照上升

22.51%和28.19%; 10 mM谷氨酸再加-1.0 MPa PEG处理下，新陆早7号和新陆早24

号叶片GAD活性分别比对照降低15.09%和15.82%，根系GAD活性分别比对照降低

34.44%和38.58%。

在10 mM天门冬氨酸作用下，GAD活性比对照有所下降。新陆早7号和新陆早24

号叶片GAD活性分别比对照下降10.55%和13.34%，根系GAD活性分别比对照上升

7.87%和7.58%；10 mM天门冬氨酸加-1.0 MPa PEG处理下，新陆早7号和新陆早24

号叶片GAD活性分别比对照降低52.97%和62.02%，根系GAD活性分别比对照降低

48.21%和45.73%。

在10 mM甘氨酸作用下，新陆早7号和新陆早24号叶片GAD活性分别比对照下降15.89%和19.51%，根系GAD活性分别比对照上升14.66%和15.43%; 10 mM甘氨酸加-1.0 MPa PEG处理下，新陆早7号和新陆早24号叶片GAD 活性分别比对照降低

59.30%和62.02%，根系GAD活性分别比对照降低46.65%和48.12%。

在10 mM丙氨酸作用下，新陆早7号和新陆早24号叶片GAD活性分别比对照下降20.46%和24.21%，根系GAD活性分别比对照上升20.38%和20.54%; 10 mM丙氨酸加-1.0 MPa PEG处理下，新陆早7号和新陆早24号叶片GAD 活性分别比对照降低

60.10%和67.53%，根系GAD活性分别比对照降低48.80%和49.81%。

在10 mM铵离子作用下，GAD活性在本处理组最低，新陆早7号和新陆早24号叶片GAD 活性分别比对照下降32.53%和37.97%，根系GAD 活性分别比对照上升

36.88%和39.61%；在10 mM铵离子加-1.0 MPa PEG处理下，新陆早7号和新陆早24

号叶片GAD活性分别比对照降低72.84%和76.28%，根系GAD活性分别比对照降低

64.97%和67.79%。



新陆早7号 Xinluzao7

新陆早24号 Xinluzao24

35

30

叶片GAD活性

Leaf GAD activity (μmol mg-1 min-1 p)

25

20

15

10

5

0

Ck -1.0MPa Glu -1.0MPa+Glu Asp -1.0MPa+Asp Gly -1.0MPa+Gly Ala -1.0MPa+Ala NH+4 -1.0MPa+NH+4

处理Treatment

图6 不同氨基酸和铵离子对棉花叶片GAD活性的影响

Fig. 6 Effect of different amino acids and ammonium ions on GAD activity of cotton leaves



新陆早7号 Xinluzao7

新陆早24号 Xinluzao24

25

20

根系GAD活性

Root GAD activity (μmol mg-1 min-1 p)

15

10

5

0

Ck -1.0MPa Glu -1.0MPa+Glu Asp -1.0MPa+Asp Gly -1.0MPa+Gly Ala -1.0MPa+Ala NH+4 -1.0MPa+NH+4

处理Treatment

图7 不同氨基酸和铵离子对棉花根系GAD活性的影响

Fig. 7 Effect of different amino acids and ammonium ions on GAD activity of cotton roots

### 2.6 不同浓度有机酸对棉花叶片和根系GABA含量的影响

图8和图9表明在100 mM草酸处理下，新陆早7号和新陆早24号叶片GABA含量分别比对照上升53.24%和26.89%，根系GABA含量分别比对照上升23.33%和11.03%；100 mM草酸加-1.0 MPa PEG处理下，新陆早7号和新陆早24号叶片GABA含量分别比对照上升187.42%和140.07%，根系GABA含量分别比对照上升232.14%和189.95%。

10 mM苹果酸的作用下，新陆早7号和新陆早24号叶片GABA含量分别比对照上升 25.66%和17.22%，根系分别比对照上升13.40%和9.17%; 10 mM苹果酸加-1.0 MPa

PEG处理下，新陆早7号和新陆早24号叶片GABA含量分别比对照上升147.63%和113.07%，根系GABA含量分别比对照上升143.94%和110.14%。

。



新陆早7号 Xinluzao7

新陆早24号 Xinluzao24

35

30

25

叶片GABA含量

Leaf GABA content(μmol g-1FW)

20

15

10

5

0

Ck -1.0MPa Oxalate-1.0MPa+Oxalate Malate -1.0MPa+Malate Citrate -1.0MPa+Citrate Butyrate-1.0MPa+Butyrate

处理Treatment

图8 不同有机酸对棉花叶片GABA含量的影响

Fig. 8 Effects of different organic acids on GABA content of cotton leaves



新陆早7号 Xinluzao7

新陆早24号 Xinluzao24

25

20

根系GABA含量

Root GABA content(μmol g-1FW)

15

10

5

0

Ck -1.0MPa Oxalate-1.0MPa+Oxalate Malate -1.0MPa+Malate Citrate -1.0MPa+Citrate Butyrate-1.0MPa+Butyrate

处理Treatment

图9 不同有机酸对棉花根系GABA含量的影响

Fig. 9 Effects of different organic acids on GABA content of cotton roots

在10 mM柠檬酸作用下，新陆早7号和新陆早24号叶片GABA含量分别比对照上升27.86%和22.08%，根系分别比对照上升19.43%和10.35%; 10 mM柠檬酸加-1.0 MPa

PEG处理下，新陆早7号和新陆早24号叶片GABA含量分别比对照上升153.54%和126.97%，根系分别比对照上升169.73%和120.53%。

在10 mM丁酸作用下，新陆早7号和新陆早24号叶片GABA含量分别比对照上升

5.88%和1.45%，根系GABA含量分别比对照上升13.79%和9.43%; 10 mM丁酸加-1.0 MPa PEG处理下，新陆早7号和新陆早24号叶片GABA含量分别比对照上升37.76%和9.59%，根系GABA含量分别比对照上升64.99%和28.89%。

### 2.7 Ca2+和CaM抑制剂浓度对棉花叶片和根系GABA含量的影响

图10和图11表明不同浓度的钙试剂处理下，新陆早7号和新陆早24号叶片和根系的各处理GABA含量变化趋势相似，均在硝酸钙处理组活性高。在-1.0 MPa PEG胁迫下，新陆早7号和新陆早24号叶片GABA含量分别比对照降低240.68%和207.54%，新陆早7号和新陆早24号根系GABA含量分别比对照降低306.42%和215.68%；

在10 mM Ca(NO3) 2处理下，新陆早7号和新陆早24号叶片GABA含量分别比对照升高24.87%和28.93%，根系GABA含量分别比对照升高25.62%和32.80%；

在-1.0 MPa PEG加10mM Ca(NO3) 2；处理下，新陆早7号和新陆早24号叶片

GABA含量比对照略有降低，分别降低了38.30%和41.24%，根系GABA含量分别降低了62.98%和67.96%；

在100 mM TFP加10 mM Ca(NO3) 2处理下，叶片分别降低了33.71%和41.00%，根系分别降低了54.61%和65.19%；新陆早7号和新陆早24号叶片和根系GABA含量比100 mM W7加10 mM Ca(NO3) 2处理稍高。



新陆早7号 Xinluzao7

新陆早24号 Xinluzao24

40

30

叶片GABA含量

Leaf GABA content(μmol g-1FW)

20

10

0

Ck -1.0MPa Ca -1.0MPa+Ca -1.0MPa+Ca+W7 -1.0MPa+Ca+TFP

处理Treatment

图 10 Ca2+ 和CaM抑制剂对棉花叶片GABA含量的影响

Fig. 10 Effects of Ca2+ and CaM inhibitors on GABA content of cotton leaves



新陆早7号 Xinluzao7

新陆早24号 Xinluzao24

30

25

20

根系GABA含量

Root GABA content(μmol g-1FW)

15

10

5

0

Ck -1.0MPa Ca -1.0MPa+Ca -1.0MPa+Ca+W7 -1.0MPa+Ca+TFP

处理Treatment

图11 Ca2+和CaM 抑制剂对棉花根系GABA含量的影响

Fig. 11 Effects of Ca2+and CaM inhibitors on GABA content of cotton roots

### 2.8 不同浓度氨基酸和铵离子对棉花叶片和根系GABA含量的影响

图12和图13表明在不同浓度的谷氨酸、天门冬氨酸、甘氨酸、丙氨酸和铵离子的作用下，GABA含量与GAD活性一样，表现出不同含量。在10 mM谷酰酸作用下，新陆早7号和新陆早24号叶片GABA含量分别比对照上升34.40和11.82%，新陆早7号和新陆早24号根系GABA含量分别比对照上升23.22%和12.40%; 10 mM谷氨酸再加-1.0 MPa PEG处理下，新陆早7号和新陆早24号叶片GABA含量分别比对照降低

153.52%和118.27%，根系GABA含量分别比对照降低191.28和153.25%。

在10 mM天门冬氨酸作用下，GABA含量比对照有所下降。新陆早7号和新陆早

24号叶片GABA含量分别比对照下降6.85%和13.98%，新陆早7号和新陆早24号根系

GABA含量分别比对照下降3.29%和10.25%；10 mM天门冬氨酸加-1.0 MPa PEG处理下，新陆早7号和新陆早24号叶片GABA含量分别比对照降低100.86%和85.86%，根系GABA含量分别比对照降低126.68%和76.69%。

在10 mM甘氨酸作用下，新陆早7号和新陆早24号叶片GABA含量分别比对照下降1.15%和15.11%，新陆早7号和新陆早24号根系GABA含量分别比对照下降3.57%

和14.14%；10 mM甘氨酸加-1.0 MPa PEG处理下，新陆早7号和新陆早24号叶片GABA含量分别比对照降低76.65%和62.35%，根系GABA含量分别比对照降低90.84%和67.04%。

在10 mM丙氨酸作用下，新陆早7号和新陆早24号叶片GABA含量分别比对照下降3.89%和13.16%，新陆早7号和新陆早24号根系GABA含量分别比对照上升3.68%和10.71%；10 mM丙氨酸加-1.0 MPa PEG处理下，新陆早7号和新陆早24号叶片GABA含量分别比对照降低79.60%和52.11%，根系GABA 含量分别比对照降低21.71%和

30.54%。

在10 mM铵离子作用下，GABA含量在本处理组最低，新陆早7号和新陆早24号叶片GABA含量分别比对照下降39.24%和48.68%，新陆早7号和新陆早24号根系

GABA含量分别比对照上升27.17%和30.54%; 10 mM铵离子加-1.0 MPa PEG处理下，新陆早7号和新陆早24号叶片GABA含量分别比对照上升8.59%和17.14%，根系GABA含量分别比对照上升20.15%和18.84%。



新陆早7号 Xinluzao7

新陆早24号 Xinluzao24

30

25

20

叶片GABA含量

Leaf GABA content(μmol g-1FW)

15

10

5

0

Ck -1.0MPa Glu -1.0MPa+Glu Asp -1.0MPa+Asp Gly -1.0MPa+Gly Ala -1.0MPa+Ala NH+4-1.0MPa+NH+4

处理Treatment

图12 不同浓度氨基酸和铵离子对棉花叶片GABA含量的影响

Fig. 12 Effect of different amino acids and ammonium ions on GABA content of cotton leavs



新陆早7号 Xinluzao7

新陆早24号 Xinluzao24

20

15

根系GABA含量

Root GABA content(μmol g-1FW)

10

5

0

Ck -1.0MPa Glu -1.0MPa+Glu Asp -1.0MPa+Asp Gly -1.0MPa+Gly Ala -1.0MPa+Ala NH+4-1.0MPa+NH+4

处理Treatment

图13 不同浓度氨基酸和铵离子对棉花根系GABA含量的影响

Fig. 13 Effect of different amino acids and ammonium ions on GABA content of cotton roots

## 3 讨论

此前的研究表明，包括矮牵牛，烟草和拟南芥，都具有CaM结合域。许多相同的胁迫刺激植物GABA合成也导致细胞内Ca2+的变化（Knight et al, 1991）。Ca2+是植物信号转导中的一个重要的信使，涉及到各种不同的环境刺激中的生理反应（Muto, 1992; Pooviah et al., 1993）。Ca2+的发挥其调节性能，通过可逆地结合到特定的靶蛋白，其中之一是CaM. Ca2+结合后，CaM发生构象变化，促进其结合到不同的靶蛋白。因为它自己没有任何已知的酶的活性，是通过刺激这些蛋白质，CaM介导Ca2+对刺激做出反应。Ling等（1994）也认为蚕豆谷氨酸脱羧酶是CaM结合蛋白，然后又提出初步的证据，其活性在pH7，被Ca2+ / CaM 刺激。GAD在pH7活化是符合的细胞质的中性条件

（Felle, 1988b; Horn et al., 1992），然而，植物GAD活性显示对pH的急剧响应（Satya Narayan and Nair, 1985; Snedden et al., 1992），并已知环境刺激可能会导致酸中毒，即使在Ca2+/CaM的情况下，而增加GABA的合成。本试验发现在加Ca2+的条件下新陆早

7号和新陆24号叶片和根系GAD活性显著上升，在加入W7和TFP的条件下，2种棉花叶片和根系GAD活性被显著抑制，符合GAD活性受Ca2+/ CaM激活的实验结果。由于W7 [N - ( 6- am inohexy l) - 5- chloro- 1- naphthalenesulfonamide]作为一种较新的

CaM拮抗剂，可导致Ca2+/CaM信使系统功能发生障碍，与TFP (三氟拉嗪)等其它CaM

拮抗剂相比，W7不影响细胞膜的结构和流动性抑制效果更显著的原因。

在不同的Ca2+ 、W7和TFP的条件下，棉花叶片和根系的GABA含量变化趋势和

GAD活性变化趋势相似。有证据表明，细胞内Ca2+水平响应细胞内pH的变化（Felle，

1988a；Bush，1993），以及环境的刺激（Knight et al, 1991）。细胞胞质酸化迅速启动持续的GABA合成，GABA快速积累已被在大豆叶片响应于冷胁迫或机械胁迫条件下观察到（Wallace et al, 1984）。这种能力的快速和持续的GABA合成需要一种基于谷氨酸脱羧消耗H+代谢的pH条件，即GABA合成涉及到pH值调节（Reggiani et al, 1988; Menegus et al, 1989; Snedden et al, 1992）。丁酸处理（pH5.0）45秒后，GABA增加，在这一点上的GABA合成占酸负荷的45％，跨膜的过剩的胞外丁酸均衡大概是排除胞浆pH值恢复。

植物内环境的pH与体内所有可解离或具有可解离基团的溶质有关，是各种无机或有机带电离子平衡的结果。通过对体内各种游离离子的组成、含量及离子或电荷的平衡特点进行分析，就可能揭示出机体稳定自身pH的调节机制。我们测定了干旱胁迫下棉花幼苗叶片和根系有机酸的变化（数据没有显示），只显示了有机酸的组成情况，草酸、苹果酸和柠檬酸是棉花叶片和根系的主要有机酸，且草酸含量远高于苹果酸和柠檬酸。在外源有机酸使用的条件下，棉花叶片和根系的GAD活性都有不同程度的提高，效果顺序为草酸＞柠檬酸＞苹果酸＞丁酸。这说明不同种类有机酸对GAD活性刺激效果不同。草酸含量虽然最高，但对GAD活性刺激效果不如苹果酸和柠檬酸，这可能是草酸在植物体内一般是以区隔化的晶体形态或以草酸钙存在（田华等，2009）的原因。丁酸作为一种不参与TCA循环的有机弱酸，能够刺激棉花叶片和根系的GAD活性，证

明外源有机酸能够刺激棉花GAD活性。

GABA的合成响应于H+/ L-Glu浓度同向转运（Chung et al, 1992；Snedden et al, 1992），降低胞浆pH值刺激GAD活性（Reggiani et al, 1988；Menegus et al, 1989；Snedden et al, 1992）。进一步支持这一观点的是GAD的细胞内定位（Tsushida and Murai, 1987；Satyanarayan et al, 1990），该酶酶活性最适pH6.0（Tsushida et al, 1987；Snedden et al, 1992）。谷氨酸是GAD形成GABA的底物，谷氨酸含量的变化应该影响GAD活性。铵离子与谷氨酸结合形成谷酰胺，GAD催化形成GABA的反应方向向逆方向移动，

GAD活性则应该降低；天门冬氨酸、甘氨酸、丙氨酸都与GABA支路有关，它们含量的变化也应该影响GAD活性，进而影响GABA含量的变化。本试验中外源使用氨基酸和铵离子都改变了棉花叶片和根系的GAD活性。其中只有外源使用谷氨酸的处理显著增加了棉花叶片和根系的GAD活性。天门冬氨酸、甘氨酸、丙氨酸和铵离子则降低了棉花叶片和根系的GAD活性。铵离子降低了棉花叶片和根系的GAD活性的效果最显著，这可能也与铵离子含量的增加可使植物中毒有关。另外，在谷氨酸、天门冬氨酸、甘氨酸、丙氨酸和铵离子及其相应的PEG处理下，新陆早7号比新陆早24号的GAD活性高，相应的GABA 含量也高，说明抗旱强的品种能够在胁迫条件下形成较多的

GABA。

本试验表明营养液添加Ca2+可能改善了胞内Ca2+信号形成的条件，有助于通过一系列生理生化过程的改变来适应环境。营养液添加的有机酸影响了Ca2+ / CaM复合体的形成，钙信号向体内的传递，进而影响了GAD活性，影响了GABA形成。不同外源氨基酸的使用可能改变了形成GABA的反应方向，改变了GABA含量。

# 第四章 与多胺代谢相关的GABA代谢对干旱胁迫的响应

腐胺（Put）、亚精胺（Spd）、精胺（Spm）是植物中主要的多胺。多胺积累也响应逆境胁迫，包括干旱、氧化、盐和冷胁迫（Alcázar et al，2010；Mattoo et al，2010；Gill et

al，2010）。多胺以游离形式，共轭与酚酸类和核酸结合形式（即可溶形式）和蛋白质结合形式（即不溶性的形式）存在（Takahashi et al, 2009; Bagni et al, 2001）。多胺刺激

DNA复制，转录和翻译，稳定细胞膜，清除自由基，与植物色素和激素相互作用，对植物的生长发育产生了广泛的影响，抗环境胁迫，感染真菌和病毒等（Takahashi et al, 2009; Gill S S et al, 2010）。亚精胺和腐胺在多胺氧化酶（PAO）和二胺氧化酶（DAO）催化下，通过D1-吡咯啉中间产物可以形成GABA，反应的关键酶是二胺氧化酶DAO

（Wakte, 2011）。从提供的外源放射性标记的腐胺生成放射性标记GABA的直接证据，可以从根系完整的玉米（Ditomaso et al, 1992），补血草和苦荞麦（Duhaze et al, 2002），番茄果皮的花盘（Rastogi et al, 1989）研究得到。加入二胺氧化酶抑制剂氨基胍（AG）放射性标记抑制GABA的积累（Duhaze et al, 2002）。

研究表明，在缺氧条件下的发芽糙米（Komatsuzaki et al, 2007），盐胁迫下的大豆

（*Glycine max* L.）幼苗根系（Su et al, 2007）和蚕豆（*Vicia faba* L．）（陈惠等, 2012; Yang et al, 2013）显著增加DAO活性和GABA含量。但关于干旱胁迫条件下DAO的活性和GABA的积累的可用信息有限，对GABA积累的GABA支路和多胺降解途径的贡献率之间的关系研究较少。氨基胍（AG）是DAO的一个特异性抑制剂，它可以阻止多胺降解途径。当多胺降解途径被抑制，方便研究两个浓度GABA对形成方式的贡献率。

有关研究表明，棉花幼苗在干旱胁迫下叶片和根系中的可溶性蛋白质、游离氨基酸和蛋白酶活性都发生了变化（第五章详述），即GABA的形成前体物质含量发生了变化，那么GABA的形成也必然变化。因此，在这项研究中，我们调查棉花幼苗在干旱胁迫条件下，GABA支路和多胺降解途径对GABA的形成的贡献率，并比较两种代谢途径与干旱胁迫的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 幼苗Th长

幼苗在1/2强度的Hoagland营养液中，用石英砂培的方式培养。石英砂装于一20×15×6 cm具多孔的塑料盒方中，盒下方再套装一装有30×20×15 cm营养液的塑料方盒，构成一套幼苗砂培系统。萌发后的种子被播种在石英砂上，用不含PEG的营养液在28℃/20℃、光强为350μmol·m-2·s -1的植物生长箱内培养15 d后，幼苗被转移到不含或含PEG的营养液中再培养5 d，在培养过程中，每天用微型加氧泵给营养液通气两

次每次5 h，同时调整营养液pH，使其保持在6.8左右，每5d更换一次营养液。

### 1.2 幼苗胁迫处理

（1）用1/2 Hoagland营养液配置成约-0.5 MPa, -1.0 MPa和-1.5 MPa水势的胁迫溶液。

(2)用1/2 Hoagland营养液配置成1.0 mM AG, -0.5MPa PEG + 1.0 mM AG, -1.0 MPa PEG + 1.0 mM AG, -1.5MPa PEG + 1.0 mM AG 胁迫溶液。

将培养好的棉花幼苗分别放入其中，每天上午10时，给含1.0 mM AG培养液的棉花幼苗叶片喷一次1.0 mM AG，连续在相同时间段喷3次，处理的第四天上午10时采样，用液氮冷冻，保存于-80℃备用。

### 1.3 测定内容与方法

#### 1.3.1 腐胺（Put）、亚精胺（Spd）和精胺（Spm）含量的测定

##### 1.3.1.1 腐胺、亚精胺和精胺含量的提取

精确称量棉花幼苗的叶片2.0000g，加入3%盐酸溶液于4℃研磨成糊状，提取1小时，用该溶液定溶于10 mL。取该溶液2 mL加入1 mL 3% 三氯乙酸摇匀15000g离心

15 min，上清液用于上机分析。

##### 1.3.1.2 腐胺、亚精胺和精胺含量分析试剂

用柠檬酸钠（AR）、氯化钠（AR）、盐酸（GR）、苯酚（AR）、氢氧化钠（AR）和重蒸水，配制成pH9.20（每升洗脱缓冲液中含柠檬酸钠34 g，氯化钠70 g，苯酚1 g）的洗脱缓冲液，显色剂为自配pH5.20茚三酮溶液，0.2 mol·L-1 NaOH为再生液。GABA标准液：浓度均为1 mmol·L-1。

##### 1.3.1.3 腐胺、亚精胺和精胺含量分析的色谱条件与仪器

色谱柱：2.8×80 mm，柱温：65℃，缓冲液流速：10 mL / min，茚三酮溶液流速：5 mL / min，检测波长：570 nm，进样量：50 uL。

多胺分析仪器为Beckman 121 MB型氨基酸自动分析仪，分析图谱如下。

mV



21

14

33 .18 5' T yr

7

0

-7

22 .69 3' V al

-14

0.5 87 '

1.1 919.'5 16 '

30 .40 9' L eu

39 .72 2'

40 .94 6'

41 .65 7'

42 .16 3' L ys

42 .59 7'

43 .49 6'

44 .16 3' H is

48 .53 6'

49 .00 7' H is

-21

20 .10 9'

-28

2.5 19 '

33..24 5452 ''

44..14 2018 ''

55..03 1569 '' A s p

6.0 98 '

6.5 72 '

6.9 82 ' T h r

8.2 44 ' S e r

88..964887''

99..258259''

1100..046687'' G lu

12 .06 3'

1133..253865''

1144 ..0393 79''

-35

-42

-49

8 16 24 32 40 48 56 64 72 80 min

图1 Put、Spd和Spm混合标准样品分析图谱

Fig1 The chromatogram chart of Put, Spd and Spm mixed standard sample

注：色谱图中，从左到右的氨基酸峰顺序为Put、Spd和Spm

Note: in the chromatographic chart, from left to right amino acid peak is Put、Spd and Spm.

mV



35

28

21

33.502' Tyr

14

7

0

-7

23.204' Ala

-14

1.234'

47.800' Lys

-21

1188..713194''

19.422'

20.395'

21.101'

25.923' Cyr

2267..713538''

2288.4.07956'' Leu

28.953'

41.752'

4423.6.15216''

43.608'

44.352'

52.968'

54.390'

-28

5.198'

67..519131'' Asp

87..271733'' STehrr

98.2.85225''

9.595'

10.627' Glu

1111.4.97502'' Pro

11132.0.45901''

3.429'

161.65.2097'1' Gly

-35

8 16 24 32 40 48 56 64 72 80 min

图2 棉花叶片Put、Spd和Spm分析图谱

1.29.8475'8'

3.539'

3.830'

5.581'

Fig2 The chromatogram chart of Put, Spd and Spm of the cotton leaves

注：色谱图中，从左到右的氨基酸峰顺序为Put、Spd和Spm

Note: in the chromatographic chart, from left to right amino acid peak is Put、Spd and Spm.

#### 1.3.2 二胺氧化酶（DAO）活性测定

称取棉花叶片0.5000 g放在4℃研钵中，加入1.6 mL 0.1M磷酸钠缓冲（pH6.5）含有5%(w / v) PVP研磨成浆状，在10000 g，于4℃离心20 min。上清液被用来确定二胺氧化酶活性。反应液（3.0 mL）包含2.5 mL 0.1M磷酸钠缓冲（pH6.5），0.1 mL粗酶提取物，0.1 mL过氧化物酶（250 U mL-1）和0.2 mL 4−氨基吡啉/ N，N−二甲基苯胺。反应由添加0.1 mL 20 mM Put启动，以555 nm的0.01 A值变化为一个酶活性单位。

## 2 结果与分析

### 2.1 PEG胁迫对棉花游离态Put含量的影响

由图3和图4可知可知，经不同水势的PEG胁迫棉花叶片游离态腐胺量都显著高于对照植株。在-0.5 MPa PEG胁迫下，新陆早7号和新陆早24号叶片游离态腐胺含量

比对照提高了63.21%和34.89%，根系游离态腐胺含量比对照提高了47.03%和36.16%；在-1.0 MPa PEG胁迫下，新陆早7号和新陆早24号叶片游离态腐胺含量比对照提高了

104.99%和69.29%，根系游离态腐胺含量比对照提高了163.33%和188.26%；在-1.5 MPa

PEG胁迫下，叶片游离态腐胺含量达到最高，新陆早7号和新陆早24号比对照提高了

164.51%和123.15%。根系游离态腐胺含量也在此条件下达到最高，新陆早7号和新陆早24号比对照提高了395.48%和258.47%；



新陆早7号 Xinluzao7

新陆早24号 Xinluzao24

140

120

100

叶片Put含量

Leaf Put content (mmol g-1 FW)

80

60

40

20

0

CK -0.5MPa -1.0MPa -1.5MPa AG -0.5MPa+AG -1.0MPa+AG -1.5MPa+AG

处理Treatment

图3 PEG胁迫对棉花叶片游离态Put含量的影响

Fig. 3 Effect of osmotic stress on the free Put content in cotton leaves



新陆早7号 Xinluzao7

新陆早24号 Xinluzao24

70

60

50

根系Put含量

Root Put content (mmol g-1 FW)

40

30

20

10

0

CK -0.5MPa -1.0MPa -1.5MPa AG -0.5MPa+AG -1.0MPa+AG -1.5MPa+AG

处理Treatment

图4 PEG胁迫对棉花根系游离态put含量的影响

Fig. 4 Effect of osmotic stress on the free put content in cotton roots

在AG处理下，新陆早7号和新陆早24号叶片和根系游离态腐胺含量比对照均有上升；在-0.5 MPa PEG +1.0 mM AG处理下，新陆早7号和新陆早24号叶片游离态腐胺含量比对照提高了110.75%和78.53%，根系游离态腐胺含量比对照提高了70.16%和118.68%；在-1.0 MPa PEG +1.0 mM AG处理下，新陆早7号和新陆早24号叶片游离态腐胺含量比对照提高了228.32%和105.58%，根系游离态腐胺含量比对照提高了254.62%和307.26%；在-1.5 MPa PEG +1.0 mM AG处理下，新陆早7号和新陆早24号叶片游离态腐胺含量比对照提高了257.79%和181.21%，根系游离态腐胺含量比对照提高了

468.43%和336.73%。

### 2.2 PEG胁迫对棉花游离态Spd含量的影响



新陆早7号 Xinluzao7

新陆早24号 Xinluzao24

14

12

10

叶片Spd含量

Leaf SPM content (mmol g-1 FW)

8

6

4

2

0

CK -0.5MPa -1.0MPa -1.5MPa AG -0.5MPa+AG -1.0MPa+AG -1.5MPa+AG

处理Treatment

图5 PEG胁迫对棉花叶片游离态Spd含量的影响

Fig. 5 Effect of osmotic stress on the free Spd content in cotton leavs



新陆早7号 Xinluzao7

新陆早24号 Xinluzao24

10

8

根系Spd含量

Root Spd content (mmol g-1 FW)

6

4

2

0

CK -0.5MPa -1.0MPa -1.5MPa AG -0.5MPa+AG -1.0MPa+AG -1.5MPa+AG

处理Treatment

图6 PEG胁迫对棉花根系游离态Spd含量的影响

Fig. 6 Effect of osmotic stress on the free Spd content in cotton roots

由图5和图6可知，在-0.5MPaPEG胁迫下，新陆早7号和新陆早24号叶片游离态Spd含量比对照提高了26.03%和15.18%，根系游离态Spd含量比对照提高了22.50%和13.91%；在-1.0 MPa PEG胁迫下，新陆早7号和新陆早24号叶片游离态Spd含量比对照提高了111.98%和69.04%，根系游离态Spd含量比对照提高了75.94%和48.25%；在

-1.5 MPa PEG胁迫下，新陆早7号和新陆早24号叶片游离态Spd含量比对照提高了

134.24%和77.57%。根系游离态Spd含量在此条件下也达到最高，新陆早7号和新陆早

24号比对照提高了118.81%和140.02%。

在AG处理下，新陆早7号和新陆早24号叶片和根系游离态Spd含量比对照增加；在-0.5 MPa PEG +1.0 mM AG处理下，新陆早7号和新陆早24号叶片游离态Spd含量比对照提高了52.21%和35.31%，根系游离态Spd含量比对照提高了30.76%和20.67%；在-1.0 MPa PEG +1.0 mM AG处理下，新陆早7号和新陆早24号叶片游离态Spd含量比

对照提高了119.97%和76.74%，根系游离态Spd含量比对照提高了95.53%和66.38%；

-1.5 MPa PEG +1.0 mM AG处理下，新陆早7号和新陆早24号叶片游离态Spd含量比对照提高了154.36%和94.66%，根系游离态Spd含量比对照提高了131.03%和151.51%。

### 2.3 PEG胁迫对棉花游离态Spm含量的影响

由图7和图8可知，在-0.5MPa PEG胁迫下，新陆早7号和新陆早24号叶片游离态Spm含量比对照提高了28.14%和12.05%，根系游离态Spm含量比对照提高了32.52%和24.53%；在-1.0 MPa PEG胁迫下，新陆早7号和新陆早24号叶片游离态Spm含量比对照提高了72.34%和37.45%，根系游离态Spm含量比对照分别提高了65.32%和52.63%；在-1.5 MPa PEG胁迫下，新陆早7号和新陆早24号叶片Spm含量比对照分别提高了222.06%和107.62%，根系游离态Spm含量比对照提高了132.80%和116.66%。



新陆早7号 Xinluzao7

新陆早24号 Xinluzao24

35

30

25

叶片Spm含量

Leaf Spm content (mmol g-1 FW)

20

15

10

5

0

CK -0.5MPa -1.0MPa -1.5MPa AG -0.5MPa+AG -1.0MPa+AG -1.5MPa+AG

处理Treatment

图7 PEG胁迫对棉花叶片游离态Spm含量的影响

Fig. 7 Effect of osmotic stress on the free Spm content in cotton leaves



新陆早7号 Xinluzao7

新陆早24号 Xinluzao24

30

25

20

根系Spm含量

Root Spm content (mmol g-1 FW)

15

10

5

0

CK -0.5MPa -1.0MPa -1.5MPa AG -0.5MPa+AG -1.0MPa+AG -1.5MPa+AG

处理Treatment

图8 PEG胁迫对棉花根系游离态spm含量的影响

Fig. 8 Effect of osmotic stress on the free spm content in cotton roots

在AG处理下，新陆早7号和新陆早24号叶片和根系游离态Spm含量比对照均有提高；在-0.5 MPa PEG +1.0 mM AG处理下，新陆早7号和新陆早24号叶片游离态Spd含量比对照提高了41.86%和23.29%，根系游离态Spm 含量比对照提高了75.71%和

58.25%；在-1.0 MPa PEG +1.0 mM AG处理下，新陆早7号和新陆早24号叶片游离态

Spm含量比对照提高了83.13%和48.88%，根系游离态Spm含量比对照提高了79.56%

和82.86%; -1.5 MPa PEG +1.0 mM AG处理下，新陆早7号和新陆早24号叶片游离态

Spm含量比对照提高了236.94%和137.76%，根系游离态Spm含量比对照提高了144.19%

和89.30%

### 2.4 PEG胁迫对棉花DAO活性的影响

新陆早7号 Xinluzao7

新陆早24号 Xinluzao24

12

10

叶片DAO活性

Leaf DAO activity (U min-1 g-1 FW)

8

6

4

2

0

CK -0.5MPa -1.0MPa -1.5MPa AG -0.5MPa+AG -1.0MPa+AG -1.5MPa+AG

处理Treatment

图9 PEG胁迫对棉花叶片游离态DAO活性的影响

Fig. 9 Effect of osmotic stress on the DAO activity in cotton leaves



新陆早7号 Xinluzao7

新陆早24号 Xinluzao24

8

6

根系DAO活性

Root DAO activity (U min-1 g-1 FW)

4

2

0

CK -0.5MPa -1.0MPa -1.5MPa AG -0.5MPa+AG -1.0MPa+AG -1.5MPa+AG

处理Treatment

图10 PEG胁迫对棉花根系DAO活性的影响

Fig. 10 Effect of osmotic stress on the DAO activity in cotton roots

图9和图10显示，在-0.5MPa PEG胁迫下，新陆早7号和新陆早24号叶片DAO活性比对照提高了63.71%和35.11%，根系DAO活性比对照提高了45.86%和110.23%；在-1.0 MPa PEG胁迫下，新陆早7号和新陆早24号叶片DAO活性比对照提高了78.82%和41.53%，根系DAO活性比对照提高了37.28%和84.47%；在-1.5 MPa PEG胁迫下，新陆早7号和新陆早24号DAO活性比对照提高了28.79%和2.33%，根系DAO活性比对照提高了58.56%和2.17%。

在AG, -0.5 MPa PEG +1.0 mM AG, -1.0 MPa PEG +1.0 mM AG, -1.5 MPa PEG +1.0

mM AG处理下，新陆早7号和新陆早24号叶片和根系DAO活性很小，且差别不大。

### 2.5 PEG胁迫对棉花GABA含量的影响

由图11和图12可知，在-0.5MPa PEG胁迫下，新陆早7号和新陆早24号叶片GABA含量比对照提高了44.17%和60.76%。新陆早7号和新陆早24号根系GABA含量比对照提高了37.89%和39.73%；在-1.0 MPa PEG胁迫下，新陆早7号和新陆早24号叶片

GABA含量比对照提高了94.39%和98.58%，新陆早7号和新陆早24号根系GABA含量比对照提高了118.86%和115.03%；在-1.5 MPa PEG胁迫下，新陆早7号和新陆早24号叶片GABA含量比对照提高了251.88%和227.25%。新陆早7号和新陆早24号根系

GABA含量比对照提高了165.13%和139.08%。

在AG处理下，新陆早7号和新陆早24号叶片和根系GABA含量比对照有所降低；在-0.5 MPa PEG +1.0 mM AG处理下，新陆早7号和新陆早24号叶片GABA含量比对照降低了6.31%和0.79%，根系GABA含量比对照降低了1.05%和10.03%；在-1.0 MPa PEG +1.0 mM AG处理下，新陆早7号和新陆早24号叶片GABA含量比对照提高了

49.14%和48.89%，根系GABA含量比对照提高了37.62%和51.38%; -1.5 MPa PEG +1.0

mM AG处理下，新陆早7号和新陆早24号叶片GABA含量比对照提高了148.14%和120.37%，根系GABA含量比对照提高了129.73%和87.89%。



新陆早7号 Xinluzao7

新陆早24号 Xinluzao24

40

30

叶片GABA含量

Leaf GABA content(μmol g-1FW)

20

10

0

CK -0.5MPa -1.0MPa -1.5MPa AG -0.5MPa+AG -1.0MPa+AG -1.5MPa+AG

处理Treatment

图11 PEG胁迫对棉花叶片GABA含量的影响

Fig. 11 Effect of osmotic stress on the GABA content in cotton leavs



新陆早7号 Xinluzao7

新陆早24号 Xinluzao24

20

18

16

根系GABA含量

Root GABA content(μmol g-1FW)

14

12

10

8

6

4

2

0

CK -0.5MPa -1.0MPa -1.5MPa AG -0.5MPa+AG -1.0MPa+AG -1.5MPa+AG

处理Treatment

图12 PEG胁迫对棉花根系GABA含量的影响

## 3 讨论

Fig. 12 Effect of osmotic stress on the GABA content in cotton roots

在水分胁迫下叶片中多胺含量的变化与品种的抗旱性有密切联系。水分胁迫下多胺累积较早，且持续时间长、Spd和Spm相对含量较高是抗旱性水稻品种的重要生理特征。水分胁迫一方面对植物造成一定的伤害，另一方面又能诱发植物通过自身的反应来调节内部代谢平衡，以适应和抵御外界环境的胁迫，维持正常的生命活动。许多研究发现，水分胁迫时多胺水平升高，且多胺水平的改变与植物抗旱性关系密切。本研究发现，棉花叶片中多胺含量大于根系中多胺含量。在不同水势的PEG胁迫下，棉花叶片和根系中多胺的含量上升，其中Put随着PEG胁迫水势的降低上升的幅度最大，Spd次之，Spm最小。张志新等（2009）认为水分胁迫诱使合成的Put增多，而Put可转化为Spd，并进一步转化为Spm，致使Spm含量增加，三种多胺处于动态平衡中，共同缓解番茄受到的水分胁迫。

在棉花叶片和根系中Put、Spd、Spm的含量所占比例上，Put＞Spd＞Spm。这与张木清等（1994）发现甘蔗叶片受到水分胁迫时多胺合成增加，游离态Put增加幅度最大的结果相同，与周小梅等（2010）发现水分胁迫促进水稻幼苗叶片Put、Spd和Spm含量的上升的结果一致。在3种水势的PEG胁迫下，新陆早7号叶片Put、Spd和Spm含量较新陆早24号高，说明抗旱性较强的品种在水分胁迫下能够积累较多的多胺。在根系中，新陆早7号Put含量在-1.0 MPa PEG处理下小于新陆早24号，而在其他两种水势PEG处理下均高于新陆早24号，说明在中等水势的胁迫下新陆早24号也具有一定的抗旱性。由此可知，水分胁迫下棉花幼苗多胺代谢的变化是对胁迫的一种抵御和适应机制。这也与杨建昌等（2004）认为抗旱品种叶片中多胺累积开始较早、持续时间长，

Spd和Spm的相对含量较高的观点一致。

在AG和不同水势AG+PEG处理下，Put、Spd和Spm含量都较PEG处理下单独处理下低，这可能是AG对Put、Spd和Spm合成的酶活性在此处理下有一定的抑制作用所造成的。

不同水势PEG处理下，新陆早7号叶片的DAO活性高于新陆早24号，且以-1.0 MPa

PEG处理最高。根系的DAO活性也是以-1.0MPa PEG处理最高。而在-0.5 MPa PEG处理的新陆早7号根系DAO活性高于新陆早24号，其余2种PEG处理均以新陆早7号根系DAO活性高。这可能与叶片和根系中Put含量高有关，Put含量高时利于其向GABA转化。

在不同水势PEG处理下的棉花叶片和根系GABA含量变化趋势与Put含量变化趋势相似。AG是特异性DAO抑制剂，加入AG使DAO活性显著降低，导致产生GABA的含量显着减少。在为期4天的PEG胁迫下，DAO活性几乎完全被抑制。-1.0 MPa

PEG+AG处理与相应的-1.0 MPa PEG处理GABA含量对比得到，新陆早7号的叶片和根系分别降低了33.37%和37.12%，新陆早24 号的叶片和根系分别降低了30.33%和

39.93%。由此可以推断，此条件下的多胺降解途径可提供30%到40%GABA形成。这与Yang等（2011）研究盐胁迫条件下大豆幼苗多胺降解途径中占约39％的GABA的合成的结果基本一致。不同的是Yang等（2011）用了（100 mM）NaCl + AG 与对应的（100

mM）NaCl处理。

# 第五章 干旱胁迫下棉花氮代谢与GABA含量变化的关系

植物体内的氨基酸态氮是氮素的主要运输形式，是氮素吸收、同化和再分配的中心，氨基酸态氮含量在一定程度上代表了植物氮代谢的能力。植物体内几乎所有的氨基酸生物合成均以谷氨酸为氨基的供体，GABA的形成也不例外。谷氨酸的合成与NO3-还原和铵离子的同化有关。硝酸还原酶（NR）是植物氮素还原过程中的限速酶和调节的关键酶，对环境胁迫敏感（Surabhi et al, 2008）。GS的基因表达受到组织状况、碳水化合物、氨基酸供应和光呼吸的影响。碳代谢及其代谢物参与谷氨酸脱氢酶（GDH）的调节

（许振柱等，2004）。当GS/GOGAT 途径受到抑制、蛋白质合成降低或蛋白质降解加速时，谷氨酸生成GABA的速度就会加快，拟南芥也可以在仅有GABA做氮源的培养基上有效生长，说明GABA参与了氮的储存与运输，以及氮代谢的整个过程。本章对干旱胁迫下棉花叶片和根系中氮同化相关的酶谷氨酰胺合成酶（GS）、谷氨酸合成酶

（GOGAT）、GHD、NR等酶的活性及谷氨酸与其他氨基酸含量的变化，分析棉花GABA

含量变化与氮代谢关系及干旱胁迫的响应予以研究。

#### 第一节 干旱胁迫下棉花叶片氮代谢与**GABA**含量变化的关系

氮代谢是植物的基本生理过程之一，在植物抗旱胁迫中氮代谢相关酶起着重要作用

（Ramanjulu et al, 1997）。硝酸还原酶（NR）是调节氮代谢速度和同化限制的关键酶，对环境条件反应敏感（Kaiser et al, 1997）水分胁迫下，由于NR活性可能受到抑制，使得NO3-还原、NH4+同化受阻，导致生成了NH4+及中间产物α-酮戊二酸供应不足，从而降低了谷氨酰胺合成酶（GS）和谷氨酸合成酶（GOGAT）活性，致使铵积累，对植物产生毒害效应。研究表明，谷氨酸脱氢酶（GDH）具有双重功能，在植物处于逆境过程中，GDH可能对大量铵解除方面发挥着独特的生理作用，已经证实植物在水分胁迫下会引起GDH活性的变化（曹慧等，2009）干旱胁迫也导致水解酶活性增强，使大分子蛋白质降解，可溶性蛋白质含量发生变化，使植物积累了一系列含氮渗透调节物质，如氨基酸和酰胺等，这些小分子化合物累积可反映水分胁迫程度，是植物适应干旱、增强抗旱性的重要方式，对植物生长具有重要意义（张立新等，2007）。因此，改善干旱胁迫条件下的氮素代谢状况，对于提高作物的抗旱能力至关重要。

近年来，有关小麦（张慧娜等，2009）、大麦（Robredo et al, 2009）、水稻（孙圆圆等，2009）等禾本科作物不同基因型品种、不同环境胁迫条件下，植株体内NR、

GS、GOGAT、GDH等氮代谢酶活性、蛋白质含量变化的研究报道较多，对番茄（Eva et

al，2009）、马铃薯（Monreal et al, 2009）、甜菜（Debouba et al, 2009）和桑树（Surabhi et al, 2009）等双子叶植物中氮代谢酶活性及环境条件、栽培措施影响的研究亦有报道，但干旱胁迫对棉花氮代谢及其关键酶活性影响的研究报道较少。本试验选用北疆棉区主

栽的2个抗旱性不同的棉花品种，分析持续干旱胁迫及复水处理下棉花叶片氮代谢关键酶活性及氨基酸含量的变化，探讨不同基因型棉花品种对干旱响应的生理机制，为棉花节水高产栽培与抗旱品种的选育提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试验设计

对新疆北疆棉区不同年代推广的16个主栽品种采用苗期反复干旱法[12]筛选得到抗

旱性差异较大的“新陆早7号”（抗旱品种）和“新陆早24号”（不抗旱品种）作为供试棉花（*Gossypium* spp）品种。盆栽试验于2012年1月～5月在西北农林科技大学生命学院人工气候室进行。

试验塑料盆长、宽、高为50 cm×25 cm×15 cm，装土10 kg。取农田耕层垆土，

过筛，与干净河沙按3∶1（体积比）混匀。土壤养分为：全氮0.71 g/kg，碱解氮51.03 mg/kg，

速效磷22.61 mg/kg，速效钾161.59 mg/kg；土壤含水量24.3%. 按纯N 0.15 g/kg, P2O 5

0.10 g/kg, K2O 0.15 g/kg施硝酸钾和磷酸氢二铵作底肥。种子于沙土中萌发，出土3d后移栽于盆内，每盆定植14株，每天光暗时间14 h/10 h，光照强度750μmol·m-2·s -1，昼夜温度为28 ℃/ 20 ℃。

试验组设持续干旱-复水处理和正常灌水的对照。每个处理5盆，重复3次。待幼苗真叶完全展开后（生长30d 左右）进行干旱胁迫处理。处理时，对照组每天8: 00

和18: 00用称重法和美国PSΨPRO土壤水分仪测量土壤含水量以确定补水量使其达到土壤相对含水量80%左右，处理组停止供水进行持续干旱胁迫，并以对照组同样的方法测定土壤含水量，确定其干旱状态。处理的当天上午10: 00 取两片完全展开真叶作为实

验用样，每个处理取样量约46 g左右，每天在相同时间取样，连续取样5 d（经多次试验发现，5d抗旱性差品种的两片真叶萎蔫，子叶用手指轻动掉落），以液氮快速冷冻，

-80℃冰箱中保存。干旱处理5d采完样后复水，复水后24 h和48 h各取样1次，总共取样7次。

### 1.2 测定指标与方法

#### 1.2.1 叶片总氮含量测定

叶片总氮含量用凯氏定氮法测定（高俊凤等，2006）。叶片烘干后粉碎，用浓H2SO4-H2O2法进行消解，采用半微量凯氏定氮法测定样品的含氮量。可溶性蛋白质含量测定用考马斯亮蓝法（高俊凤等，2006）；硝酸还原酶（NR）活性活体法（高俊凤等，

2006），以每1 mg蛋白质在1 h内还原KNO3所形成的NO2-质量（μg）表示。

#### 1.2.2 叶片内肽酶活性测定

内肽酶活性测定参考邓志瑞报道的方法（邓志瑞等，2003）：每克鲜叶片加2 mL

pH8.0, 50 mmol/L Tris - HCI缓冲液（内含1 mmol / L EDTA, 2 mmol / L DTT, 0.1% PV P）和少量石英砂在研钵中于冰浴上研磨，在4℃、15000 g下离心20 min，弃沉淀，上清液定容到8 mL，此溶液用于内肽酶活性的测定。内肽酶测定体系组成如下：pH5.0，

200 mmol / L醋酸钠缓冲液0.4 mL，上述酶液0.4 mL，1%的酪蛋白0.2 mL. 混合物于

45℃下保温1 h，加入15% 三氯乙酸1 mL中止反应，对照则是在保温前加入三氯乙酸。

4℃下静止30 min，在4 ℃、15000 g下离心15 min. 取上清液0.2 mL加入2.8 mL 1%

的茚三酮，沸水浴煮15 min，冷却后用分光光度计测定570 nm光密度值，每1 mg蛋白质在1 h内的△A 570表示内肽酶活力的大小。

#### 1.2.3 叶片谷氨酰胺合成酶活性测定

谷氨酰胺合成酶（GS）测定参照中国科学院上海植物生理研究所和上海植物生理学会编写《现代植物生理学试验指南》和刘淑云报道的方法（刘淑云等，2007）。GS活性用每1mg蛋白质在1h催化形成γ-谷氨酰异羟肟酸（γ–glutamylhydroxamate GHA）物质的量（µmol）表示。

#### 1.2.4 叶片谷氨酸合成酶活性测定

谷氨酸合成酶（GOGAT）和谷氨酸脱氢酶（GDH）活性测定参考张金政报道的方法（张金政等，2007）：GOGAT活性以每毫克蛋白质在30℃、1 h催化NADH减少的物质的量（µmol）表示。GDH活性以每1mg蛋白质在30℃1 h氧化NADH的物质的量（µmol）表示。

#### 1.2.5 叶片氨基酸和铵离子含量测定

##### 1.2.5.1 叶片氨基酸和铵离子提取

氨基酸和铵离子提取同于第一章GABA提取。

用柠檬酸钠（AR）、氯化钠（AR）、盐酸（GR）、苯酚（AR）、氢氧化钠（AR）和重蒸水，配制成pH3.28、pH3.90和pH5.26的洗脱缓冲液，显色剂为自配pH5.20茚三酮溶液，0.2 mol·L-1 NaOH 为再生液。标准液：浓度均为1 mmol·L-1的进口Beckman氨基酸分析标准汇合液。

##### 1.2.5.2 氨基酸分析色谱条件与仪器

氨基酸分析色谱条件与仪器同于第一章。氨基酸分析色谱图如下。



注：色谱图中，从左到右的氨基酸峰顺序为：Asp、Thr、Ser、Glu、Pro、Gly、Ala、Cys、Val、Met、Ileu、Leu、Tyr、

Phe、Lys、His、NH4+、Arg.

Note: in the chromatogram chart, from left to right amino acid peak is Asp、Thr、Ser、Glu、Pro、Gly、Ala、Cys、Val、

Met、Ileu、Leu、Tyr、Phe、Lys、His、NH4 、Arg.

+

### 1.3 数据处理

用SPSS17.0软件处理数据，以Duncan's多重比较检验差异显著性，数据均以平均数±标准偏差表示，并以不同字母表示处理间的差异显著性水平（*P*＜0.05）。

## 2 结果与分析

### 2.1 干旱胁迫及复水对棉花幼苗叶片中内肽酶酶活性的影响

在正常供水条件和干旱胁迫2d，2个品种叶片中内肽酶活性变化不大（图1）。胁迫

3d和对照相比，2个棉花品种叶片内肽酶活性显著提高（*P*＜0.05）；胁迫4～5d，2个品种叶片内肽酶活性都快速增加，至5d时均达到最大值，此时，新陆早7号和新陆早

24号内肽酶活性分别比相应对照增加了115.76%和165.06%，差异显著（*P*＜0.05）。复水1d，新陆早7号较新陆早24号内肽酶活性下降显著（*P*＜0.05）；复水2d，2个品种内肽酶活性接近，但仍与对照差异显著。

A

B

干旱 Drought

对照 Control

60 60

50 50

叶片内肽酶活性

Leaf endopeptidase activity (△ 570 mgY Dpatraotein h )

-1

叶片内肽酶活性

Leaf endopeptidase activity (△ 570 mg-1 protein h-1)

40 40

-1

30 30

20 20

10

1 2 3 4 5 6 7

10

1 2 3 4 5 6 7

处理天数Treatment days (d)

图1 干旱胁迫对棉花叶片内肽酶活性的影响

Fig1 Effect of drought stress and re-watering on endopeptidase activity in leaves of cotton seedlings

注：A区表示新陆早7号的数据图，B区表示新陆早24号的数据图，下图同。

Note: Area A represents the data map of Xinluzao 7, Area B represents the data map of Xinluzao 24, with the following figure.

### 2.2 干旱胁迫及复水对棉花幼苗叶片总氮含量和可溶性蛋白含量的影响

由图2可知，在正常供水和胁迫2d时，2个品种叶片总氮含量变化不大；胁迫3～

4d，2个品种叶片总氮含量较相应对照显著上升（*P*＜0.05），但2个品种间差异不显著

（*P*＞0.05）；胁迫4～5d，2个品种叶片的总氮含量变化缓慢；至5d，2个品种叶片总氮含量达到最大值，此时新陆早7号和新陆早24号叶片总氮含量较相应对照分别高出

11.39%和8.43%；复水后，2个品种叶片总氮含量均呈下降趋势，但仍与对照差异显著

（*P*＜0.05）。

A

B

干旱 Drought

对照 Control

5.0 5.0

叶片总氮含量

Leaf total nitrogen content (g 100g-1DW)

4.8 4.8

叶片总氮含量

Leaf total nitrogen content (g 100g-1DW)

4.6 4.6

4.4 4.4

4.2

1 2 3 4 5 6 7

1 2 3 4 5 6 7

4.2

处理天数Treatment days (d)

图2 干旱胁迫及复水对棉花叶片总氮含量的影响

Fig2 Effect of drought stress and re-watering on total nitrogen content in leaves of cotton seedlings

可溶性蛋白是植物氮代谢的重要产物，是植物细胞质中的重要渗透调节物质之一

（谢志玉等，2010）。如图3所示，在干旱胁迫处理的前2d，2个品种叶片可溶性蛋白质含量与其对照相比差异不显著（*P*＞0.05）；胁迫3～5d，较对照显著增加（*P*＜0.05）；胁迫5d达到最大值，此时新陆早7号和新陆早24号叶片可溶性蛋白含量分别为21.99和19.60mg /g·FW。复水1d，新陆早7号可溶性蛋白质含量较新陆早24号下降显著（*P*＜

0.05），复水2d，2个品种之间差异不显著（*P*＞0.05），但仍高于其对照。

25 25

A

B

干旱 Drought

对照 Control

叶片可溶性蛋白质含量

Leaf soluble protein content (mg g-1FW)

叶片可溶性蛋白质含量

Leaf soluble protein content (mg g-1FW)

20 20

15 15

10 10

5

1 2 3 4 5 6 7

5

1 2 3 4 5 6 7

处理天数Treatment days (d)

图3 干旱胁迫对棉花叶片可溶性蛋白质含量的影响

Fig3 Effect of drought stress and re-watering on soluble protein content in leaves of cotton seedlings

### 2.3 干旱胁迫及复水对棉花幼苗叶片NR活性、GS活性、GOGAT活性和

GDH活性的影响

硝酸还原酶（NR）是硝态氮同化的限速酶，是植物氮代谢的关键酶，其活性强弱在一定程度上反映了蛋白质合成和氮代谢活性（张智猛等，2008）。如图4所示，在干旱胁迫2d，2个品种间NR活性差异不显著（*P*＞0.05）；从3d开始2个品种NR开始显著下降（*P*＜0.05），5d下降到最低值，其中新陆早7号和新陆早24号NR活性分别比对照降低51.67%和74.22%，差异显著（*P*＜0.05）。复水1d，新陆早7号较新陆早24号硝酸还原酶活性恢复快（*P*＜0.05）；复水2d，2个品种间差异不显著（*P*＞0.05），但均低于对照。

20 20

A

B

干旱 Drought

对照 Control

叶片NR活性

Leaf NR activity (μg NO2 h-1mg-1protein)

叶片NR活性

Leaf NR activity (μg NO2 h-1mg-1protein)

15 15

10 10

5 5

0

1 2 3 4 5 6 7

0

1 2 3 4 5 6 7

处理天数Treatment days (d)

图 4 干旱胁迫及复水对棉花叶片NR活性的影响

Fig4 Effect of drought stress and re-watering on NR activity in leaves of cotton seedlings

谷酰胺合成酶（GS）是处于氮代谢中心的多功能酶，参与多种氮代谢的调节，其活性的高低可以反映氮素同化能力的强弱（王月福等，2010）。由图5可知，干旱胁迫2d，

2个供试品种叶片GS活性较对照条件下略有上升；胁迫3～5d，GS活性显著下降；至

5d，新陆早7号和新陆早24号的GS活性降至最低值，分别为66.04和38.47μmol GHA

/ h·mg·protein，品种间差异显著（*P*＜0.05）；复水后2个品种叶片GS活性均上升，新陆早7号较新陆早24号的GS活性上升更快，2个品种间差异显著（*P*＜0.05）。

160 160

A

B

干旱 Drought

对照 Control

叶片GS活性

Leaf GS activity (μmolCHA h-1mg-1protein)

叶片GS活性

Leaf GS activity (μmolCHA h-1mg-1protein)

140 140

120 120

100 100

80 80

60 60

40 40

20 20

1 2 3 4 5 6 7 1 2 3 4 5 6 7

处理天数Treatment days (d)

图5 干旱胁迫及复水对棉花叶片GS 活性的影响

Fig5 Effect of drought stress and re-watering on GS activity in leaves of cotton seedlings

从图6可以看出，在干旱胁迫处理前3d，新陆早7号和新陆早24号叶片的GOGAT活性变化幅度较小，处理4d下降幅度较大，5d降到最大值，分别比相应对照降低43.12%和68.36%，品种间差异显著（*P*＜0.05）；复水后，新陆早7号较新陆早24号GOGAT活性上升快，品种间差异显著（*P*＜0.05）。

A

B

干旱 Drought

对照 Control

50 50

40 40

叶片GOGAT活性

Leaf GOGAT activity (μmolNADH h mg protein)

叶片GOGAT活性

Leaf GOGAT activity (μmolNADH h-1mg-1protein)

30 30

-1 -1

20 20

10 10

0

1 2 3 4 5 6 7

0

1 2 3 4 5 6 7

处理天数Treatment days (d)

图6 干旱胁迫及复水对棉花叶片GOGAT 活性的影响

Fig6 Effect of drought stress and re-watering on GOGAT activity in leaves of cotton seedlings

如图7所示，干旱胁迫2d时，2个品种叶片GDH活性较对照略有下降，但胁迫3d时，又显著上升（*P*＜0.05），胁迫4d，新陆早7号和新陆早24号叶片的GDH活性上升到最大值，分别为73.01和63.06μmol NADH / h·mg·protein，品种间差异达到显著水平（*P*＜0.05）；胁迫5d，2个品种的GDH活性显著下降（*P*＜0.05），且新陆早7号较新陆早24号下降幅度较小。复水后，2个品种GDH活性又较对照显著上升（*P*＜0.05）。

A

B

干旱 Drought

对照 Control

240 240

200 200

叶片GDH活性

Leaf GDH activity (μmolNADH h-1mg-1protein)

叶片GDH活性

Leaf GDH activity (μmolNADH h-1mg-1protein)

160 160

120 120

80 80

40

1 2 3 4 5 6 7

40

1 2 3 4 5 6 7

处理天数Treatment days (d)

图7 干旱胁迫及复水对棉花叶片GDH 活性的影响

Fig7 Effect of drought stress and re-watering on GDH activity in leaves of cotton seedlings

### 2.4 干旱胁迫及复水对棉花幼苗叶片中铵离子含量的影响

图8显示，2个棉花品种幼苗叶片铵离子含量在胁迫前2d变化较小，胁迫3～5d

铵离子含量显著增加（*P*＜0.05），至5d铵离子含量达到最高值，新陆早7号和新陆早

24号分别为6.70和7.32mg /100g·FW，差异显著（*P*＜0.05）；复水1d，新陆早7号叶片铵离子含量下降较新陆早24号显著（*P*＜0.05），复水2d，2个品种叶片的铵离子含量差异不显著，但均高于对照。

A

B

干旱 Drought

对照 Control

9 9

8 8

叶片铵离子浓度

Leaf NH4+ content (mg 100g-1FW)

叶片铵离子浓度

Leaf NH4+ content (mg 100g-1FW)

7 7

6 6

5 5

4 4

3 3

2

1 2 3 4 5 6 7

2

1 2 3 4 5 6 7

处理天数Treatment days (d)

图8 干旱胁迫对棉花叶片中铵离子浓度的影响

Fig8 Effect of drought stress and re-watering on NH4+ content in leaves of cotton seedlings

### 2.5 干旱胁迫及复水对棉花幼苗叶片中游离氨基酸含量的影响

游离氨基酸是植物体内氮素同化物的主要运输形式（张智猛等，2008）。表1显示，

2个品种棉花幼苗叶片游离氨基酸总量随土壤相对含水量的下降而增加，至胁迫5d时最高，复水2d，游离氨基酸总量显著降低；2个品种中，抗旱品种新陆早7号随胁迫时间的延长变化幅度较小，胁迫5d的总含量较抗旱性差品种新陆早24号高。干旱胁迫下，叶片脯氨酸（Pro）含量的变化趋势与总游离氨基酸变化相似，但较游离氨基酸变幅大，说明Pro含量对水分胁迫的响应较为敏感。

表1 干旱胁迫及复水条件对棉花幼苗叶片游离氨基酸含量的影响

Table 1 Effect of soil drought stress and re-watering on free amino acid contents in leaves of cotton seedlings （mg/100g·FW ）

| 氨基酸  Amino acid | 品种  genotype | 处理  Treatme- nt |  |  | 处理天数 treatment days | | |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 1d | 2d | 3d | 4d | 5d | 6d | 7d |
| 天冬氨酸Asp | 新陆早 7 号  Xinluzao 7 | CK | 11.97a | 11.91a | 11.31b | 11.75c | 11.29c | 10.91c | 11.60b |
| 干旱 drought | 11.80a | 12.07a | 18.22a | 37.17a | 52.43a | 27.53a | 15.06a |
| 新陆早 24 号  Xinluzao 24 | CK | 10.57a | 11.62a | 11.32b | 10.71c | 11.46c | 11.77c | 10.28b |
| 干旱 drought | 10.84a | 11.51a | 18.22a | 25.57b | 41.33b | 25.34b | 15.87a |
|  | 新陆早 7 号  Xinluzao 7 | CK | 2.29b | 2.32c | 2.35c | 2.29c | 2.28c | 2.31c | 2.26c |
| 苏  氨酸Thr |  |
| 干旱 drought | 2.32b | 2.46b | 3.03b | 4.47b | 8.34b | 3.18b | 2.54b |
| 新陆早 24 号  Xinluzao 24 | CK | 2.47ab | 2.55b | 2.59c | 2.51c | 2.48c | 2.49c | 2.55b |
| 干旱 drought | 2.57a | 2.89a | 4.51a | 5.79a | 10.75a | 4.62a | 4.12a |
|  | 新陆早 7 号  Xinluzao 7 | CK | 4.23b | 4.21c | 4.35c | 4.28c | 4.33c | 4.32c | 4.40c |
| 丝  氨酸Ser |  |
| 干旱 drought | 4.34b | 4.72b | 6.19b | 9.75b | 15.44b | 9.15b | 5.31b |
| 新陆早 24 号  Xinluzao 24 | CK | 4.68ab | 4.69b | 4.64c | 4.61c | 4.63c | 4.71c | 4.59c |
| 干旱 drought | 4.70a | 6.19a | 10.57a | 17.68a | 21.13a | 13.99a | 10.76a |
|  | 新陆早 7 号  Xinluzao 7 | CK | 18.54ab | 18.41c | 17.70c | 17.94c | 18.48d | 17.91d | 17.85c |
| 谷  氨酸Glu |  |
| 干旱 drought | 20.84b | 22.39bc | 26.51a | 32.57b | 51.96a | 40.10a | 32.36a |
| 新陆早 24 号  Xinluzao 24 | CK | 20.93a | 21.09b | 21.98b | 20.32b | 22.10c | 21.41c | 21.22b |
| 干旱 drought | 17.90a | 19.70a | 23.92b | 31.56a | 41.10b | 34.20b | 25.34b |
|  | 新陆早 7 号  Xinluzao 7 | CK | 3.15b | 3.21b | 3.18d | 3.24c | 3.23c | 3.28c | 3.24d |
| 脯  氨酸Pro |  |
| 干旱 drought | 3.21b | 3.59b | 9.24a | 24.72a | 54.42a | 28.74a | 9.11a |
| 新陆早 24 号  Xinluzao 24 | CK | 4.76a | 4.72a | 4.73c | 4.76c | 4.62c | 4.64c | 4.70c |
| 干旱 drought | 4.73a | 5.13a | 7.85b | 15.01b | 28.58b | 13.31b | 6.13b |
|  | 新陆早 7 号  Xinluzao 7 | CK | 1.71b | 1.73d | 1.77c | 1.68d | 1.74d | 1.71d | 1.72d |
| 甘  氨酸Gly |  |
| 干旱 drought | 1.78a | 1.96c | 2.20b | 3.72b | 5.59b | 2.96b | 2.61b |
| 新陆早 24 号  Xinluzao 24 | CK | 2.27b | 2.19b | 2.18b | 2.29c | 2.23c | 2.22c | 2.15c |
| 干旱 drought | 2.22a | 2.45a | 2.82a | 4.08a | 6.98a | 3.35a | 2.85a |
|  | 新陆早 7 号  Xinluzao 7 | CK | 9.16b | 9.37b | 9.29b | 9.32c | 9.26c | 9.21b | 9.22b |
| 丙  氨酸Ala |  |
| 干旱 | 9.25b | 9.35b | 10.47b | 11.66b | 14.69a | 13.25a | 11.96a |
| 新陆早 24 号  Xinluzao 24 | CK | 11.62a | 11.85a | 12.21a | 11.96b | 12.19b | 12.23a | 11.96a |
| 干旱 drought | 12.13a | 13.04a | 13.60a | 14.83a | 15.93a | 13.45b | 12.97c |
|  | 新陆早 7 号  Xinluzao 7 | CK | 1.25b | 1.26b | 1.21d | 1.21b | 1.25d | 1.20c | 1.24c |
| 胱  氨酸Cys |  |
| 干旱 drought | 1.24b | 1.33b | 1.41c | 1.55a | 1.87b | 1.68b | 1.61b |
| 新陆早 24 号  Xinluzao 24 | CK | 1.57a | 1.57a | 1.58b | 1.58a | 1.60c | 1.63b | 1.59b |
| 干旱 drought | 1.58a | 1.64a | 1.71a | 1.64a | 2.04a | 1.91a | 1.70a |
|  | 新陆早 7 号  Xinluzao 7 | CK | 2.04a | 2.06b | 2.04b | 1.99b | 1.95c | 2.02b | 2.03b |
| 缬  氨酸Val |  |
| 干旱 drought | 2.07a | 2.25a | 2.69a | 2.98a | 4.15a | 3.88a | 3.01a |
| 新陆早 24 号  Xinluzao 24 | CK | 1.63b | 1.68c | 1.65c | 1.64c | 1.60d | 1.56c | 1.64c |
| 干旱 drought | 1.62b | 1.64c | 1.71c | 1.87b | 2.52b | 2.21b | 1.97b |

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  | 新陆早 7 号  Xinluzao 7 | CK | 1.90b | 2.00c | 1.90c | 1.91d | 1.95d | 1.90c | 1.89d |
| 蛋  氨酸Met |  |
| 干旱 drought | 1.92b | 2.18cb | 2.41b | 2.76b | 3.94a | 2.92a | 2.58b |
| 新陆早 24 号  Xinluzao 24 | CK | 2.30a | 2.33b | 2.30b | 2.34c | 2.34c | 2.36b | 2.32c |
| 干旱 drought | 2.39a | 2.61a | 2.72a | 2.90a | 3.12b | 3.04a | 2.83a |
| 异亮氨酸Ileu | 新陆早 7 号  Xinluzao 7 | CK | 2.65a | 2.55c | 2.64c | 2.62b | 2.60b | 2.60c | 2.59c |
| 干旱 drought | 2.60a | 2.77b | 2.92b | 4.96a | 9.37a | 5.61a | 3.46b |
| 新陆早 24 号  Xinluzao 24 | CK | 2.54a | 2.58bc | 2.49d | 2.47b | 2.49b | 2.54c | 2.56c |
| 干旱 drought | 2.57a | 3.42a | 3.72a | 4.60a | 8.46a | 4.51b | 3.97a |
|  | 新陆早 7 号  Xinluzao 7 | CKCK | 1.40b | 1.42b | 1.36d | 1.40c | 1.41c | 1.39c | 1.42c |
| 亮  氨酸Leu |  |
| 干旱 drought | 1.42b | 1.46b | 1.49c | 2.35b | 3.73b | 2.79a | 2.30a |
| 新陆早 24 号  Xinluzao 24 | CK | 1.66a | 1.67b | 1.69b | 1.62c | 1.58c | 1.64c | 1.66b |
| 干旱 drought | 1.69a | 2.19a | 2.37a | 2.88a | 4.17a | 2.44b | 2.33a |
|  | 新陆早 7 号  Xinluzao 7 | CK | 1.06b | 1.11b | 1.01c | 1.07c | 1.12d | 1.01d | 1.07c |
| 酪  氨酸Tyr |  |
| 干旱 drought | 1.07b | 1.19b | 1.42b | 1.77b | 2.39b | 1.93b | 1.52a |
| 新陆早 24 号  Xinluzao 24 | CK | 1.19a | 1.23b | 1.26b | 1.21c | 1.26c | 1.24c | 1.22c |
| 干旱 drought | 1.24a | 1.57a | 2.39a | 2.65a | 3.04a | 2.61a | 2.48a |
| 苯丙氨酸Phe | 新陆早 7 号  Xinluzao 7 | CK | 1.03ab | 0.99c | 1.00b | 1.00c | 1.00c | 0.96c | 0.90d |
| 干旱 drought | 0.98b | 1.03c | 1.12b | 1.56b | 2.12b | 1.89a | 1.49b |
| 新陆早 24 号  Xinluzao 24 | CK | 1.14a | 1.20b | 1.19b | 1.16c | 1.10c | 1.15b | 1.15c |
| 干旱 drought | 1.18a | 1.62a | 1.81a | 1.99a | 2.46a | 1.92a | 1.81a |
|  | 新陆早 7 号  Xinluzao 7 | CK | 1.74a | 1.76b | 1.72b | 1.69c | 1.71c | 1.69c | 1.38b |
| 赖  氨酸Lys |  |
| 干旱 drought | 1.72a | 2.06a | 2.44a | 2.73b | 3.06b | 2.56a | 2.28a |
| 新陆早 24 号  Xinluzao 24 | CK | 1.81a | 1.82b | 1.87b | 1.83c | 1.81c | 1.78c | 1.80ab |
| 干旱 drought | 1.83b | 2.18a | 2.49a | 3.04a | 3.27a | 2.26b | 2.04a |
|  | 新陆早 7 号  Xinluzao 7 | CK | 2.08a | 2.15b | 2.17b | 2.07b | 2.09c | 2.05c | 2.10c |
| 组  氨酸His |  |
| 干旱 drought | 2.17a | 2.55a | 3.15a | 5.01a | 8.85a | 5.77a | 4.00a |
| 新陆早 24 号  Xinluzao 24 | CK | 1.63b | 1.64c | 1.63c | 1.61c | 1.59d | 1.60d | 1.60d |
| 干旱 drought | 1.64b | 1.76c | 1.88c | 2.04b | 3.65b | 2.74b | 2.48b |
|  | 新陆早 7 号  Xinluzao 7 | CK | 2.14a | 2.09b | 2.17b | 2.19c | 2.11b | 2.01c | 2.12d |
| 精  氨酸Arg |  |
| 干旱 drought | 2.20a | 2.32b | 2.77a | 3.54a | 4.29a | 3.84a | 3.22a |
| 新陆早 24 号  Xinluzao 24 | CK | 2.31a | 2.28a | 2.31b | 2.31c | 2.34b | 2.27c | 2.30c |
| 干旱 drought | 2.32a | 2.89a | 2.96a | 3.23b | 4.23a | 3.17b | 2.86b |
|  | 新陆早 7 号  Xinluzao 7 | CK | 68.37b | 68.58c | 67.19d | 67.69d | 67.80d | 66.46d | 66.99d |
| 总量  total | 干旱 drought | 70.95a | 75.68bc | 97.69b | 153.2a | 246.66a | 157.77a | 104.40b |
| 新陆早 24 号  Xinluzao 24 | CK | 71.73a | 73.04b | 72.96c | 71.56c | 72.71c | 73.22c | 71.68c |
|  | 干旱 drought | 73.15a | 81.37a | 111.07a | 141.36b | 205.51b | 135.08b | 102.52a |

如表2所示，在2个品种棉花叶片所含17种游离氨基酸中，酸性氨基酸天门冬氨酸、丝氨酸、谷氨酸和脯氨酸含量占氨基酸总量的比例随胁迫时间的延长增加较大，约占总量的70%以上，抗旱品种增加更显著；在中性氨基酸中，缬氨酸和异亮氨酸含量随干旱胁迫的持续提高了2倍多；新陆早7号中苯丙氨酸约和酪氨酸显著低于新陆早24号；其他其氨基酸含量随处理时间持续发生了较小幅度的相应变化。

### 2.6 干旱胁迫及复水棉花幼苗叶片中游离氨基酸含量与GABA含量变化的

相关性分析

表2 新陆早7号棉花叶片GABA含量与土壤含水量、铵离子浓度、游离氨基酸总量、Glu和Pro

含量相关性分析

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 土壤含水量  Soil water content | GAGB 含量  GAGB content | 铵离子浓度  +  NH4 content | Glu 含量  Glu content | Pro 含量  Pro content |
| GAGB 含量  GAGB content | -0.681\* |  |  |  |  |
| 铵离子浓度  NH + content  4 | -0.730\* | 0.981\*\* |  |  |  |
| Glu 含量  Glu content | -0.854\*\* | 0.943\*\* | 0.945\*\* |  |  |
| Pro 含量  Pro content | -0.591 | 0.987\*\* | 0.963\*\* | 0.887\*\* |  |
| AA 总量  AA content | -0.691\* | 0.997\*\* | 0.989\*\* | 0.943\*\* | 0.985\*\* |

Table 2 Analysis of the concentration of soil water, ammonium ion, total free amino acid, Glu and Pro correlation with GABA content in Xinluzao7 cotton leaves

由表2可知，新陆早7号棉花叶片GAGB含量、铵离子浓度、Glu含量和Pro含量四个指标之间均呈极显著正相关性，并与AA总量亦表现出极显著正相关性；土壤含水量除与Pro含量无显著性外，与AA含量、铵离子浓度、GAGB含量和Glu含量呈显著性和极显著性负相关。

表3 新陆早24号棉花叶片GABA含量与土壤含水量、铵离子浓度、游离氨基酸总量、Glu 和

Pro含量相关性分析

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 土壤含水量  Soil water content | GAGB 含量  GAGB content | 铵离子浓度  +  NH4 content | Glu 含量  Glu content | Pro 含量  Pro content |
| GAGB 含量  GAGB content | -0.726\* |  |  |  |  |
| 铵离子浓度  NH4+ content | -0.553 | 0.719\* |  |  |  |
| Glu 含量  Glu content | -0.926\*\* | 0.786\* | 0.747\* |  |  |
| Pro 含量  Pro content | -0.549 | 0.817\* | 0.964\*\* | 0.722\* |  |
| AA 总量  AA content | -0.713\* | 0.971\*\* | 0.961\*\* | 0.859\*\* | 0.971\*\* |

Table 3 Analysis of the concentration of soil water, ammonium ion, total free amino acid, Glu and Pro correlation with GABA content in Xinluzao24cotton leaves

由表3可知，新陆早24号棉花叶片GAGB含量、铵离子浓度、Glu含量和Pro含量四个指标之间除铵离子浓度与Pro含量呈极显著正相关性，两两之间均呈显著正相关性，并与AA总量亦表现出极显著正相关性；土壤含水量与Pro含量、铵离子浓度均无

显著性差异，与AA含量、GAGB含量和Glu含量呈显著性和极显著性负相关。

## 3 讨论

叶片是植物氮同化的主要部位（王志强等，2009）；不同形态氮素在器官间的含量与比例可反映作物氮素营养状况和生理功能的强弱（许振柱等，2007）。本研究中，2个棉花品种幼苗叶片中总氮含量均随水分胁迫天数的延长稍有增加，且抗旱品种新陆早

7号含量高于不抗旱品种新陆早24号。这可能是干旱胁迫条件下抗旱品种叶片的氮素积累较多，或者是氮素重新分配到其他部位的比例较小引起的（许振柱等，2007）。可溶性蛋白具有较强的亲水胶体性质，影响着细胞的保水力，植物通过可溶性蛋白的主动积累来降低渗透势，进行渗透调节（桑子阳等，2011）。本试验中，新陆早7号叶片可溶

性蛋白含量变化大于新陆早24号，可能是干旱胁迫时，抗旱品种通过提高叶片内可溶性蛋白含量来减少体内水分散失，以适应胁迫条件的变化。

水分胁迫下水解酶类活性增强，促使蛋白质降解（刘子凡，2007），叶片中蛋白质降解主要由内肽酶起作用（张鹏等，2011）。本试验表明，在干旱胁迫下，抗旱品种叶片的内肽酶活性较低，蛋白质降解幅度较小，复水后代谢的恢复较快。叶片内的NH4+源于NR还原NO3－生成NH4+，及通过光呼吸产生大量的NH4+；NH4+必须尽快被同化为有机氮，以解除其毒害；NH4+同化通过GS/GOGAT循环和GDH途径来实现。本试验条件下，抗旱品种在胁迫期间NR、GS和GOGAT活性下降慢于抗旱性差品种，复水后抗旱品种活性上升较快；抗旱品种GDH活性在胁迫的3～4d快速上升，5d时活性下降，但下降幅度小于不抗旱品种，复水后活性高于不抗旱品种。张慧娜等（2009）认为低盐胁迫下，GS/GOGAT循环可能充当氨同化的主要途径来维持谷氨酸含量。在高盐胁迫下，当GS活性明显降低时，GDH途径对增加的铵起重要的补充同化作用，但由于GDH同化铵离子的能力有限，所以铵离子含量显著增加，铵离子含量增加可能是高盐伤害的原因之一。

植物体内的氨基酸态氮是氮素运输的主要形式，其含量高低在一定程度上代表了植物的氮代谢能力（张玉宵等，2010），在环境胁迫影响植物代谢过程中，氨基酸和其他水溶性化合物起着非常重要的作用（路兴花等，2009）。本试验表明，抗旱品种棉花幼苗叶片的总游离氨基酸含量在胁迫4～5d较不抗旱品种增加显著，复水后随之下降明显；其酸性氨基酸（天冬氨酸、丝氨酸、谷氨酸和脯氨酸）总量占游离氨基酸总量的比例高于不抗旱品种，随处理时间延长酸性氨基酸含量变化幅度大。这些氨基酸可作为胁迫条件下植物储存物质和能量的一种方式，防止造成过多的损害性消耗并缓解分解产物引起的毒害；另一方面，这些物质浓度的迅速增加，可以起到渗透调节和维持植物水势的效用（沈黎明，1996）。谷氨酸可用于其他氨基酸的合成，在含氮化合物的转化中起着关键作用。本试验中胁迫3～5d的抗旱品种谷氨酸含量高于不抗旱品种，这可能是植物中谷氨酸一方面自身起渗透调节作用，另一方面作为前体进一步转化为脯氨酸（沈黎明，

1996）。干旱胁迫诱导脯氨酸的积累主要是通过增强谷氨酸途径合成（王英等，2010）。在本试验中，2个棉花品种叶片的脯氨酸含量均随着干旱胁迫程度的进行而显著增加，抗旱品种增加更快。这可能是脯氨酸积累的生理效应在于维持光合作用、渗透调节以及防止蛋白质和酶的降解。也可作为胁迫恢复过程中的快速有效的氮源、碳源及还原剂，降低细胞质的水势，维持胞质的水分状况，最大限度地降低了逆境对植物细胞的伤害（周静等，2010）。

甘氨酸、丝氨酸和丙氨酸含量可以有效地反映植物光呼吸作用的强弱（王志强等，

2009）。在本试验中，2个棉花品种叶片甘氨酸、丝氨酸和丙氨酸含量随着干旱胁迫程度的加大而显著增加，特别是不抗旱品种丝氨酸含量占游离氨基酸总量的比例较高，说明抗旱性差品种的光呼吸作用较强。精氨酸除参与氮素循环外，还是生成信使分子一氧化氮和多胺等的前体，可以通过向多胺和一氧化氮的转化而感知和识别外界条件的变化

（张海娜等，2011）。此外，属于多胺类的二胺（腐胺）来源于精氨酸，有促进细胞分裂的功能。本研究中，抗旱品种叶片中较高含量的精氨酸为二胺的合成提供了物质基础，有利于复水后的生长。

本研究发现，在干旱胁迫下，新陆早7号棉花叶片GAGB含量与铵离子浓度、Glu含量和Pro含量四个指标之间均呈极显著正相关性，并与AA总量亦表现出极显著正相关性；新陆早24号叶片GAGB含量与叶片铵离子浓度、Glu含量和Pro含量四个指标之间除铵离子浓度与Pro 含量呈极显著正相关性，两两之间均呈显著正相关性，并与

AA总量亦表现出极显著正相关性。这说明棉花抗旱性与叶片GAGB含量密贴相关。作物对干旱胁迫及复水的响应是一个十分复杂的过程（刘瑞显等，2008）。本研究

进一步阐明干旱对作物生长有滞后作用，复水后的生长表现是滞后事件的恢复或补偿，而且在一周左右才能显著观察出来水分胁迫解除后作物形态和生长速率的变化。由于本试验工作量较大，测定项目和数据多，对复水恢复测定的时间短，对本研究结果的验证还需补充。

总之，持续干旱胁迫及复水环境改变了棉花幼苗的氮代谢途径，使棉花幼苗叶片中

NR、GS、GOGAT、GDH、内肽酶活性，以及总氮、可溶性蛋白和氨基酸含量发生了改变。抗旱品种棉花具有较强同化铵离子能力，增加渗透调节物质游离氨基酸含量，特别是脯氨酸含量提高其耐旱性。研究表明，可通过增强棉花幼苗的NR、GS、GOGAT、

GDH酶活性来减轻干旱胁迫对氮代谢的影响，以缓解干旱对所造成的伤害。

#### 第二节 干旱胁迫下棉花幼苗根系氮代谢与**GABA**含量变化的关系

根系最早最直接地感受到土壤水分含量的变化，从而对干旱胁迫做出快速反应（徐兴友等，2003），且植物地上部分氮素主要来源于根部的吸收，根系的生长状况是影响地上部氮素含量和代谢的重要因素（陈晓飞等，2008）。因此，改善干旱胁迫条件下的氮素代谢状况，对于提高作物的抗旱能力至关重要。棉花根系与土壤水分之间关系密切，棉株根系生长状况及其生理活性高低直接影响地上部的生长发育（董志强等，2005）。因此，开展棉花不同品种持续干旱胁迫及胁迫解除后幼苗根系氮代谢变化的研究，对耐旱品种的筛选及水肥调控等具有重要意义。本研究选用北疆棉区耐旱性不同的棉花品种为试材，研究棉花幼苗根系在持续干旱胁迫与复水条件下氮代谢方面的动态差异，探讨耐旱性不同的基因型棉花品种根系可溶性蛋白质、总氮、铵离子、游离氨基酸含量及氮代谢过程中关键酶活性的变化，揭示持续干旱胁迫及复水条件对不同棉花品种幼苗根系氮代谢的影响，旨在为棉花耐旱品种筛选及田间栽培水肥调控措施的制定提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试验设计

同第一章。

### 1.2 分析方法

分析项目与方法同第五章第一节。

### 1.3 数据处理

同第五章第一节。

## 2 结果与分析

### 2.1 干旱胁迫及复水对棉花幼苗根系中内肽酶活性的影响

在干旱胁迫2 d，2个供试品种幼苗根系内肽酶活性变化不大（图1）。在胁迫3 d后，2个棉花品种幼苗根系内肽酶活性较对照显著提高（*P＜0.05*）；胁迫4 d，2个品种内肽酶活性都快速增加；胁迫5 d，2个品种内肽酶活性达到最大值，此时，新陆早7号和新陆早24号内肽酶活性分别达到71.04, 85.11Δ570/（h·mg），差异显著（*P＜0.05*）。复水1 d，新陆早7号较新陆早24号内肽酶活性下降显著（*P＜0.05*）；复水2 d，2个供试品种棉花幼苗根系内肽酶活性变化接近。



A

B

干 旱 Drought

对 照 Control

120 120

100 100

根系内肽酶活性

Root endopeptidase activity (△ 570 mg-1 protein h-1)

根系内肽酶活性

Root endopeptidase activity (△ 570 mg-1 protein h-1)

80 80

60 60

40 40

20 20

0

1 2 3 4 5 6 7

0

1 2 3 4 5 6 7

处理天数Treatment days (d)

图1 干旱胁迫及复水对棉花幼苗根系内肽酶总活性的影响

Fig. 1 Effect of drought stress and rewatering on activity of endopeptidase of cotton roots

注：A区表示新陆早7号的数据图，B区表示新陆早24号的数据图，下图同。

Note: Area A represents the data map of Xinluzao 7, Area B represents the data map of Xinluzao 24, with the following figure.

### 2.2 干旱胁迫及复水对棉花幼苗根系总氮含和可溶性蛋白含量的影响

由图 2 可知，在胁迫 2 d 后，2 个棉花品种幼苗根系总氮含量的变化与对照差异不显著；胁迫 3 d，2 个品种总氮含量上升较快，与对照差异显著，但品种间差异不显著； 4 d 时 2 个品种处理间达到显著（*P＜0.05*）；5 d 新陆早 7 号和新陆早 24 号根系总氮含量分别上升到最大值，比对照高出 14.01%和 12.14%。复水后，2 个品种根系的总氮含量均呈下降趋势，但仍与对照差异显著（*P＜0.05*）。

A

B

干 旱 Drought

对 照 Control

#### 2.2 2.2

2.0 2.0

根系总氮含量

Root total nitrogen content (g 100g-1 DW)

根系总氮含量

Root total nitrogen content (g 100g-1 DW)

1.8 1.8

1.6 1.6

1 2 3 4 5 6 7 1 2 3 4 5 6 7

处理天数Treatment days (d)

图2 干旱胁迫及复水对棉花幼苗根系总氮含量的影响

Fig. 2 Effect of drought stress and rewatering on total nitrogen content of cotton roots

图3显示，2个棉花品种幼苗根系中的可溶性蛋白质含量在处理前2 d变化不显著；胁迫3 d后较对照显著增加（*P＜0.05*），胁迫5 d时达到最大值，此时新陆早7号和新陆早24号可溶性蛋白含量分别为21.99, 9.60 mg/g FW，差异显著（*P＜0.05*）。复水后，

2个品种干旱处理可溶性蛋白质含量都显著下降。



干 旱 Drought

对 照 Control

A

B

20 20

15 15

根系可溶性蛋白含量

Root soluble protein content

(g mg FW)

根系可溶性蛋白含量

Root soluble protein content

(g mg FW)

10 10

-1

-1

5 5

0

1 2 3 4 5 6 7

0

1 2 3 4 5 6 7

处理天数Treatment days (d)

图3 干旱胁迫及复水对棉花幼苗根系可溶性蛋白含量的影响

Fig. 3 Effect of drought stress and rewatering on soluble protein content of cotton roots

### 2.3 干旱胁迫及复水对棉花幼苗根系NR、GS、GOGAT、GDH活性的影响

图4表明，在干旱胁迫下2个棉花品种干旱处理NR活性的变化趋势基本一致，均在胁迫2 d略有上升，3 d下降，但品种间差异不显著；4～5 d显著下降（*P*＜*0.05*）；5 d时降到最低值，其中新陆早7号和新陆早24号硝酸还原酶活性分别为2.30, 1.99μg NO2-/

（mg·h），差异显著（P＜0.05）。复水1 d，新陆早7号硝酸还原酶活性恢复较快；复水

2 d，2个品种间差异不明显，但与对照差异仍达显著（*P*＜*0.05*）。

A

B

干 旱 Drought

对 照 Control

6 6

5 5

根系NR活性

Root NR activity (μg g-1h-1FW)

根系NR活性

Root NR activity (μg g-1h-1FW)

4 4

3 3

2 2

1

1 2 3 4 5 6 7

1

1 2 3 4 5 6 7

处理天数Treatment days (d)

图4 干旱胁迫及复水对棉花幼苗根系NR活性的影响

Fig. 4 Effect of drought stress and rewatering on NR activity of cotton roots

图5表明，干旱胁迫前2 d，2个棉花品种根GS活性变化不大，3 d开始呈下降趋势，4 d时2个品种间的GS活性下降差异达到显著水平（*P*＜*0.05*）；5 d时GS活性下降到最低值，其中新陆早7号和新陆早24号GS活性分别为25.68, 18.43μmolγ-GHM/

（mg·h）。复水后2个品种根系GS活性上升，但新陆早7号的GS活性上升较快，与新陆早24号差异达到显著水平（*P＜0.05*）。

80 80

A B

根系GS活性

Root GS activity (μmolGAH h-1g-1FW)

根系GS活性

Root GS activity (μmolGAH h-1g-1FW)

70干旱Drought 70

对照Control

60 60

50 50

40 40

30 30

20 20

10 10

0

1 2 3 4 5 6 7

0

1 2 3 4 5 6 7

处理天数Treatment days (d)

图5 干旱胁迫及复水对棉花幼苗根系GS活性的影响

Fig. 5 Effect of drought stress and rewatering on activity of GS of cotton roots

由图6可知，2个棉花品种根系的GOGAT活性变化趋势和GS活性变化相似，干旱胁迫3 d开始呈下降趋势，4 d下降幅度较大；5 d下降到最大值，新陆早7号和新陆

24号的GOGAT活性分别为10.30, 5.22 μmol NADH/（mg·h），差异达到显著水平（*P*

＜*0.05*）；复水后，新陆早7号较新陆早24号GOGAT活性上升快，差异显著（*P*＜*0.05*）

35 35

A B

30干旱 Drought 30

根系GOGAT活性

Root GOGAT activity (NADHμmol h-1g-1protein)

根系GOGAT活性

Root GOGAT activity (NADHμmol h-1g-1protein)

对照Control

25 25

20 20

15 15

10 10

5

1 2 3 4 5 6 7

5

1 2 3 4 5 6 7

处理天数Treatment days (d)

图6 干旱胁迫及复水对棉花幼苗根系GOGAT 活性的影响

Fig. 6 Effect of drought stress and rewatering on activity of GOGAT of cotton roots

图7表明，2个棉花品种根系在干旱胁迫2 d时GDH活性较低，在胁迫3～4 d明显上升，与对照差异显著（*P*＜*0.05*），且4 d上升到最大值；5 d时2个品种的GDH活性显著下降。复水后，新陆早7号GDH活性缓慢下降，而新陆早24号GDH活性略有上升。



A

B

干旱 Drought

对 照 Control

80 80

70 70

60 60

根系GDH活性

Root GDH activity (NADHμmol h-1g-1protein)

根系GDH活性

Root GDH activity (NADHμmol h-1g-1protein)

50 50

40 40

30 30

20 20

10 10

0

1 2 3 4 5 6 7

0

1 2 3 4 5 6 7

处理天数Treatment days (d)

图7 干旱胁迫及复水对棉花幼苗根系GDH 活性的影响

Fig. 7 Effect of drought stress and rewatering on activity of GDH of cotton roots

### 2.4 干旱胁迫及复水对棉花幼根系铵离子含量的影响

图8表明，2个供试棉花品种幼苗根系中铵离子含量随着干旱胁迫的进行逐渐增加，从胁迫3 d开始与对照差异达到显著水平（*P*＜*0.05*）；在胁迫5 d铵离子含量最高，新陆早7号和新陆早24号分别为3.61, 4.04 mg/g FW。复水后2个品种根系中的铵离子含量下降，新陆早7号在复水后根系铵离子含量较新陆早24号下降快，差异显著（*P*

＜*0.05*）。

4 4



A

B

干 旱 Drought

对 照 Control

根系铵离子浓度

Ammonium ion content (mg 100g-1 FW)

-1

Ammonium ion content (mg 100g FW)

3 3

根系铵离子浓度

2 2

1 1

0

1 2 3 4 5 6 7

0

1 2 3 4 5 6 7

处理天数Treatment days (d)

图8 干旱胁迫及复水对棉花幼苗根系铵离子浓度的影响

Fig. 8 Effect of drought stress and rewatering on concentration of NH4

+

### 2.5 干旱胁迫及复水对棉花幼苗根系中游离氨基酸含量的影响

表1表明，在胁迫2 d，2个棉花品种根系中游离氨基酸总量增加不明显，胁迫3～5 d新陆早7号根系游离氨基酸总量增加较新陆早24号快，复水后新陆早24号下降的速度也较快；在胁迫3～4 d，新陆早7号脯氨酸含量的增加幅度比新陆早24号显著（*P*

＜*0.05*），分别为对照的16，10倍以上。在2个品种根系所含的16种氨基酸中，天门冬氨酸、丝氨酸、谷氨酸和脯氨酸含量占氨基酸总量的比例大，平均约占70%，其中，天门冬氨酸和谷氨酸随着处理时间变化幅度也较相对较小；在中性氨基酸中，异亮氨酸随

着处理时间变化幅度较大，随着胁迫天数的增加增幅达3倍以上；在碱性氨基酸中，组氨酸和精氨酸随着处理时间变化幅度大，随着胁迫增加增幅达7，3倍以上；其他氨基酸随着随着处理时间增加幅度都在1倍左右。

表1 干旱胁迫及复水条件对棉花幼苗根系游离氨基酸含量的影响

Table 1 Effect of soil drought stress and re-watering on free amino acid contents in cotton seedling roots

（mg/100g·FW ）

| 氨基酸  Amino acid | 品种  genotype | 处理  Treatme- nt |  |  | 处理天数 treatment days | | |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 1d | 2d | 3d | 4d | 5d | 6d | 7d |
| 天冬氨酸Asp | 新陆早 7 号  Xinluzao 7 | CK | 6.79b | 6.98ab | 6.82c | 6.62c | 7.12c | 6.99c | 7.06c |
| 干旱 drought | 7.08ab | 7.37a | 11.13a | 16.65a | 21.41a | 15.49a | 11.09a |
| 新陆早 24 号  Xinluzao 24 | CK | 6.67a | 6.71a | 6.86c | 6.80c | 6.77c | 6.74c | 6.79c |
| 干旱 drought | 6.83a | 7.57a | 9.19b | 14.36b | 18.21b | 12.58b | 8.00b |
|  | 新陆早 7 号  Xinluzao 7 | CK | 1.49a | 1.59b | 1.51c | 1.56c | 1.53c | 1.54c | 1.51c |
| 苏  氨酸Thr |  |
| 干旱 drought | 1.56a | 1.72a | 2.45b | 4.71a | 6.44a | 4.21a | 2.95a |
| 新陆早 24 号  Xinluzao 24 | CK | 1.30b | 1.32d | 1.31d | 1.36d | 1.38c | 1.40c | 1.37c |
| 干旱 drought | 1.38b | 1.46c | 2.58a | 3.12b | 4.28b | 3.42b | 2.61b |
|  | 新陆早 7 号  Xinluzao 7 | CK | 4.89b | 4.84d | 4.91c | 5.12b | 4.94c | 4.87c | 4.98b |
| 丝  氨酸Ser |  |
| 干旱 drought | 5.03b | 7.12b | 13.38b | 18.46a | 20.71b | 15.66b | 13.54a |
| 新陆早 24 号  Xinluzao 24 | CK | 5.44a | 5.78c | 5.37c | 5.56b | 5.42c | 5.59c | 5.57b |
| 干旱 drought | 5.53a | 7.76a | 15.10a | 19.52a | 25.37a | 19.22a | 14.68a |
|  | 新陆早 7 号  Xinluzao 7 | CK | 13.63a | 13.54a | 12.67b | 12.86c | 13.47c | 12.37c | 14.11a |
| 谷  氨酸Glu |  |
| 干旱 drought | 13.68a | 14.09a | 17.70a | 24.51a | 27.60a | 16.54a | 13.32a |
| 新陆早 24 号  Xinluzao 24 | CK | 13.47a | 13.15a | 12.96b | 13.01c | 14.06c | 14.02c | 13.37a |
| 干旱 drought | 13.07a | 14.14a | 16.37a | 20.41b | 25.51b | 14.51b | 11.01b |
|  | 新陆早 7 号  Xinluzao 7 | CK | 1.54b | 1.55c | 1.53c | 1.51c | 1.54c | 1.56c | 1.55c |
| 脯  氨酸Pro |  |
| 干旱 drought | 1.57b | 1.84b | 4.36a | 12.59a | 28.60a | 11.62a | 4.71a |
| 新陆早 24 号  Xinluzao 24 | CK | 2.25a | 2.31a | 2.22bc | 2.17c | 2.20c | 2.18c | 2.29b |
| 干旱 drought | 2.16a | 2.49a | 4.26b | 9.18b | 24.33b | 9.70b | 4.82b |
|  | 新陆早 7 号  Xinluzao 7 | CK | 0.63b | 0.67c | 0.65d | 0.63d | 0.64d | 0.62d | 0.66d |
| 甘  氨酸Gly |  |
| 干旱 drought | 0.68b | 0.71c | 1.09b | 1.46b | 1.67b | 2.43b | 1.77b |
| 新陆早 24 号  Xinluzao 24 | CK | 0.80a | 0.79b | 0.83c | 0.86c | 0.84c | 0.81c | 0.82c |
| 干旱 drought | 0.83a | 0.89a | 1.55a | 2.23a | 2.78a | 2.43a | 1.77a |
|  | 新陆早 7 号  Xinluzao 7 | CK | 1.35b | 1.32c | 1.31d | 1.29d | 1.28b | 1.30d | 1.33d |
| 丙  氨酸Ala |  |
| 干旱 | 1.34b | 1.48b | 1.83b | 2.32b | 3.13a | 2.64b | 1.82a |
| 新陆早 24 号  Xinluzao 24 | CK | 1.44a | 1.43b | 1.47c | 1.42c | 1.41b | 1.47c | 1.46c |
| 干旱 drought | 1.45a | 1.64a | 2.01a | 2.52a | 3.21a | 2.85a | 1.60b |
|  | 新陆早 7 号  Xinluzao 7 | CK | 0.50a | 0.49b | 0.51c | 0.48c | 0.47c | 0.52c | 0.51b |
| 胱  氨酸Cys |  |
| 干旱 drought | 0.49a | 0.56a | 0.67a | 0.70a | 0.99a | 0.72a | 0.57a |
| 新陆早 24 号  Xinluzao 24 | CK | 0.48a | 0.51b | 0.50c | 0.49c | 0.46c | 0.47c | 0.49b |
| 干旱 drought | 0.47a | 0.51b | 0.58b | 0.61b | 0.76b | 0.60b | 0.56a |
|  | 新陆早 7 号  Xinluzao 7 | CK | 0.50b | 0.49b | 0.51b | 0.52c | 0.48b | 0.53b | 0.54b |
| 缬  氨酸Val |  |
| 干旱 drought | 0.51b | 0.56a | 1.23a | 2.33b | 4.52a | 3.32a | 2.26a |
| 新陆早 24 号  Xinluzao 24 | CK | 0.41a | 0.43c | 0.42b | 0.43c | 0.44b | 0.42b | 0.43b |
| 干旱 drought | 0.42a | 0.48b | 1.25a | 2.58a | 4.32a | 3.23a | 2.35a |

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  | 新陆早 7 号  Xinluzao 7 | CK | 1.26c | 1.28c | 1.27d | 1.29d | 1.32c | 1.30c | 1.33d |
| 蛋  氨酸Met |  |
| 干旱 drought | 1.31bc | 1.40b | 2.03a | 2.52a | 3.54a | 2.53a | 2.04a |
| 新陆早 24 号  Xinluzao 24 | CK | 1.42ab | 1.47a | 1.48c | 1.45c | 1.44c | 1.47c | 1.45c |
| 干旱 drought | 1.50a | 1.53a | 1.62b | 1.82b | 2.64b | 2.08b | 1.79b |
| 异亮氨酸Ileu | 新陆早 7 号  Xinluzao 7 | CK | 1.45b | 1.42d | 1.41d | 1.43d | 1.42c | 1.44d | 1.46d |
| 干旱 drought | 1.47b | 1.57c | 2.21b | 3.39b | 6.78b | 4.40a | 3.24b |
| 新陆早 24 号  Xinluzao 24 | CK | 1.71a | 1.72b | 1.74c | 1.71c | 1.70c | 1.73c | 1.70c |
| 干旱 drought | 1.73a | 1.80a | 2.72a | 3.55a | 7.45a | 4.06b | 3.75a |
|  | 新陆早 7 号  Xinluzao 7 | CKCK | 1.15b | 1.07c | 1.10c | 1.08c | 1.13d | 1.14c | 1.21c |
| 亮  氨酸Leu |  |
| 干旱 drought | 1.17b | 1.27bc | 1.88a | 2.74a | 3.94a | 2.81a | 2.34a |
| 新陆早 24 号  Xinluzao 24 | CK | 1.27a | 1.33ab | 1.29b | 1.31c | 1.30c | 1.32c | 1.28c |
| 干旱 drought | 1.31a | 1.42a | 1.80a | 2.24b | 2.85b | 2.12b | 1.78b |
|  | 新陆早 7 号  Xinluzao 7 | CK | 1.17a | 1.07b | 1.09b | 1.12c | 1.15c | 1.16c | 1.22c |
| 酪  氨酸Tyr |  |
| 干旱 drought | 1.15a | 1.24a | 1.50a | 1.74a | 2.35b | 1.56b | 1.39a |
| 新陆早 24 号  Xinluzao 24 | CK | 1.13a | 1.14b | 1.15b | 1.18c | 1.16c | 1.17c | 1.15c |
| 干旱 drought | 1.17a | 1.32a | 1.53a | 1.62b | 2.03a | 1.70a | 1.61a |
| 苯丙氨酸Phe | 新陆早 7 号  Xinluzao 7 | CK | 0.91a | 0.90c | 0.87c | 0.92c | 0.95c | 0.91c | 0.94b |
| 干旱 drought | 0.93a | 1.18a | 1.56a | 1.86a | 2.5a | 2.13a | 1.54a |
| 新陆早 24 号  Xinluzao 24 | CK | 0.95a | 0.98bc | 0.99c | 0.95c | 0.94c | 0.95c | 0.96b |
| 干旱 drought | 0.96a | 1.07ba | 1.32b | 1.50b | 2.07b | 1.70b | 1.61a |
|  | 新陆早 7 号  Xinluzao 7 | CK | 0.69b | 0.67c | 0.72c | 0.70c | 0.73d | 0.71c | 0.72c |
| 赖  氨酸Lys |  |
| 干旱 drought | 0.72b | 0.73c | 1.12a | 1.91b | 2.95b | 2.28a | 1.56a |
| 新陆早 24 号  Xinluzao 24 | CK | 0.83a | 0.84b | 0.85b | 0.86c | 0.86c | 0.84b | 0.83b |
| 干旱 drought | 0.83a | 0.91a | 1.21a | 2.44a | 3.21a | 2.11a | 1.33a |
|  | 新陆早 7 号  Xinluzao 7 | CK | 0.64b | 0.62b | 0.66d | 0.68d | 0.64d | 0.63d | 0.65d |
| 组  氨酸His |  |
| 干旱 drought | 0.68b | 0.75b | 1.58b | 2.58b | 5.61b | 3.18b | 2.65b |
| 新陆早 24 号  Xinluzao 24 | CK | 1.11a | 1.15a | 1.10c | 1.07c | 1.17c | 1.14c | 1.11c |
| 干旱 drought | 1.09a | 1.17a | 2.59a | 3.44a | 7.32a | 4.34a | 2.48a |
|  | 新陆早 7 号  Xinluzao 7 | CK | 0.71a | 0.73b | 0.69c | 0.72c | 0.74c | 0.72c | 0.71c |
| 精  氨酸Arg |  |
| 干旱 drought | 0.73a | 0.79a | 1.21b | 1.91b | 2.95b | 2.29b | 1.56b |
| 新陆早 24 号  Xinluzao 24 | CK | 0.63b | 0.65c | 0.66c | 0.64c | 0.66c | 0.65c | 0.63c |
| 干旱 drought | 0.65b | 0.81a | 1.38a | 2.44a | 4.34a | 3.08a | 2.10a |
|  | 新陆早 7 号  Xinluzao 7 | CK | 39.33b | 39.28d | 38.27c | 38.56d | 39.67b | 38.32c | 40.51c |
| 总量  total | 干旱 drought | 40.16ab | 44.43b | 66.97a | 101.95a | 144.00a | 92.48a | 67.43a |
| 新陆早 24 号  Xinluzao 24 | CK | 41.36a | 41.79c | 41.22b | 41.31c | 42.25b | 42.38b | 41.73c |
|  | 干旱 drought | 41.43a | 47.01a | 67.12a | 93.63b | 140.74a | 89.78a | 64.63b |

### 2.6 干旱胁迫及复水棉花幼苗根系中游离氨基酸含量与GABA含量变化的相关性分析

由表2可知，新路早7号根系铵离子浓度、Glu含量、Pro含量与土壤含水量呈现显著（*P<0.05*）负相关。根系GAGB含量、铵离子浓度、Glu含量、Pro含量、AA总量相互之间均呈现极显著（*P<0.01*）正相关。

表2 新陆早7号棉花根系GABA含量与土壤含水量、铵离子浓度、游离氨基酸总量、Glu和Pro

含量相关性分析

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 土壤含水量  Soil water content | GAGB 含量  GAGB content | 铵离子浓度  +  NH4 content | Glu 含量  Glu content | Pro 含量  Pro content |
| GAGB 含量  GAGB content | -0.670 |  |  |  |  |
| 铵离子浓度  NH + content  4 | -0.762\* | 0.986\*\* |  |  |  |
| Glu 含量  Glu content | -0.796\* | 0.961\*\* | 0.973\*\* |  |  |
| Pro 含量  Pro content | -0.738\* | 0.971\*\* | 0.981\*\* | 0.924\*\* |  |
| AA 总量  AA content | -0.632 | 0.969\*\* | 0.956\*\* | 0.903\*\* | 0.975\*\* |

Table 2 Analysis of the concentration of soil water, ammonium ion, total free amino acid, Glu and Pro correlation with GABA content in Xinluzao7 cotton roots

由表3可知，新路早24号根系GAGB含量、铵离子浓度、Pro含量与土壤含水量呈现显著（*P<0.05*）负相关。根系GAGB含量、铵离子浓度、Glu含量、Pro含量、AA总量相互之间均呈现极显著（*P<0.01*）或显著（*P<0.05*）正相关。

表3 新陆早24号棉花根系GABA含量与土壤含水量、铵离子浓度、游离氨基酸总量、Glu 和

Pro含量相关性分析

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 土壤含水量  Soil water content | GAGB 含量  GAGB content | 铵离子浓度  +  NH4 content | Glu 含量  Glu content | Pro 含量  Pro content |
| GAGB 含量  GAGB content | -0.694\* |  |  |  |  |
| 铵离子浓度  NH + content  4 | -0.728\* | 0.926\*\* |  |  |  |
| Glu 含量  Glu content | -0.613 | 0.722\* | 0.919\*\* |  |  |
| Pro 含量  Pro content | -0.739\* | 0.956\*\* | 0.922\*\* | 0.712\* |  |
| AA 总量  AA content | -0.627 | 0.947\*\* | 0.980\*\* | 0.862\*\* | 0.937\*\* |

Table 3 Analysis of the concentration of soil water, ammonium ion, total free amino acid, Glu and Pro correlation with GABA content in Xinluzao24cotton roots

## 3 讨论与结论

植物体内不同形态氮素在器官间的含量与比例可反映作物氮素营养状况和生理功能的强弱，是影响氮素在体内分配的一个重要因素（Ladha J K et al, 1998）。在本试验中，2个棉花品种幼苗根系中的总氮含量都随着水分胁迫天数延长而增加，且新陆早 7

号含量高于新陆早24号。这可能是在干旱胁迫条件下耐旱品种根系的氮素积累较多，也可能是根系内氮素重新分配到其他部位的比例较小的原因，这为耐旱品种复水后的快速生长提供了氮素营养基础。

水分胁迫下蛋白质水解占优势，可溶性蛋白质含量下降。但也有研究表明，当胁迫强度或时间达到一定值时，可溶性蛋白质明显增加（刘子凡，2007）。许振柱等认为干旱对氮素分配的影响可能因物种和试验条件而异（许振柱等，2004）。在本试验中，随着干旱胁迫的进行，2个棉花品种幼苗根系可溶性蛋白变含量逐渐增加，其中新陆早7号根系可溶性蛋白变含量化大于新陆早24号。Monreal等认为干旱胁迫下可溶性总蛋白含量的增加可以增强蛋白质的合成，对胁迫下对细胞起保护作用（Monreal J A et al, 2007）。

水分胁迫下水解酶类活性增强，促使蛋白质降解（许振柱等，2004），并因此损害植物正常代谢过程。本试验表明，在正常供水条件下，2个供试品种蛋白酶活性异不大。在胁迫3～5 d新陆早24号蛋白酶活性显著高于新陆早7号。复水以后，新陆早24号蛋白酶活性下降较慢。这与盐胁迫下不同基因型桑树（*Morus alba L.*）蛋白酶活性变化结果相似（许振柱等，2004），表明干旱胁迫对耐旱棉花品种幼苗根系蛋白降解相对较小，有利于复水后代谢的恢复。

硝酸还原酶（NR）是植物氮素还原过程中的限速酶和调节的关键酶，对环境胁迫敏感（许振柱等，2004）。本试验表明，适度降低土壤含水量可以提高NR 活性，且耐旱品种在干旱胁迫下NR活性较高且恢复较快。植物体内铵离子的同化通过GS/GOGAT循环和GDH途径实现。水分胁迫下GS活性的下降会造成植物体内NH4+积累。在本试验中，GS、GOGAT活性在干旱胁迫下先略微升高，然后逐渐降低，其中耐旱品种下降幅度较小；GDH活性随干旱胁迫变化是先稍有下降再上升，4 d上升到最大值，5 d又下降。这表明棉花根系在轻度干旱胁下主要依靠GS/GOGAT途径进行铵离子同化，在中度干旱胁迫下GS/GOGAT和GDH途径都起作用，在重度干旱胁迫胁迫下，GDH可能在解除铵离子毒害方面起主要作用，GDH同化铵离子的能力有限（张慧娜等，2009），致使铵离子浓度表现出显著增加，而耐旱品种仍具有较强的氨同化能力，降低了铵离子对其的毒害作用。复水后耐旱品种GS、GOGAT和GDH活性恢复较快，根系中铵离子浓度下降也较快。

植物体内的氨基酸态氮是氮素的主要运输形式，是氮素吸收、同化和再分配的中心，氨基酸态氮含量在一定程度上代表了植物氮代谢的能力（孙圆圆等，2009）。在水分胁迫下，植物可通过游离氨基酸的累积参与渗透调节，通过渗透势的改变来维持膨压，进而抵御干旱的影响。本试验表明，2个品种棉花幼苗根系的游离氨基酸含量变化的总趋势是随着干旱胁迫的进行而增加，复水后随之下降，新陆早7号较新陆早24号总游离氨基酸含量高，说明耐旱品种根系的渗透调节能力较强。

在植物氮素代谢途径中，几乎所有的氨基酸的生物合成均以谷氨酸为氨基的供体。天门冬氨酸是合成赖氨酸、苏氨酸、异亮氨酸、蛋氨酸等氨基酸的前体。在本试验中，

2个品种棉花幼苗根系内谷氨酸和天门冬氨酸含量的增多，可能是干旱胁迫下其转化受阻所致，也可能是该品种代谢较旺盛，用于将氮从源器官向其他器官的转移；丝氨酸是由光呼吸产生的氨基酸，其含量受干旱胁迫影响变化显著，在植物根系中还未见相关报道，其机理有待进一步研究。在棉花幼苗根系的碱性氨基酸中，精氨酸含量受干旱胁迫影响显著，是变化最大的氨基酸之一。杨洪强等认为精氨酸除参与氮素循环外，还是生成信使分子一氧化氮和多胺等的前体，可以通过向多胺和一氧化氮的转化而感知和识别外界条件的变化（杨洪强等，2009）；另外，棉花幼苗根系中的中性氨基酸异亮氨酸在干旱胁迫下变化也显著，它是由丙酮酸衍生的支链氨基酸，其含量变化与棉花抗旱的关系尚不明确；脯氨酸的合成被认为是同化多余氨的一种方式，作为额外氮元素的储存形式（Brugiére N et al, 1999）。在本试验中，2个品种棉花根系的脯氨酸含量都随着干旱胁迫的进行而显著增加，新陆早7号的脯氨酸含量较新陆早24号高，说明耐旱品种同化多余氨的能力较强。

本研究发现，新路早7号根系铵离子浓度、Glu含量、Pro含量与土壤含水量呈现显著（*P<0.05*）负相关。根系GAGB含量、铵离子浓度、Glu含量、Pro含量、AA总量相互之间均呈现极显著（*P<0.01*）正相关；新路早24号根系GAGB含量、铵离子浓度、Pro含量与土壤含水量呈现显著（*P<0.05*）负相关。根系GAGB含量、铵离子浓度、

Glu含量、Pro含量、AA总量相互之间均呈现极显著（*P<0.01*）或显著（*P<0.05*）正相关。这说明GAGB含量与干旱胁迫下的氮代谢密贴相关。

持续干旱胁迫及复水环境改变了棉花幼苗的氮代谢途径，使棉花幼苗根系的NR、

GS、GOGAT、GDH、内肽酶活性，以及总氮、可溶性蛋白和氨基酸含量发生了改变。耐旱型棉花品种具有较强同化铵离子能力，增加渗透调节物质游离氨基酸含量，特别是脯氨酸含量提高其耐旱性。另外，在胁迫解除后，耐旱品种氮代谢恢复较快，但复水2 d后并没有恢复到对照水平，即干旱对作物生长有滞后作用，复水后的生长表现是滞后事件的恢复或补偿（王磊等，2006）。因此，也要根据品种水肥特性采取相应的措施，促进壮苗早发，提高棉花产量。

# 第六章 研究结论与展望

## **1** 研究结论

### **1.1** 棉花**GABA**含量及其代谢的主要酶**GAD**活性对干旱胁迫的响应

在持续干旱胁迫下，新陆早7号（耐旱品种）和新陆早24号（不耐旱品种）的叶水势、叶片相对含水量、根系含水量和根系活力逐渐下降，在胁迫5d降低到最低，与同期处理的对照组相比较，差异达到显著水平。GAD活性在处理4d达到最大值，5d及复水后随之下降；GABA含量随着干旱胁迫天数的增加而增加，在胁迫5d上升到最大值，此时新陆早7号和新陆早24号叶片分别比对照增加约3和2倍。新陆早7号和新

陆早24号根系GABA含量分别比对照增加3.2和2倍。新陆早7号和新陆早24号叶片GABA-T活性在胁迫前期高，随着胁迫时间的延长而下降，在3d较对照显著降低，5d达到最低。2个品种根系的GABA-T活性变化趋势和叶片相似。复水后，2个品种叶片和根系GAD活性、GABA-T活性、GABA含量恢复，其中新陆早7号比新陆早24号恢复速度较快，说明耐旱型棉花品种具有较强的恢复能力。

外源GABA能够显著降低棉花叶片和根系的内肽酶活性。棉花叶片和根系中至少存在3种内肽酶，即巯基蛋白酶、丝氨酸蛋白酶及金属蛋白酶。其中最活跃的是巯基蛋白酶。

### **1.2** 棉花**GABA**代谢的主要酶**GAD**活性对不同调节物质的响应

-1.0 MPa PEG处理下，棉花叶片和根系GAD活性显著降低；在10 mMCa（NO3）

2加处理下，棉花叶片GAD活性显著上升；在100mM TFP+10mM Ca（NO3）和100 mMW7+10 mM Ca(NO3) 2处理下，棉花叶片GAD活性显著高于-1.0M Pa PEG处理，但低于对照，而W7对GAD活性抑制效果最显著；在5 mM谷氨酸、5 mM丙氨酸、5 mM甘氨酸、5 mM天门冬氨酸和5 mM铵离子处理处理下，以处理的棉花叶片GAD活性最高；其他氨基酸的处理略高于对照；在5 mM铵离子加-1.0 MPa PEG处理下，棉花叶片

GAD活性最低；在10 mM丁酸处理下，棉花叶片GAD活性略高于对照；10 mM柠檬酸处理下，棉花叶片GAD活性高于苹果酸和丁酸处理；100 mM草酸处理下，棉花叶片GAD活性最高；在-1.0 MPa PEG + 10 mM丁酸加、-1.0 MPa PEG + 10 mM柠檬酸、

-1.0 MPa PEG + 100 mM草酸和-1.0 MPa PEG + 10 mM苹果酸的不同处理下，棉花叶片

GAD活性变化趋势和不加PEG相似，只是活性上升幅度较大。棉花叶片GABA含量在以上处理下的变化趋势和GAD活性基本相似。

在不同水势的PEG处理下棉花根系的GAD活性和GABA含量的变化趋势略同与叶片，不同的是变化幅度降低且缓慢。

### **1.3** 与多胺代谢相关的**GABA**代谢对干旱胁迫的响应

在-0.5 MPa、-1.0 MPa和-1.5 MPa水势的PEG溶液胁迫下，棉花叶片腐胺（Put）、亚精胺（Spd）和精胺（Spm）含量都随着胁迫水势的降低而上升。在-1.5 MPa水势的

PEG溶液胁迫下，Put的含量上升最显著，Spd次之，Spm变化幅度最小；在加入AG后，棉花叶片Put、Spd和精胺Spm含量均随着胁迫水势的降低而略有上升，上升幅度最大的也是Put；在-0.5 MPa、-1.0 MPa和-1.5 MPa水势的PEG溶液胁迫下，棉花叶片

DAO活性在-1.0 MPa时最高，-1.0 MPa次之，在-0.5 MPa最低。加入AG后，棉花叶片

DAO活性几乎完全被抑制；在-1.5 MPa水势的PEG溶液胁迫下，GABA含量最高，-1.0

MPa水势的PEG溶液胁迫下次之，在-0.5 MPa水势的PEG溶液胁迫下，棉花叶片GABA

含量最低。

棉花根系的Put、Spd、Spm、DAO活性、GABA含量与叶片基本相似，不同的是

Put、Spd、Spm和GABA含量比叶片低的多，DAO活性则略低。-1.0 MPa PEG溶液胁迫下的棉花叶片和根系的多胺降解途径可提供30%到40%GABA形成。

### **1.4** 干旱胁迫下棉花幼苗叶片和根系氮代谢与**GABA**代谢的关系

在持续干旱胁迫下，2个品种叶片含水量逐渐降低，其中新陆早7号下降较为明显；与对照正常供水相比，新陆早7号和新陆早24号谷氨酰胺合成酶（GS）活性、硝酸还

原酶（NR）活性均发生不同程度降低，其中新陆早7号降低的幅度小。内肽酶活性、

谷氨酸脱氢酶（GDH）活性、可溶性蛋白质含量和总氮含量均增加，其中新陆早7号增加的幅度较大，铵离子含量分别增加了104.04%和111.53%；另外，持续干旱胁迫增加了2个品种叶片游离氨基酸含量，新陆早7号在胁迫前期游离氨基酸含量增加慢，后期

增加快，新陆早24号游离氨基酸含量的变化趋势与新陆早7号相反。复水后，新陆早7号叶片含水量和硝酸还原酶活性及谷酰胺合成酶活性恢复较快，谷氨酸脱氢酶活性和内肽酶活性与游离氨基酸、铵离子、可溶性蛋白质和总氮含量下降的速度也较新陆早24号快。

研究发现，在干旱胁迫下，新陆早7号棉花叶片GAGB含量与铵离子浓度、Glu含量和Pro含量四个指标之间均呈极显著正相关性，并与游离氨基酸总量亦表现出极显著正相关性；新陆早24号棉花叶片GAGB含量与叶片铵离子浓度、Glu含量和Pro含量四个指标之间除铵离子浓度与Pro含量呈极显著正相关性，两两之间均呈显著正相关性，并与游离氨基酸总量亦表现出极显著正相关性。

在持续干旱胁迫下，新陆早7号和新陆早24号根系的硝酸还原酶（NR）活性与对照相比分别降低45.03% 和62.37%，谷氨酰胺合成酶（GS）活性分别降低53.22%和

67.23%，谷氨酸合成酶（GOGAT）活性分别降低54.92% 和79.28%，谷氨酸脱氢酶

（GDH）活性在处理4d达到最大值，5d及复水后随之下降，可溶性蛋白质含量分别增加了87.38%和77.12%，总氮含量分别增加了14.01%和12.14%，铵离子含量分别增加了232.02% 和263.47%。干旱胁迫使新陆早7号根系在胁迫前期游离氨基酸含量增加慢，

后期增加快，新陆早24号根系游离氨基酸含量的变化趋势与新陆早7号则相反。复水后，新陆早7号根系NR活性、GS活性、GOGAT活性和GDH 活性恢复较快，内肽酶活性和游离氨基酸、铵离子、可溶性蛋白质和总氮含量下降也较快。试验表明，耐旱型棉花品种具有较强的铵离子同化能力，增加渗透调节物质游离氨基酸含量，特别是脯氨酸含量增强其耐旱性。根系GAGB含量、铵离子浓度、Glu含量、Pro含量、AA总量相互之间均呈现极显著（*P<0.01*）或显著（*P<0.05*）正相关。这说明GAGB含量与干旱胁迫下的氮代谢密贴相关。

## 2 研究的创新点

（1）在棉花上外源使用不同的有机酸和氨基酸，发现外源苹果酸和谷氨酸对棉花

GAD活性激活显著，丁酸、柠檬酸、草酸对GAD活性激活略有激活作用，甘氨酸、丙氨酸、天门冬氨酸对GAD活性有一定的抑制作用，铵离子的抑制作用最显著。

（2）利用氨基酸分析仪以柱后衍生法分析多胺，发现在PEG胁迫下，棉花叶片和根系Put、Spd、Spm含量随着胁迫强度增加而增大，增加顺序为Put> Spd> Spm。棉花叶片DAO活性在-1.0MPa时最高。通过AG抑制发现，-1.0 MPa PEG溶液胁迫下的棉花叶片和根系的多胺降解途径可提供30%到40%GABA形成。

（3）在棉花上外源使用GABA，发现它能够显著降低棉花叶片和根系的内肽酶活性。棉花叶片和根系中至少存在3种内肽酶，即巯基蛋白酶、丝氨酸蛋白酶及金属蛋白酶。其中最活跃的是巯基蛋白酶。

## **3** 展望

尽管近年来人们对植物N的合成途径、利用效率及其植物体内的转化过程展开了大量的研究，取得了一系列新的认识。但对作为TCA循环的支路的GABA途径所涉及的氮代谢，重视的程度远远不够，全世界只有科学家Shelp三十多年来一直坚持这一方向的研究，国内也有多位科学家做了不少工作，但这一途径的许多难点和疑点还有待阐明。在本文的研究过程中发现有以下几个疑点：

（1）GABA可以由多胺代谢途径形成，本文论述了干旱胁迫下多胺与游离态多胺的关系，但植物中束缚态和结合态多胺与GABA形成的关系又如何，三种多胺与GABA形成的分子机理也待研究。

（2）有关研究发现，GABA转换到SSA在细菌和动物需要2-酮戊二酸作为氨基受体，而植物是利用丙酮酸作为氨基受体（Shelp et al, 1999）。最近更多的研究在拟南芥（Van Cauwenberghe et al, 2002; Clark et al, 2009a）和番茄（Clark et al, 2009b）中的研究表明，拟南芥和番茄分别拥有一个和三个GABA-T基因，合成蛋白质用乙醛酸，以及丙酮酸做氨基酸受体。拟南芥GABA-T和番茄GABA-T1定位于线粒体，而番茄GABA-T 2和GABA-T3分别位于细胞质和叶绿体。这些数据表明GABA代谢和光呼吸之间存在潜在的生化相互作用（Clark et al, 2009a, b; Shelp et al, 2012b）。到目前为

止，两个水稻GABA-T基因已经被鉴定；一个被爆发真菌感染诱导（Ansari et al., 2005），另一个在衰老叶子高度表达（Wu et al, 2006），但是这些基因和它们相应的蛋白质没有全面被表征。本研究中也用比色法测定到棉花叶片和根系中丙酮酸依赖GABA-T

（GABA-TP）的活性，但没有用色谱法验证（数据未列出）。此外，棉花叶片和根系中丙酮酸依赖GABA-T（GABA-TP）的活性也应该用分子生物学方法加以验证。

（3）GABA支路对C / N分配和氨基酸代谢具有一个中心调节作用，在支路的多个转氨基反应中，谷氨酸转换为2-OG是用做氨基的供体。因此，谷氨酸脱羧生成GABA，然后转氨基生成SSA，伴随2-OG到谷氨酸的转换，链接支路到多个亚细胞代谢网络的交叉，并紧密相关胁迫条件。它可能是谷氨酸转化为GABA伴随其他胁迫与谷氨酸代谢途径相关的调节。谷氨酸是几个生长相关的代谢反应的一个积极调节因子

（López -Bucio et al, 2006）。因此，干旱胁迫下谷氨酸定量转化为GABA需要用同位素法予以研究，谷氨酸转化相关的酶GS、GOGAT、GDH和GAD也应该用用分子生物学方法加以研究。

以上三个问题的解决，可能会起到对于GABA 精确定量作用，以此结果来调节

GABA支路，会使植物适应干旱胁迫和他逆境的能力增强。

参考文献

[1]曹慧，王孝威，邹岩梅，束怀瑞．外源NO对水分胁迫下平邑甜茶幼苗中几种氮代谢酶的影响．园艺学报，2009，36（6）：781-786

[2]曹慧，韩振海，许雪峰.水分胁迫诱导平邑甜茶叶片衰老期间内肽酶活力的变化及其生化特性研究.中国农业科学，2002，35（12）：1514–1518

[3]陈贵林，贾开志。钙和钙调素拮抗剂对高温胁迫下茄子幼苗抗氧化系统的影响。中国农业科学，

2005, 38(1):197-202

[4]邓志瑞，陆巍，张荣铣，许晓明．水稻叶片光合功能衰退过程中内肽酶活力的变化．中国水稻科学，2003，17（1）：47-51

[5]丁俊胄，刘贞，张璐，董梦钇，熊善柏，赵思明. 储藏期对发芽糙米富集γ-氨基丁酸的影响.中

国粮油学报，2011，26（9）∶83-6.

[6]高俊凤主编．《植物生理学实验指导》．北京：高等教育出版社，2006

[7]焦彦生，郭世荣，李娟，樊怀福，马蓉丽，黄保健. 钙调素桔抗剂w7对低氧胁迫下黄瓜根系抗氧化系统的影响. 中国农业生态学报，2008，16（5）∶1178-1182

[8]焦彦生，郭世荣，李娟，樊怀福，马蓉丽，黄保健。钙调素拮抗剂W7对低氧胁迫下黄瓜幼苗根系生长和多胺动态变化的影响。应用与环境生物学报，2008，14（4）：454~459

[9]刘淑云，董树亭，赵秉强，李秀英，张振ft．长期施肥对夏玉米叶片氮代谢关键酶活性的影响．作物学报，2007，33（2）：278-283

[10]刘瑞显，郭文琦，陈兵林，周治国．对花铃期干旱及复水后棉花叶片保护酶活性和内源激素含量的影响．作物学报，2008，34（9）：1598-1607

[11]刘子凡．作物对土壤干旱胁迫适应机理的最新研究进展．安徽农业科学，2007，35（3）：11011-11013, 11018

[12]路兴花，吴良欢，庞林江．节水栽培水稻某些氮代谢生理特性研究．植物营养与肥料学报，2009，

15(4)：737-743

[13]罗黄颖，高洪波，夏庆平，宫彬彬，吴晓蕾.γ-氨基丁酸对盐胁迫下番茄活性氧代谢及叶绿素荧光参数的影响.中国农业科学，2011，44（4）：753-761

[14]《棉花抗逆性及抗病虫性鉴定技术》中国农业科学院棉花研究所主编．北京：中国农业科技出版社，1996

[15]秦嗣军，吕德国，李志霞，马怀宇，刘灵芝，刘国成.水分胁迫对东北ft樱幼苗呼吸等生理代谢

的影响.中国农业科学，2011，44（1）：201-209

[16]桑子阳，马履一，陈发菊．干旱胁迫对红花玉兰幼苗生长和生理特性的影响．西北植物学报，2011, 31（1）：0109- 0115沈黎明．林生ft黧豆体内游离氨基酸与土壤水势的关系．中国草地，1996，4: 43-46

[17]施征，史胜青，钟传飞等.γ- 氨基丁酸在植物抗逆生理及调控中的作用.生命科学研究，

[18] 2007, 11(4)：57- 61

[19]宋红苗，陶跃之，王慧中，徐祥彬. GABA 在植物体内的合成代谢及生物学功能. 浙江农业科学，

2010, 2: 225-8.

[20]孙圆圆，孙永健，吴合洲，马均．水分胁迫对水稻氮素同化酶及光合特性的影响．植物营养与肥料学报，2099，15（5）：1016-1022

[21]覃凤云，吕金印，梁宗锁，ft仑.外源精胺对水分胁迫下小麦幼苗蛋白酶和核糖核酸酶活性的影

响.2004，22(2)：95-99

[22]田华，王兰，段美洋，黎国喜.植物草酸代谢及调控研究进展.现代农业科技，2009, 8:212-214

[23]张木清，陈如凯，余松烈．水分胁迫下叶片多胺代谢变化及其同抗旱性关系．植物生理学报，

1994，22，(3)：327-332．

[24]汪沛洪主编．植物生物化学．北京：中国农业出版社，1995

[25]王月福，姜东，于振文，曹卫星．氮素水平对小麦籽粒产量和蛋白质含量的影响及其生理基础

[J]．中国农业科学，2003，36（3）：513-520

[26]王英，吕德国，秦嗣军，张玉龙，马怀宇，刘国成，孟倩．低温对ft定子和平邑甜茶幼苗根系氮代谢酶及游离氨基酸的影响．园艺学报，2010，37（2）：179-184

[27]王志强，王春丽，王同朝，林同保．钙离子对盐胁迫小麦幼苗氮代谢的影响．生态学报，2009，

29(8)：4339-4345

[28]夏庆平，高洪波，李敬蕊.γ-氨基丁酸( GABA)对低氧胁迫下甜瓜幼苗光合作用和叶绿素荧光参数的影响.应用生态学报，2011，22（4）: 99: 1006

[29]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

[30]熊瑛，吕强，刘素云，陈明灿，李友军。ABA及Ca2+／CaM信使系统对高温逆境下棉苗根系生

长的调控.干旱地区农业研究，2010，28（6）：165–169

[31]谢志玉，张文辉，刘新成．干旱胁迫对文冠果幼苗生长和生理生化特征的影响．西北植物学报，

2010, 30(5)：0948-0954

[32]许振柱，周广胜，王玉辉．干旱和复水对羊草碳氮分配的影响．气象与环境学报，2007, 23（3）：

65-71

[33]杨建昌，张亚洁，张建华，王志琴，朱庆森. 水分胁迫下水稻剑叶中多胺含量的变化及其与抗旱性的关系.作物学报，2004，30（11）:1069-1075

[34]张海娜，方向文，蒋志荣，冯彦皓．柠条平茬处理后不同组织游离氨基酸含量．生态学报，2011，

31(9)：2454-2460

[35]张慧娜，王志强，崔国金，林同保．渗透胁迫下不同抗旱性小麦幼苗氨同化差异．应用生态学报，2009，20（10）：2406-2410

[36]张金政，刘岳路，李晓东，刘洪章，孙国峰，何卿．过量施氮对嵌合体‘金旗’玉簪叶色、氮代谢关键酶活性及叶绿体超微结构的影响．草业学报，2011，20（5）：93-101

[37]张立新，李生秀．水分胁迫下氮、钾对不同基因型夏玉米氮代谢的影响．植物营养与肥料学报，

2007, 13(4)：554-560

[38]张鹏，王飞，张列峰，芮琪，徐朗莱．丝氨酸内肽酶在黄瓜叶片衰老中的作用．植物生理与分子生物学学报，2006，32（5）：593-599

[39]张为民，张钧，邢智峰，姬生栋，胡轶红，徐存拴.五种黄精属植物的蛋白水解酶谱研究.广西植

物，2000，20(1): 64- 68

[40]张玉宵，王孝威，曹慧，刘飞．水分胁迫对桃树叶片氮代谢相关指标的影响．安徽农业科学，

2010, 38(3)：1200-1202

[41]张智猛，万书波，宁堂原，戴良香．氮素水平对花生氮素代谢及相关酶活性的影响．植物生态学报，2008，32（6）：1407-1416.

[42]张志新，邹志荣，张春梅，王云冰，杨建军，燕飞.水分胁迫对番茄幼苗叶片和根系中多胺代谢

的影响.西北农林科技大学学报（自然科学版），2009，37（7）:97-102

[43]周静，汪天，崔键，胡锋，李辉信，张斌．红壤水分条件对柑橘叶片氨基酸及多胺含量的影响．中国生态农业学报，2009, 17（1）：85-89

[44]周小梅，赵运林，周朴华，李小湘，王淑红.水分胁迫下水稻幼苗多胺含量变化与抗旱性的关系.

湖南农业大学学报（自然科学版），2010，36，（1）:17-21

[45]周翔，吴晓岚，李云，张蜀秋.盐胁迫下玉米幼苗ABA和GABA的积累及其相互关系.应用与环境生物学报，2005，11（4）: 412-415

[46] Aaron Fait, Adriano Nunes Nesi, Ruthie Angelovici, Martin Lehmann, Phuong Anh Pham, Luhua Song, Richard P. Haslam, Johnathan A. Napier, Gad Galili, Alisdair R. Fernie. Targeted enhancement of glutamate-to-g-aminobutyrate conversion in Arabidopsis seeds affects carbon-nitrogen balance and storage reserves in a development-dependent manner. Plant Physiology, 2011, 157: 1026–1042

[47] Akama K, Akihiro T, Kitagawa M, Takaiwa F. Rice (*Oryza sativa*) contains a novel isoform of glutamate decarboxylase that lacks an authentic calmodulin-binding domain at the C-terminus. Biochimica et Biophysica Acta, 2001, 1522: 43 -150

[48] Akihito T, Koike S, Tani R, Tominaga T, Watanabe S, Iijima Y, Aoki K, Shibata D, Ashihara

H, Matsukura C, Akama K, Fujimura T, Ezura H. Biochemical Mechanism on GABA Accumulation During Fruit Development in Tomato. Plant Cell Physiol, 2008, 49(9)：1378–1389

[49] Alcázar R, Garcia-Martinez J L, Cuevas J C, Tiburcio A F, Altabella T. Overexpression of ADC2 in Arabidopsis induces dwarfism and late-flowering through GA deficiency. Plant Journal, 2005, 43: 425–436.

[50] Alcázar R, Cuevas J C, Patrón M, Altabella T, TiburcioA F. Abscisic acid modulates polyamine metabolism under water stress in *Arabidopsis thaliana.* Physiologia Plantarum, 2006, 128: 448–455.

[51] Alcázar R, Marco F, Cuevas J C, Patron M, Ferrando A, Carrasco P, Tiburico A F, Altabella T. Involvement of polyamines in plant response to abiotic stress, Biotechnology Letters, 2006, 28: 1867–1876.

[52] Alcázar R, Altabella T, Marco F, Bortolotti C, Reymond M, Koncz C, et al. Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. Planta, 2010, 231(6)：1237-1249.

[53] Arazi T, Baum G, Snedden W A, Shelp B J, Fromm H. Molecular and biochemical analysis of calmodulin interactions with the calmodulinbinding domain of plant glutamate decarboxylase. Plant Physiology, 1995, 108: 551–561.

[54] Babu Y S, Bugg C E, Cook W J. Structure of calmodulin refined at 2.2Åresolution. Molecular

Biology and evolution, 1988, 204: 191–204.

[55] Barbosa J M, Singh N K, Cherry J H, Locy R D. Nitrate uptake and utilization is modulated by exogenousγ-aminobutyric acid in *Arabidopsis thaliana* seedlings. Plant Physiology and Biochemistry, 2010, 48: 443-450

[56] Baum G, Chen Y, Arazi T, Takatsuji H, Fromm H. A plant glutamate decarboxylase containing a calmodulin binding domain. Cloning, sequence, and functional analysis. Biological Chemistry, 1993, 268: 19610–19617.

[57] Baum G, Lev-Yadun S, Fridmann Y, Arazi T, Katsnelson H, Zik M, Fromm H. Calmodulin binding to glutamate decarboxylase is required for regulation of glutamate and GABA metabolism and normal development in plants. EMBO, 1996, 15: 2988–2996.

[58] Bernado P, Mylonas E, Petoukhov M V, Blackledge M, Svergun D I. Structural characterization of

Flexible proteins using small-angle X-ray scattering. J. Am. Chem. Soc, 2007，129, 5656–5664.

[59] Bertoldi M, Cellini B, Clausen T, Voltattorni C B. Spectroscopic and kinetic analyses reveal the pyridoxal 5′-phosphate binding mode and the catalytic features of Treponema denticola cystalysin.

Biochemistry, 2002, 41: 9153–9164.

[60] Beuve N, Rispail N, Laine P, Cliquet J B, Ourry A, Deuneff E L. Putative role of gamma-aminobutyric acid (GABA) as a long-distance signal in up-regulation of nitrate uptake in Brassica napus L. Plant Cell Environ, 2004, 27: 1035-1046.

[61] Bhatnagar P, Minocha R, Minocha S C. Genetic manipulation of the metabolism of polyamines in

Poplar cells. The regulation of putrescine catabolism, Plant Physiology, 2002, 128: 1455–1469.

[62] Blankenhorn D, Phillips J, Slonczewski J L. Acid- and base-induced proteins during aerobic and anaerobic growth of Escherichia coli revealed by two-dimensional gel electrophoresis. Bacteriol, 1999, 181: 2209–2216.

[63] Bouche N, Fait A, Zik M, Fromm H. The root-specific glutamate decarboxylase (GAD1) is essential for sustaining GABA levels in Arabidopsis. Plant Mol. Biol, 2004, 55: 315–325.

[64] Bouche N, Fromm H. GABA in plants: just a metaboliteTrendsPlantScience, 2004, 9: 110–115.

[65] Bouche N, Lacombe B, Fromm H. GABA signaling: a conserved and ubiquitous mechanism. Trends in Cell Biology, 2003, 13: 607-610.

[66] Bouche N, Yellin A, Snedden W A, Fromm H. Plant-specific calmodulin-binding proteins. Annu. Rev. Plant Biol, 2005, 56: 435–466.

[67] Bown A W, Macgregor K B, Shelp B J. Gamma-aminobutyrate: defense against invertebrate pestsTrendsPlantScience, 2006, 11: 424–427.

[68] Breitkreuz K E, Shelp B J. Subcellular compartmentation of the 4-aminobutyrate shunt in protoplasts from developing soybean cotyledons. Plant Physiology, 1995, 108: 99–103.

[69] Breitkreuz K E, Allan W L, Van Cauwenberghe O R, Jakobs C, Talibi D, Andre B, Shelp B J. A novel gamma-hydroxybutyrate dehydrogenase: identification and expression of an Arabidopsis cDNA and potential role under oxygen deficiency. Journal of Biological Chemistry, 2003, 278: 41552-41556.

[70] Cao S, Cai Y, Yang Z, Zheng Y. MeJA induces chilling tolerance in loquat fruit by regulating proline and c-aminobutyric acid contents. Food Chemistry, 2012, 133: 1466–1470

[71] Capitani G, De Biase D, Aurizi C, Gut H, Bossa F, Grutter M G. Crystal structure and functional analysis of Escherichia coli glutamate decarboxylase. EMBO J, 2003, 22: 4027–4037.

[72] Carafoli E. Calcium–a universal carrier of biological signals. FEBS, 2005, 272: 1073–1089.

[73] Clark S M, Leo R D, Dhanoa P K, Van Cauwenberghe O R, Mullen R T, Shelp B J. Biochemical characterization, mitochondrial localization, expression, and potential functions for an Arabidopsisγ-aminobutyrate transaminase that utilizes both pyruvate and glyoxylate. Journal of Experimental Botany, 2009, 60(6)：1743–1757

[74] Crawford L A, Bown A W, Breitkreuz K E, Cuine F C. The Synthesis ofγ- Aminobutyric Acid in Response to Treatments Reducing Cytosolic pH. Plant Physiol, 1994, 104: 865-871

[75] Cuin T A, Shabala S. Amino acids regulate salinity-induced potassium efflux in barley root epidermis. Planta, 2007, 225(3)：753-761

[76] De Biase, D., Tramonti, A., John, R. A. & Bossa, F. (1996). Isolation, overexpression, and biochemical characterization of the two isoforms of glutamic acid decarboxylase from Escherichia coli. Protein Expr. Purif. 8, 430–438.

[77] De Biase D, Tramonti A, Bossa F, Visca P. The response to stationary-phase stress conditions in

Escherichia coli: role and regulation of the glutamic acid decarboxylase system. Mol. Microbiol, 1999, 32: 1198–1211.

[78] Debouba M., Gouia H., Suzuki A., Ghorbel M. H．NaCl stress effects on enzymes involved in nitrogen

Assimilation pathway in tomato" *Lycopersicon esculentum*" seedlings．Journal of Plant Physiology, 2006, 163(12)：1247-1258

[79] Deewatthanawong R, Rowell P, Watkins C B.γ-Aminobutyric acid (GABA) metabolism in CO2

Treated tomatoes. Postharvest Biology and Technology, 2010, 57: 97–105

[80] Dele C, Faes P, Niogret M F, Alain Bouchereau. Effects of the inhibitor of the γ

-aminobutyrate-transaminase, vinyl-gaminobutyrate, on development and nitrogen metabolism in *Brassica napus* seedlings. Plant Physiology and Biochemistr, 2013, 64: 60 - 69

[81] DiTomaso J M, Hart J J, Kochian L V. Transport kinetics and metabolism of exogenously applied putrescine in roots of intact maize seedlings. Plant Physiology 98 (1992) 611–620.

[82] Drum C L, Yan S Z, Bard J, Shen Y Q, Lu D, Soelaiman S. Structural basis for the activation of

Anthrax adenylyl cyclase exotoxin by calmodulin. Nature, 2002, 415: 396–402.

[83] Duca S D, Beninatit S, Serafini-Fracassini D. Polyamines in chloroplasts: identification of their glutamyl and acetyl derivatives. Biochem, 1995, 305: 233-237

[84] Duhaze C, Gouzerh G, Gagneul D, Larher F, Bouchereau A. The conversion of spermidine to putrescine and 1,3-diaminopropane in the roots of Limonium tataricum, Plant Science, 2002, 63: 639–646.

[85] Dutyshev D I, Darii E L, Fomenkova N P, Pechik I V, Polyakov K M, Nikonov S V. Structure of Escherichia coli glutamate decarboxylase (GADalpha) in complex with glutarate at 2.05 angstroms resolution. Acta Crystallogr, 2005, 61: 230–235.

[86] Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, Von H G. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. Journal of molecular biology, 2000, 300(4)：1005-1016.

[87] Eva S R, MaraíM R W, Roís J J, Blasco B, Rosales MÁ，Melgarejo R, Romero L, Ruiz J M．Ammonia production and assimilation: Its importance as a tolerance mechanism during moderate water deficit in tomato plants [J]．Journal of Plant Physiology, 2011, 168(8)：816-823

[88] Fait A, Yellin A, Fromm H. GABA shunt deficiencies and accumulation of reactive oxygen

Intermediates: insight from Arabidopsis mutants. FEBS Letters, 2005, 579: 415–420

[89] Fait A, Nesi A N, Angelovici R, Lehmann M, Pham P A, Song L, Haslam R P, Napier J A, Galili G, Fernie A R. Targeted enhancement of glutamate-to-γ-aminobutyrate conversion in Arabidopsis seeds affects carbon-nitrogen balance and storage reserves in a development-dependent manner. Plant Physiology, 2011, 157: 1026–1042

[90] Fenalti G, Law R H, Buckle A M, Langendorf C, Tuck K, Rosado C J. GABA production by glutamic acid decarboxylase is regulated by a dynamic catalytic loop. Journal of Structural Biology, 2007, 14: 280–286.

[91] Fischer W N. Andréb B, Rentscha D, Krolkiewicza S, Tegedera M, Breitkreuza K, Frommera W B. Amino acid transport in plants. Trends Plant Science, 1998, 3: 188- 195

[92] Hilt W, Wolf D H. Stress induced proteolysis in yeast. Molecular. Microbiology.1992, 6: 2437- 2442

[93] Huffaker R C. Proteolytic activity during senescence of plants. New Phytologist, 1990, 116: 199–231

[94] Garcia S C, Moretti M B, Ramos E, Batlle Z. Carbon and Nitrogen Sources regulate S-Aminolevulinic Acid and y-Aminobutyric Acid Transport in Saccharomyces cerevisiae. Biochem. Cd Bid, 1997, 29(9)：1097-1101

[95] Gill S S, Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiol Bioch. 2010, 48(12)：909-930.

[96] Gloss L M, Kirsch J F. Decreasing the basicity of the active site base, Lys-258, of Escherichia coli aspartate aminotransferase by replacement with gamma-thialysine. Biochemistry, 1995, 34: 3990–3998.

[97] Gout E, Bligny R, Douce R. Regulation of intracellular pH values in higher plant cells. Carbon-13 and phosphorus-31 nuclear magnetic resonance studies, 1992, 267: 13903–13909.

[98] Gut H, Dominici P, Pilati S, Astegno A, Petoukhov M V, Svergun D I, Grütter M G, Capitani

G. A Common Structural Basis for pH- and Calmodulin-mediated Regulation in Plant Glutamate Decarboxylase. J. Mol. Biol, 2009, 392: 334–351

[99] Gut H, Pennacchietti E, John R A, Bossa F, Capitani G, De Bias, D. & Grutter, M. G. Escherichia coli acid resistance: pH-sensing, activation by chloride and autoinhibition in GadB. EMBO J. 2006, 25: 2643–2651.

[100] Han K L, Lee Y, Song J H, Hwang Y S, Lee W S, Kim M W, Kim S H. Enhanced production and secretion of rutin and GABA in immobilized cells of mulberry tree (Morus bombycis K.). Plant Cell Tiss Organ Cult, 2012, 108: 513–520

[101] Handa A K, Mattoo A K. Differential and functional interactions emphasize the multiple roles of

Polyamines in plants. Plant Physiology and Biochemistry, 2010, 48: 540–546.

[102] Hayashi H, Mizuguchi H, Kagamiyama, H. Rat liver aromatic L-amino acid decarboxylase: spectroscopic and kinetic analysis of the coenzyme and reaction intermediates. Biochemistry, 1993, 32: 812–818.

[103] Hoeflich K P, Ikura M. Calmodulin in action: diversity in target recognition and activation mechanisms. Cell, 2002, 108: 739–742.

[104] Honikel K O, Madsen N B. Comparison of the absorbance spectra and fluorescence behavior of phosphorylase b with that of model pyridoxal phosphate derivatives in various solvents. J. Biological Chemistry, 1972, 247: 1057–1064.

[105] Ikushiro H, Hayashi H, Kawata Y, Kagamiyama H. Analysis of the pH- and ligand-induced

Spectral transitions of tryptophanase: activation of the coenzyme at the early steps of the catalytic cycle. Biochemistry, 1998, 37: 3043–3052.

[106] Jakoby W B, Fredericks J. Pyrroline and putrescine metabolism: - aminobutyraldehyde dehydrogenase. Journal of Biological Chemistry, 1959, 234: 2145–2150.

[107] Jansonius J N. Structure, evolution and action of vitamin B6-dependent enzymes. Curr. Opin. Struct. Biol, 1998, 8: 759–769.

[108] Jones D T. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. Molecular biology and evolution, 1999, 292: 195–202.

[109] Jordan B R, Givan C V. Effects of light and inhibitors on glutamate metabolism in leaf discs of

*Vicia faba* L. Plant Physiol, 1979, 64: 1043-1047.

[110] Jose M. Barbosa, Narendra K. Singh, Joe H. Cherry, Robert D. Locy. Nitrate uptake and utilization is modulated by exogenous g-aminobutyric acid in Arabidopsis thaliana seedlings. Plant Physiology and Biochemistry xxx (2010) 1-8

[111] Kaiser W M, Huber S C．Posttranslational regulation of nitrate reductase in higher plants．Plant Physiology, 1994, 106（3）∶817-821

[112] Kaplan F, Kopka J, Haskell D W, Zhao W, Schiller K C, Gatzke N, et al. Exploring the temperature-stress metabolome of Arabidopsis. Plant physiology. 2004, 136(4)：4159-4168.

[113] Kaplan F, Kopka J, Sung D Y, Zhao W, Popp M, Porat R, et al. Transcript and metabolite profiling during cold acclimation of Arabidopsis reveals an intricate relationship of cold-regulated gene expression with modifications in metabolite content. The Plant Journal, 2007, 50(6)：967-981.

[114] Kathiresan A, Miranda J, Chinnappa C C, Reid D M.γ–aminobutyric acid promotes stem

Elongation in *Stellaria longipes*: the role of ethylene. Plant Growth Regulation, 1998, 26: 131–137.

[115] Kevin E. Breitkreuz, Barry J. Shelp, Wolf N. Fischer, Rainer Schwacke, Doris Rentsch. Identi￠cation and characterization of GABA, proline and quaternary ammonium compound transporters from Arabidopsis thaliana. FEBS Letters, 1999, 450: 280-284

[116] Khanna S, Rai V K. Changes in proline level in response to osmotic stress and exogenous amino

Acids in *Raphanus sativus* L. seedlings. Acta Physiologiae Plantarum, 1998, 20(4)：393-397

[117] Khanna S, Rai V K. Changes in proline level in response to osmotic stress and exogenous amino acids in *Raphanus sativus* L. seedlings. Acta physiologiae plantarum, 1998，20，(4) 393-397

[118] Kinnersley A M, Turano F J. Gamma aminobutyric acid (GABA) and plant responses to stress. Crit Rev Plant Sci, 2000, 19(6)：479-509.

[119] Kumar A, Taylor M A, Arif S A M, Davies H V. Potato plants expressing antisense and sense S-adenosylmethionine decarboxylase (SAMDC) transgenes show altered levels of polyamines and ethylene: antisense plants display abnormal phenotypes. Plant Journal, 1996, 9: 147–158

[120] Kumar P P, Thorpe T A. Putrescine metabolism in excised cotyledons of Pinus radiata cultured in

Vitro. Physiologia Plantarum, 1989, 76: 521–526.

[121] Ladha J K, Kirk G J D, Bennett J, Peng S, Reddy C K, Reddy P M, Singh U．Opportunities for increased nitrogen use efficiency from improved lowland rice germplasm．Field Crops Research, 1998, 56(1-2)：41-71

[122] Lesley A. Crawford, Alan W. Bown, Kevin E. Breitkreuz, Fredérique C. Cuine. The Synthesis

Ofγ- Aminobutyric Acid in Response to Treatments Reducing Cytosolic pH. Plant Physiol, 1994, 104: 865-871

[123] Macgregor K B, Shelp B J, Peiris S, Bown A W. Overexpression of glutamate decarboxylase in

Transgenic tobacco plants deters feeding by phytophagous insect larvae. J. Chem. Ecol, 2003, 29: 2177–2182.

[124] Masgrau C, Altabella T, Farrás R, Flores D, Thompson A J, Besford R T, Tiburcio A F.

Inducible expression of oat arginine decarboxylase in transgenic tobacco plants. Plant Journal, 1997, 11:465–473.

[125] Mattoo A K, Minocha S C, Minocha R, Handa A K. Polyamines and cellular metabolism in plants: transgenic approaches reveal different responses to diamine putrescine versus higher polyamines spermidine and spermine. Amino Acids, 2010, 38(2):405-413.

[126] Mattoo A K, Sobolev A P, Neelam A, Goyal R K, Handa A K, Segre A L. Nuclear magnetic

Resonance spectroscopy-based metabolite profiling of transgenic tomato fruit engineered to accumulate spermidine and spermine reveals enhanced anabolic and nitrogen–carbon interactions. Plant Physiology, 2006, 142: 1759–1770.

[127] Mazzucotelli E, Tartari A, Cattivelli L, Forlani G. Metabolism of {gamma} -aminobutyric acid during cold acclimation and freezing and its relationship to frost tolerance in barley and wheat. Journal of Experimental Botany, 2006, 57(14)：3755-3766.

[128] McLean M D, Yevtushenko D P, Deschene A, Van Cauwenberghe O R, Makhmoudova A，

Potter J W. Overexpression of glutamate decarboxylase in transgenic tobacco plants confers resistance to the northern root-knot nematode. Molecular Breeding, 2003, 11: 277–285.

[129] Mehta R A, Cassol T, Li N, Ali N, Handa A K, Mattoo A K. Engineered polyamine accumulation in tomato enhances phytonutrient content, juice quality, and vine life. Nature Biotechnology, 2002, 20: 613–618.

[130] Modulation of Osmotic Closure of Stomata, Stomatal resistance and K+ fluxes by exogenous amino acids in *Vicia faba* L. Leaves. Biochemie und Physiologie der Pflanzen, 1989, 185(5–6)：369–376

[131] Monreal J A, Jiménez E T, Remesal E, Morillo-Velarde R, Garcaí-Mauriño S, EchevarraíC．Proline content of sugar beet storage roots: Response to water deficit and nitrogen fertilization at field conditions．Environmental and Experimental Botany, 2007, 60(2)：257-267

[132] Nakai K, Kanehisa M. A knowledge base for predicting protein localization sites in eukaryotic cells. Genomics, 1992, 14: 897–911

[133] Narayan V S, Nair P M. Metabolism, enzymology and possible roles of 4-aminobutyrate in higher plants. Phytochemistry, 1990, 29(2)：367-375.

[134] Ngoc A T H, Chen Y H, Woo H K, Taek J K. Expanding the active pH range of Escherichia coli glutamate decarboxylase by breaking the cooperativeness. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2013, 115(2)：154-158

[135] Nisreen A A Q, Robert D L, Narendra K S. Implications of paraquat and hydrogen peroxide-induced oxidative stress treatments on the GABA shunt pathway in *Arabidopsis thaliana* calmodulin mutants. Plant Biotechnol Rep, 2011, 5: 225–234

[136] Oh S H, Choi W G. Changes in the Levels ofγ-Aminobutyric Acid and Glutamate Decarboxylase

In Developing Soybean Seedlings. Journal of Plant Research, 2001, 114: 309-313

[137] Oh S H, Choi W G, Lee I T, Yun S J. Cloning and characterization of a rice cDNA encoding glutamate decarboxylase. J. Biochem. Molecular biology and evolution, 2005, 38: 595–601.

[138] Palanivelu R, Brass L, Edlund A F, Preuss D. Pollen tube growth and guidance is regulated by POP2, an Arabidopsis gene that controls GABA levels. Cell, 2003, 114: 47–59.

[139] Petoukhov M V, Svergun D I. Global rigid body modeling of macromolecular complexes against small-angle scattering data. Biophys. 2005, 89: 1237–1250.

[140] Pittmana J K, Shigaki T, Hirschi K D. Evidence of differential pH regulation of the Arabidopsis vacuolar Ca2+/H+ antiporters CAX1 and CAX2. FEBS Letters, 2005, 579: 2648–2656

[141] Rai V K. Role of Amino Acids in Plant Responses to Stresses. Biologia Plantarum,2002, 45(4):481-487

[142] Radivojac P, Vucetic, S, O'Connor T R, Uversky, V N, Obradovic, Z, Dunker A K. Calmodulin

Signaling: analysis and prediction of a disorder-dependent molecular recognition. Proteins: Struct. Funct. Genet., 2006, 63: 398–410.

[143] Rai V K, Kumari A. Modulation of membrane permeability by amino acids in *Vinca*. Experientia，

1983, 39(3)：301-303

[144] Ramanjulu S, Sudhakar C．Drought tolerance is partly related to amino acid accumulation and ammonia assimilation: A comparative study in two mulberry genotypes differing in drought sensitivity．Journal of Plant Physiology, 1997, 150（3）∶345-350

[145] Ramputh A I, Bown A W. Rapid [gamma] - aminobutyric acid synthesis and the inhibition of the

Growth and development of oblique-banded leafroller larvae. Plant Physiolology, 1996, 111: 1349–1352.

[146] Rana U, Rai V K. Modulation of calcium uptake by exogenous amino acids, in Phaseolus vulgaris seedlings. Acta Physiologiae Plantarum, 1996, 18(2)：452-458

[147] Ranieri A, Bernardi R, Lanese P, Soldatini G F. Changes in free amino acid content and protein pattern of maize seedlings under water stress. Environmental and Experimental Botany, 1989, 29(3)：351–357

[148] Rastogi R, Davies P J. Polyamine metabolism in ripening tomato fruit. I. Identification of

Metabolites of putrescine and spermidine. Plant Physiology, 1989, 94: 1449–1455.

[149] Reichow S L, Gonen T. Noncanonical binding of calmodulin to aquaporin-0: implications for channel regulation. Structure, 2008，16, 1389–1398.

[150] Rhodes D, Handa S. Amino Acid Metabolism in Relation to Osmotic Adjustment in Plant Cells. Environmental Stress in Plants, NATO ASI, 1989，(19)：41-62

[151] Robredo A, Usue P L, Jon M A, Lacuesta M, Amaia M P, Alberto M R．Elevated CO2 reduces the drought effect on nitrogen metabolism in barley plants during drought and subsequent recovery．Environmental and Experimental Botany, 2011, 71（3）∶399-408

[152] Santos M G, Pimentel C. Daily balance of leaf sugars and amino acids as indicators of common

Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) metabolic response and drought intensity. Physiol. Mol. Biol. Plants 2009, 15

（1）：23-30

[153] Satyanarayan V, Nair P. Enzymolog and possible roles of 4-aminobutyric in highplants phytochemistry. Phytochmistry, 1990, 29(2)：367-376.

[154] Schwacke R, Grallath S, Breitkreuza K E, LeProT, Stranskya E, Stranskya H, Frommera W B, Rentscha D. LeProT, a transporter for proline, glycine betaine, and r - amnobutyric acid in tomato pollen. Plant Cell, 1999, 11: 377- 391

[155] Shelp B J, Allan W L, Faure D. Role of g -Aminobutyrate and g -Hydroxybutyrate in Plant Communication, Signaling and Communication in Plants, Plant-Environment Interactions, 2009, 73-84,

[156] Shelp B J, Bozzo G G, Trobacher C P, Zarei A, Deyman K L, Brikis C J. Contribution of putrescine to 4-aminobutyrate (GABA) production in response to abiotic stress. Plant Science, 2012, 193–194: 130–135

[157] Shelp B J, Walton C S, Snedden W A, Tuin L G, Oresnik I J, Layzell D B. GABA shunt in developing soybean seeds is associated with hypoxia. Physiol Plantarum, 1995, 94(2):219-228.

[158] Shelp B J, Bown A W, McLean M D. Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid. Trends Plant Sci, 1999, 4(11):446-452.

[159] Shelp B J, Bozzo G G, Trobacher C P, Chiu G, Bajwa V S. Strategies and tools for studying the

Metabolism and function ofγ-aminobutyrate in plants. I. Pathway structure. Botany, 2012, 90: 651-669

[160] Shelp B J. The composition of phloem exudate and xylem sap from broccoli (Brassica oleracea var. italica) supplied with NH4+, NO3- or NH4NO3. journal of experimental botany, 1987, 38: 1619–1636.

[161] Shimajiri Y, Ozaki K, Kainou K, Akama K. Differential subcellular localization, enzymatic

Properties and expression patterns ofγ-aminobutyric acid transaminases (GABA-Ts) in rice (*Oryza sativa*).

Journal of Plant Physiology, 2013, 170: 196–201

[162] Showler A. Effects of water deficit stress, shade, weed competition, and kaolin particle film on selected foliar free amino acid accumulations in cotton, *Gossypium hirsutum* (L.). Journal of Chemical Ecology, 2002，28，(3)：631-651

[163] Simon-Sarkadi L, Kocsy G, VárhegyiÁ，Galiba G, De Ronde J A. Stress-induced changes in

The free amino acid composition in transgenic soybean plants having increased proline content. Biologia plantarum, 2006, 50(4): 793-796

[164] Snedden W A, Arazi T, Fromm H, Shelp B J. Calcium-calmodulin activation of soybean glutamate-decarboxylase. Plant Physiology, 1995, 08: 543–549.

[165] Snedden W A, Koutsia N, Baum G, Fromm H. Activation of a recombinant petunia glutamate decarboxylase by calcium/calmodulin or by a monoclonal antibody which recognizes the calmodulin binding domain. Biological Chemistry, 1996, 271: 4148–4153.

[166] Su G X, Yu B J, Zhang W H, Liu Y L. Higher accumulation ofγ-aminobutyric acid induced by salt stress through stimulating the activity of diamine oxidases in *Glycine max* (L.) Merr. roots. Plant Physiology and Biochemistry, 2007, 45: 560-566

[167] Sukhareva B S, Tikhonenko A S, Darii E L. Study of the quaternary structure of glutamate

Carboxylase from Escherichia coli. Mol. Biol. (Mosk), 1994, 28: 1407–1411.

[168] Srivali B, Renu K C. Drought induced enhancement of protease activity during monocarpic senescence in wheat. Current Science, 1998, 75(11)：1174-1176

[169] Surabhi G K, Reddy A M, Kumari G J, Sudhakar C．Modulations in key enzymes of nitrogen metabolism in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) with differential sensitivity to salt stress．Environmental and Experimental Botany, 2008, 64(2)：171-179

[170] Svergun D I. Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing. Biophy, 1999, 76: 2879–2886.

[171] T. Capell, L. Bassie, P. Christou, Modulation of the polyamine biosynthetic pathway in transgenic rice confers tolerance to drought stress, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101: 9909–9914.

[172] Tanaka O, Nasu Y, Sonoyama A, Maehara Y, Kobayashi T, Nawafune H, Kugimoto M. Effects

Of Exogenous Amino Acids on Iron Uptake in Relation to their Effects on Photoperiodic Flowering in

*Lemna paucicostata* 6746. Plant and Cell Physiology, 1987, 28(4)：697-702.

[173] Trobachera C P, Clarka S M, Bozzoa G G, MullenbR T, DeEllc J R, Shelp B J. Catabolism of GABA in apple fruit: Subcellular localization and biochemical characterization of twoγ-aminobutyrate transaminases. Postharvest Biology and Technology, 2013, 75: 106–113

[174] Tuin L G, Shelp B J.. In situ [14C] Glutamate Metabolism by Developing Soybean Cotyledons

II. The Importance of Glutamate Decarboxylation. J. PlAnt PhysioL, 1996, 147: 714-720

[175] Turano F J, Fang T K. Characterization of two glutamate decarboxylase cDNA clones from Arabidopsis. Plant Physiology, 1998, 117: 1411–1421.

[176] Ueno H. Enzymatic and structural aspects on glutamate decarboxylase. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2000, 10: 67–79

[177] UranoK, Yoshiba Y, Nanjo T, Ito T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. Arabidopsis stress-inducible gene for arginine decarboxylase AtADC2 is required for accumulation of putrescine in salt tolerance. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004, 313: 369–375.

[178] Urano K, Yoshiba Y, Nanjo T, Igarashi Y, Seki M, Sekiguchi F, Yamaguchi- Shinozaki K，

Shinozaki K. Characterization of Arabidopsis genes involved in biosynthesis of polyamines in abiotic stress responses and developmental stages. Plant, Cell & Environment, 2003, 26: 1917–1926.

[179] Van Cauwenberghe O R, Shelp B J. Biochemical characterization of partially purified gaba: pyruvate transaminase from *Nicotiana tabacum.* Phytochemistry, 1999, 52: 575-581

[180] Van Cauwenberghe O R, Makhmoudova A, McLean M D, Clark S, Shelp B J. Plant pyruvate-dependent gamma-aminobutyrate transaminase: identification of an Arabidopsis cDNA and its expression in *Escherichia coli*. Canadian Journal of Botany, 2002, 80: 933–941

[181] Vazquez Segura M A, Donoso, J, Munoz F, Garcia B F, Garcia d V, Echevarria, G. (1994).

Photophysical study of the Schiff bases of 5′-deoxypyridoxal and n-hexylamine in cationic micelles. Photochemistry and photobiology, 1993, 60, 399–404.

[182] Vetter S W, Leclerc E. Novel aspects of calmodulin target recognition and activation. Eur. J. Biochem, 2003, 270: 404–414.

[183] Vierstra R D. Protein degradation in plants. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1993, 44: 385–410

[184] Wang H L, Lee P D, Liu L F, Su J C. Effect of sorbitol induced osmotic stress on the changes of

Carbohydrate and free amino acid pools in sweet potato cell suspension cultures. Bot. Bull. Acad. Sin, 1999, 40: 219-225

[185] WANG Hua-Jing, WU Liang-Huan, WANG Min-Yan, ZHU Yuan-Hong, TAO Qin-Nan，

ZHANG Fu-Suo. Effects of Amino Acids Replacing Nitrate on Growth, Nitrate Accumulation, and Macroelement Concentrations in Pak-choi (*Brassica chinensis* L.).

[186] Wilhelmi L K, Preuss D. Self-sterility in Arabidopsis due to defective pollen tube guidance.

Science, 1996, 274: 1535–1537.

[187] Yan H, Hu X, Li F. Leaf photosynthesis, chlorophyll fluorescence, ion content and free amino acids in Caragana korshinskii Kom exposed to NaCl stress. Acta Physiol Plant, 2012，DOI 10.1007/s11738-012-1029-4

[188] Yang C W, Lin C C, Kao C H. Proline, ornithine, arginine and glutamic acid contents in detached rice leaves. Biologia Plantarum, 2000, 43(2)：05-307

[189] Yang R, Guo Q, Gu Z. GABA shunt and polyamine degradation pathway onγ-aminobutyric acid accumulation in germinating fava bean (*Vicia faba* L.) under hypoxia. Food Chemistry, 2013, 136: 152–159

[190] Yang T B, Poovaiah B W. Calcium/ calmodulin-mediated signal network in plants. Trends Plant Science, 2003, 8: 505–512.

[191] Yang R, Yin Y, Guo Q, Gu Z. Purification, properties and cDNA cloning of glutamate decarboxylase in germinated faba bean (*Vicia faba* L.). Food Chemistry, 2013, 138: 1945–1951

[192] Yap K L, Yuan T, Mal T K, Vogel H J, Ikura M. Structural basis for simultaneous binding of two carboxy-terminal peptides of plant glutamate decarboxylase to calmodulin. J. Mol. Biol, 2003, 328, 193–204.

[193] Yutaka Kato, Nobutaka Imamura. Effect of calcium ion on uptake of amino acids by symbiotic

*Chlorella* F36-ZK isolated from Japanese *Paramecium bursaria*. Plant Science 174 (2008) 88–96

[194] Zhang H, Yao H, Chen F, Wang X. Purification and characterization of glutamate decarboxylase from rice germ. Food Chemistry, 2007, 101: 1670–1676

[195] Zhang J, Cheltsov A V, Ferreira G C. Conversion of 5-aminolevulinate synthase into a more active enzyme by linking the two subunits: spectroscopic and kinetic properties. Protein Science, 2005, 14, 1190–1200.

[196] Zhi-Qiang W, Yong-Ze Y, Ji-Quan O, Qing-Hua L, Chu-Fu Z．Glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase contribute differentially to proline accumulation in leaves of wheat (*Triticum aestivum*) seedlings exposed to different salinity．Journal of Plant Physiology, 2007, 64(6)：695-701

[197] Zhou X, Toney M D. pH studies on the mechanism of the pyridoxal phosphate-dependent

Dialkylglycine decarboxylase. Biochemistry, 1999, 38: 311–320.

[198] Zik M, Fridmann-Sirkis, Y. & Fromm H. Cterminal residues of plant glutamate decarboxylaseare required for oligomerization of a high-molecular weight complex and for activation by calcium/ calmodulin. Biochim. Biophys. Acta, 2006, 1764: 872–876.

[199] Zik M, Arazi T, Snedden W A, Fromm H. Two isoforms of glutamate decarboxylase in

Arabidopsis are regulated by calcium/calmodulin and differ in organ distribution. Plant Molecular Biology, 1998, 37: 967–975.

致谢

本研究是在导师张旺锋教授和梁宗锁教授的悉心指导下完成的。从试验选题、内容设计、方案实施到数据分析及论文的撰写，无不倾注着两位导师辛勤的汗水和大量的心血，值此论文完成之际，谨向导师致以最崇高的敬意和最真诚的感谢！两位导师导师渊博的学识、活跃的学术思想、严谨求真的治学态度、求实创新的科学精神、真诚善良和宽厚待人的人格魅力以及忘我的工作作风，深深地感染了我，使我受益终生。两位导师导师的睿智、严谨、谦虚、正直，对科研孜孜以求的精神，将是我今后工作学习中的楷模！

衷心感谢西北农林科技大学副校长王跃进教授在博士学习期间对我的鼓励和帮助。是您教导我感恩导师，尊敬导师，虚心向导师学习，认真做好论文。是您教会了我心胸开阔，不计较个人得失，大胆向前。每当精神最脆弱的时候，想到您，我就振作了起来。值此之际，谨向您致以最崇高的敬意和最真诚的感谢！

衷心感谢石河子大学农学院马富裕教授、梁永超教授、向本春教授、张凤华教授、危常州教授、吕新教授、在论文开题和中期考核过程中提出的宝贵意见和建议，使论文得以顺利完成。

衷心感谢本课题组的勾玲副教授、罗宏海副教授和张亚黎副教授，西北农林科技大学生命科学学院慕自新副教授、武永军副教授、郝文芳副教授、吕金印教授、康靖全高级实验师、蒲鹏老师、段慧老师和张林生教授对我在学习和试验过程中的很多困惑和棘手的问题给予了及时的、肯定的意见和建议，以及在论文写作过程中对论文写作思路的指引、框架的构建及完善给予了建设性的意见和帮助。

衷心感谢西北农林科技大学图书馆赵惠清副研究馆员、杨新成老师、陈建文老师和农学院许喜棠副研究员在论文写作过程中对论文写作思路的指引、框架的构建及完善给予了建设性的意见、帮助、支持和鼓励。

衷心感谢石河子大学许兰萍处长在博士学习期间对我的帮助。

衷心感谢石河子大学农学院莫文萍老师在博士学习期间对我的帮助。

衷心感谢本课题组的博士研究生胡渊渊、陶先萍、张前兵，占东霞，硕士研究生薛军、姚贺盛、易小平、田景ft，在文献查阅、试验方案讨论、数据分析方法学习、试验汇报过程中，给予的支持和帮助。

衷心感谢西北农林科技大学生命科学学院博士生朱卫宁、硕士生吴洁云和园艺学院硕士生杜杨建在论文实验与写作过程中的帮助。

衷心感谢我的父母、妻子、弟弟、妹妹、岳父、岳母对我的支持、理解、鼓励以及无私的关爱。而直到今天我所能做的只是在此向你们表示感激之情，惭愧之心，难以言表，希望我今后能做得更好，以报答这人世间最伟大的亲情！

至此论文完成之际，谨向所有关心和帮助过我的老师、同学、朋友和亲人表示最诚挚的谢意！祝你们幸福、快乐！

曹让

2013年5月于石河子

## 作者简介

曹让，1984年7月至今在西北农林科技大学生命科学学院工作；2000年9月至2004年7月，

在西北农林科技大学生命科学学院攻读硕士学位；2005年9月至2013年7月，在石河子大学农学院攻读博士学位。

在学期间发表的主要研究论文如下：

1、曹让，梁宗锁，吴洁云，张旺锋，许加．干旱胁迫及复水对棉花叶片氮代谢的影响．核农学报，

2013，27(2)：231-239．

2、曹让，梁宗锁，吴洁云，张旺锋．干旱胁迫及复水对棉花幼苗根系氮代谢的影响．水土保持学报，

2012，6: 274-285．

3、曹让，张林生，张旺锋，梁宗锁．用氨基酸分析仪分析棉花叶片中的谷胱甘肽含量．植物生理学通讯，2007, 43（4）：761-764．

4、曹让，张林生，兰晓继．氨基酸分析仪管理使用之经验点滴．现代仪器，2007，3: 57-59

5、戴明，邓西平，杨淑慎，曹让，郭宏波，张芳．水分胁迫对不同基因型小麦幼芽蛋白质表达和某些生理特性的影响．应用生态学报，2009，9（3）：179-187

6、武永军，曹让，应旭霞，梁宗锁．Hg胁迫对两种基因型小麦生长及其过氧化物酶活性的影响．西北农业学报2009, 18（6）：171- 174

7、武永军，项燕，曹让，王培先，梁宗锁．干旱胁迫下蚕豆叶片抗氧化酶活性的变化．干旱地区农业研究，2009，27（5）：188- 192



石河子大学博士研究Th学位论文

## 导师评阅表

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 研究生姓名 | 曹让 | 学制 | 3 年 |
| 专业 | 作物栽培学与耕作学 | 研究方向 | 作物高产生理生态 |
| 学术评语:  新疆干旱区约占全国干旱区总面积的 50%，是我国最主要的干旱区，水资源缺乏是制约新疆农业可持续发展的重要因素。棉花是新疆最重要的经济作物，研究棉花适应干旱逆境的能力，探讨棉花抗逆生理生态机制，培育耐旱品种，已成为新疆现代植棉业迫切需要解决的重要问题。  曹让博士的学位论文选择抗旱性不同的 2 个棉花品种进行干旱胁迫处理，对棉花幼苗的叶片和根系中γ-氨基丁酸（GABA）代谢关键酶、与氮代谢密切相关的多胺以及硝酸还原酶等进行了检测分析，并通过实验分析了谷氨酸脱羧酶（GAD）的作用， 阐明了干旱胁迫下，棉花叶片中多胺 Put、Spd 和 Spm 含量增加，多胺降解途径在一定程度影响 GABA 形成，外源 GABA 能显著降低棉花叶片和根系中的内肽酶活性。耐旱型棉花品种具有较强的铵离子同化能力，增加了渗透调节物质游离氨基酸含量，特  别是脯氨酸含量能增强其耐旱性，GAGB 含量与干旱胁迫下的氮代谢密切相关。研究结果对棉花抗逆栽培及抗逆品种选育、指导新疆棉花生产具有重要的理论价值。  论文试验设计合理，研究方案可行，试验方法先进。试验实施工作细致，结果可信。论文写作结构严谨，文笔通畅，表明该生具有扎实的基础理论知识和试验技能， 具备独立开展科学研究的能力。论文整体上达到了博士学位论文水平，建议通过答辩后授予博士学位。  指导教师签字：年 月 日 | | | |