

外源 NO 对干旱胁迫下板蓝根叶片 氧化损伤的保护作用

毛亚斌¹, 魏小红²

(1. 甘肃农业大学农学院, 甘肃 兰州 730070; 2. 甘肃农业大学生命科学技术学院, 甘肃 兰州 730070)

摘要:采用 10% 的聚乙二醇 6 000 对板蓝根(*Strobilanthes cusia*) 叶片进行干旱胁迫处理 8 d, 并添加不同浓度的一氧化氮(NO) 供体硝普钠(SNP), 研究外源 NO 处理对干旱胁迫下板蓝根叶片氧化损伤的影响。结果表明, 随着干旱胁迫的加强, 外源 NO 处理促进干旱胁迫下板蓝根叶片脯氨酸(Pro) 积累和可溶性糖含量的提高, 且低浓度的 NO 能提高 SOD 酶和 POD 酶的活性, 而高浓度的 NO 则抑制这 2 种酶的活性。相同处理下丙二醛(MDA) 含量的变化都呈现下降趋势, 而低浓度的 SNP 使 MDA 含量下降的更大。表明外源 NO 处理提高了板蓝根的抗旱性。

关键词:一氧化氮; 板蓝根; 干旱胁迫

中图分类号:Q945; R282. 2

文献标识码:A

文章编号:1001-0629(2010)06-0097-05

*¹ 一氧化氮(Nitric Oxide, NO) 是广泛分布于生物体的一种气体类生物活性分子, 是植物体重要的生物活性分子, 植物体内通过酶促和非酶促途径产生 NO^[1-3]。NO 作为信号分子参与了植物适应逆境的生理调节过程, 适宜浓度的 NO 能够提高植物对环境的适应能力^[4]。樊怀福等^[5] 研究认为 NO 可缓解盐胁迫对黄瓜(*Cucumis sativus*) 造成的伤害, 提高其生长量和抗氧化酶活性; 王罗霞等^[6] 研究表明低浓度 NO 能够对渗透胁迫下小麦(*Triticum aestivum*) 叶片膜脂过氧化有明显的缓解效应; 马向丽等^[7] 研究表明外源 NO 可显著诱导温度胁迫下一年生黑麦草(*Lolium multiflorum*) 叶片脯氨酸、可溶性糖的积累, 表明外源 NO 可通过调节渗透物质代谢来缓解温度胁迫对黑麦草幼苗造成的伤害。

板蓝根(*Strobilanthes cusia*) 是两年生十字花科植物, 在我国板蓝根产区, 水资源紧缺已成为影响板蓝根高产的主要限制性因素之一, 提高板蓝根的抗旱能力是我国当前乃至今后相当长一段时期内所面临的重大科研课题和关键技术问题。目前研究 NO 提高植物的抗逆性, 多以大田作物为材料, 在板蓝根上少有报道, 本研究以定西板蓝根为材料, 通过外源喷施 NO, 研究干旱胁迫板蓝

根叶片的膜脂过氧化特性和抗氧化酶活性, 探讨 NO 对板蓝根抗旱性的保护作用。

1 材料和方法

1.1 材料 试验材料为定西板蓝根, 选取籽粒饱满、大小均匀的板蓝根种子, 用 0.1% HgCl₂ 消毒 10 min 后, 用自来水冲洗 30 min, 然后置于 25 °C 恒温箱中浸种 48 h。按照板蓝根的播种技术, 播种于花盆中, 土壤预先高压灭菌, 为营养土。2009 年 3 月 26 日种植于花盆中, 每盆一株, 共 70 盆, 花盆直径 25 cm, 高 17 cm, 当每棵苗长出 10~14 枝分枝时, 采用 10% 的聚乙二醇 6 000 (PEG 6 000) 对板蓝根根部进行轻度干旱胁迫处理, 用不同浓度的硝普钠(SNP) 溶液喷洒叶片, 喷后用塑料薄膜保湿 2~3 h, 连续喷施 3 d, 对照喷施蒸馏水。每个处理 3 盆, 3 次重复, 进行 NO 处理。T₀: 蒸馏水, CK; T₁: 10% (w/v) PEG 6 000; T₂: 200 μmol/L SNP + 10% (w/v) PEG 6 000; T₃: 500 μmol/L SNP + 10% (w/v) PEG 6 000;

收稿日期: 2009-12-24

基金项目: 甘肃省教育厅资助项目(0702-14; 032B-01)

作者简介: 毛亚斌(1982-), 男, 甘肃文县人, 在读硕士生, 主要从事植物生理与分子生物学研究。

E-mail: gsaumyb@163.com

通信作者: 魏小红 E-mail: weixh@gsau.edu.cn

T4:1 000 $\mu\text{mol/L}$ SNP+10% (w/v) PEG 6 000;
T5:1 500 $\mu\text{mol/L}$ SNP +10% (w/v) PEG 6 000;
T6:2 000 $\mu\text{mol/L}$ SNP +10% (w/v) PEG 6 000。
处理 8 d 后分别取生长一致的各处理组板蓝根叶片测定相关生理生化指标。

1.2 试剂 NO 供体硝普钠 (SNP, 购自 Sigma 公司) 现用现配, 即用蒸馏水配制 50 mmol/L SNP 母液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 用时按实验所需的浓度进行稀释。

1.3 生理生化指标的测定 基于上述处理, 分别于干旱胁迫前、干旱胁迫后采板蓝根叶片进行相关生理生化指标测定。SOD 活性测定采用氮蓝四唑 (NBT) 光化还原抑制法, 以抑制 NBT 光化还原的 50% 为 1 个酶活性单位 (U)^[8]; POD 活性测定采用愈创木酚法, 以每分钟内 470 nm 下的光密度变化 0.01 为 1 个 POD 活性单位 (U)^[9]; MDA 含量的测定采用 Predieri 等方法^[10]; 脯氨酸 (Pro) 含量的测定采用磺基水杨酸法^[11]; 可溶性糖含量的测定采用蒽酮法^[11]。

1.4 数据处理 对所有数据进行方差分析, 处理间的差异显著性用新复极差 (Duncan) 检验。整个计算过程在 SPSS13.0 和 EXCEL2003 软件系统下完成。

2 结果与分析

2.1 不同浓度 SNP 对 SOD 的影响 如图 1 所示, 10% PEG 6 000 单独处理时 (T1), 板蓝根叶片 SOD 酶活性高于对照 (T0), T1 的 SOD 活性较对照苗增加了 20.51%; 与 T0 相比, 胁迫期

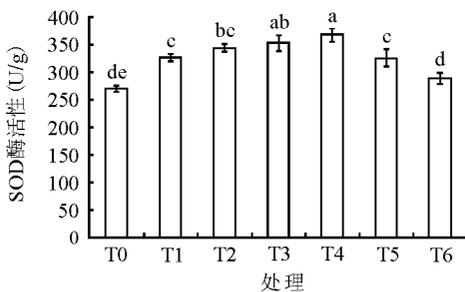


图 1 不同浓度 SNP 处理对 SOD 酶活性的影响

注: 不同字母表示不同处理之间方差分析结果的差异显著性 ($P < 0.05$, $n=3$)。下同。

间不同浓度 SNP 处理之间 SOD 酶活性有差别, 相对于 T0, T2、T3、T4、T5、T6 的 SOD 活性较对照苗分别增加了 26.98%、30.93%、36.39%、20.45%、6.78%, 均显著高于对照苗 ($P < 0.05$), 其中 1 000 $\mu\text{mol/L}$ SNP 处理的 SOD 酶活性达到最高。多重比较结果表明, 干旱胁迫下不同浓度的 SNP 处理, 低浓度 SNP 使 SOD 活性上升, 高浓度 SNP 使 SOD 活性下降, 呈现明显的梯度。说明随着 SNP 处理浓度的增大, 外源 NO 的保护作用逐渐降低或消失。

2.2 不同浓度 SNP 对 POD 活性的影响

如图 2 所示, 10% PEG 6 000 单独处理时 (T1), 板蓝根叶片 POD 酶活性高于对照 (T0), T1 的 POD 活性较对照苗增加了 11.97%; 与 T0 相比, 胁迫期间不同浓度 SNP 处理之间 POD 酶活性有差异。相对于 T0, T2、T3、T4、T5 的 POD 活性较对照苗分别增加了 59.34%、85.08%、157.38%、141.48%, 均显著高于对照苗 ($P < 0.05$), 其中 1 000 $\mu\text{mol/L}$ SNP 处理 POD 酶活性达到最高。而 T6 的 POD 活性较对照苗下降了 6%, 说明外源 NO 的保护作用已消失, 板蓝根叶片抗氧化酶活性已低于对照苗的水平。多重比较结果表明, 不同浓度 SNP 处理组间对 POD 酶活性趋势存在显著差异, 低浓度 SNP 使 POD 活性上升, 高浓度 SNP 使 POD 活性下降, 呈现明显的梯度。表明外源 NO 在干旱胁迫下提高了板蓝根叶片抗氧化酶的活性, 降低了细胞膜的通透性, 消除了自由基, 以此来减少干旱胁迫造成的伤害。

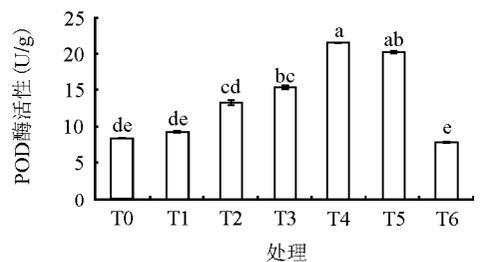


图 2 不同浓度 SNP 处理对 POD 酶活性的影响

2.3 不同浓度 SNP 对丙二醛含量的影响

如图 3 所示, 10% PEG 6 000 单独处理时 (T1), 板蓝根叶片 MDA 含量高于对照 (T0), T1 的

MDA 含量较对照苗增加了 59.75%;与 T0 相比,不同浓度 SNP 处理之间丙二醛含量存在着显著差异,T2、T3、T4、T5、T6 的 MDA 含量较对照苗分别增加了 29.14%、27.82%、18.6%、31.18%、37.68%,均显著高于对照苗 ($P < 0.05$),其中 1 000 $\mu\text{mol/L}$ SNP 处理 MDA 含量达到最低。多重比较结果表明,不同浓度 SNP 处理组间 MDA 含量趋势存在显著差异,MDA 含量都呈现下降趋势,而低浓度的 SNP 使 MDA 含量下降的更大。表明外源 NO 在缓解干旱胁迫下板蓝根叶片膜脂过氧化过程中具有重要作用。

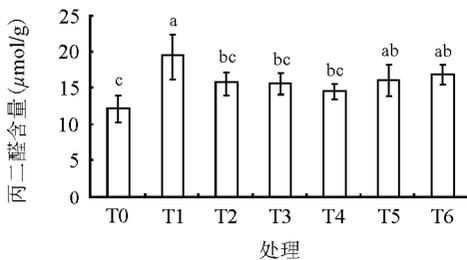


图3 不同浓度 SNP 处理对丙二醛含量的影响

2.4 不同浓度 SNP 对 Pro 含量的影响

Pro 是植物重要的渗透调节和抗氧化物质,干旱胁迫使 Pro 含量积累。如图 4 所示,10% PEG6 000 单独处理时 (T1),板蓝根叶片 Pro 含量高于对照 (T0),胁迫苗的 Pro 含量比对照苗提高了 4.29%。叶片经 SNP 处理后与 T0 相比,T2、T3、T4、T5、T6 的 Pro 含量较对照苗分别增加了 17.43%、52.61%、112.04%、198.35%、211.61%,且 T3、T4、T5、T6 均显著高于对照苗 ($P < 0.05$)。多重比较分析,胁迫期间 Pro 含量随着 SNP 处理浓度的增大而增加,差异显著,Pro 含量呈现上升的梯度。可见 SNP 处理可以显著

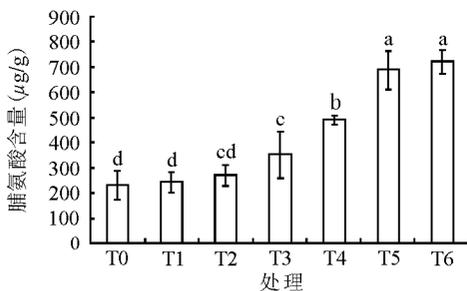


图4 不同浓度 SNP 处理对脯氨酸含量的影响

诱导 Pro 的积累,提高干旱胁迫下板蓝根叶片的渗透保护能力,通过调节渗透物质代谢缓解干旱胁迫对板蓝根叶片造成的伤害。

2.5 不同浓度 SNP 对可溶性糖含量的影响

可溶性糖也是植物重要的渗透调节物质。如图 5 所示,10% PEG 6 000 单独处理时 (T1),板蓝根叶片可溶性糖含量高于对照 (T0),与 T0 相比,胁迫期间不同浓度 SNP 处理之间可溶性糖含量有差别。相对于 T0,T1 的可溶性糖含量较对照苗增加了 21.47%;而 T2、T3、T4、T5、T6 的可溶性糖含量较对照苗分别增加 43.27%、47.7%、55.19%、66.1%、96.08%,均显著高于对照苗,胁迫期间板蓝根叶片中可溶性糖含量呈上升的趋势。说明外源 NO 可以提高干旱胁迫下板蓝根叶片的渗透保护能力。

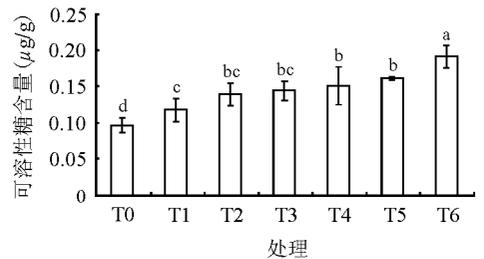


图5 不同浓度 SNP 处理对可溶性糖含量的影响

3 讨论

植物遭受逆境胁迫伤害的主要特征之一是活性氧代谢的失调^[12-13],生物膜在植物逆境胁迫研究中占重要地位。许多研究证实生物膜与植物抗性关系密切^[14]。在正常条件下,植物体内活性氧的产生与清除处于动态平衡的状态,由于细胞内自由基浓度很低,不会对植物造成伤害。但当植物遭受到逆境胁迫时,体内活性氧的产生与清除之间的平衡被破坏,引发膜脂过氧化反应,从而引起膜的渗漏,使细胞膜透性增强^[15]。干旱胁迫初期板蓝根叶片中 SOD、POD 酶活性显著提高,是板蓝根对干旱的一种自身适应和调节的能力。干旱胁迫导致活性氧含量增加,板蓝根通过提高酶活性及时清除干旱胁迫产生的活性氧,降低了细胞膜的透性,消除自由基。SOD 和 POD 是植物体内自由基清除系统的 2 种主要酶,它们活性的

变化在一定程度上反映了机体内自由基的代谢概况^[16]。试验结果表明,在不同浓度 SNP 处理下,板蓝根叶片 SOD、POD 的活性变化不同,低浓度的 NO 能提高 SOD 和 POD 的活性,而高浓度的 NO 则抑制这 2 种酶的活性,1 000 $\mu\text{mol/L}$ 的 SNP 处理的效果最为显著。说明外源 NO 能一定程度提高抗氧化能力,并呈现浓度效应。这进一步证实了 NO 具有二元性功能,即低浓度下具有保护作用,而高浓度 NO 则对细胞产生伤害^[17]。

丙二醛(MDA)是植物在遭受逆境伤害时细胞膜发生膜脂过氧化作用形成的最终分解产物之一^[18]。干旱胁迫促进植物细胞的膜脂过氧化,使 MDA 含量增加,从而导致膜的稳定性降低,膜透性增大。本试验结果表明,干旱胁迫下板蓝根叶片中 MDA 含量增加,且干旱胁迫程度越严重脂质过氧化作用产物 MDA 就越多,从而对细胞膜伤害就越严重,细胞膜透性增大。外源 NO 处理可以降低 MDA 的含量,抑制脂质过氧化作用,减轻干旱胁迫对板蓝根叶片的伤害程度。MDA 含量的高低是反映细胞脂质过氧化作用强弱和质膜破坏程度的重要指标^[19]。试验结果表明,外源低浓度 NO 供体可以明显缓解干旱胁迫所造成的板蓝根叶片膜脂过氧化,1 000 $\mu\text{mol/L}$ 的 SNP 处理可以显著降低叶片 MDA 含量,从而避免膜脂过氧化的羟自由基大量生成。相反,较高浓度 SNP 处理则不明显,表明 NO 的生理效应与其浓度有关,这与 Beligni 和 Lamattina^[20] 和王宪叶等^[21] 的结论基本一致。通过分析干旱胁迫下外源 NO 处理对板蓝根叶片细胞膜透性和脂质过氧化作用的影响,外源 NO 处理降低了干旱胁迫下板蓝根叶片细胞膜的膜相对透性及丙二醛的积累。说明外源 NO 对细胞膜具有良好的保护或修复作用,可减轻或防止细胞膜系统的伤害,从而缓解膜透性增大和离子外渗,进一步证明了 NO 对细胞膜结构的保护作用。

干旱胁迫下,植物细胞水分会发生亏缺,细胞则会主动形成渗透调节物质,如 Pro、可溶性糖等,可以使细胞保持适当的渗透势而防止脱水,同时对生物分子的结构和功能起到稳定和保作

用^[22]。提高溶质浓度,降低水势,以利于从外界获得水分,从而适应不良环境。Pro 是广泛存在的渗透剂,植物体内的 Pro 含量的增加,一定程度上反映了植物的抗逆性。可溶性糖在植物的渗透调节中也起着重要作用。干旱胁迫下渗透调节物质的积累是植物适应性及损伤反应的一种选择性结果。本试验研究发现,外源 NO 处理的板蓝根叶片在干旱胁迫下其脯氨酸及可溶性糖含量增加明显高于对照,脯氨酸和可溶性糖含量的增大使植物具有一定抗性。本试验结果较好地反映了外源 NO 可显著诱导脯氨酸和可溶性糖的积累,提高干旱胁迫下板蓝根叶片的渗透保护能力,缓解干旱胁迫对板蓝根叶片造成的伤害。

参考文献

- [1] Chandokm R, Ytterberg A J, Van Wijk K J. The pathogen-inducible nitric oxide synthase (iNOS) in plants is variant of the protein of the glycine decarboxylase complex[J]. *Cell*, 2003, 113(4): 1380-1384.
- [2] Wojtaszek O. Nitric oxide in plants to NO or not to NO[J]. *Phytochemistry*, 2000, 54(1): 1-4.
- [3] 李源, 李金娟, 魏小红. 镉胁迫下蚕豆幼苗抗氧化能力对外源 NO 和 H_2O_2 的响应[J]. *草业学报*, 2009, 18(6): 186-191.
- [4] Beligni M V, Lamattina L. Nitric oxide counteracts cytotoxic processes mediated by reactive oxygen species in plant tissues[J]. *Planta*, 1999, 208: 337-344.
- [5] 樊怀福, 郭世荣, 焦彦生, 等. 外源一氧化氮对 NaCl 胁迫下黄瓜幼苗生长、活性氧代谢和光合特性的影响[J]. *生态学报*, 2007, 27(2): 546-557.
- [6] 王罗霞, 赵志光, 王锁民. 一氧化氮对水分胁迫下小麦叶片活性氧代谢及膜脂过氧化的影响[J]. *草业学报*, 2006, 15(4): 104-108.
- [7] 马向丽, 魏小红, 龙瑞军, 等. 外源一氧化氮提高一年生黑麦草抗冷性机制[J]. *生态学报*, 2005, 25(6): 126-127.
- [8] 王爱国, 罗广华, 邵从本, 等. 大豆种子超氧化物歧化酶的研究[J]. *植物生理学报*, 1983, 9(9): 77-83.
- [9] Gong H J, Zhu X Y, Chen K M, *et al.* Silicon alleviates oxidative damage of wheat plants in pots under drought[J]. *Plant Science*, 2005, 169: 313-321.

- [10] Predieri S, Norman M A, Krizek D T, *et al.* Influence of UV-B radiation on membrane lipid composition and ethylene of evolution in 'Doy-enned' 'Hiver' pear shoots grown in vitro under different photosynthetic photo fluxes[J]. *Environmental and Experimental Botany*, 1995, 35:152-260.
- [11] 邹琦, 赵世杰, 王忠, 等. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000(7): 111-112, 161-162.
- [12] Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels [J]. *Analytical biochemistry*, 1971, 44(1):276-287.
- [13] Navari-Izzo F, Quartacci M F, Sgherri C M. Superoxide generation in relation to dehydration and rehydration [J]. *Biochemical Society Transactions*, 1996, 24:447-451.
- [14] 王志勇, 廖丽, 王幸斌, 等. 磷钾肥和多效唑对高羊茅越夏性的影响研究 II. 高温对高羊茅叶片中膜系统和抗坏血酸含量的影响[J]. *草业科学*, 2006, 23(8):89-92.
- [15] 张庆峰, 徐胜, 李建龙. 高温胁迫下高羊茅生理生化特性研究[J]. *草业科学*, 2006, 23(4):26-28.
- [16] 刘鸿先, 曾韶西, 王以柔. 低温对不同耐寒力黄瓜幼苗子叶各细胞器官中 SOD 的影响[J]. *植物生理学报*, 1985, 11(1):46-57.
- [17] Beligni M V, Lamattina L. Nitric oxide in plants: the history is just beginning[J]. *Plant Cell Environment*, 2001, 24:267-278.
- [18] 姜义宝, 王成章, 李德峰. 高温胁迫下苜蓿抗氧化系统及叶绿素含量对草酸的响应[J]. *草业科学*, 2008, 25(2):55-59.
- [19] 柯世省. 土壤干旱胁迫对云锦杜鹃水分利用率的影响[J]. *河南师范大学学报(自然科学版)*, 2007, 27(2):150-153.
- [20] Beligni M V, Lamattina L. Nitric oxide: a non-traditional regulator of plant growth [J]. *Trend in Plant Science*, 2001(6):508-509.
- [21] 王宪叶, 沈文飏, 徐朗莱. 外源一氧化氮对渗透胁迫下小麦幼苗叶片膜脂过氧化的缓解作用[J]. *植物生理与分子生物学学报*, 2004, 30(2):195-200.
- [22] 田晓艳, 刘延吉, 郭迎春. 盐胁迫对 NHC 牧草 Na⁺、K⁺、Pro、可溶性糖及可溶性蛋白的影响[J]. *草业科学*, 2008, 25(10):34-38.

Effects of exogenous nitric oxide on lipid peroxidation antioxidant fluorescence of *Isatis indigotica* leaves under drought stress

MAO Ya-bin¹, WEI Xiao-hong²

(1. College of Agronomy, Gansu Agricultural University, Gansu Lanzhou 730070, China;

2. School of Life Science and Technology, Gansu Agricultural University, Gansu Lanzhou 730070, China)

Abstract: Combination of adding the exogenous NO donor sodium nitroprusside (SNP) with different concentrations, *Isatis indigotica* leaves were treated with 10% PEG 6 000 solution for 8 days to determine the effect of exogenous nitric oxide on oxidative damage fluorescence under drought stress. This study showed that exogenous NO treatment increased the accumulation of Proline and soluble sugar content of *Isatis Indigotica* leaves with the strengthening drought stress, and that the low concentrations of NO increased SOD and POD enzyme activity, while the high concentrations of NO restrained the activity of these two kinds of enzymes. This study also indicated that the variation of MDA contents of *Isatis Indigotica* leaves in same treatment showed a decreasing trend while low concentrations of NO made greater decreased in MDA content. The results of this study suggested that exogenous NO treatment increased the drought resistance of *Isatis Indigotica*.

Key words: nitric oxide; *Isatis indigotica*; drought stress