

外源一氧化氮对渗透胁迫下小麦幼苗叶片膜脂过氧化的影响

王俊红¹,魏小红²,龙瑞军³,王小妍⁴,苏桐¹

(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;
3. 中国科学院西北高原生物研究所,青海西宁 810008; 4. 兰州大学生命科学院,甘肃兰州 730000)

摘要:以永良4号小麦品种为试验材料,研究了不同浓度 SNP(0.2、0.5、1.0 mmol/L)处理对渗透胁迫下(10%PEG-6000)小麦幼苗叶片膜脂过氧化的影响.结果表明:低浓度 SNP(0.2 mmol/L)可以在处理后期(第2和第3天)显著地缓解渗透胁迫下小麦幼苗叶片的氧化损伤,并与其超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)活性以及渗透调节物质脯氨酸(Pro)含量的上升作用一致,与超氧阴离子(O₂⁻)的释放速率以及丙二醛(MDA)含量的下降一致.高浓度的 SNP(1.0 mmol/L)则抑制这两种酶的活性和脯氨酸含量的增加,使 O₂⁻产生速率和 MDA 含量相对升高.

关键词:小麦;一氧化氮;膜脂过氧化;渗透胁迫

中图分类号: S 512.11

文献标识码: A

文章编号: 1003-4315(2008)01-0077-05

Effects of exogenous nitric oxide on membrane lipid peroxidation in wheat leaves under osmotic stress

WANG Jun-hong¹, WEI Xiao-hong², LONG Rui-jun³, WANG Xiao-yan⁴, SU Tong¹

(1. College of Agronomy, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China; 2. College of Life Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China; 3. Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Science, Xining 810008, China; 4. College of Life Science, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

Abstract: Effects of nitric oxide (NO) donor, sodium nitroprusside (SNP), with different concentrations on lipid peroxidation in wheat seedling leaves under 10% PEG-6000 osmotic stress were investigated through 3 d of treatment. The results indicated that low concentration of SNP (0.2 mmol/L) could apparently alleviate the osmotic stress-induced lipid peroxidation during the late period of treatment (after 2 day treatment), which consistent with the up-regulation of enzyme activities, such as SOD, POD and the content of proline; consistent with the down-regulation of O₂⁻ production speed and the content of MDA. Meanwhile, high concentration of SNP (1.0 mmol/L) suppressed the activities of SOD and POD enzymes and content of proline, enhanced the O₂⁻ production speed and the content of MDA.

Key words: wheat; nitric oxide (NO); membrane lipid peroxidation; osmotic stress

作者简介: 王俊红(1980-),女,甘肃天水人,硕士研究生,主要从事 NO 抗逆信号传导研究.

通讯作者: 魏小红,女,教授,硕士生导师.主要从事植物 NO 信号传导机理研究. E-mail: weixh@gsau.edu.cn

资助基金: 甘肃省教育厅基金资助项目(032B-01).

收稿日期: 2007-03-09

渗透胁迫对植物的生理生化过程乃至植物的生长发育都有很大的影响,它可导致植物体内自由基的产生与猝灭平衡状态受到破坏,使自由基和活性氧的含量增加,生物膜中脂质过氧化,最终产生大量的活性氧(reactive oxygen species, ROS),从而造成植物的次生氧化损伤^[1,2]. ROS 引起氧化伤害,同时

也触发不同的信号途径^[3]. NO 以不同的方式与 ROS 相互作用,在不同的胁迫中可能作为一种抗氧化剂起作用^[4].

一氧化氮(nitric oxide)是生物体内一种重要的氧化还原信号分子,可以减少非生物胁迫下植物体内 ROS 的积累,缓解各种胁迫造成的氧化损伤,从而增强植物的适应能力^[5]. Beligni 等人^[6,7]认为 NO 对植物体具有双重性,其作用与植物细胞的生理条件和 NO 浓度有关. Zhang^[8]等在研究外源 NO 对渗透胁迫下小麦种子萌发及活性氧代谢的影响时,发现 0.1 mmol/L 和 0.5 mmol/L 的 SNP 可明显促进渗透胁迫(25%的 PEG-6000 处理)下小麦种子的萌发,胚根和胚芽的伸长,同时还能促进过氧化氢酶(CAT)、脯氨酸含量的积累,从而提高渗透胁迫下小麦种子萌发过程中的抗氧化能力. 本试验旨在探讨 SNP 处理对渗透胁迫下永良 4 号小麦幼苗叶片抗氧化酶 SOD、POD 的活性和膜脂过氧化产物 MDA 含量、 $O_2^{\cdot -}$ 释放速率、渗透调节物质脯氨酸积累情况,进一步研究外源 NO 对渗透胁迫下小麦叶片氧化损伤的影响.

1 材料与方 法

1.1 材料的培养与处理

供试小麦品种为永良 4 号,由定西种子站提供. 种子经 0.1% $HgCl_2$ 消毒,播种于预先高压灭菌的花盆土壤中,适时浇水. 待小麦幼苗长至两叶一心期,挑选长势整齐一致、无病、无损伤的小麦植株进行处理. 将 100 mL 浓度分别为 0.2、0.5、1.0 mmol/L 的 NO 供体硝普钠(sodium nitroprusside, SNP)喷施于小麦叶面,每个处理重复 3 次,对照喷施蒸馏水,喷施后用塑料膜覆盖植株保湿 2 h. 连续喷施 3 d,每天 1 次,第 4 天将经过 SNP 处理的小麦从培养箱中取出,进行渗透胁迫处理 3 d. 试验中的 4 个处理分别为:CK(蒸馏水 + 10% PEG-6000); T_1 (0.2 mmol/L SNP + 10% PEG-6000); T_2 (0.5 mmol/L SNP + 10% PEG-6000); T_3 (1.0 mmol/L SNP + 10% PEG-6000). 选择各处理下生长一致的幼苗,于胁迫前(0 d),渗透胁迫期间(1, 2, 3 d)取小麦第 1 和 2 片真叶测定相关指标.

1.2 测定方法

参照王韵唐^[9]主编的植物生理学实验指导,超

氧化物歧化酶(SOD)测定采用 NBT 显色法;过氧化物酶(POD)测定采用愈创木酚氧化法;脯氨酸的测定采用茚三酮显色法;丙二醛(MDA)的测定参照赵世杰等^[10]的方法; $O_2^{\cdot -}$ 释放速率参照王爱国等^[11]的方法. 每项指标的测定重复 3 次.

2 结果与分析

2.1 不同浓度的 SNP 对渗透胁迫下小麦幼苗叶片 SOD、POD 活性的影响

由图 1 可见,胁迫 1 d 后不同浓度的 SNP 处理 SOD 酶活性都呈上升趋势,且达到最大值,之后 SOD 酶活性开始下降,到第 2 d 后各浓度 SNP 处理组的 SOD 酶活性都比对照 CK 大,处理 T_1 、 T_2 、 T_3 分别比对照增大 21.48%、14.09%、6.38%,其中以 0.2 mmol/L 处理的 SOD 酶活性最大. 说明随着胁迫时间的延长,外源 NO 的保护作用逐渐降低或丧失,外源 NO 可诱导渗透胁迫前期小麦幼苗叶片的 SOD 活性. 由图 2 可见,随着处理时间的延长,POD 酶活性先呈现上升趋势,到胁迫第 2 天 POD 酶活性达到最大,以后又开始下降. 胁迫 1 d 后,SNP 处理组 POD 酶活性均比对照 CK 大,处理 T_1 、 T_2 、 T_3 分别比对照增大 34.43%、31.14%、16.87%. 胁迫 2 d 后,只有处理 T_1 (0.2 mmol/L SNP) 比 CK 高 29.93%,差异达到显著性水平($P < 0.05$). 胁迫 3 d 后,处理 T_1 、 T_2 比 CK 分别高 17.96%、8.98%. 上述结果表明,低浓度 SNP 处理可明显提高渗透胁迫下小麦幼苗叶片抗氧化酶的催化能力,其中以 0.2 mmol/L 的 SNP 处理效果最好,而 0.5 mmol/L SNP 处理也能提高渗透胁迫下小麦幼苗叶片的抗氧化酶活性,但其效应相对较弱.

2.2 不同浓度的 SNP 对渗透胁迫下小麦幼苗叶片 MDA 含量和 $O_2^{\cdot -}$ 产生速率的影响

如图 3 所示,渗透胁迫条件下对照 CK 和不同浓度 SNP 处理组的小麦幼苗叶片 MDA 含量均呈先升后降的趋势. 对照(CK)和处理 T_3 在第 2 天达到最大值后开始下降,而处理 T_1 、 T_2 在第 1 天即达到最大,然后开始下降. 胁迫 1 d 后处理 T_3 (0.5 mmol/L SNP) MDA 含量比对照 CK 增大 19.98%,而处理 T_1 、 T_2 的 MDA 含量分别比对照 CK 降低 6.20% 和 9.35%;胁迫 2 d 后处理 T_3

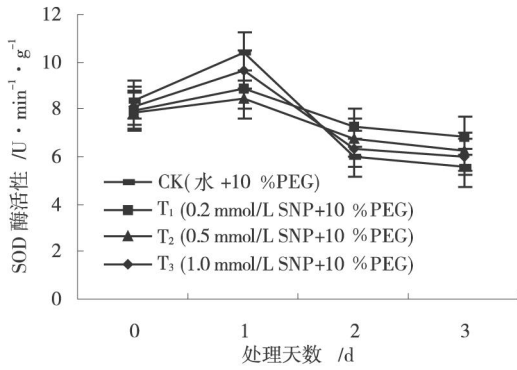


图 1 SNP 处理对渗透胁迫下小麦幼苗叶片 SOD 活性的影响

Fig. 1 Effects of exogenous nitric oxide on SOD activity in wheat seedling leaves under osmotic stress

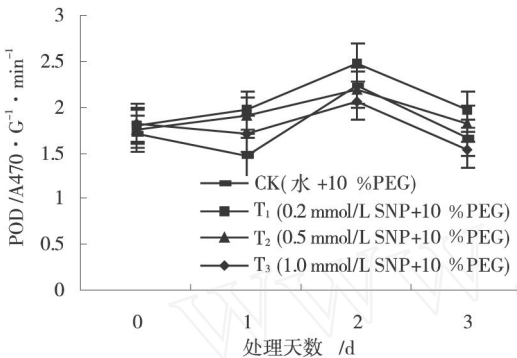


图 2 SNP 处理对渗透胁迫下小麦幼苗叶片 POD 活性的影响

Fig. 2 Effects of exogenous nitric oxide on POD activity in wheat seedling leaves under osmotic stress

MDA 含量达到最大,且比对照 CK 高 16.66%,而处理 T₁、T₂ 比对照分别低 49.94%、28%;在胁迫 3 d 后处理 T₁、T₂ MDA 含量分别比 CK 降低 59.34%、45.09%,差异达到极显著水平 ($P < 0.01$). 上述结果表明低浓度 SNP 处理能降低 MDA 的含量,而处理前期的上升现象,可能是植物对于 NO 处理后硝化和亚硝酰化胁迫的一种应激反应. O₂^{·-} 产生速率的测定结果表明(图 4),对照 CK 可明显提高 O₂^{·-} 产生速率,并且在处理第 1 天达到最大,而处理 T₁ 和 T₂ 则显著降低了渗透胁迫处理下 O₂^{·-} 的产生速率 ($P < 0.05$),分别比对照低 32.33%和 13.16%,而处理 T₃ 在胁迫 1 d 后产生速率比对照 CK 增高 10.05%,以后随着处理时间的延长 O₂^{·-} 产生速率开始下降.在胁迫 2 d 后 SNP 处理组 O₂^{·-} 产生速率均低于对照 CK,处理 T₁、T₂、T₃ 分别比对照低 32.57%、13.98%、7.31%. 胁迫

3 d 后处理 T₁、T₂ 比对照 CK 分别降低 25.77%、25.96%,而 T₃ 则比对照 CK 增高 16.38%. 在整个处理过程中, T₂ 和 T₃ 的 O₂^{·-} 产生速率始终低于对照 CK ($P < 0.05$). 上述结果表明低浓度的 SNP 能够降低 O₂^{·-} 产生速率,其中以 0.2 mmol/L SNP 处理效果最好,而高浓度的 SNP (1.0 mmol/L) 处理没有使 O₂^{·-} 产生速率减低的效应.

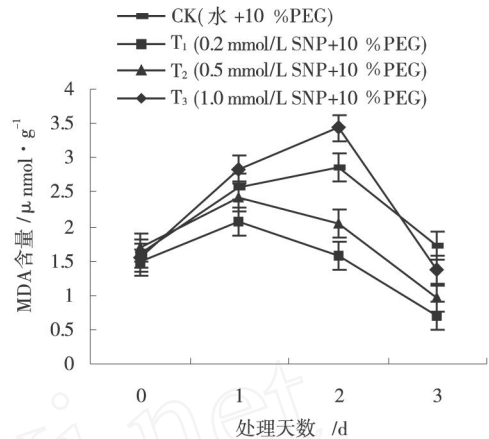


图 3 SNP 处理对渗透胁迫下小麦幼苗叶片 MDA 含量的影响

Fig. 3 Effects of exogenous nitric oxide on MDA content in wheat seedling leaves under osmotic stress

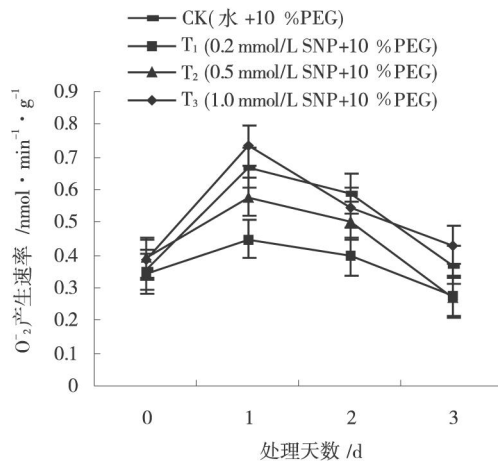


图 4 SNP 处理对渗透胁迫下小麦幼苗叶片 O₂^{·-} 产生速率的影响

Fig. 4 Different concentrations of and O₂^{·-} production speed

2.3 不同浓度的 SNP 对渗透胁迫下小麦幼苗叶片脯氨酸含量的影响

脯氨酸是一种重要的渗透调节和抗氧化物质,本研究发现(图 5),渗透胁迫条件下对照 CK 的小麦幼苗叶片脯氨酸含量积累,且随着胁迫时间的延长而加剧,而 NO 能够起进一步的促进作用. 不同浓

度 SNP 处理的脯氨酸含量也呈现上升趋势,而且均高于对照,胁迫 2 d 后处理 T₁、T₂ 分别比对照 CK 高 83.44 %、37.07 %,胁迫 3 d 后分别高 54.57 %、48.61 %。其中 0.2 mmol/L SNP 处理含量最高,处理效果最好,与对照差异达极显著水平 ($P < 0.01$)。而 T₃ 则仅比对照高 4.41 % 和 8.61 %,并没有使脯氨酸的含量显著增加。

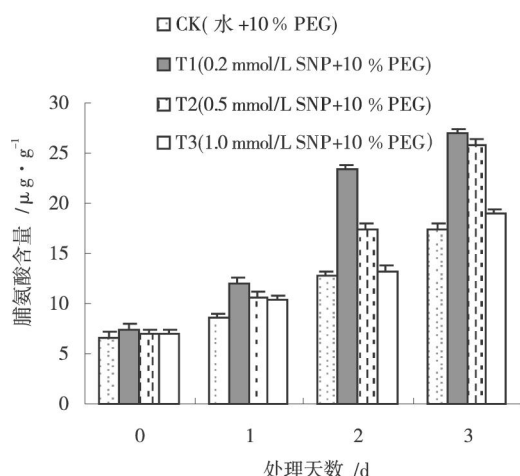


图 5 不同浓度的外源 NO 对渗透胁迫下小麦幼苗叶片脯氨酸含量的影响

Fig. 5 Effects of exogenous nitric oxide on proline content in wheat seedling leaves under osmotic stress

3 讨论

逆境条件下植物细胞产生的 OH^- 、 O_2^- 和 H_2O_2 等自由基增多,自由基启动膜脂过氧化作用导致膜的损伤和破坏,造成植物体内重要的活性氧清除酶 SOD 和 POD 等膜保护酶活性降低。NO 可以通过调节植物体内的 ROS 代谢来减轻胁迫损伤^[12]。本试验结果表明,低浓度 (0.2 mmol/L) 外源 NO 处理可以提高渗透胁迫下小麦幼苗叶片 SOD 和 POD 酶的活性,尤其能显著诱导 POD 酶活性的增加。但外源 NO 对这两种酶的诱导在时间上不一致,即 SOD 活性在处理第 1 d 即达到最大,而 POD 酶活性在处理第 2 d 才达到最大。外源 NO 诱导渗透胁迫下小麦幼苗叶片 SOD 活性的提高可能与其作为信号分子来影响 SOD 编码基因的表达有关^[13]。

在渗透胁迫下,活性氧的代谢平衡被打破,使活性氧的产生量增加^[14]。外源 NO 供体 (SNP) 可以提高小麦叶片的抗氧化能力,从而缓解盐胁迫和水分胁迫下的氧化伤害^[12]。本研究表明:低浓度的 NO

可使 MDA 含量和 O_2^- 产生速率降低,如 0.2 mmol/L 的 SNP 处理可以显著降低叶片丙二醛 (MDA) 的累积,并与其对 O_2^- 产生速率有关,而高浓度 (1.0 mmol/L) 的 SNP 处理使 MDA 和 O_2^- 含量相对升高,例如,1.0 mmol/L SNP 处理在胁迫 1 d 后 MDA 含量和 O_2^- 产生速率均高于对照 CK。证明 NO 的生理效应与其浓度有关,即低浓度下具有保护作用,而高浓度 NO 则对细胞产生伤害^[16,71]。

渗透胁迫能诱导植物脯氨酸含量的增加^[15],而脯氨酸不仅可以增强植物细胞的保水能力,同时也有显著的抗氧化作用^[16]。本试验结果显示,外源 NO 处理的小麦幼苗在渗透胁迫下脯氨酸含量增加明显高于对照 (图 5)。渗透胁迫下植物体内大量积累的脯氨酸除了作为渗透胁迫物质外,还可在清除 ROS、提高抗氧化能力、稳定大分子结构、降低细胞酸性以及解除氨毒等方面起重要作用。

研究表明,低浓度的 NO 可以有效地缓解渗透胁迫下小麦叶片中 ROS 的伤害,减少膜脂过氧化产物 MDA 的产量;而高浓度的 NO 则起了相反的作用^[17,18],即在 NO 影响渗透胁迫下小麦叶片中的 ROS 和 MDA 含量及抗氧化酶活性时,存在一浓度效应,而这一生理作用极有可能依赖于 NO 与 ROS 的直接作用及其对抗氧化酶活性的影响。外源 NO 缓解渗透胁迫下小麦幼苗叶片膜脂过氧化可能的原因是:NO 可以直接作为抗氧化剂,清除植物细胞内的 ROS^[16];作为信号分子的 NO 通过诱导细胞内多种抗氧化酶的活性或相关编码基因的表达,以及提高具有清除 ROS 能力的活性物质含量,来间接清除 ROS^[18,19,20]。从本试验结果来看,外源 NO 缓解渗透胁迫下小麦幼苗叶片膜脂过氧化与其抑制 MDA 含量和 O_2^- 产生速率,促进脯氨酸积累及提高 SOD、POD 等保护酶的活性有关。

参考文献

- [1] Zhu J K. Salt and drought stress signal transduction in plants[J]. Annu Rec Plant Biol, 2002, 53:247-273
- [2] 倪郁,李唯.作物抗旱机制及其指标的研究进展与现状[J].甘肃农业大学学报,2001,36(1):14-22
- [3] Neill SJ, Desikan R, Clarke A, et al. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signal molecules in plants[J]. Journal of Experimental Botany, 2002, 53:1237-1247

- [4] Beligni M V, Lamattina L. Is nitric oxide toxic or protective[J]. Trends in Plant Sci, 1999, 4(8): 299-300
- [5] 张文利, 沈文飏, 徐朗莱. 一氧化氮在植物体内的信号分子作用[J]. 生命的化学, 2002, 22(1): 61-62
- [6] Beligni M V, Lamattina L. Nitric oxide protects against cellular damage produced by methylviologen herbicides in potato plants[J]. Nitric Oxide, 1999, 3(3): 199-208
- [7] Beligni M V, Lamattina L. Nitric oxide in plants: the history is just beginning[J]. Plant Cell Environ, 2001, 24: 267-278
- [8] Zhang H, Shen W B, Xu L L. Effect of nitric oxide on the germination of wheat seed and its active oxygen species metabolisms under osmotic stress [J]. Acta Bota Sin, 2003, 45: 901-905
- [9] 王韶唐. 植物生理学实验指导[M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1986
- [10] 赵世杰. 植物组织中丙二醛测定方法的改进[J]. 植物生理学通讯, 1994, 30(3): 207-210
- [11] 雍山玉, 郁继华, 王燕燕, 等. 外源一氧化氮对盐胁迫下辣椒种子萌发和幼苗生理的影响[J]. 甘肃农业大学学报, 2007, 42(4): 51-55
- [12] 阮海华, 沈文飏. 一氧化氮对盐胁迫下小麦叶片氧化损伤的保护效应[J]. 科学通报, 2001, 46(23): 1993-1997
- [13] Beligni M V, Fath A, Bethke P C, et al. Nitric oxide acts as an antioxidant and delays programmed cell death in barley aleurone layers [J]. Plant Physiol, 2002, 129: 1642-1650
- [14] 姜义宝, 崔国文, 李红. 干旱胁迫下外源钙对苜蓿抗旱相关生理指标的影响[J]. 草业学报, 2005, 14(5): 32-36
- [15] 张国盛, 张仁陟. 水分胁迫下氮磷营养对小麦幼苗渗透物质积累影响[J]. 甘肃农业大学学报, 2001, (1): 95-99
- [16] 蒋明义, 荆家海, 王韶唐. 水分胁迫与植物膜脂过氧化[J]. 西北农业大学学报, 1991, 19(2): 88-94
- [17] Yamasaki H, Shimoji H, Ohshiro Y, et al. Inhibitory effects of nitric oxide on oxidative phosphorylation in plant mitochondria[J]. Nitric Oxide, 2001, 5(3): 261-270
- [18] 刘鹏程, 王辉, 程佳强, 等. NO对小麦叶片干旱诱导膜脂过氧化的调节效应[J]. 西北植物学报, 2004, 24(1): 141-145
- [19] 陈明, 沈文飏, 阮海华, 等. 一氧化氮对盐胁迫下小麦幼苗根生长和氧化损伤的影响[J]. 植物生理与分子生物学学报, 2004, 30(5): 569-576
- [20] 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