

# 外源 NO 对 NaCl 胁迫下黄瓜 (*Cucumis sativus* L.) 幼苗生长和谷胱甘肽抗氧化酶系统的影响

樊怀福<sup>1,2</sup>, 郭世荣<sup>1,\*</sup>, 段九菊<sup>1</sup>, 杜长霞<sup>1</sup>, 孙 锦<sup>1</sup>

(1. 南京农业大学园艺学院, 南京 210095; 2. 浙江林学院农业与食品科学学院, 临安 311300)

**摘要:** 采用营养液水培, 研究了外源一氧化氮(NO)对黄瓜(*Cucumis sativus* L.)幼苗生长和叶片谷胱甘肽抗氧化酶系统的影响。结果表明, 正常生长条件下添加 NO 能促进黄瓜幼苗生长, 而添加 NO 信号传递途径关键酶鸟苷酸环化酶(cGC)抑制剂亚甲基蓝(MB-1)显著抑制了黄瓜幼苗的生长; 添加 NO 显著缓解了盐胁迫对黄瓜幼苗生长的抑制, 提高了叶片谷胱甘肽还原酶(GR)活性、脱氢抗坏血酸还原酶(DHAR)活性、抗坏血酸过氧化物酶(APX)及还原型谷胱甘肽(GSH)、抗坏血酸(ASA)含量, 降低了氧化型谷胱甘肽(GSSG)含量, 提高了 GSH/GSSG, 对单脱氢抗坏血酸还原酶(MDAR)活性无显著影响; NaCl 胁迫下添加 NO 的同时添加 MB-1 抑制了 GR 活性的提高, GSH 和 ASA 含量、GSH/GSSG 均降低, GSSG 含量提高, 但对 MDAR、APX 和 DHAR 活性无显著影响, 表明 NaCl 胁迫下 NO 对 GR 活性、GSH 和 ASA 含量、GSH/GSSG 的调节可能是通过 cGC 介导的, 对 MDAR 无明显的调节作用, 对 DHAR、APX 的调节还存在其它途径。

**关键词:** 一氧化氮; NaCl 胁迫; 黄瓜 (*Cucumis sativus* L.) 幼苗; 谷胱甘肽

文章编号: 1000-0933(2008)06-2511-07 中图分类号: Q143, Q945, Q948 文献标识码: A

## Effects of nitric oxide on the growth and glutathione dependent antioxidative system in cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings under NaCl stress

FAN Huai-Fu<sup>1,2</sup>, GUO Shi-Rong<sup>1,\*</sup>, DUAN Jiu-Ju<sup>1</sup>, DU Chang-Xia<sup>1</sup>, SUN Jin<sup>1</sup>

1 College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

2 School of Agriculture and Food Science, Zhejiang Forestry College, Lin'an 311300, China

*Acta Ecologica Sinica*, 2008, 28(6): 2511 ~ 2517.

**Abstract:** The object of the study was to investigate the effects of nitric oxide on the growth and glutathione dependent antioxidative system in cucumber (*Cucumis sativus* L. cv. Jinchun 2) seedlings. The results showed that exogenous nitric oxide increased the growth of cucumber seedlings in normal growth conditions. But exogenous methylene blue, the inhibitor of the key enzyme cGC during signal transfer of nitric oxide, markedly decreased the growth of cucumber seedlings. Exogenous nitric oxide alleviated the injured cucumber seedlings under NaCl stress. The activities of GR and DHAR, and the content of APX, GSH, ASA, GSH/GSSG was increased while the content of GSSG was decreased. The activity of MDAR was not affected under NaCl stress. But methylene blue blocked some effects of exogenous nitric oxide under NaCl stress, so the activity of GR and the content of GSH, ASA, GSH/GSSG was decreased. It was observed that the content of GSSG was increased, however, the activity of DHAR, MDAR and APX was not affected markedly under NaCl stress.

基金项目: 国家教育部博士点科研基金资助项目(20050307031)

收稿日期: 2007-03-17; 修订日期: 2007-10-12

作者简介: 樊怀福 (1979 ~), 男, 山东济宁人, 博士生, 主要从事蔬菜生理生态研究. E-mail: wwghff@126.com

\* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: srguo@njau.edu.cn

**Foundation item:** This work was financially supported by the Scientific Research Foundation of Ph. D. Programs, China (No. 20050307031)

**Received date:** 2007-03-17; **Accepted date:** 2007-10-12

**Biography:** FAN Huai-Fu, Ph. D. candidate, mainly engaged in ecology and physiology of vegetable. E-mail: wwghff@126.com

Therefore nitric oxide was not adjusted the activity of GR, the content of GSH and ASA, GSH/GSSG through cGC. Nitric oxide couldn't affect on the activity of MDAR. And there were some other ways which adjusted the activity of DHAR and the content of APX.

**Key Words:** nitric oxide; NaCl stress; cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedling; glutathione

土壤盐渍化是一个全球性的问题,盐害是目前影响植物生产的主要因素之一<sup>[1]</sup>。近年来,中国设施栽培面积逐年增加,设施内特有的小气候特点以及不当的栽培管理措施,如施肥量过大且偏重化肥、地温高、蒸发旺盛、无雨水冲淋等,以  $\text{NO}_3^-$  和  $\text{Ca}^{2+}$  为主要盐分组成的土壤次生盐渍化日趋明显,盐害面积呈进一步扩大的趋势<sup>[2]</sup>。因此,提高作物耐盐性的研究具有重要的现实意义。

盐胁迫条件下,植物细胞由于代谢受阻产生大量的活性氧(Reactive oxygen species, ROS)如  $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、 $\text{H}_2\text{O}_2$ 、 $\cdot\text{OH}$ 等,这些活性氧浓度的提高造成对细胞膜脂过氧化作用加强,使活性氧产生与清除之间的动态平衡被破坏,导致膜系统损伤和细胞伤害<sup>[3]</sup>。

一氧化氮(Nitric oxide, NO)是生物体中一种重要的氧化还原信号分子和毒性分子,广泛存在于植物组织中,并参与植物在生物及非生物胁迫下适应性的提高。在动物中,NO 作用的重要途径之一是激活鸟苷酸环化酶(cGC)产生环鸟苷单磷酸(cGMP),NO 的许多生理作用是由 cGMP 介导的;在植物中,cGMP 的存在已被大量的质谱分析技术所证实。现在已经证实 NO 的这种信号传递方式广泛存在于植物中。例如,用 NO 处理烟草叶片后可以检测到 cGMP 水平迅速而短暂的上升<sup>[4]</sup>。以往的研究表明,外源 NO 通过提高盐胁迫下小麦<sup>[5]</sup>、水稻<sup>[6]</sup>、黄瓜<sup>[7]</sup>幼苗叶片超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)活性缓解由于盐胁迫导致的叶片 ROS 的累积,从而具有保护作用,同时 NO 本身也具有抗氧化功能,可以延缓由赤霉素诱导的糊粉层细胞程序性死亡以及 CAT、SOD 编码基因 mRNA 转录水平的降低。Uchida 等<sup>[8]</sup>亦证实一定浓度的 NO 对盐胁迫下水稻幼苗的生长具有促进作用,且与其对 ROS 及清除酶的调节有关。

植物体中存在的抗氧化物质和抗氧化防御酶系统对环境胁迫下植物体内活性氧清除起到极其重要的作用。有关盐胁迫条件下对 SOD 和 POD 等保护酶活性的影响报道较多,而有关谷胱甘肽抗氧化酶系统研究报道较少,NO 对植物谷胱甘肽抗氧化酶系统的影响目前尚不十分清楚。本实验以对盐胁迫敏感的设施栽培主栽作物之一黄瓜为材料,研究了外源 NO 对盐胁迫下黄瓜幼苗叶片非酶促抗氧化物质 GSH、ASA 及相关抗氧化酶系统的调节作用,初步探讨相关机理,为进一步了解 NO 提高植物耐盐性的作用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试材与处理

试验于 2006 年 3 月至 7 月在南京农业大学玻璃温室内进行。以黄瓜(*Cucumis sativus* L.)品种‘津春 2 号’为材料。种子在 28℃ 恒温箱催芽 30h 后,播入装有石英砂的穴盘中育苗,昼温 25~30℃,夜温 16~20℃,自然光照。在幼苗第 2 片真叶展开时,选整齐一致的幼苗移入 20L 塑料周转箱中进行水培,每小时通气 40min,营养液为山崎黄瓜专用配方<sup>[9]</sup>,预培养 3d 后用 NaCl(50mmol·L<sup>-1</sup>)处理,同时在营养液中加入 NO 供体硝普钠(Sodium nitroprusside, SNP)或 NO 信号传递途径关键酶鸟苷酸环化酶抑制剂亚甲基蓝(Methylene blue, MB-1),各处理分别为:(1)正常营养液栽培(CK)、(2)正常营养液栽培(CK) + 100μmol·L<sup>-1</sup> SNP (SNP)、(3)正常营养液栽培(CK) + 5μmol·L<sup>-1</sup> MB-1 (MB)、(4)50mmol·L<sup>-1</sup> NaCl 胁迫(NaCl)、(5)50mmol·L<sup>-1</sup> NaCl 胁迫 + 100μmol·L<sup>-1</sup> SNP (NaCl + SNP)、(6)50mmol·L<sup>-1</sup> NaCl 胁迫 + 100μmol·L<sup>-1</sup> SNP + 5μmol·L<sup>-1</sup> MB-1 (NaCl + SNP + MB)。处理后第 0、2、4、6、8 天取幼苗生长点下第 2 片展开叶进行各项生理指标的测定。为了保证处理浓度的稳定性,处理期间每 2d 更换 1 次营养液。实验设 3 次重复。

### 1.2 测定方法

株高(茎基部到生长点):用直尺测量;茎粗(茎基部):用游标卡尺测量;鲜重、干重:鲜样先用自来水冲洗

2~3 次,再用蒸馏水冲洗 2 次,用吸水纸吸干后称量鲜重,105℃杀青 15min,75℃烘干至恒重,称干重。

抗坏血酸过氧化物酶 (APX) 活性按照 Nakano 和 Asada<sup>[10]</sup> 方法测定;谷胱甘肽还原酶 (GR) 活性按照 Foyer 和 Halliwell<sup>[11]</sup> 方法测定;脱氢抗坏血酸还原酶 (DHAR) 活性按照 Hossain 和 Asada<sup>[12]</sup> 方法测定;单脱氢抗坏血酸还原酶 (MDAR) 活性按照 Miyake 和 Asada<sup>[13]</sup> 方法测定;抗坏血酸 (ASA) 含量按照 Arakawa 等<sup>[14]</sup> 方法测定;谷胱甘肽 (GSH、GSSG) 含量按照 Griffith<sup>[15]</sup> 方法测定。

所有数据用 SAS 软件进行单因素方差分析,并对平均数用 Duncan's 新复极差法进行多重比较。

## 2 结果与分析

### 2.1 外源 NO 对幼苗生长的影响

从表 1 可以看出,盐胁迫下 8d 后,黄瓜幼苗株高、茎粗、鲜重和干重较对照显著下降,盐胁迫明显抑制了黄瓜幼苗的生长,而添加外源 NO 后显著缓解盐胁迫对黄瓜幼苗生长的抑制,盐胁迫条件下添加外源 NO 的同时添加抑制剂 MB-1 后,消除了 NO 对盐胁迫下黄瓜幼苗生长的缓解作用,幼苗的生长状况与单独盐处理相当;正常生长条件下添加外源 NO 对黄瓜幼苗的生长有促进作用,株高、茎粗、鲜重和干重分别比对照高 10.81%、2.34%、4.10% 和 5.19%,其中株高和干重与对照差异显著,正常生长条件下添加 MB-1 显著抑制了黄瓜幼苗的生长,生物量较对照显著下降。

表 1 外源 NO 对 NaCl 胁迫下黄瓜幼苗生长的影响

Table 1 Effects of exogenous nitric oxide on the plant growth of cucumber seedlings under NaCl stress

| 处理<br>Treatment | 株高<br>Plant height (cm) | 茎粗<br>Stem thickness (mm) | 鲜重<br>Fresh weight (g/plant) | 干重<br>Dry weight (g/plant) |
|-----------------|-------------------------|---------------------------|------------------------------|----------------------------|
| CK              | 33.85b                  | 6.83a                     | 50.99a                       | 4.43b                      |
| SNP             | 37.57a                  | 6.99a                     | 53.08a                       | 4.66a                      |
| MB              | 19.00d                  | 5.09c                     | 20.35c                       | 2.14d                      |
| NaCl            | 18.07d                  | 4.66c                     | 22.09c                       | 1.80d                      |
| NaCl + SNP      | 29.00c                  | 5.89b                     | 42.66b                       | 3.48c                      |
| NaCl + SNP + MB | 16.87d                  | 4.99c                     | 19.29c                       | 2.04d                      |

不同字母表示差异达 5% 显著水平 Different letters indicate significant difference at 5% level

### 2.2 外源 NO 对幼苗叶片 ASA 含量和 APX 活性的影响

由图 1A 可以看出,盐胁迫条件下,黄瓜幼苗叶片内 ASA 含量先上升后下降,在胁迫第 2 天时高于对照,为对照的 121.63%,但无显著性差异,随后其含量开始下降,且一直低于对照,胁迫第 8 天时显著低于对照,仅为对照的 57.83%;盐胁迫条件下添加外源 NO 能够促进盐胁迫条件下黄瓜幼苗叶片内 ASA 的积累,在胁迫第 2 天和第 4 天时都高于对照,分别为对照的 136.39% 和 105.48%,然后含量有所下降但一直都高于单独盐胁迫处理;添加 NO 同时添加 NO 的抑制剂 MB-1 后,抑制了 NO 对 ASA 含量的提高作用,ASA 含量水平与单独盐胁迫处理相当。正常生长条件下添加 NO 也提高了叶片 ASA 的含量,在处理第 8 天时与对照差异显著;正常条件下添加 MB-1 叶片 ASA 含量在处理第 2 天时有短暂的升高,然后下降,在处理第 6、8 天时显著低于对照。

图 1B 表明,盐胁迫条件下,黄瓜幼苗叶片的 APX 活性提高,在整个胁迫处理期间与对照比较均差异显著,盐胁迫条件下添加 NO 对 APX 活性的提高有促进作用,在处理的第 4、6、8 天与单独盐处理均差异显著,盐胁迫条件下添加 NO 的同时添加其抑制剂 MB-1,APX 活性在第 2 天时显著高于其它各处理,在其它处理时间与 NaCl + SNP 处理无显著差异;正常条件下添加 NO 对黄瓜幼苗叶片的 APX 活性有提高作用,在处理的第 2、4 天显著高于对照,正常生长条件下添加 MB-1 同样促进了 APX 活性的提高,在处理第 8 天时显著高于对照。

### 2.3 外源 NO 对幼苗叶片 GR 活性、GSH 和 GSSG 含量及 GSH/GSSG 的影响

由图 2A 可以看出,盐胁迫下黄瓜叶片 GR 活性升高,在处理的第 8 天与对照差异显著,盐胁迫下添加 NO,GR 活性在处理的第 6、8 天显著高于单独盐胁迫处理,添加 NO 的同时添加 NO 的抑制剂 MB-1 消除了

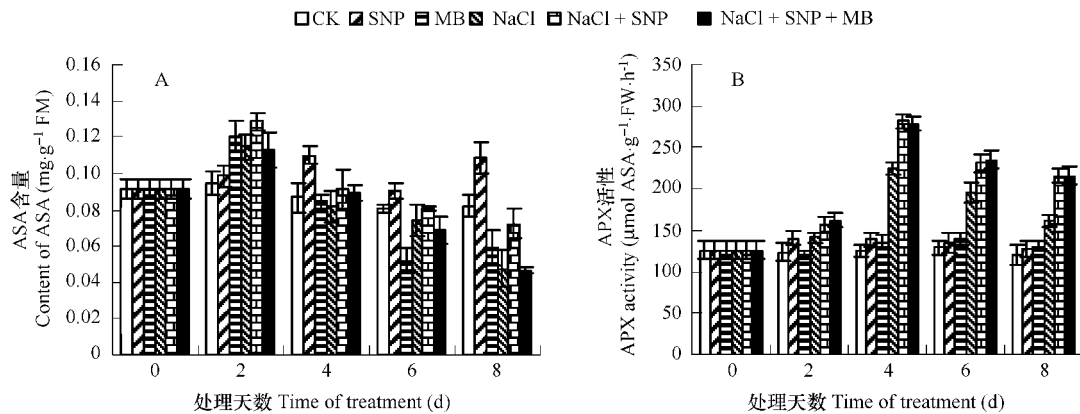


图1 外源 NO 对 NaCl 胁迫下黄瓜幼苗叶片 ASA 含量(A) 和 APX 活性(B) 的影响

Fig. 1 Effects of exogenous nitric oxide on the content of ASA(A) and APX activity (B) in leaves of cucumber seedlings under NaCl stress

NO 的作用,GR 活性与 NaCl + SNP 处理比较显著降低,在处理的第 4 天和第 6 天差异显著。正常生长条件下添加 NO 同样促进了 GR 活性的提高,在第 4、6、8 天时与对照差异显著,而正常条件下添加 NO 的抑制剂 MB-1 抑制了 GR 活性的升高,在整个处理期间一直低于对照,在处理的第 4、6、8 天与对照差异显著。

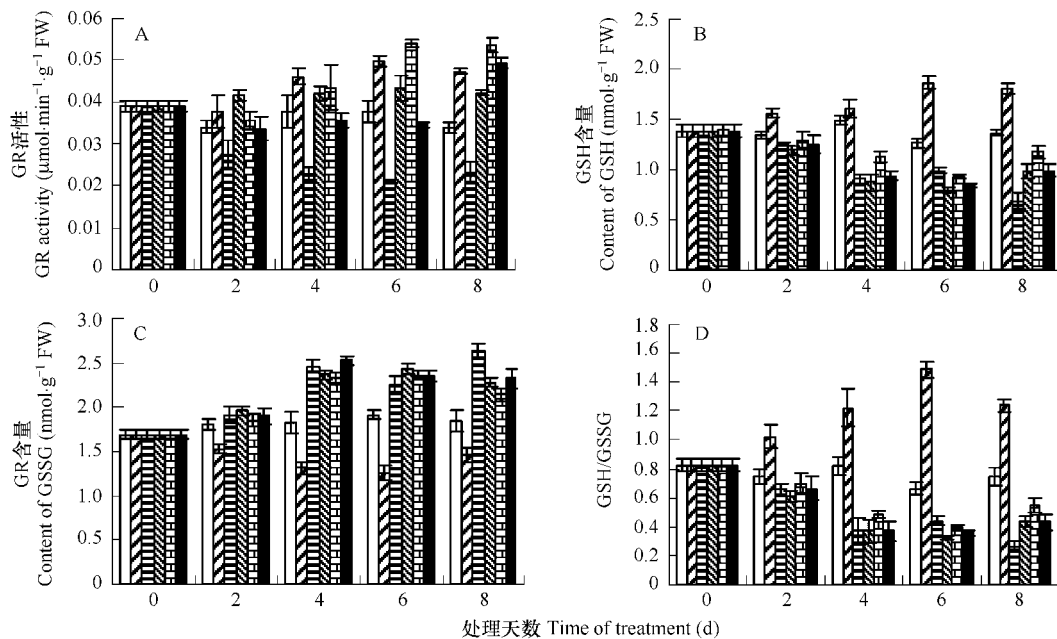


图2 外源 NO 对 NaCl 胁迫下黄瓜幼苗叶片 GR 活性、GSH 和 GSSG 含量及 GSH/GSSG 的影响

Fig. 2 Effects of exogenous nitric oxide on GR activity (A), the content of GSH (B) and GSSG (C) and GSH/GSSG (D) in leaves of cucumber seedlings under NaCl stress

由图 2B 得出,盐胁迫条件下,黄瓜幼苗叶片 GSH 含量较对照降低,在处理的第 4、6、8 天与对照比较都有显著性差异,盐胁迫下添加外源 NO 缓解了由于盐胁迫造成的 GSH 含量的下降,GSH 含量在整个处理期间都高于单独盐胁迫处理,但与单独盐胁迫处理间无显著性差异,添加 NO 的同时添加 NO 的抑制剂 MB-1 消除了 NO 对 GSH 含量的提高作用,GSH 含量又恢复到了与单独盐胁迫处理相当的水平。正常生长条件下添加外源 NO 显著提高了叶片内 GSH 的含量,在处理的第 2、6、8 天显著高于对照。正常生长条件下添加 MB-1 使叶片 GSH 的含量较对照下降,在处理的第 4、6、8 天与对照差异显著。

由图 2C 可知,盐胁迫条件下黄瓜幼苗叶片的 GSSG 含量升高,在第 4、6、8 天与对照差异显著,盐胁迫下

添加 NO 对 GSSG 含量无显著影响,与单独盐胁迫处理差异不显著,在处理的第 2、4、6、8 天分别是单独盐胁迫处理的 94.41%、98.84%、97.27%、94.03%。添加 NO 的同时添加 MB-1, GSSG 含量略有增加,在整个处理期间与 N + S 处理含量水平相当。正常生长条件下添加 NO 黄瓜幼苗叶片内 GSSG 含量较对照下降,在整个处理期间与对照均差异显著。正常生长条件下添加 MB-1 对 GSSG 含量都有促进作用,在整个处理期间 GSSG 含量与对照均差异显著。

GSH/GSSG 受 GR 活性的调节,由图 2D 看出, GSH/GSSG 与 GR 活性有相似的变化规律,正常条件下添加 NO 提高了 GSH/GSSG,在整个处理期间与对照差异显著,盐胁迫下添加 NO 同样提高了 GSH/GSSG,盐胁迫下添加 NO 的同时添加 MB-1 抑制了 GSH/GSSG 的提高,但 NaCl、NaCl + SNP、NaCl + SNP + MB-1 三处理间无差异显著性。正常生长条件下添加 NO 的抑制剂 MB-1 降低了 GSH/GSSG,在整个处理期间与对照差异显著。

## 2.4 外源 NO 对幼苗 MDAR 和 DHAR 活性的影响

由图 3A 可以得出,盐胁迫条件下,黄瓜幼苗叶片 DHAR 活性升高,在处理的第 4、6、8 天显著高于对照,盐胁迫下添加 NO 对 DHAR 活性有促进作用,在处理的第 8 天显著高于单独盐胁迫处理,添加 NO 的同时添加 MB-1 在整个处理期间 DHAR 活性与 NaCl + SNP 处理相当。正常条件下添加 NO 对 DHAR 的活性有促进作用,在处理的第 6、8 天与对照差异显著;正常生长条件下添加 MB-1, DHAR 活性也提高,在处理的第 4、6、8 天与对照差异显著。

由图 3B 可以看出,盐胁迫条件下黄瓜幼苗叶片的 MDAR 活性提高,在处理的第 4、6 天与对照差异显著,盐胁迫下添加 NO 对黄瓜幼苗叶片的 MDAR 活性无显著影响,添加 NO 的同时添加 MB-1, MDAR 活性与 NaCl + SNP 处理无显著差异。正常生长条件下添加 NO 处理对 MDAR 活性无显著影响;正常生长条件下添加 MB-1 提高了 MDAR 的活性,在处理的第 4 天时显著高于对照。

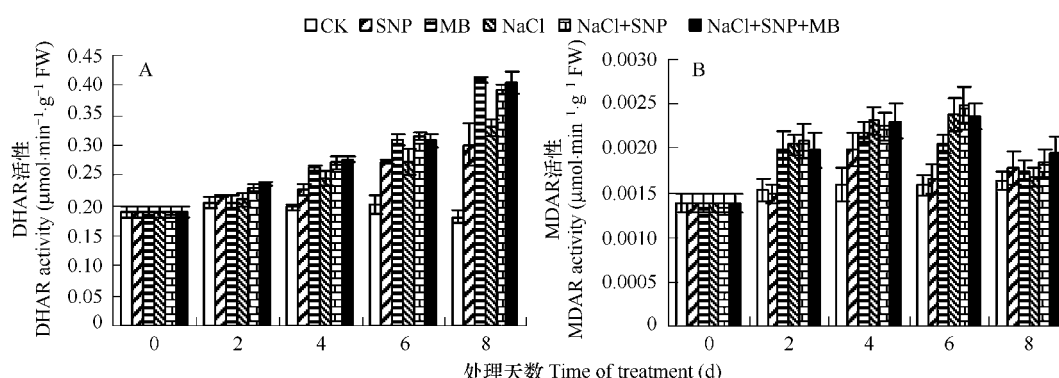


图 3 外源 NO 对 NaCl 胁迫下黄瓜幼苗叶片 DHAR 活性(A) 和 MDAR 活性(B) 的影响

Fig. 3 Effects of exogenous nitric oxide on DHAR(A) and MDAR (B) activity in leaves of cucumber seedlings under NaCl stress

## 3 讨论

生长量是植物对盐胁迫响应的综合体现及对盐胁迫的综合反应。本研究结果表明, NaCl 胁迫下黄瓜幼苗生长受到显著抑制,而添加外源 NO 缓解了 NaCl 胁迫对黄瓜幼苗生长的抑制作用,添加 NO 的同时添加 NO 的抑制剂 MB-1, NO 的缓解作用则被解除。NO 能促进 NaCl 胁迫下黄瓜幼苗的生长,与 NO 可通过质外体直接作用于细胞壁组分,使细胞壁松弛,以及 NO 作用于膜的磷脂双分子层,增强膜的流动性,从而促进细胞扩展、植株生长有关<sup>[16]</sup>。

植物在逆境胁迫下为防御过量活性氧的产生而造成伤害,植物体内存在酶促和非酶促两类活性氧自由基清除系统,在维持膜的结构和完整性、防御活性氧自由基对膜脂的攻击伤害中发挥着重要作用,其中 SOD、POD、CAT、GR、APX 在抗氧化酶系中起关键作用。APX、DHAR、MDAR、GR 是植物 ASA-GSH 氧化还原途径中的重要酶组分,对还原型 ASA 和 GSH 再生具有重要作用, GSH、ASA 等是重要的非酶促抗氧化物质<sup>[17]</sup>。

外源 NO 能诱导盐胁迫下黄瓜幼苗叶片 SOD、POD、CAT 活性的升高,延缓  $O_2^{\cdot-}$ 、 $H_2O_2$  的积累,提高植株渗透调节物质含量已被证实<sup>[7,18]</sup>,本研究进一步表明,外源 NO 处理能明显提高盐胁迫下黄瓜幼苗叶片的 APX 和 GR 活性以及 GSH 含量和 GSH/GSSG。APX 活性的提高标志着植物体清除活性氧能力的增强;GR 是 ASA-GSH 循环中的一种关键酶,在 NADPH 作用下,催化氧化型谷胱甘肽(GSSG)还原为还原型谷胱甘肽(GSH),较高的 GR 活性能够维持盐胁迫下黄瓜幼苗叶片较高的 GSH 水平和合适的 GSH/GSSH 比值,并在保持细胞的氧化还原势方面发挥重要的作用。已有证据表明,GSH/GSSH 比值可以作为细胞内的信号分子,从而对相关基因表达、翻译速率、蛋白质巯基化以及酶活性的调节进行直接的调控,同时,超量表达 GR 的转基因植物的耐盐性亦显著提高<sup>[19]</sup>。APX 和 GR 活性变化的不同可能跟不同酶激活物质有关,Xiang 等认为,APX 由  $H_2O_2$  激活,而 GR 受茉莉酸激活<sup>[20]</sup>。盐胁迫条件下,APX 的升高可能是幼苗叶片对过量 ROS 的应激反应,添加 NO 能进一步提高其活性与 NO 能够作为信号分子诱导 APX 基因表达有关。已有研究发现,NO 在抑制伤害反应时有茉莉酸的积累,并且 NO 能够调控茉莉酸的信号转导<sup>[21]</sup>,所以添加外源 NO 提高了 GR 活性可能与 NO 激活茉莉酸有关。

GR 的活性直接影响 GSH 库的水平,GSH 是植物细胞内最主要的含量最丰富的含巯基的低分子肽,植物细胞保持较高的 GSH 浓度可有效还原 S-S 键,稳定 SH 族,使膜蛋白结构稳定<sup>[22]</sup>,GSH 水平及 GR 酶活性被认为是机体抗氧化状态的重要标志。本研究的结果表明,盐胁迫下添加外源 NO 能够提高黄瓜幼苗叶片 GSH 的含量,稍微降低 GSSG 的含量,与 GR 活性的提高相互统一,与阮海华等<sup>[6]</sup>在小麦上的研究结果一致,是 NO 缓解黄瓜幼苗盐胁迫伤害的重要原因。

逆境条件下,APX 的活性直接影响到 ASA 的含量,ASA 是普遍存在于植物组织中的高丰度小分子量的抗氧化物质,它可以直接清除  $O_2^{\cdot-}$ 、 $H_2O_2$ 、 $\cdot OH$ 、 $^1O_2$  等活性氧,在植物抗氧化胁迫中具有重要作用。正常情况下,有毒物质  $H_2O_2$  可通过 Halliwell-Asada 途径清除,ASA 在 APX 的作用下与  $H_2O_2$  反应, $H_2O_2$  接受以 GSH 为中介的 NADPH 的电子还原成  $H_2O$ ,从而清除  $H_2O_2$ 。ASA 氧化时,形成单脱氢抗坏血酸(MDHA),MDHA 进一步氧化形成脱氢抗坏血酸(DHA),在 MDAH 还原酶(MDAR)和 DHA 还原酶(DHAR)存在时,ASA 可由 MDHA 和 DHA 再生<sup>[23]</sup>。NO 缓解了盐胁迫下黄瓜幼苗叶片 ASA 含量的下降,这可能与 NO 能改变盐胁迫下植物细胞内的氧化还原状态或提高 ASA 合成酶活性有关,GSH 是催化 ASA 合成的关键酶双脱氢抗坏血酸 DHAR 的底物,盐胁迫下添加外源 NO 提高了黄瓜幼苗叶片 DHAR 活性和 GSH 含量,可能部分地促进了 ASA 的上升。在胁迫条件下 DHAR 和 MDAR 活性的升高是对逆境的一种适性反应。APX 是叶绿体中清除  $H_2O_2$  的关键酶,而 APX 正常的发挥作用,需要依赖 MDHAR 和 DHAR 源源不断地再生 ASA。DHAR 和 MDAR 酶活的提高,使 ASA 的含量维持了较高的生理水平,同时也保证了 APX 正常生理功能的需要。

同时,正常条件下添加外源 NO,提高了 GR、APX、DHAR 活性以及 GSH、ASA 的含量,GSSG 含量下降,GSH/GSSG 提高,对 MDAR 无显著影响;正常条件下添加 MB-1 抑制了 GR 活性,GSH/GSSG 以及 GSH、ASA 含量下降,GSSG 含量升高,APX、MDAR、DHAR 活性提高;盐胁迫下添加外源 NO 的同时添加 MB-1 抑制了 GR 活性的提高和 GSH、ASA 含量,GSH/GSSG 比值降低,但对 APX、DHAR、MDAR 无显著影响。以上结果充分说明盐胁迫下 NO 对 GR 活性、GSH 和 ASA 含量、GSH/GSSG 可能是通过 cGC 介导的,而对 MDAR 无明显的调节作用,对 APX、DHAR 的调节还存在其它途径,这一点有待于进一步研究。添加 MB-1 的两处理 APX 和 DHAR 活性虽提高、MDAR 活性升高或无显著变化,同时 ASA 含量却下降,也表明本实验中黄瓜幼苗叶片 ASA 含量的多少在很大程度上受 ASA 合成酶的调节。

综上所述,盐胁迫下通过添加外源 NO 提高了 GR、APX、DHAR 等抗氧化酶活性和非酶抗氧化物质 ASA 和 GSH 含量及 GSH/GSSG 比值,提高了黄瓜幼苗叶片的抗氧化能力,从而缓解了盐胁迫对黄瓜幼苗造成的伤害。

#### References:

- [1] Parida A K, Das A B. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2005, 60(3):324-349.

- [ 2 ] Shi Q H, Zhu Z J, Al-aghabary K, *et al.* Effects of iso-osmotic salt stress on the activities of antioxidative enzymes,  $H^+$ -ATPase and  $H^+$ -PPase in tomato plants. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 2004, 30(3):311—316.
- [ 3 ] Sreenivasulu N, Grimm B, Wobus U, *et al.* Differential response of antioxidants to salinity stress in salt-tolerant and salt-sensitive seedlings of foxtailmillet (*Setaria italica*). *Physiol Plant*, 2000, 109(4):435—442.
- [ 4 ] Durner J, Wendehenne D, Klessing D F. Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(17):10328—10333.
- [ 5 ] Ruan H H, Shen W B, Ye M B, *et al.* Protective effects of nitric oxide on salt stress-induced oxidative damage to wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. *Chin Sci Bull*, 2001, 46(23):1993—1997.
- [ 6 ] Ruan H H, Shen W B, Liu K L, *et al.* Effects of exogenous NO donor on glutathione-dependent antioxidative system in wheat seedling leaf under salt stress. *Acta Agronomica Sinica*, 2005, 31(9):1114—1149.
- [ 7 ] Fan H F, Guo S R, Jiao Y S, *et al.* The effects of exogenous nitric oxide on growth, active oxygen metabolism and photosynthetic characteristics in cucumber seedlings under NaCl stress. *Acta Ecologica Sinica*, 2007, 27(2):546—553.
- [ 8 ] Uchida A, Andre T J, Takashi H. Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice. *Plant Sci*, 2002, 163:515—523.
- [ 9 ] Guo S R. Soilless culture science. Beijing: China Agricultural Press, 2003. 114.
- [ 10 ] Nakano Y, Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology*, 1981, 22:867—880.
- [ 11 ] Foyer C H, Halliwell B. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta*, 1976, 133:21—25.
- [ 12 ] Hossain M A, Asada K. Purification of dehydroascorbate reductase from spinach and its characterization as a thiol enzyme. *Plant Cell Physiology*, 1984, 25(1):85—92.
- [ 13 ] Miyake C, Asada K. Thylakoid-bound ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts and photoreduction of its primary oxidation product of monodehydroascorbate radicals in thylakoids. *Plant Cell Physiology*, 1992, 33:541—553.
- [ 14 ] Arakawa N, Tsutsumi, Sanceda N G, Kurata T, *et al.* A rapid and sensitive method for the determination of ascorbic acid using 4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1981, 45(5):1289—1290.
- [ 15 ] Griffiths O W. Determination of glutathione and glutathione disulphide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Analytical Biochemistry*, 1980, 106:207—212.
- [ 16 ] Leshem Y Y, Hamarat Y E. Plant aging: the emission of NO and ethylene and effect of NO-releasing compounds on growth of pea (*Pisum sativum*) foliage. *J Plant Physiol*, 1996, 148:258—263.
- [ 17 ] Gao Y S, Chen J S. Effects of  $La^{3+}$  on antioxidant system in wheat seedling leaves under salt stress. *Journal of The Chinese Rare Earth Society*, 2005, 23(4):490—495.
- [ 18 ] Fan H F, Guo S R, Du C X, *et al.* Effects of exogenous NO on  $NO_3^-$ -N,  $NH_4^+$ -N and soluble protein contents and NR activities in cucumber seedlings under NaCl stress. *Acta Bot Boreal Occident Sin*, 2006, 26(10):2063—2068.
- [ 19 ] Allen R D, Webb R P, Schake S A. Use of transgenic plants to study antioxidant defenses. *Free Radic Biol Med*, 1997, 23:473—479.
- [ 20 ] Xiang C, Oliver D J. Glutathione metabolites genes coordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in Arabidopsis. *Plant Cell*, 1998, 10:1539—1550.
- [ 21 ] Hu X Y, Cai W M. Nitric oxide and elicitor-induced plant defense responses. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2005, 17(2):176—182.
- [ 22 ] Chen Q, Liu Y L. Effect of glutathione on active oxygen scavenging system in leaves of barely seedlings under salt stress. *Acta Agronomica Sinica*, 2006, 30(3):365—371.
- [ 23 ] Jin Y H, Tao D L, Hao Z Q, *et al.* Environmental stresses and redox status of ascorate. *Acta Botanica Sinica*, 2003, 45(7):795—801.

#### 参考文献:

- [ 2 ] 史庆华,朱祝军,Khalid Al-aghabary,等.等渗盐胁迫对番茄抗氧化酶和 ATP 酶及焦磷酸酶活性的影响. *植物生理与分子生物学学报*, 2004,30(3):311—316.
- [ 5 ] 阮海华,沈文飏,叶茂炳,等.一氧化氮对盐胁迫下小麦叶片氧化损伤的保护效应. *科学通报*,2001,46(23):1993~1997.
- [ 6 ] 阮海华,沈文飏,刘开力,等.外源一氧化氮供体对盐胁迫下小麦幼苗叶片谷胱甘肽氧化酶系统的影响. *作物学报*,2005,31(9):1114~1149.
- [ 7 ] 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. *生态学报*,2007,27(2):546~553.
- [ 9 ] 郭世荣主编. 无土栽培学. 北京:中国农业出版社,2003:114.
- [ 16 ] 陈立松,刘星辉.水分胁迫对荔枝叶片活性氧代谢的影响. *园艺学报*,1998,25(3):241~246.
- [ 17 ] 高永生,陈集双.盐胁迫下镉对小麦幼苗叶片抗氧化系统的影响. *中国稀土学报*,2005,23(4):490~495.
- [ 18 ] 樊怀福,郭世荣,杜长霞,等.外源一氧化氮对 NaCl 胁迫下黄瓜幼苗氮化合物和硝酸还原酶的影响. *西北植物学报*,2006,26(10):2063~2068.
- [ 21 ] 胡向阳,蔡伟明.一氧化氮与激发子诱导的植物抗病防卫反应. *生命科学*,2005,2005,17(2):176~182.
- [ 22 ] 陈沁,刘友良.谷胱甘肽对盐胁迫大麦叶片活性氧清除系统的保护作用. *作物学报*,2006,30(3):365~371.