

DOI: 10.5846/stxb201310142472

周万海, 冯瑞章, 师尚礼, 寇江涛. NO 对盐胁迫下苜蓿根系生长抑制及氧化损伤的缓解效应. 生态学报, 2015, 35(11): 3606-3614.

Zhou W H, Feng R Z, Shi S L, Kou J T. Nitric oxide protection of alfalfa seedling roots against salt-induced inhibition of growth and oxidative damage. Acta Ecologica Sinica, 2015, 35(11): 3606-3614.

NO 对盐胁迫下苜蓿根系生长抑制及氧化损伤的缓解效应

周万海^{1,2}, 冯瑞章¹, 师尚礼^{2,*}, 寇江涛²

1 宜宾学院生命科学与食品工程学院 西南特色经济植物实验室, 宜宾 644000

2 甘肃农业大学草业学院 草业生态系统教育部重点实验室, 兰州 730070

摘要:以“甘农 4 号”苜蓿品种为材料, 采用水培法, 用 NO 供体硝普钠(SNP)、硝普钠类似物亚铁氰化钠(不产生 NO)、NO 特异清除剂 c-PTIO、一氧化氮合酶(NOS)活性抑制剂 N-硝基-L-精氨酸甲酯(L-NAME)、硝酸还原酶(NR)活性抑制剂钨酸盐处理苜蓿植株, 研究 NO 对盐胁迫下苜蓿幼苗根系生长、根系活力、根系中渗透调节物质、膜脂过氧化、活性氧含量及抗氧化酶活性等的影响, 探讨 NO 调控苜蓿幼苗根系耐盐性的生理机制。结果表明: 盐胁迫下 SNP 处理提高了根系活力, 促进了苜蓿幼苗根系生长, 降低游离脯氨酸含量, 促进可溶性蛋白含量增加; 增强超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、愈创木酚过氧化物酶(GPX)、抗坏血酸过氧化物酶(APX)和谷胱甘肽还原酶(GR)活性, 提高还原型抗坏血酸(AsA)和还原型谷胱甘肽(GSH)含量, 降低过氧化氢(H₂O₂)、羟自由基(OH[·])含量、超氧阴离子(O₂^{·-})产生速率和膜脂过氧化产物丙二醛(MDA)含量; 同时, SNP 处理显著促进了苜蓿幼苗根系内源 NO 的积累。NO 供体 SNP 的类似物亚铁氰化钠对盐胁迫下苜蓿根系各项生理生化指标无明显影响; 盐胁迫下添加 c-PTIO、L-NAME 和钨酸盐进一步降低了苜蓿幼苗根系活力和根系生长, 抑制了根系抗氧化系统活性, 加剧了根系膜脂过氧化作用, 降低了内源 NO 积累, 添加 SNP 则能缓解该抑制效应; 表明外源 SNP 处理能明显缓解盐胁迫对苜蓿幼苗根系生长的抑制和氧化损伤, 且通过 NOS 和 NR 途径产生的内源 NO 也可能在苜蓿根系适应盐胁迫的调节中起关键作用; 该研究结果为苜蓿耐盐机制及 NO 在苜蓿耐盐育种、化学调控和盐碱地栽培利用等提供了理论依据。

关键词:一氧化氮; 苜蓿; 盐胁迫; 抗氧化系统; 根系

Nitric oxide protection of alfalfa seedling roots against salt-induced inhibition of growth and oxidative damage

ZHOU Wanhai^{1,2}, FENG Ruizhang¹, SHI Shangli^{2,*}, KOU Jiangtao²

1 Laboratory of Southwestern Economic Plants, College of Life Science & Food Engineering, Yibin University, Yibin 644000, China

2 Key Ecosystem Laboratory of the Ministry of Education, College of Grassland Science, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China

Abstract: Roots play important roles in anchoring plants in the soil and absorbing water and nutrients from the soil. Soil salinity is one of the major abiotic stresses that adversely affect root growth and development. The exogenous application of some bioactive substances is a simple and effective approach to improve plant stress tolerance in agricultural production. Nitric oxide (NO) is a bioactive, gaseous, multifunctional molecule which plays a central role and mediates a variety of physiological processes and responses to biotic and abiotic stresses, including salt. However, information on the effects of exogenous SNP on alfalfa root systems under salt stress conditions and its physiological mechanisms is lacking. In this study, *Medicago sativa* L. cv. Gannong No.4 was used as the experimental material and NO-donor sodium nitroprusside (SNP),

基金项目:牧草种质资源保护利用(NB2130135); 国家牧草产业技术体系专项(CARS-35); 宜宾学院重点科研项目(2013QD06)

收稿日期:2013-10-14; **网络出版日期:**2014-08-22

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: shishl@gsau.edu.cn

NO-scavenger 2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide (c-PTIO), tungstate, the nitrate reductase (NR) inhibitor, nitric oxide synthase (NOS) inhibitor NG-nitro-L-Arg-methyl ester (L-NAME) and sodium ferrocyanide (SNP analogue, does not release NO) were used to investigate the effects of NO on growth, root vigor, osmoregulatory molecules, membrane lipid peroxidation, reactive oxygen species (ROS) accumulation and the activity of antioxidant enzyme in alfalfa roots under NaCl stress. Results showed that when 100 $\mu\text{mol/L}$ SNP was applied in the nutrient solution under NaCl stress, the growth of alfalfa roots was significantly improved for eight days, the root vigor value and the content of free proline were increased and the content of soluble protein was decreased throughout the treatment period. SNP also caused an increase in the activities of ascorbate peroxidase (APX), catalase (CAT), glutathione reductase (GR), guaiacol peroxidase (GPX), superoxide dismutase (SOD), and the contents of reduced ascorbic acid (AsA) and reduced glutathion (GSH) under salt stress. Whereas, the content of H_2O_2 , $\text{OH}^\cdot$, production rate of $\text{O}_2^\cdot$ and MDA level were decreased in alfalfa roots. Meanwhile, SNP pretreatment improved the endogenous NO accumulation. Sodium ferrocyanide, the NO-donor SNP analogue, has no noticeable effect on the damage caused by NaCl stress for alfalfa roots. When applied with the NO-scavenger c-PTIO, under NaCl stress, the NR inhibitor tungstate and NOS inhibitor L-NAME both reduced the accumulation of endogenous NO in roots, further inhibited the activity of the antioxidant system, aggravated membrane lipid peroxidation and root growth, however, their harmful effects on growth, antioxidant system and membrane lipid peroxidation could be reversed by the addition of SNP. Thus, the results showed that application of SNP significantly increased root vigor, activated the antioxidant system, alleviated the oxidative root damage induced by salt stress and promoted root growth under NaCl stress. Endogenous NO may also take part in the regulation of salt-tolerance of alfalfa roots under NaCl stress, and the release of NO according to the NOS and NR pathways may play an important role in alleviating the inhibitive effect in alfalfa root growth. These results may provide a theoretical basis for the mechanisms of salt resistance, help research into NO in the chemical regulation of alfalfa salt tolerance, the breeding of salt tolerant alfalfa cultivars, and the utilization of saline land in the future.

Key Words: Nitric oxide; alfalfa; salt stress; antioxidant systems; roots

根系是植物与土壤环境接触的主要界面,不仅在植物水分、养分吸收、土壤固着及内源激素合成中起关键作用,也是土壤盐渍危害中植物最直接的受害部位,因此改善和提高植物根系的生长对植物适应环境有重要意义^[1-2]。一氧化氮(NO)是一种重要的信号分子,在植物生长发育和抗逆反应中起关键作用^[3],研究表明,一定浓度的NO对植物侧根、不定根和根毛的发育有促进作用,但对主根的伸长具抑制效应^[4-5]。外源NO能提高盐胁迫下根组织的渗透调节能力、降低自由基积累,缓解根系氧化损伤,改善根系对离子的选择性吸收、促进根系生长,从而提高植株耐盐性^[6-8]。然而,植物能通过一氧化氮合酶(NOS)或硝酸还原酶(NR)催化的酶学途径或非酶学途径形成内源NO,且内源NO的产生受植物种、组织和细胞类型及环境条件的影响^[9],使得NO在植物体中的来源及在抗逆中的作用有较大争议。因此,研究NO对根系耐盐性的调控效应及作用机制具有重要的理论意义和实践价值。

苜蓿(*Medicago sativa* L.)是我国西北地区广泛种植的一种优质豆科牧草,盐渍已成为限制苜蓿生产的主要土壤环境因子之一,虽然苜蓿耐盐性研究已有一些报道,但有关NO对苜蓿根系耐盐性的作用机制仍然模糊不清,且苜蓿根系中内源NO的来源和对根系抗逆性的影响亦无相关报道,为进一步阐明NO在这一过程中的作用,本试验以苜蓿为材料,研究外源NO对盐胁迫下苜蓿根系生长和氧化损伤的缓解效应;同时还研究了苜蓿根系中内源NO的来源及其在根系耐盐中的作用,为进一步理解盐胁迫对豆科双子叶植物根系生长抑制的作用机制及调控方法提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料的培养和处理

供试苜蓿品种为甘农 4 号 (*Medicago sativa* L. cv. Gannong No.4)。选取饱满均匀的苜蓿种子,用 0.1% HgCl_2 溶液消毒 5 min, 去离子水洗净,播种于灭菌的蛭石培养钵中,种子萌发后每盆定植 10 株,转移至光照培养室(相对湿度 60%,光照时间为 14 h,光通量密度 $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$,昼/夜温度为 $25^\circ\text{C}/20^\circ\text{C}$),每 3 d 浇灌 1 次 1/2 Hoagland 营养液,生长 35 d 后,挑选整齐一致的幼苗洗净后移栽到盛有 1/2 Hoagland 营养液的塑料钵中预培养,预培养 3 d 后开始处理。试验中以亚硝基铁氰化钠(sodium nitroprusside, SNP)为 NO 供体,亚铁氰化钠(sodium ferrocyanide, SF)为 SNP 类似物(不产生 NO),2-4-羧苯基四甲基咪唑烷-1-氧-3-氧化物(2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide, c-PTIO)为 NO 特异清除剂,钨酸盐(tungstate, 缩写为 T)为硝酸还原酶活性抑制剂,N-硝基-L-精氨酸甲酯(NG-nitro-L-Arg-methyl ester, L-NAME)为一氧化氮合酶抑制剂,以上化学试剂均购于 Sigma 公司。试验设 11 种处理:1) CK, 2) SNP (100 $\mu\text{mol/L}$ SNP), 3) NaCl (150 mmol/L NaCl), 4) NaCl+SNP (150 mmol/L NaCl+100 $\mu\text{mol/L}$ SNP), 5) NaCl+SF (150 mmol/L NaCl+100 $\mu\text{mol/L}$ 亚铁氰化钠), 6) NaCl+c-PTIO (150 mmol/L NaCl+100 $\mu\text{mol/L}$ c-PTIO), 7) NaCl+c-PTIO+SNP (150 mmol/L NaCl+100 $\mu\text{mol/L}$ c-PTIO+100 $\mu\text{mol/L}$ SNP), 8) NaCl+T (150 mmol/L NaCl+100 $\mu\text{mol/L}$ Tungstate), 9) NaCl+SNP+T (150 mmol/L NaCl+100 $\mu\text{mol/L}$ Tungstate+100 $\mu\text{mol/L}$ SNP), 10) NaCl+L-NAME (150 mmol/L NaCl+100 $\mu\text{mol/L}$ L-NAME), 11) NaCl+SNP+L-NAME (150 mmol/L NaCl+100 $\mu\text{mol/L}$ L-NAME+100 $\mu\text{mol/L}$ SNP);所用溶液均用 1/2 Hoagland 营养液溶解配制,试验采用随机区组设计,每处理 10 盆,重复 3 次。为保证处理浓度稳定,每隔 2 d 更换 1 次处理液,用空气压缩泵给营养液间歇通入空气。处理第 8 天取根样测定各项指标,每处理取 3 个重复。

1.2 测定项目与方法

1.2.1 根系干重测定

处理结束后,将植株的地上部和地下部分开,取苜蓿幼苗根系,用去离子水冲洗干净,擦干水分, 105°C 杀青 15 min, 70°C 烘干至恒重,称干质量。

1.2.2 生理生化指标及 NO 产生量测定

根系活力用氯化三苯基四氮唑(triphenyltetrazolium chloride, TTC)法测定^[10],游离脯氨酸含量用水合茚三酮法测定^[10],用蒽酮法测定可溶性糖含量^[10],考马斯亮蓝 G-250 法测定可溶性蛋白含量^[10],硫代巴比妥酸法测定丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量^[10],羟自由基含量测定参考 Halliwell 的方法^[11],过氧化氢(H_2O_2)含量测定采用 Velikova 的方法^[12],超氧阴离子产生速率测定参考王爱国的方法^[13];粗酶液的制备参考 Azevedo-Neto 的方法^[14],超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性测定参考 Giannopolitis 和 Ries 的方法^[15],过氧化氢酶(catalase, CAT)活性测定参考 Beers 和 Sizer 的方法^[16],抗坏血酸过氧化物酶(ascorbate peroxidase, APX)活性测定参考 Nakano and Asada(1981)的方法^[17],愈创木酚过氧化物酶(guaiacol peroxidase, GPX)活性测定参考 Urbanek 的方法^[18],谷胱甘肽还原酶(glutathione reductase, GR)活性测定参考 Foyer 的方法^[19];还原型抗坏血酸(reduced ascorbic acid, AsA)含量测定参考 Law 的方法^[20],还原型谷胱甘肽(reduced glutathion, GSH)含量测定参考 Griffith 的方法^[21];NO 产生量测定参考 Zhou 的方法^[22]。

1.3 数据处理

所有数据均为 3 个重复的平均值 $\pm$ 标准误($\pm\text{SE}$),SPSS (16.0)软件进行单因素方差(ANOVA)统计分析, Duncan 法多重比较,差异显著性定义为 $P < 0.05$,Excel 2003 制作相应图表。

2 结果与分析

2.1 SNP 对苜蓿根系生长和根系活力的影响

盐胁迫抑制了苜蓿幼苗根系生长和根系活力(图 1),与 CK 相比,根系干重和活力分别降低 15.9% 和

58.7% ($P<0.05$); SNP 缓解了盐胁迫对根系生长和活力的抑制, 干重和根系活力分别比 CK 降低 8.1% 和 16.7% ($P<0.05$)。NO 的特异清除剂 c-PTIO、硝酸还原酶活性抑制剂钨酸盐和一氧化氮合酶活性抑制剂 L-NAME 分别与 NaCl 共处理进一步抑制了苜蓿根系干重和根系活力 ($P<0.05$), 与 CK 相比根系干重分别降低 26.7%、24.9% 和 32.7%, 根系活力降低 63.3%、62.5% 和 68.9%; c-PTIO、钨酸盐和 L-NAME 对根系干重和活力的抑制效应能被 SNP 缓解, 各处理根系干重和活力与 NaCl 处理无差异; 盐胁迫对苜蓿幼苗根系生长和根系活力的抑制不能被 SNP 类似物亚铁氰化钠缓解 ($P>0.05$)。

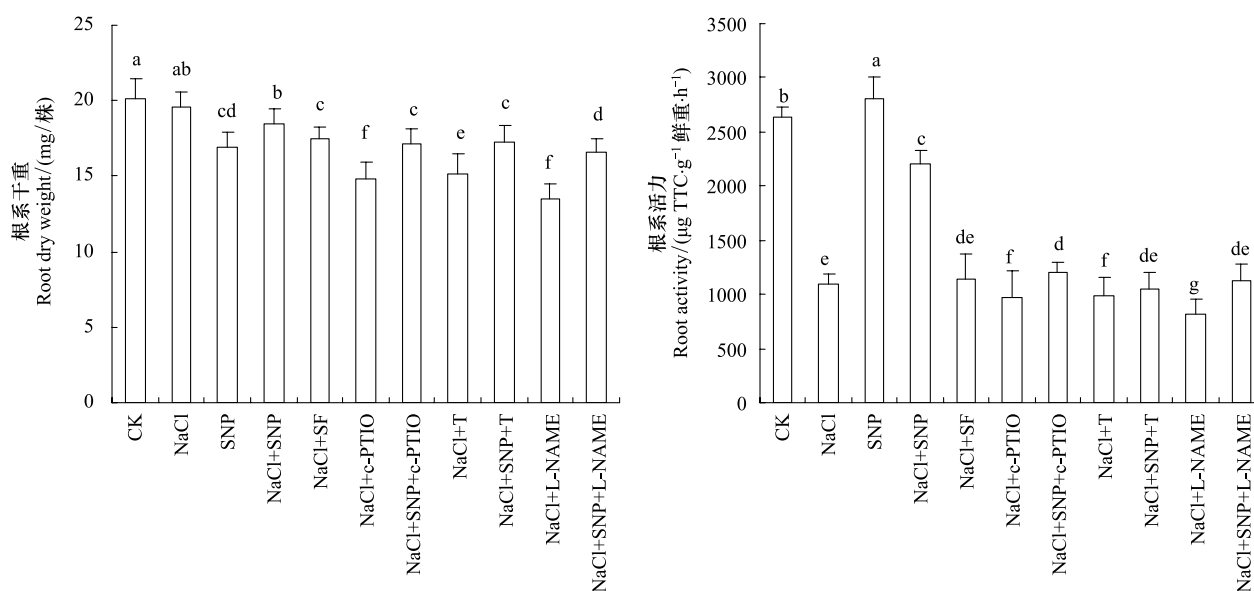


图 1 SNP 对盐胁迫下苜蓿根系干重和根系活力的影响

Fig.1 Effect of sodium nitroprusside on dry weight and root activity in alfalfa root system under salt stress

2.2 SNP 对盐胁迫下苜蓿根系渗透调节物质含量的影响

盐胁迫下苜蓿根系中游离脯氨酸和可溶性糖含量分别比 CK 增加 3.4 倍和 2.1 倍, 可溶性蛋白含量降低 43.7%, 表明盐胁迫引起苜蓿根系的渗透胁迫。添加 SNP 使可溶性蛋白含量升高, 游离脯氨酸和可溶性糖含量降低。c-PTIO、钨酸盐和 L-NAME 与 NaCl 共处理进一步提高了游离脯氨酸和可溶性糖含量, 降低了可溶性蛋白含量 ($P<0.05$), 与 CK 相比, 游离脯氨酸增加 3.8—4.1 倍, 可溶性糖含量提高 2.3—2.6 倍, 可溶性蛋白分别降低 56.1%、52.3% 和 58.7%, 添加 SNP 能逆转 c-PTIO、钨酸盐和 L-NAME 处理对苜蓿根系游离脯氨酸、可溶性糖、可溶性蛋白的影响。亚铁氰化钠处理使苜蓿根系中游离脯氨酸、可溶性糖和可溶性蛋白含量与 NaCl 处理无差异 ($P>0.05$) (表 1)。

2.3 SNP 对盐胁迫下苜蓿根系自由基和 MDA 含量的影响

盐胁迫下苜蓿根系中 H_2O_2 和 $OH^\cdot$ 含量及 $O_2^{\cdot-}$ 产生速率显著增加, 膜脂过氧化产物 MDA 也随之增加, 根系中 MDA、 H_2O_2 和 $OH^\cdot$ 含量及 $O_2^{\cdot-}$ 产生速率分别比 CK 增加 662%、50.7%、209.8% 和 180.8%, 施加 SNP 降低了根系中 H_2O_2 、 $OH^\cdot$ 含量及 $O_2^{\cdot-}$ 产生速率, 有效缓解根系膜脂过氧化程度 ($P<0.05$) (图 2)。盐胁迫下, c-PTIO、钨酸盐和 L-NAME 处理使 H_2O_2 、 $OH^\cdot$ 含量和 $O_2^{\cdot-}$ 产生速率显著增加, 进一步加剧膜脂过氧化程度 ($P<0.05$), c-PTIO、钨酸盐和 L-NAME 处理下添加 SNP 则降低了根系中 H_2O_2 、 $OH^\cdot$ 含量及 $O_2^{\cdot-}$ 产生速率及膜脂过氧化程度。与 NaCl 处理相比, 亚铁氰化钠对根系中 MDA、 H_2O_2 、 $OH^\cdot$ 含量和 $O_2^{\cdot-}$ 产生速率无缓解效应 ($P>0.05$) (图 2)。

表 1 SNP 对盐胁迫下苜蓿根系可溶性蛋白、游离脯氨酸和可溶性糖含量的影响

处理	可溶性蛋白/(mg/g 鲜重)	游离脯氨酸/(μg/g 鲜重)	可溶性糖/(μg 葡萄糖/g 鲜重)
Treatment	Soluble protein content	Free proline content	Soluble sugar content
CK	42.6±2.4 a	14.89±3.1 g	150±21 e
NaCl	22.5±1.5 cd	50.54±2.8 de	298±34 c
SNP	43.9±3.6 a	13.11±3.3 g	164±22 e
NaCl+ SNP	38.7±4.2 b	32.41±3.9 f	232±12 d
NaCl+SF	24.5±2.4 c	48.41±1.4 d	300±19 c
NaCl+c-PTIO	18.7±1.1 e	60.34±1.8 b	387±24 a
NaCl+ SNP +c-PTIO	25.1±3.7 c	52.15±1.6 d	312±10 c
NaCl+T	20.3±2.6 d	65.44±2.5 a	351±15 b
NaCl+ SNP +T	22.9±2.7 cd	54.67±2.1 cd	289±18 c
NaCl+L-NAME	17.6±2.1 e	56.38±1.1 c	366±26 ab
NaCl+ SNP +L-NAME	23.1±3.2 c	47.54±2.9 e	307±20 c

数据以平均数±标准差表示;同一列不同字母为差异显著 ($P<0.05$)

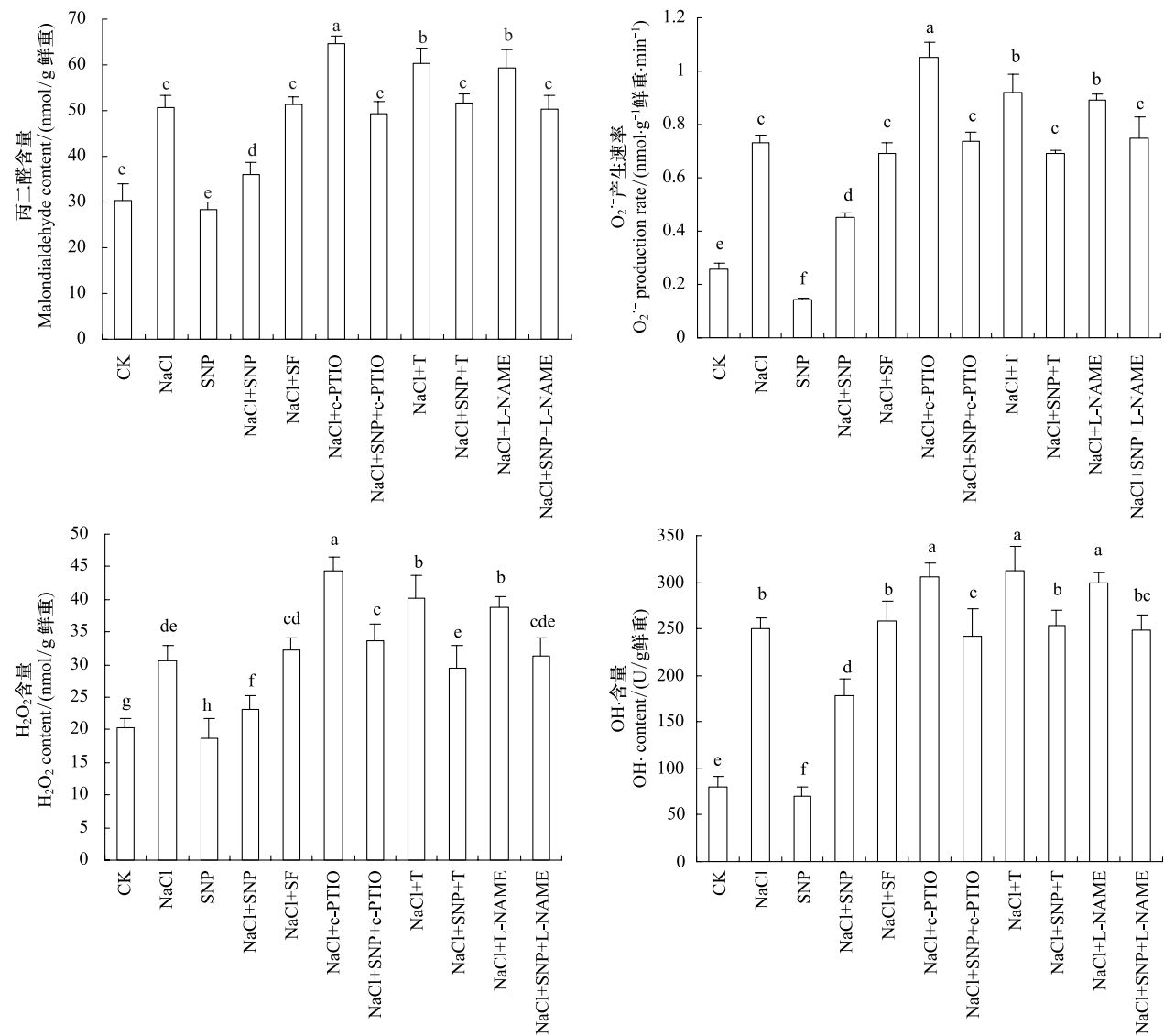


图 2 SNP 对盐胁迫下苜蓿根系 MDA、H₂O₂、OH· 含量和 O₂^{·-} 产生速率的影响

Fig.2 Effect of sodium nitroprusside on the level of MDA, H₂O₂, OH· and production rate of O₂^{·-} in alfalfa root system under salt stress

2.4 SNP 对盐胁迫下苜蓿根系抗氧化系统的影响

与 CK 相比,正常条件下添加 SNP 能在一定程度上提高苜蓿根系抗氧化酶活性和抗氧化物含量(表 2);盐胁迫使苜蓿根系 SOD、CAT、GPX 和 APX 活性比 CK 降低 48.5%、50.2%、23.9%和 57.4%,GR 活性升高 34.4%($P<0.05$),AsA 和 GSH 含量分别提高 1.17 和 1.28 倍。SNP 提高根系抗氧化系统活性,SOD、CAT、GPX、APX 和 GR 活性分别比 NaCl 处理提高 54.2%、83.3%、125.9%、78.3%和 25.6%,AsA 和 GSH 含量也进一步提高($P<0.05$)(表 2)。c-PTIO、钨酸盐和 L-NAME 处理能抑制 SOD、GPX、CAT、APX 和 GR 活性,降低 AsA 和 GSH 含量($P<0.05$)。添加 SNP 能缓解 c-PTIO、钨酸盐和 L-NAME 处理对抗氧化系统活性的抑制;亚铁氰化钠处理对苜蓿幼苗根系抗氧化系统的影响与 NaCl 处理类似($P>0.05$)(表 2)。

表 2 SNP 对盐胁迫下苜蓿根系抗氧化系统活性和 NO 含量的影响

Table 2 Effect of sodium nitroprusside on the activity antioxidant system and nitric oxide content in alfalfa root system under salt stress

处理 Treatment	超氧化物歧化酶 Superoxide dismutase activity/ (U/mg 蛋白)	愈创木酚过氧化酶活性 Guaiacol peroxidase activity/ (μmol 愈创木酚 mg^{-1} 蛋白 min^{-1})	过氧化氢酶活性 Catalase activity/ ($\mu\text{molH}_2\text{O}_2$ mg^{-1} 蛋白 min^{-1})	抗坏血酸过氧化酶活性 Ascorbate peroxidase activity/ (μmolAsA mg^{-1} 蛋白 min^{-1})	谷胱甘肽还原酶活性 Glutathione reductase activity/ ($\mu\text{molNADPH}$ mg^{-1} 蛋白 min^{-1})	还原型抗坏血酸 Reduced ascorbic acid/ ($\mu\text{mol/g}$ 鲜重)	还原型谷胱甘肽 Reduced glutathion ($\mu\text{mol/g}$ 鲜重)	一氧化氮 Nitric oxide (nmol/g 鲜重)
CK	68±4 a	7.1±0.7 d	0.036±0.04 a	16.2±2.1 a	3.2±0.5 c	0.46±0.06 d	0.42±0.06 c	138.9±9.5 c
NaCl	35±3 c	5.4±1.1 e	0.018±0.01 b	6.9±1.5 c	4.3±0.4 b	0.75±0.07 c	0.54±0.09 b	94.6±8.6 e
SNP	69±2 a	14.1±0.5 a	0.037±0.01 a	15.5±1.0 a	3.6±0.2 c	0.37±0.02 e	0.44±0.01 c	286.4±2.3 a
NaCl+ SNP	44±5 b	12.2±0.3 b	0.033±0.03 a	12.3±2.3 b	5.4±0.9 a	1.27±0.03 a	0.69±0.02 a	225.1±11.5 b
NaCl+SF	37±1 c	6.4±0.9 e	0.021±0.01 b	7.2±1.4 c	4.4±0.3 b	0.8±0.08 bc	0.52±0.03 b	97.7±10.4 e
NaCl+c-PTIO	24±1 e	4.6±1.5 f	0.008±0.01 d	4.3±2.1 e	2.6±0.5 d	0.69±0.04 c	0.31±0.01 d	32.8±4.6 h
NaCl+ SNP +c-PTIO	34±2 c	8.2±0.4 c	0.017±0.03 b	7.1±0.9 c	3.8±0.6 bc	0.95±0.03 b	0.43±0.06 c	101.3±7.9 d
NaCl+T	28±6 e	7.2±0.6 d	0.007±0.01 d	5.6±0.8 d	3.1±0.4 c	0.74±0.09 c	0.29±0.05 d	36.9±6.4 g
NaCl+ SNP +T	36±3 c	8.7±0.4 c	0.015±0.04 b	6.5±1.1 c	4.2±0.7 b	0.89±0.10 bc	0.39±0.02 c	95.4±5.2 e
NaCl+L-NAME	30±1 d	3.8±0.7 f	0.011±0.03 c	4.9±0.5de	3.2±0.8 c	0.65±0.04 c	0.34±0.07 d	49.9±3.9 f
NaCl+ SNP +L-NAME	35±2 c	5.6±0.3 e	0.019±0.05 b	7.2±0.9 c	4.1±0.1 b	0.99±0.06 b	0.41±0.04 c	99.7±12.3 e

数据以平均数±标准差表示;同一列不同字母为差异显著($P<0.05$)

2.5 SNP 处理对盐胁迫下苜蓿根系 NO 含量的影响

由表 2 可知,与 CK 相比,正常条件下添加 SNP 显著促进了苜蓿根系中 NO 产量($P<0.05$);150 mmol/L NaCl 处理降低了根系中 NO 产量($P<0.05$)。盐胁迫下 SNP 处理使根系中 NO 产量分别比 CK 提高 2.06 倍($P<0.05$)。而 c-PTIO、钨酸盐和 L-NAME 处理显著抑制了 NO 的产生,与 NaCl 处理相比,NO 含量分别降低 51.6%、61.1%和 47.3%($P<0.05$);添加 SNP 能逆转 c-PTIO、钨酸钾和 L-NAME 处理对 NO 产量的影响。盐胁迫下亚铁氰化钠处理下苜蓿根系中 NO 含量与 NaCl 处理无差异($P>0.05$)。

3 结论与讨论

根系生长受抑制是盐胁迫下植物最早和最明显的症状^[23],本试验中 NaCl 胁迫明显抑制苜蓿幼苗根系生长,用 100 $\mu\text{mol/L}$ SNP 处理苜蓿幼苗,根系干重显著增加,NO 清除剂 c-PTIO 处理则进一步降低了苜蓿幼苗根系干重,添加 SNP 能逆转 c-PTIO 对根生长的抑制,由于 SNP 被广泛用做 NO 供体,且 SNP 类似物亚铁氰化钠处理对苜蓿根的生长无促进效应,表明 NO 能够缓解盐胁迫对苜蓿幼苗根生长的抑制效应。

根系活力是判断植物对逆境适应能力的优良指标。本研究中,盐胁迫导致苜蓿幼苗根系活力显著降低,说明盐胁迫破坏了苜蓿根系的功能。NO 作为生长素下游的一个信号分子,能替代 IAA 诱导植物侧根发育并促进根系对水分和养分的吸收^[4,24];此外,NO 还能调控生长素在根器官中的转运和平衡^[25],抑制 IAA 氧化酶

的活性,提高膜的转运活性和根系吸收功能^[26],从而促进细胞的分裂和生长^[27],增强根系活力和植株对逆境的适应能力,本研究也得到类似结果。

植物能通过积累可溶性蛋白、氨基酸和可溶性糖等一些小分子有机物缓解盐胁迫的不利影响^[28]。其中可溶性蛋白除参与渗透调节外^[29],还在一定程度上代表植物器官功能的变化^[30];脯氨酸含量的增加也能调控植物渗透势,提高植株耐性^[31]。本试验中盐胁迫显著降低苜蓿幼苗根系中可溶性蛋白含量,提高了游离脯氨酸含量,说明盐胁迫破坏了根系功能,但可溶性蛋白的分解会产生大量的游离氨基酸,这有利于根系进行渗透调节。因此,盐胁迫下根系中可溶性蛋白的分解可能是游离脯氨酸含量升高的原因之一。SNP 处理显著降低了根系中游离脯氨酸含量,但提高了可溶性蛋白含量,表明 NO 促进了植株蛋白的合成,这有助于维持根系渗透压和恢复根系功能。盐胁迫也提高了苜蓿根系中可溶性糖含量,但 SNP 处理使其含量显著降低,由于可溶性糖在植物体内具有渗透保护、碳储存和清除自由基的作用^[32],这种变化可能与 NO 对碳水化合物的代谢调控有关,需做进一步研究。因此,NO 通过渗透调节来维持根系渗透压和功能是促进盐胁迫下苜蓿根系生长的原因之一。

盐胁迫导致活性氧(ROS)代谢失衡,引起膜脂过氧化作用,因此氧化胁迫也是植物生长受抑制的原因之一^[33]。本试验中苜蓿根系的 H_2O_2 、 $\text{OH}^\cdot$ 含量和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 产生速率在盐胁迫下显著增加,膜脂过氧化产物 MDA 也随之升高,说明盐渍破坏 ROS 代谢平衡,ROS 的过量积累导致苜蓿根系的氧化伤害。植物进化过程中形成的抗氧化系统有助于 ROS 代谢平衡,其活性高低直接反映植株耐盐性^[34]。在抗氧化系统中,SOD 能够将 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 转变为 H_2O_2 ;CAT、GPX、APX 和 GR 是清除细胞内 H_2O_2 的关键酶^[35];AsA 和 GSH 除能直接清除 ROS 外,还与 APX 和 GR 协同作用清除 H_2O_2 。本试验中,盐胁迫使苜蓿幼苗根系中 SOD、CAT、APX 和 GPX 活性显著降低,但 GR 活性升高,SOD 活性较低可能与其猝灭根系中 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 有关,但这会产生过量的 H_2O_2 ,如果产生的 H_2O_2 不能被及时清除,它将与 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 或一些过度簇金属离子反应形成更具毒性的 $\text{OH}^\cdot$ ^[36],而 CAT 活性易受高浓度 H_2O_2 的抑制^[37],本试验中 CAT、APX 和 GPX 活性降低与 H_2O_2 和 $\text{OH}^\cdot$ 积累量是一致的。但盐胁迫提高了苜蓿根系中 AsA 和 GSH 含量,说明苜蓿根系的抗氧化更多依赖非酶抗氧化物。添加 SNP 使 SOD、CAT、APX、GPX 和 GR 活性升高,表明外源 NO 能激活苜蓿根系抗氧化酶活性。此外 NO 还能直接与 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 反应,形成毒性较低的 ONOO^- ,缓解细胞伤害^[38];本试验中 NO 处理使根系 SOD 活性仅轻微提高,可能与 NO 直接猝灭 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 有关。CAT、APX、GPX 和 GR 活性升高对降低 H_2O_2 含量有重要作用。NO 除调控根系生长发育外,还对根系中物质合成具调控作用^[39],如 NO 能促进苜蓿根部 GSH 合成^[40]。GSH 作为抗氧化剂以及金属硫蛋白和植物螯合肽的前体,能直接猝灭自由基,AsA 也能直接与 ROS 作用;本试验中 SNP 处理也使苜蓿根系中 GSH 和 AsA 含量显著升高。进一步分析表明,随抗氧化系统活性提高,根系组织中 MDA、 H_2O_2 、 $\text{OH}^\cdot$ 含量和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 产生速率显著降低,表明 NO 能诱导苜蓿根系中抗氧化系统活性,缓解盐诱导的氧化伤害,从而保护根系的结构和功能,促进根系的生长。

NOS 和 NR 是植物体内源 NO 的最主要来源,但仍存在争议^[9]。为明确苜蓿根系内源 NO 的来源和其对苜蓿根系耐盐性的影响,本试验用 NO 特异清除剂 c-PTIO、NOS 活性抑制剂和 NR 活性抑制剂处理苜蓿幼苗,结果表明,c-PTIO 处理进一步提高根系中自由基含量,加剧膜脂过氧化作用,添加 SNP 能逆转 c-PTIO 的效应,SNP 类似物处理对苜蓿根系的膜脂过氧化和 ROS 代谢无缓解效应,表明 NO 能缓解盐胁迫对苜蓿幼苗的氧化胁迫,且内源 NO 对根系耐盐也有一定作用。与 c-PTIO 处理类似,NOS 抑制剂 L-NAME 降低了根组织中 NO 的产生量和根系活力,加剧根系中 ROS 的积累和膜脂过氧化作用,抑制了根系的抗氧化系统活性和根系生长。但添加 SNP 则能提高根系中 NO 含量,缓解 L-NAME 的处理效应,表明根系中内源 NO 的合成可能依赖于 NOS 途径;用 NR 活性抑制剂钨酸盐处理,也得到与 L-NAME 类似的结果,然而,需要注意的是,钨酸盐不仅抑制 NR 活性,还能抑制植物根系生长、影响皮层微管的形成和诱导细胞的程序性死亡^[41],且通过 NR 途径来源的 NO 也受培养液中氮源的影响,因此,本研究中,钨酸盐处理下根系伤害的加剧和内源 NO 来源及代谢变化的原因还需被进一步研究和阐明。

逆境胁迫可以改变内源 NO 的代谢^[42],本试验中盐胁迫降低了苜蓿根系中 NO 的积累,这与一年生蒺藜苜蓿^[26]上的研究结果一致,但与拟南芥^[43]上的研究结果相反,这可能与研究中使用的材料类型,胁迫因子及处理时间有关。然而,内源 NO 必须积累达到一定浓度才能启动根的生长^[44]。因此,内源 NO 浓度降低也可能是盐胁迫下苜蓿根系生长降低的原因,而添加外源 SNP 后,促进了内源 NO 的积累,达到启动根系生长所需的浓度阈值,从而促进苜蓿植株根系的生长,但相关机制还应做进一步研究。

综上所述,SNP 处理能明显促进根系中 NO 的积累,提高苜蓿幼苗根系可溶性蛋白含量、根系活力和根系中抗氧化系统活性,降低自由基含量和膜脂过氧化作用,缓解盐胁迫对苜蓿幼苗根系的氧化伤害和生长抑制。NO 特异清除剂 c-PTIO、NOS 活性抑制剂和 NR 活性抑制剂处理盐胁迫下苜蓿幼苗,进一步降低了根系活力和根系中 NO 产量,抑制了根系抗氧化系统活性,提高了根系中自由基含量和膜脂过氧化作用,加剧了盐渍对苜蓿根系生长的抑制,表明依赖于 NOS 活性和/或 NR 活性产生的内源 NO 也参与盐胁迫下苜蓿幼苗根系耐盐性的调节。

参考文献 (References):

- [1] 闻玉,赵翔,张骁.水分胁迫下一氧化氮对小麦幼苗根系生长和吸收的影响.作物学报,2008,34(2):344-348.
- [2] Chen C W, Yang Y W, Lur H S, Tsai Y G, Chang M C. A novel function of abscisic acid in the regulation of rice (*Oryza sativa* L.) root growth and development. Plant and Cell Physiology, 2006, 47(1): 1-13.
- [3] Qiao W H, Fan L M. Nitric oxide signaling in plant responses to abiotic stresses. Journal of Integrative Plant Biology, 2008, 50(10): 1238-1246.
- [4] Correa-Aragunde N, Graziano M, Lamattina L. Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato. Planta, 2004, 218(6): 900-905.
- [5] 张美玲,廖伟彪,肖洪浪.一氧化氮和过氧化氢对万寿菊不定根形成的影响.中国沙漠,2012,32(1):105-111.
- [6] 陈明,沈文飏,阮海华,徐朗莱.一氧化氮对盐胁迫下小麦幼苗根生长和氧化损伤的影响.植物生理与分子生物学学报,2004,30(5):569-576.
- [7] 刘建新,胡浩斌,王鑫.外源 NO 对盐胁迫下黑麦草幼苗根生长抑制和氧化损伤的缓解效应.植物研究,2008,28(1):7-13.
- [8] Shi Q H, Ding F, Wang X F, Wei M. Exogenous nitric oxide protect cucumber roots against oxidative stress induced by salt stress. Plant Physiology and Biochemistry, 2007, 45(8): 542-550.
- [9] Moreau M, Lindermayr C, Durner J, Klessig D F. NO synthesis and signaling in plants-where do we stand. Physiologia Plantarum, 2010, 138(4): 372-383.
- [10] 邹琦.植物生理学实验指导.北京:中国农业出版社,2006.
- [11] Halliwell B, Grootveld M, Gutteridge J M C. Methods for the measurement of hydroxyl radicals in biochemical systems: deoxyribose degradation and aromatic hydroxylation. Methods of Biochemical Analysis, 2006, 33: 59-90.
- [12] Velikova V, Yordanov I, Edreva A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants. Plant Science, 2000, 151(1): 59-66.
- [13] 王爱国,罗广华.植物的超氧化物自由基与羟胺反应的定量关系.植物生理学通讯,1990,(6):55-57.
- [14] de Azevedo N A, Prisco J T, Enéas-Filho J, Rolim Medeiros J V, Gomes-Filho E. Hydrogen peroxide pre-treatment induces salt-stress acclimation in maize plants. Journal of Plant Physiology, 2005, 162(10): 1114-1122.
- [15] Giannopolitis C N, Ries S K. Superoxide dismutases. I. Occurrence in higher plants. Plant Physiology, 1977, 59(2): 309-314.
- [16] Beers R F, Sizer I W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. Journal of Biological Chemistry, 1952, 195(1): 133-140.
- [17] Nakano Y, Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidases in spinach chloroplasts. Plant and Cell Physiology, 1981, 22(5): 867-880.
- [18] Urbanek H, Kuzniak-Gebarska E, Herka K. Elicitation of defense responses in bean leaves by *Botrytis cinerea* polygalacturonase. Acta Physiologiae Plantarum, 1991, 13(1): 43-50.
- [19] Foyer C H, Halliwell B. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. Planta, 1976, 133(1): 21-25.
- [20] Law M Y, Charles S A, Halliwell B. Glutathione and ascorbic acid in spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplasts. The effect of hydrogen peroxide and of paraquat. Biochemical Journal, 1983, 210(3): 899-903.

- [21] Griffith O W. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Analytical Biochemistry*, 1980, 106(1): 207-212.
- [22] Zhou B Y, Guo Z F, Xing J P, Huang B R. Nitric oxide is involved in abscisic acid-induced antioxidant activities in *Stylosanthes guianensis*. *Journal of Experimental Botany*, 2005, 56(422): 3223-3228.
- [23] 弋良朋, 王祖伟. 盐胁迫下 3 种滨海盐生植物的根系生长和分布. *生态学报*, 2011, 31(5): 1195-1202.
- [24] Chen W W, Yang J L, Qin C, Jin C W, Mo J H, Ye T, Zheng S J. Nitric oxide acts downstream of auxin to trigger root ferric-chelate reductase activity in response to iron deficiency in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 2010, 154(2): 810 - 819.
- [25] Fernández-Marcos M, Sanz L, Lewis D R, Muday G K, Lorenzo O. Nitric oxide causes root apical meristem defects and growth inhibition while reducing PIN-FORMED 1 (PIN1)-dependent acropetal auxin transport. *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America*, 2011, 108(45): 18506-18511.
- [26] Xu J, Wang W Y, Yin H X, Liu X J, Sun H, Mi Q. Exogenous nitric oxide improves antioxidative capacity and reduces auxin degradation in roots of *Medicago truncatula* seedlings under cadmium stress. *Plant Soil*, 2010, 326(1/2): 321-330.
- [27] Zhang Y H, Liu H, Yin H, Wang W X, Zhao X M, Du Y G. Nitric oxide mediates alginate oligosaccharides-induced root development in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 2013, 71: 49-56.
- [28] 周万海, 师尚礼, 寇江涛. 盐胁迫下外源 NO 对苜蓿幼苗生长及氮代谢的影响. *应用生态学报*, 2012, 23(11): 3003-3008.
- [29] Sadeghipour O, Monem R, Tajal A A. Production of mungbean (*Vigna radiata* L.) as affected by nitrogen and phosphorus fertilizer application. *Journal of Applied Sciences*, 2010, 10(10): 843-847.
- [30] Cernusak L A, Aranda J, Marshall J D, Winter K. Large variation in whole-plant water-use efficiency among tropical tree species. *New Phytologist*, 2007, 173(2): 294-305.
- [31] Wang X Z, Wang H, Wu F Z, Liu B. Effects of cinnamic acid on the physiological characteristics of cucumber seedlings under salt stress. *Frontiers of Agriculture China*, 2007, 1(1): 58-61.
- [32] 廖岩, 彭友贵, 陈桂珠. 植物耐盐性机制研究进展. *生态学报*, 2007, 27(5): 2077-2085.
- [33] Lu S Y, Zhuo C L, Wang X H, Guo Z F. Nitrate reductase (NR)-dependent NO production mediates ABA- and H₂O₂-induced antioxidant enzymes. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2014, 74: 9-15.
- [34] 刘伟成, 郑春芳, 陈琛, 彭益全, 曾国权, 冀德伟, 陈少波, 谢起浪, 於俊琦. 花期海蓬子对盐胁迫的生理响应. *生态学报*, 2013, 33(17): 5184-5193.
- [35] Noctor G, Foyer C H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1998, 49(1): 249-279.
- [36] Tanou G, Molassiotis A, Diamantidis G. Induction of reactive oxygen species and necrotic death-like destruction in strawberry leaves by salinity. *Environmental and Experimental Botany*, 2009, 65(2/3): 270-281.
- [37] Horváth E, Szalai G, Janda T. Induction of abiotic stress tolerance by salicylic acid signaling. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2007, 26(3): 290-300.
- [38] Yamasaki H, Sakihama Y, Takahashi S. An alternative pathway for nitric oxide production in plants: new features of an old enzyme. *Trends in Plant Science*, 1999, 4(4): 128-129.
- [39] Ungar I A. *Ecophysiology of Vascular Halophytes*. Boca Raton: CRC Press, 1991.
- [40] Innocenti G, Pucciariello C, Gleuher M L, HopkiNs J, Stefano M D, Delledonne M, Puppo A, Baudouin E, Frendo P. Glutathione synthesis is regulated by nitric oxide in *Medicago truncatula* roots. *Planta*, 2007, 225(6): 1597-1602.
- [41] Xiong J, Fu G F, Yang Y J, Zhu C, Tao L X. Tungstate: is it really a specific nitrate reductase inhibitor in plant nitric oxide research. *Journal of Experimental Botany*, 2012, 63(1): 33-41.
- [42] Méndez-Bravo A, Raya-González J, Herrera-Estrella L, López-Bucio J. Nitric oxide is involved in alkamide-induced lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology*, 2010, 51(10): 1612-1626.
- [43] Besson-Bard A, Gravot A, Richaud P, Auroy P, Duc C, Gaymard F, Taconnat L, Renou J P, Pugin A, Wendehenne D. Nitric oxide contributes to cadmium toxicity in *Arabidopsis* by promoting cadmium accumulation in roots and by up-regulating genes related to iron uptake. *Plant Physiology*, 2009, 149(3): 1302-1315.
- [44] Wang P, Du Y, Li Y, Ren D, Song C P. Hydrogen peroxide-mediated activation of MAP kinase 6 modulates nitric oxide biosynthesis and signal transduction in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 2010, 22(9): 2981-2998.