

## 水杨酸通过一氧化氮信号诱导抗氧化防护来提高小麦幼苗根部耐盐性

冯峰<sup>1</sup>, 王育鹏<sup>1,2</sup>, 张震<sup>1</sup>, 周守标<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>安徽农业大学资源与环境学院, 安徽合肥 230036; <sup>2</sup>安徽师范大学生命科学学院, 安徽芜湖 241000)

**摘要:**水杨酸和一氧化氮在植物研究中被认为是调控一系列生理过程的重要内源信号分子。采用药理学和生物化学的方法, 研究发现外源水杨酸溶液对盐诱导小麦根部组织的氧化伤害具有保护作用。盐处理(150mmol/L)显著提高根部组织的脂质过氧化水平以及抑制根的生长; 同时添加 100 $\mu$  mol/L 的水杨酸(SA) 不仅可以有效的降低脂质过氧化水平以及部分增加根的生长, 而且激活了包括 SOD、POD 和 APX 等抗氧化酶的活性。此外, 一氧化氮(NO)供体硝普钠(SNP)处理能得到与上述 SA 处理相类似的生物学表型。进一步的研究发现, SA 的这种生物学功能很可能与 NO 有关, 因为结合采用 NO 专一性清除剂 cPTIO 的处理则不同程度地逆转了 SA 的各种缓解效应。更重要的是, SA 能通过模拟 SNP 的作用来诱导小麦幼苗根部大量释放 NO。上述研究表明, SA 通过 NO 信号上调小麦幼苗根部抗氧化防护来提高耐盐性。

**关键词:**小麦幼苗; 水杨酸; 一氧化氮; 抗氧化防护

中图分类号: S311 文献标识码: A

### Nitric Oxide is Involved in Salicylic Acid Induced-Antioxidant Defense under Salt Stress in Wheat Seedling Roots

Feng Feng<sup>1</sup>, Wang Yupeng<sup>1,2</sup>, Zhang Zhen<sup>1</sup>, Zhou Shoubiao<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>College of Resources and Environment, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;

<sup>2</sup>College of Life Sciences, Anhui Normal University, Wuhu 241000)

**Abstract:** In the present study, both Salicylic (SA) acid and nitric oxide (NO) were proven as signaling molecules in regulating a serial of physiological processes in plants. Using pharmacological and biochemical approaches, we evaluated the protective effect of exogenous salicylic acid against salt-induced oxidative damage in the roots of wheat seedling. Plants exposed to salt (150mmol/L NaCl) exhibited the significant increase of lipid peroxidation as well as the inhibition of root growth. However, SA (100 $\mu$ mol/L) supplementation to NaCl (150mmol/L) treated plants effectively not only reduced the lipid peroxidation and partially increased the root growth, but also activated anti-oxidant enzyme, including superoxide dismutase (SOD), activities.guaiacol peroxidase (POD) and ascorbate peroxidase (APX), which was also mimicked by the application of the nitric oxide (NO) donor sodium nitroprusside (SNP). Further analyses showed that the above ameliorating effects of SA were specific and related to NO, because the specific scavenger of NO 4,4,5,5-tetramethylimidazole-1-oxyl-3-oxide potassium salt (cPTIO) differentially blocked the above effects. Additionally, SA was able to mimic the effect of SNP by strongly increasing NO release in the roots after daily treatment. Taken together, above results suggest that SA might confer an increased tolerance to salinity stress by enhancing antioxidant defense in wheat seedling roots, which were partially mediated by NO signal.

**Key words:** wheat seedling, salicylic acid, nitric oxide, antioxidant defense

基金项目: 安徽省高校青年教师科研资助计划项目(2006jq1120); 安徽农业大学 2008 年度校长青年基金立项项目。

第一作者简介: 冯峰, 女, 1983 年出生, 安徽淮北人, 助教, 本科, 研究方向为植物氧化胁迫调控。通信地址: 230036 安徽省合肥市安徽农业大学资源与环境学院, Tel: 0551-5786461, E-mail: fengfeng@ahau.edu.cn。

通讯作者: 王育鹏, 男, 1976 年出生, 安徽合肥人, 讲师, 在读博士, 主要从事植物抗逆生理研究。通信地址: 230036 安徽省合肥市安徽农业大学资源与环境学院, Tel: 0551-5786602, E-mail: ypengwang@hotmail.com。

收稿日期: 2008-07-16, 修回日期: 2008-07-22。

盐渍化是影响土地生产力的重要障碍因子,它严重制约了粮食生产和农业可持续发展。世界上大约有半数的灌溉土地受盐渍化的影响。中国盐渍土分布也十分广泛,据国家统计局资料显示,1997年中国盐碱地面积约为 $7.7 \times 10^6 \text{hm}^2$ 。由于灌溉扩展、不合理的开发利用与管理以及气候变化等原因,这个数字还在以每年上百万公顷的速度增加。所以,土壤盐渍化已成为一个世界性问题,并且与人类正面临的人口、资源、环境和粮食等问题都密切相关。

大量的研究表明,在盐胁迫等逆境条件下,植物体内活性氧代谢系统的平衡受到影响,体内积累较多的活性氧使超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)等活性氧清除酶类的结构活性受到破坏,含量降低,导致植物清除活性氧的防御能力下降,膜脂过氧化或脱脂导致膜的完整性被破坏,差别透性丧失,电解质及某些小分子有机物大量渗漏,细胞物质交换平衡破坏,而膜脂过氧化产物对植物防御体系的破坏又加剧了膜脂的过氧化作用<sup>[1]</sup>;另一方面,累积的活性氧又会引起DNA断裂,导致基因突变,由于DNA损伤,使维持细胞基本生理功能的基因丧失了表达活性进而导致细胞衰老<sup>[2]</sup>。此外,活性氧还可损伤光合系统的细胞器,使光合电子传递系统失活,引起光抑制。试验表明,染色质结构对离子环境的改变极端敏感,盐离子浓度可以影响染色质结构的松弛度,细胞内盐浓度和抗渗透剂种类、含量的变化,可能影响细胞内染色质的静电作用和疏水作用的平衡。多数试验证明,高盐浓度诱导多倍化导致核型不稳定,有丝分裂紊乱,非整倍化。盐影响染色体数目的同时,也引起染色体的结构变异。高浓度NaCl还抑制RNA的合成。

一氧化氮(Nitric Oxide, NO)已被公认为动物和微生物中激活多种防护基因表达的可移动细胞间信号分子或者第二信使。由于其能提高植物抵御外来病原菌侵染以及多种逆境的能力,例如,低浓度(0.1~1 $\mu\text{M}$ )NO可有效清除叶绿体内大量产生的超氧阴离子,从而显著降低敌草快和百草枯对植物的氧化伤害<sup>[3]</sup>。因此,NO也被视为植物细胞内重要的第二信使。此外,NO与水杨酸(SA)、脱落酸(ABA)、生长素(IAA)、乙烯( $\text{C}_2\text{H}_4$ )及 $\text{H}_2\text{O}_2$ 等信号分子关系也非常密切,在一定程度上存在“cross-talk”现象。

笔者以小麦为材料,探查外源SA对下小麦幼苗根组织抗氧化防护的调节作用,试图去阐明外源SA为什么能缓解盐胁迫对小麦根部氧化伤害作用。其研究结果不仅可以探索外源SA对盐毒害下小麦生长的影响及其与NO相关机理,而且提高人们对SA在植

物盐适应中生理功能的认识,并为进一步了解植物盐适应生理过程以及提高植物耐盐性的实践措施提供理论依据。

## 1 材料

### 1.1 试验时间和地点

2007年10月在安徽农业大学资源与环境学院生态学实验室进行。

### 1.2 材料与处理

挑选大小一致的扬麦158 (*Triticum aestivum* L., Yangmai 158)种子,用2% NaClO消毒5min后,用蒸馏水冲洗干净,并在25 $^{\circ}\text{C}$ 暗培养1d催芽。之后用周转箱转移大小一致的种子至光照培养箱内( $<25 \pm 1>^{\circ}\text{C}$ ,光密度 $200 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ,光周期14h/10h),培养液每天更换1次直至两叶完全伸展。当小麦幼苗第2叶完全伸展后直接向培养液中加入150mM NaCl作为盐胁迫处理方式。试验设计了一系列组合,包括1个对照(Con,单用Hoagland培养液培养,不加NaCl和其他化学药剂)和其他7个处理(NaCl, Con+150mmol/L NaCl; SA+NaCl, Con+100 $\mu\text{mol}/\text{L}$  SA+150mmol/L NaCl; SA, Con+100 $\mu\text{mol}/\text{L}$  SA; SA+SNP+NaCl, Con+100 $\mu\text{mol}/\text{L}$  SNP+100 $\mu\text{mol}/\text{L}$  SA+150mmol/L NaCl; SA+NaCl+cPTIO, Con+100 $\mu\text{mol}/\text{L}$  SA+150mmol/L NaCl+1mmol/L cPTIO; SNP+NaCl, Con+100 $\mu\text{mol}/\text{L}$  SNP+150mmol/L NaCl; SNP+NaCl+cPTIO, Con+100 $\mu\text{mol}/\text{L}$  SNP+150mmol/L NaCl+1mmol/L cPTIO)。

## 2 方法

### 2.1 TBARS含量测定

膜脂过氧化(TBARS)根据Ruan<sup>[4]</sup>等(2002)方法测定。

### 2.2 酶活性测定

SOD活性测定参照Beauchamp和Fridovich(1971)<sup>[5]</sup>的方法,以氮蓝四唑(NBT)光化还原反应抑制50%所需的酶量为一个酶活性单位(U)。POD活性测定参照Hammerschmidt等<sup>[6]</sup>的方法稍加改进,3ml反应体系含0.25%愈创木酚和0.75% $\text{H}_2\text{O}_2$ ,加入适量酶液启动反应,记录A460的连续变化值( $\epsilon=26.6 \text{mmol}/(\text{L} \cdot \text{cm})$ )。APX活性测定参照Nakano和Asada<sup>[7]</sup>的方法, $\epsilon=2.8 \text{mmol}/(\text{L} \cdot \text{cm})$ 。LOX活性按Zhang<sup>[8]</sup>等描述的方法测定, $\epsilon=25 \text{mmol}/(\text{L} \cdot \text{cm})$ 。蛋白含量采用考马斯亮蓝法测定,以牛血清白蛋白(BSA)为标准蛋白<sup>[9]</sup>。

### 2.3 NO含量测定

采用Zhou等<sup>[10]</sup>的方法来检测NO的含量。用 $\text{NaNO}_2$ 标准溶液作为标准曲线,测量的吸收峰为540nm。

## 2.4 统计分析

实验数据用平均值 $\pm$ SE表示,采用 SPSS 10.0 软件对实验数据进行统计分析。不同字母表示通过 Duncan's 测验处理间差异达 0.05 显著水平

## 3 结果与分析

### 3.1 外源 SA 溶液对盐胁迫下小麦的生长的影响

植物受  $\text{Na}^+$  毒害最明显的症状就是根的生长受抑制,如图 1 所示,150mmol/L NaCl 处理 10d,小麦的生物量就抑制了 36.1%, $\text{Na}^+$  浓度越大,抑制作用越明显(数据未列)。

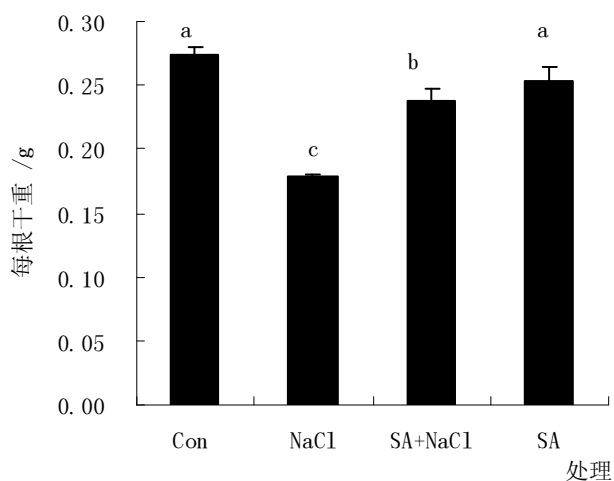
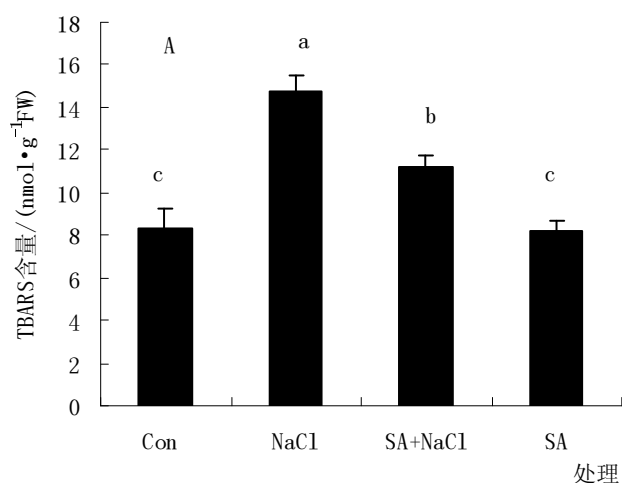


图 1 外源 SA 溶液处理对盐胁迫下小麦幼苗根生长的影响

外源 SA 溶液处理能够缓解  $\text{Na}^+$  对根生长的抑制作用,并且具有浓度效应(数据未列)。与单独  $\text{Na}^+$  处理相比,根部干重量的累积随着 SA 浓度的增加而增加,



当浓度为  $100\mu\text{mol/L}$  时达到最大值。上述结果表明, SA 缓解了  $\text{Na}^+$  对小麦根生长的抑制作用。

### 3.2 外源 SA 溶液对盐诱导的小麦根部氧化伤害的影响

为了进一步证明 SA 对  $\text{Na}^+$  诱导氧化胁迫的缓解作用,笔者测定了植物根部 TBARS 的含量,研究发现,  $150\mu\text{mol/L}$  NaCl 处理 24h 诱导了小麦根部脂质过氧化产物 TBARS 的积累(图 2A),反之,外源 SA 溶液则显著地降低  $\text{Na}^+$  诱导的 TBARS 的积累,表明 SA 缓解了  $\text{Na}^+$  诱导的小麦根部脂质过氧化损伤。

此外,笔者通过对 LOX 活性进行测定来评价质膜过氧化的程度。LOX 催化含 cis, cis-1, 4- 戊二烯结构的不饱和脂肪酸,通过加入分子氧来生成过氧羟基脂肪酸,因此它也是催化脂质过氧化的关键酶。研究结果显示,NaCl 处理 24h 诱导小麦根部 LOX 活性的上升,表明  $\text{Na}^+$  可以通过诱导 LOX 活性的上升来导致质膜过氧化。 $100\mu\text{M}$  SA 处理则明显降低了  $\text{Na}^+$  诱导的 LOX 活性的升高。而且以上结果与 TBARS 结果是相一致的。此外,单独 SA 溶液处理对小麦根部 TBARS 含量和 LOX 活性无明显影响(图 2B)。

### 3.3 SA 诱导 NO 的产生

为了探查 SA 缓解 NaCl 诱导的氧化胁迫过程中可能存在与 NO 的互作关系,笔者对不同处理组中 NO 的含量进行了分析,研究发现,NaCl 处理 24h 能明显地增加 NO 的含量,外源 SA 处理则进一步显著地诱导 NO 含量的增加。上述结果暗示,NO 可能参与了 SA 缓解  $\text{Na}^+$  诱导的氧化胁迫的过程。

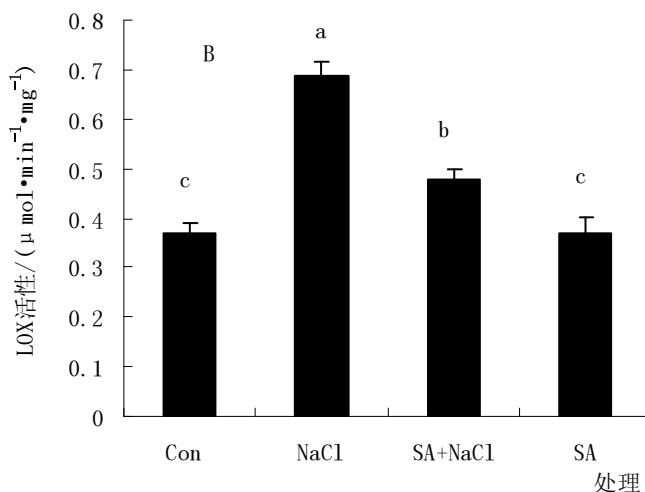


图 2 外源 SA 溶液处理对盐胁迫下小麦幼苗根部 TBARS 含量(A)和 LOX 活性(B)的影响

3.4 外源 SA、NO 供体 SNP 溶液及其专一性清除剂 cPTIO 对盐胁迫下小麦根部抗氧化酶活性的影响以前已有研究报道,在盐胁迫下,NO 可以提高植物体内的抗氧化酶活性<sup>[11]</sup>。实验结果表明,与单独盐胁迫相比,

NO 供体 SNP(Con+ $100\mu\text{mol/L}$  SNP+ $150\text{mmol/L}$  NaCl)可以显著增强( $P<0.05$ ) $150\text{mmol/L}$  NaCl 胁迫 24h 后的小麦幼苗根部的 SOD、POD 和 APX 活性。与此同时, $100\mu\text{mol/L}$  SA 处理 (Con+ $100\mu\text{mol/L}$  SA+ $150\text{mM}$  Na

Cl)也能得到类似的结果,但 SA 和 SNP 对抗氧化酶活性的影响没有叠加效应(表 1)。

有趣的是,结合 cPTIO (Con+150mmol/L NaCl+1mmol/L cPTIO) 处理 24h 不仅可以有效的抑制由于 SA 和 SNP 分别处理诱导的 SOD、POD 和 APX 活

性的增强,而且诱导了 TBARS 含量的上升(表 1)。这些结果表明,在盐胁迫下,NO 可能参与经 SA 信号而激活抗氧化酶的活性增强的调控。以上的结果都进一步暗示了 NO 可能参与调控 SA 诱导的小麦幼苗根部抗氧化防护。

表 1 外源 SA 溶液、SNP 溶液和 NO 的专一性清除剂 cPTIO 对盐胁迫下小麦根部酶活性以及 TBARS含量的影响

处理	TBARS	SOD	POD	APX
	/(nmol · g <sup>-1</sup> FW)	/(U · mg <sup>-1</sup> protein)	/(μmol · min <sup>-1</sup> · mg <sup>-1</sup> protein)	/(μmol · min <sup>-1</sup> · mg <sup>-1</sup> protein)
Con	8.32±0.89 <sup>c</sup>	19.2±1.4 <sup>c</sup>	8.2±1.2 <sup>c</sup>	420.2±12.3 <sup>c</sup>
NaCl	14.72±0.76 <sup>a</sup>	25.3±2.1 <sup>b</sup>	16.2±2.2 <sup>b</sup>	483.3±15.9 <sup>b</sup>
SA+NaCl	11.23±0.55 <sup>b</sup>	37.2±1.9 <sup>a</sup>	28.2±3.1 <sup>a</sup>	542.8±17.1 <sup>a</sup>
SA+SNP+NaCl	11.12±0.65 <sup>b</sup>	36.6±1.2 <sup>a</sup>	27.8±2.6 <sup>a</sup>	539.2±13.4 <sup>a</sup>
SA+NaCl+cPTIO	14.20±0.52 <sup>a</sup>	25.3±2.3 <sup>b</sup>	18.4±2.5 <sup>b</sup>	473.3±25.9 <sup>b</sup>
SNP+NaCl	10.83±0.39 <sup>b</sup>	37.5±2.4 <sup>a</sup>	28.5±2.8 <sup>a</sup>	537.2±16.8 <sup>a</sup>
SNP+NaCl+cPTIO	14.89±0.46 <sup>a</sup>	26.3±2.1 <sup>b</sup>	16.8±1.6 <sup>b</sup>	479.3±21.5 <sup>b</sup>

#### 4 讨论

盐胁迫常常引起植物体内发生氧化胁迫。所以,植物本身耐盐性的高低就与其是否具有高效的抗氧化防护系统密切相关。例如,在水稻中过表达酵母的 Mn-SOD 后可以比野生型的水稻更具耐盐性<sup>[12]</sup>。笔者提供明显的证据证明了外源 SA 对小麦根组织 Na<sup>+</sup> 胁迫氧化损伤的保护作用。实验表明,Na<sup>+</sup> 造成了膜脂质过氧化(图 2)及根生长量的抑制(图 1),这两个指标是盐毒害最明显的症状。100μmol/L SA 则缓解了上述 Na<sup>+</sup> 诱导的氧化损伤,包括缓解 Na<sup>+</sup> 诱导的氧化胁迫和膜脂质过氧化以及削弱 LOX 的活性(图 2),提高抗氧化酶的活性(包括 SOD、POD 和 APX)(表 1)。同样,SA 被证明参与了对铝(Al)诱导的 *C.tora* 根尖柠檬酸分泌的调节<sup>[13]</sup>,外源 SA 的施加明显增加了 *C.tora* 根尖柠檬酸的分泌,降低了根尖 Al 的积累,并且在 Al 处理 10h 时,根尖 Al 含量仅为单独 Al 处理(对照)的 29%。此外,SA 在植物抗冷性和抗旱性上也发挥着重要的作用<sup>[14]</sup>。因此,这些研究结果明确地暗示了 SA 能够缓解植物体内各种氧化胁迫。

大量研究报道指出,SA 在植物内的功能与 NO 非常相似,NO 在哺乳动物体内主要是由 NOS 来产生的。在植物体内,虽然对是否存在 NOS 依赖的 NO 产生方式尚有争议,但是 NO 已被公认为是参与调节植物发育、对抗胁迫以及防御反应的信使分子<sup>[15]</sup>。笔者在研究还发现,小麦幼苗在盐胁迫 24h 后,其根部的 NO 含量明显增加,这可能是作为一种信号来诱导抗氧化酶活性的升高。另外,外加 NO 供体 SNP 处理后

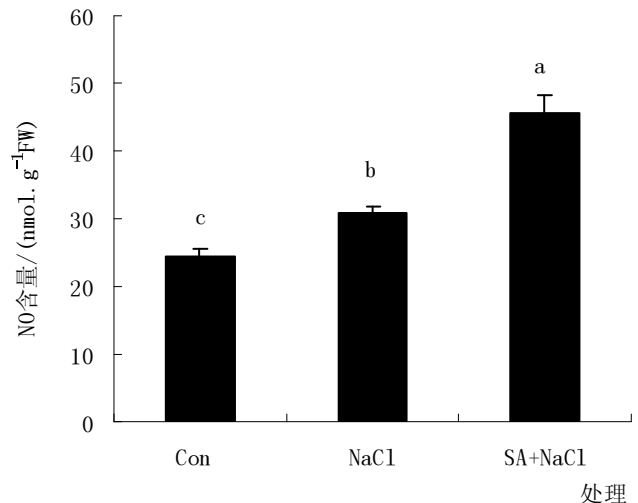


图 3 外源 SA 溶液处理对盐胁迫下小麦幼苗根部 NO 产生的诱导作用

(Con+100μmol/L SNP+150mmol/L NaCl) 则明显增强了小麦幼苗的耐盐性(表 D)。

此外,从图 3 结果中发现,当用 100μ M SA 与 NaCl 共处理后,根部的 NO 含量迅速增加(图 3),并且还发现,用组合 cPTIO 处理(Con+100μ mol/L SA+150mmol/L NaCl+1mmol/L cPTIO) 大幅下调了由 SA 诱导的抗氧化酶(SOD、POD 和 APX)活性的增强,并且,TBARS 含量也同步上升(表 1)。与 SA 相类似,NO 供体 SNP 处理(SNP+NaCl 和 SNP+NaCl+cPTIO 处理组)也能模拟上述类似的效应。总之,上述的结果都暗示着,NO 至少部分介导 SA 通过上调抗氧化防护提高小麦幼苗耐盐性。

## 参考文献

- [1] 孙兰菊,岳国峰.植物耐盐机制的研究进展.海洋科学,2001,25(4):28-31.
- [2] 陈德明.盐渍环境中的植物耐盐性及其影响因素.土壤学进展,1994,22(5):22-29.
- [3] Beligni M V, Lamattina L. Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyl elongation, three light-inducible responses in plants. *Planta*, 2000, 210(2):215-221.
- [4] Ruan H H, Shen W B, Ye M B, et al. Protective effects of nitric oxide on salt stress-induced oxidative damages to wheat (*Triticum aestivum*) leaves. *Chin Sci Bull*, 2002, 47(23):677-681.
- [5] Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem*, 1971, 44(1):276-287.
- [6] Hammerschmidt R, Nuckles E M, Kuc J. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. *Physiol Plant Pathol*, 1982, 20:73-82.
- [7] Nakano Y, Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol*, 1981, 22(5):867-880.
- [8] Zhang H, Shen W B, Xu L L. Effects of nitric oxide on the germination of wheat seeds and its reactive oxygen species metabolism under osmotic stress. *Acta Bot Sin*, 2003, 45(8):901-905.
- [9] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72(1-2):248-254.
- [10] Zhou B, Guo Z, Xing J, et al. Nitric oxide is involved in abscisic acid-induced antioxidant activities in *Stylosanthes guianensis*. *J Exp Bot*, 2005, 56(422):3223-3228.
- [11] Uchida A, Jagendorf A T, Hibino T, et al. Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice. *Plant Sci*, 2002, 163(3):515-523.
- [12] Tanaka Y, Hibino T, Hayashi Y, et al. Salt tolerance of transgenic rice overexpressing yeast mitochondrial Mn-SOD in chloroplasts. *Plant Sci*, 1999, 148(2):131-138.
- [13] Yang Z M, Wang J, et al. Salicylic acid-induced aluminum tolerance by modulation of citrate efflux from roots of *Cassia tora* L. *Planta*, 2003, 217(1):168-174.
- [14] 尹玲莉,侯晓杰.植物抗性信号分子—水杨酸研究进展.中国农学通报,2007,3(1):338-342.
- [15] Neill S J, Desikan R, Clarke A, et al. Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signalling in stomatal guard cells. *Plant Physiol*, 2002, 128(1):13-16.