

外源一氧化氮供体 SNP 对 NaCl 胁迫下黑麦草幼苗叶片抗坏血酸—谷胱甘肽循环的影响

刘建新, 王鑫, 李博萍

(陇东学院生命科学系, 甘肃 庆阳 745000)

摘要:采用营养液栽培,研究了外源一氧化氮(NO)供体硝普钠(SNP)对 150 mmol/L NaCl 胁迫下黑麦草幼苗叶片抗坏血酸—谷胱甘肽(ASA—GSH)循环中抗氧化酶活性和抗氧化物质及丙二醛(MDA)和 H₂O₂ 含量的影响。结果表明,正常条件下 100 μmol/L SNP 略微降低了黑麦草幼苗叶片的 MDA 和 H₂O₂ 含量,NO 信号转导途径关键酶鸟苷酸环化酶(GC)抑制剂亚甲基蓝(MB)促进了 MDA 和 H₂O₂ 水平的提高。NaCl 胁迫下,SNP 显著缓解了 MDA 和 H₂O₂ 的积累,提高了抗坏血酸过氧化物酶(APX)、谷胱甘肽还原酶(GR)和脱氢抗坏血酸还原酶(DHAR)活性及还原型抗坏血酸(ASA)、谷胱甘肽(GSH)含量,降低脱氢抗坏血酸(DHA)和氧化型谷胱甘肽(GSSG)含量,使 ASA/DHA 和 GSH/GSSG 提高,但对单脱氢抗坏血酸还原酶(MDAR)活性无显著影响;MB 逆转了 SNP 对 NaCl 胁迫下 MDA、H₂O₂、ASA、GSH、DHA、GSSG 含量和 APX、GR 活性及 ASA/DHA 和 GSH/GSSG 的调节作用,对 MDAR 和 DHAR 活性无显著影响。由此表明,NO 可能通过 GC 介导参与盐胁迫下黑麦草叶片 ASA—GSH 循环中 APX、GR 活性和 ASA、GSH 含量及 ASA/DHA、GSH/GSSH 的调节,缓解盐胁迫诱导的氧化伤害,提高植株的耐盐性。

关键词:一氧化氮;NaCl 胁迫;多年生黑麦草;抗坏血酸—谷胱甘肽循环

中图分类号:S543⁺.603.4;Q945.78 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-5759(2010)02-0082-07

* 盐害是植物遭受的主要逆境之一。盐胁迫下植物营养失衡和渗透调节遭受破坏^[1],使细胞叶绿体和线粒体电子传递泄漏的电子增加,活性氧(ROS)大量积累,造成膜系统氧化损伤^[2];引起光合电子传递系统失活和光抑制^[3],体内激素平衡破坏和生物量积累下降^[4];蛋白质和核酸变性,甚至导致细胞死亡^[5]。植物则通过限制盐分的过量吸收和调节抗氧化系统清除 ROS 积累等减轻或抵御盐胁迫对细胞的伤害^[6]。

一氧化氮(NO)是生物体重要的信号分子,在植物生长发育及应答盐、干旱和病原菌侵染等逆境胁迫反应中起重要作用^[7]。试验证实,外源 NO 参与了植物对盐胁迫应答的调节。盐胁迫下,NO 可缓解小麦(*Triticum aestivum*)叶片的氧化损伤^[8]、维持水稻(*Oryza sativa*)光系统 II 的高活性^[9]、提高黄瓜(*Cucumis sativus*)幼苗的抗氧化防护^[10],减轻盐对番茄(*Lycopersicon esculentum*)幼苗的伤害^[11]。已经知道,抗坏血酸(ASA)—谷胱甘肽(GSH)循环是植物清除 ROS 的酶促催化系统,在植物抵抗氧化胁迫、清除逆境 ROS 积累方面具有重要作用,但目前对 NO 调控盐胁迫下 ASA—GSH 循环代谢的研究并不多见^[12]。黑麦草(*Lolium perenne*)是栽培面积最大的禾本科优质牧草和草坪草,虽然不少品种具有中等强度的耐盐性,然而盐胁迫仍是制约黑麦草生产的主要逆境因子。有关 NO 调控黑麦草响应各种逆境的研究表明,外源 NO 能够缓解 NaCl 胁迫下幼苗的氧化损伤和生长抑制^[13-15];通过提高活性氧清除能力和增强依赖于叶黄素循环库的非辐射能量耗散,保护由镉胁迫引起的叶片光合机构的破坏^[16,17];提高种子的萌发和幼苗生长^[18],增强抗冷性^[19]。但 NO 对盐胁迫下草坪草植物 ASA—GSH 循环代谢调节的研究未见报道。本试验以多年生黑麦草为材料,研究了外源 NO 供体硝普钠(SNP)对 NaCl 胁迫下幼苗叶片 ASA、GSH 含量及相关抗氧化酶活性的影响,旨在为 NO 提高植物耐盐性提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料培养与处理

试验于 2008 年 9—11 月在陇东学院生命科学系生物园进行。供试多年生黑麦草品种为‘Barlennium’。种

* 收稿日期:2009-04-07;改回日期:2009-07-21

基金项目:甘肃省庆阳市科技攻关计划项目(0802NKCM082)资助。

作者简介:刘建新(1964-),男,甘肃通渭人,教授。E-mail: liujx1964@163.com

子催芽后,选露白一致的播于装有珍珠岩的塑料盆(27 cm×27 cm)中,每盆播 120 粒,用 1/2 Hoagland 溶液在玻璃温室中培育,自然光照,昼温 25~28℃,夜温 16~19℃,相对湿度 65%左右。待幼苗具 5 个叶片时,选长势一致的幼苗根据预实验筛选的 NaCl 胁迫浓度和 NO 供体硝普钠(sodium nitroprusside, SNP)处理浓度,同时加入 NO 信号传递途径关键酶鸟苷酸环化酶(guanylate cyclase, GC)抑制剂亚甲基蓝(methylene blue, MB),按如下设计方案进行浇苗处理,每天浇苗 1 次,每盆用量 300 mL。每处理 6 盆,3 次重复,随机区组排列。

实验处理为:1) Hoagland 溶液(CK);2) 含 SNP 100 μmol/L 的 Hoagland 溶液,SNP;3) 含 MB 10 μmol/L 的 Hoagland 溶液,MB;4) 含 150 mmol/L NaCl 的 Hoagland 溶液,NaCl;5) 含 NaCl 150 mmol/L 和 100 μmol/L SNP 的 Hoagland 溶液,NaCl+SNP;6) 含 NaCl 150 mmol/L、SNP 100 μmol/L 和 MB 10 μmol/L 的 Hoagland 溶液,NaCl+SNP+MB。处理后第 0,2,4,6,8 天取植株顶部向下第 2~3 片完全展开叶用液氮速冻后保存在 -80℃ 冰箱中,及时进行各项指标的测定,重复 3 次。

1.2 测定指标与方法

丙二醛(MDA)含量采用硫代巴比妥酸法测定^[20];H₂O₂含量参照 Brennan 和 Frenkel^[21]的方法测定;还原型抗坏血酸(ASA)和脱氢抗坏血酸(DHA)测定按照 Jin 等^[22]的方法;还原型谷胱甘肽(GSH)和氧化型谷胱甘肽(GSSG)含量采用 Gossett 等^[23]的方法测定;抗坏血酸过氧化物酶(APX)活性按 Nakano 和 Asada^[24]的方法测定;单脱氢抗坏血酸还原酶(MDAR)活性采用 Miyake 和 Asada^[25]的方法测定;脱氢抗坏血酸还原酶(DHAR)活性按 Hossain 和 Asada^[26]的方法测定;谷胱甘肽还原酶(GR)活性测定按照 Foyer 和 Halliwell^[27]的方法测定。测定结果以单位干重表示。

1.3 数据统计分析

采用 SPSS 12.0 软件进行方差分析,并用 SSR 法进行差异显著性检验($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 SNP 对 NaCl 胁迫下黑麦草幼苗叶片 MDA 和 H₂O₂ 含量的影响

MDA 是膜脂过氧化的产物。正常条件下 SNP 或 MB 处理的叶片 MDA 含量与对照无显著差异(图 1A);NaCl 胁迫下 MDA 含量显著高于对照,并随处理时间延长不断增加;SNP 显著降低了 NaCl 胁迫下的 MDA 水平;抑制剂 MB 消除了 SNP 对 MDA 的调节效应,使 MDA 含量与单独 NaCl 处理相比无显著差异。

正常条件下 SNP 处理的 H₂O₂ 含量与对照无显著差异(图 1B);MB 处理却提高了 H₂O₂ 含量,除处理第 2 天与对照无显著差异外,在处理第 4,6,8 天均显著高于对照。NaCl 胁迫明显促进了叶片 H₂O₂ 的积累,胁迫第 2 天时比对照增加 2.9 倍,而后缓慢降低,但仍显著高于对照;NaCl 胁迫下 SNP 降低了 H₂O₂ 的水平,在处理期间 H₂O₂ 含量显著低于 NaCl 处理;MB 逆转了 SNP 对 H₂O₂ 积累的抑制作用。

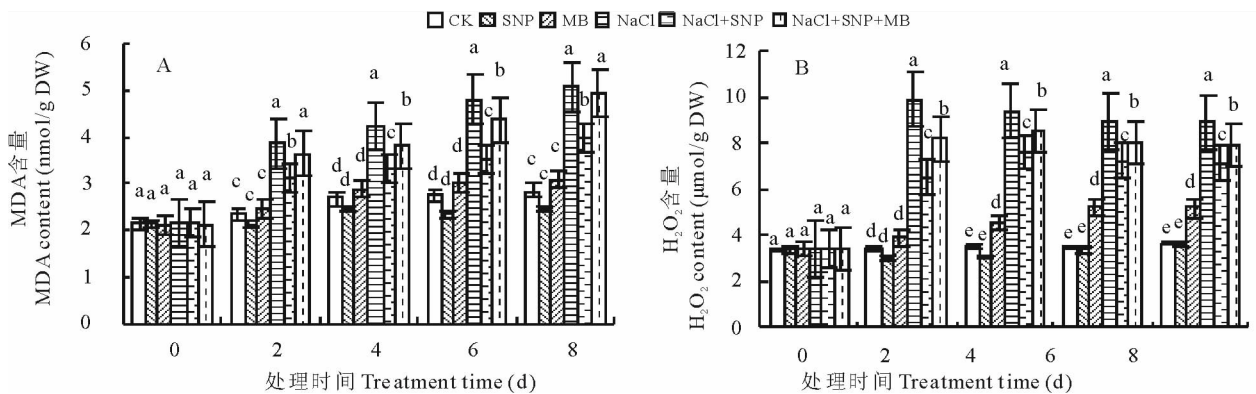


图 1 SNP 对 NaCl 胁迫下黑麦草幼苗叶片 MDA(A)和 H₂O₂ (B) 含量的影响

Fig. 1 Effects of SNP on contents of MDA (A) and H₂O₂ (B) in leaves of ryegrass seedlings under NaCl stress

图中不同小写字母表示同期处理间差异显著($P < 0.05$),下同 Different normal letters among the same times of treatment mean significant differences at the 0.05 level, the same below

2.2 SNP对NaCl胁迫下黑麦草幼苗叶片ASA和DHA含量及ASA/DHA的影响

正常条件下SNP提高了叶片的ASA含量;而MB处理的ASA含量在第2,4天时显著高于对照,第6,8天时显著降低(图2A)。NaCl胁迫下ASA含量在胁迫的第2天即显著高于对照,此后随胁迫时间延长迅速降低,第8天时显著低于对照;SNP明显缓解了盐胁迫下ASA含量的下降;MB却逆转了在NaCl胁迫期间SNP对ASA含量的提升作用。

正常条件下,SNP提高了黑麦草幼苗叶片的DHA含量,但随处理时间延长DHA含量并无显著变化(图2B);MB显著提高了DHA含量,并随处理时间延长呈先升后降变化。NaCl胁迫下DHA含量提高,并随处理时间延长而增加;SNP降低了NaCl胁迫下的DHA含量,在胁迫第6,8天时达显著水平;MB抑制了SNP对DHA含量的降低作用。表明NO可能通过GC介导参与盐胁迫下黑麦草体内ASA的氧化还原过程。

进一步分析发现,正常条件下,SNP使叶片的ASA/DHA在处理第2天时显著降低,而第4,6,8天时明显提高;MB处理除在处理第2天时ASA/DHA无明显变化外,第4,6,8天均显著低于对照。NaCl胁迫在处理第2天时ASA/DHA显著提高,第4,6,8天时又明显下降;SNP显著提高了NaCl胁迫下的ASA/DHA;添加MB后部分逆转了SNP对NaCl胁迫下ASA/DHA的提高作用(图2C)。说明NO可能通过依赖cGMP介导的信号途径保持盐胁迫下黑麦草体内较高水平的ASA/DHA,从而维持正常的氧化还原状态。

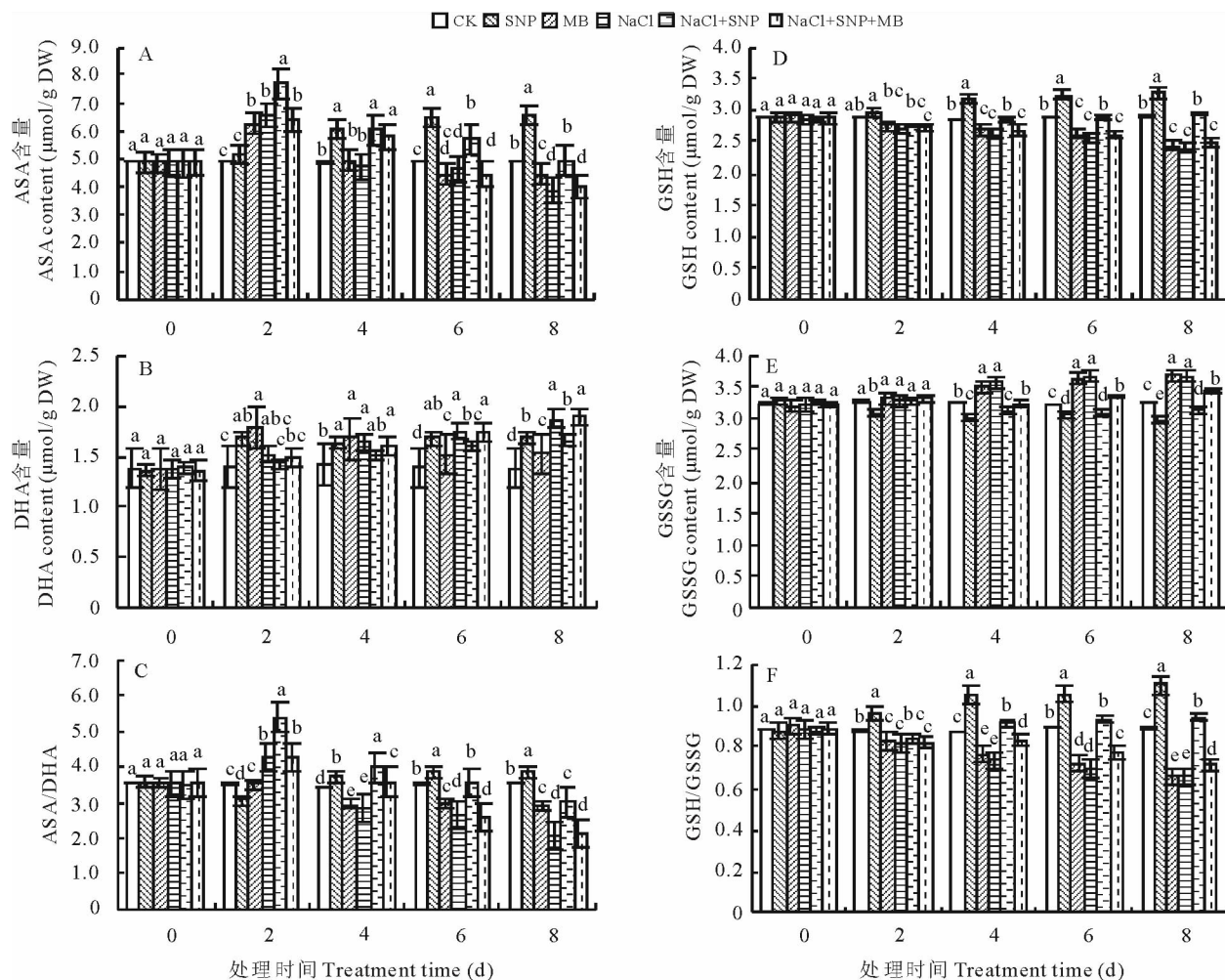


图2 SNP对NaCl胁迫下黑麦草幼苗叶片ASA(A)、DHA(B)、ASA/DHA(C)、GSH(D)、GSSG(E)和GSH/GSSG(F)含量或比值的影响

Fig. 2 Effects of SNP on contents of ASA (A) and DHA (B), ASA/DHA (C), contents of GSH (D) and GSSG (E), GSH/GSSG (F) in leaves of ryegrass seedlings under NaCl stress

2.3 SNP 对 NaCl 胁迫下黑麦草幼苗叶片 GSH 和 GSSG 含量及 GSH/GSSG 的影响

正常条件下 SNP 处理与对照相比显著提高了叶片的 GSH 含量而降低了 GSSG 含量;MB 处理则使 GSH 含量显著降低,GSSG 含量却明显增加。NaCl 胁迫处理在显著降低 GSH 含量的同时显著提高了 GSSG 水平;SNP 显著缓解了盐胁迫诱导的 GSH 含量的下降,同时,又明显降低了 NaCl 胁迫引起的 GSSG 含量提高;添加 MB 处理则消除了 SNP 对 NaCl 胁迫下 GSH 含量提高和 GSSG 含量降低的作用(图 2D,E)。

进一步分析表明,添加 SNP 处理既显著提高了正常生长条件下幼苗叶片的 GSH/GSSG,又使 NaCl 胁迫下的 GSH/GSSG 显著增大;添加 MB 处理使 NaCl 胁迫下 SNP 提高 GSH/GSSG 的作用受到逆转,也使正常生长条件下叶片的 GSH/GSSG 显著低于对照(图 2F)。说明 NO 可能通过 GC 途径介导调节 GSH 和 GSSG 的含量来维持较高水平的 GSH/GSSG,从而增强黑麦草的抗氧化能力。

2.4 SNP 对 NaCl 胁迫下黑麦草幼苗叶片 APX、GR、MDAR 和 DHAR 活性的影响

APX 是以 ASA 为底物的 H_2O_2 清除酶。正常条件下 SNP 处理显著提高了叶片的 APX 活性(图 3A);MB 处理的 APX 活性与对照无显著差异。NaCl 胁迫下 APX 活性在整个胁迫期间显著高于对照;SNP 则进一步提高了盐胁迫下的 APX 活性;MB 却解除了 SNP 对 APX 活性的提高作用,使胁迫期间 APX 活性与 NaCl 处理相比无显著差异。

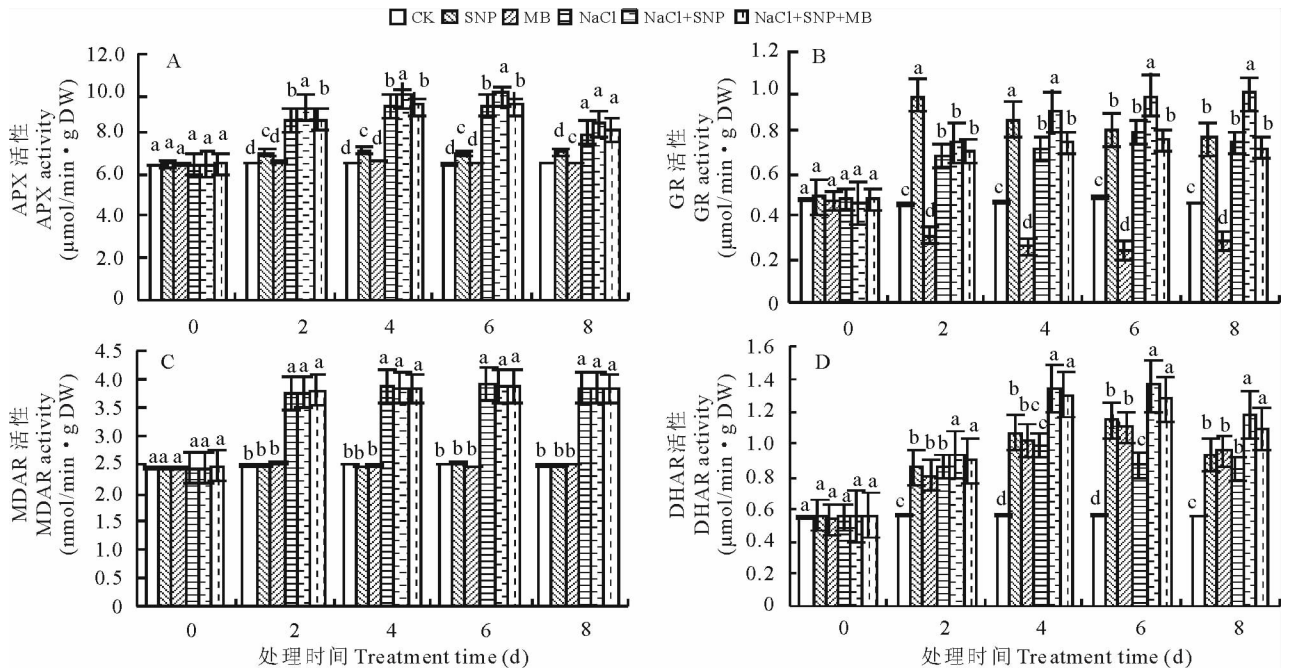


图 3 SNP 对 NaCl 胁迫下黑麦草幼苗叶片 APX(A)、GR(B)、MDAR(C)、DHAR(D)活性的影响

Fig. 3 Effects of SNP on activities of APX (A), GR (B), MDAR(C) and DHAR (D)

in leaves of ryegrass seedlings under NaCl stress

GR 是植物细胞将 GSSG 还原为 GSH 的关键酶,也是 ASA—GSH 循环清除 H_2O_2 的酶促系统组分之一。正常条件下 SNP 处理的 GR 活性在整个胁迫期显著高于对照;而 MB 处理使 GR 活性显著低于对照。NaCl 胁迫下 GR 活性显著提高;SNP 使 NaCl 胁迫下的 GR 活性在整个胁迫期间显著增强,MB 处理消除了 SNP 对盐胁迫下 GR 活性的调节作用(图 3B)。

MDAR 以 NAD(P)H 为底物催化单脱氢抗坏血酸(MDA)生成 ASA,DHAR 则以 GSH 为底物将 DHA 还原为 ASA,二者同属于 ASA—GSH 循环酶催化系统的重要组分。正常条件下 SNP 处理或 MB 处理的 MDAR 活性与对照无显著差异。NaCl 胁迫下 MDAR 活性显著高于对照;SNP 对 NaCl 胁迫下的 MDAR 活性无显著影响,添加 SNP 的同时添加 MB 处理的 MDAR 活性与 NaCl+SNP 处理比较也无显著差异(图 3C)。正常条件下

SNP 或 MB 处理显著提高了 DHAR 活性。NaCl 胁迫下 DHAR 活性在整个胁迫期间显著高于对照; SNP 进一步促进了 NaCl 胁迫下 DHAR 活性的显著提高, MB 逆转了 SNP 对 NaCl 胁迫下 DHAR 活性的提高作用(图 3D)。

3 讨论

盐胁迫下活性氧大量产生导致膜系统损伤是植物受害的普遍现象^[27]。本试验结果显示, 外源 SNP 可有效减缓 NaCl 胁迫下黑麦草幼苗叶片 H_2O_2 和 MDA 的积累, 这可能与 NO 直接清除 H_2O_2 有关^[8], 也可能与 NO 提高抗氧化酶活性和抗氧化物质含量有关。抑制剂 MB 逆转 SNP 对盐胁迫 H_2O_2 和 MDA 积累的缓解作用, 表明 NO 可能通过 GC 介导参与 H_2O_2 的清除来保护盐对细胞的过氧化伤害。

植物在减缓或抵御细胞伤害时常调运酶促和非酶促两类系统来清除活性氧, 其中 APX、MDAR、DHAR 和 GR 是 ASA—GSH 循环活性氧清除系统的重要酶组成, ASA 和 GSH 等是重要的非酶抗氧化物质。在 ASA—GSH 循环途径中, ASA 在 APX 的催化下与 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 的毒性, 此时 GSH 被氧化形成 GSSG; ASA 被氧化形成单脱氢抗坏血酸(MDHA), MDHA 或在 MDAR 作用下再生形成 ASA, 或通过非酶促歧化形成 DHA, DHA 在 DHAR 作用下再生形成 ASA; GR 是将 GSSG 还原为 GSH 的关键酶。Bogdan^[28]认为, NO 能够诱导 APX 基因的表达。胡向阳和蔡伟明^[29]的研究表明, NO 在抑制伤害反应时茉莉酸产生积累, 并认为 NO 能够调控茉莉酸的信号转导。Xiang 和 Oliver^[30]则认为, APX 由 H_2O_2 激活, 而 GR 受茉莉酸激活。本试验结果表明, NaCl 胁迫下黑麦草幼苗叶片 APX、GR、MDAR 和 DHAR 活性明显提高, 这可能是对过量 H_2O_2 的应激反应。外源 SNP 进一步提高 NaCl 胁迫下的 APX 和 GR 活性, 可能与 NO 作为信号分子诱导 APX 基因表达或激活并调控茉莉酸信号转导有关; SNP 对 DHAR 活性的诱导作用可能是 NO 提高 APX 和 GR 活性, 促进 ASA—GSH 循环有效运转所致。MB 消除了 SNP 对 NaCl 胁迫下 APX 和 GR 活性的提高作用, 但对 MDAR 和 DHAR 活性无显著影响。同时, 正常条件下外源 SNP 提高 APX、GR、DHAR 活性, 对 MDAR 无显著影响; MB 抑制 GR 活性, 提高 DHAR 活性, 对 APX 和 MDAR 无显著影响。以上结果说明, NO 可能通过 GC 介导参与 NaCl 胁迫下 APX 和 GR 活性的调节, 有效清除 H_2O_2 , 降低盐胁迫产生的伤害。而对 MDAR 无明显的调节作用, 对 DHAR 的调节还存在其他途径, 这与樊怀福等^[12]在黄瓜上的研究结果类似。

ASA 是细胞内普遍存在的一种活性氧清除剂, ASA 水平、氧化还原状态(ASA/DHA)及其合成代谢相关酶活性的变化与植物响应盐胁迫密切相关。刘正鲁等^[31]认为, 茄子(*Solanum melongena*)嫁接苗较高的 ASA 含量、ASA/DHA 及 APX、GR 活性是其耐盐性优于自根苗的重要原因。Shalata 等^[32]报道, 盐胁迫使盐敏感番茄根系中的 ASA 含量降低, DHA 含量升高, ASA/DHA、APX 和 MDAR 活性降低; 而耐盐品种却相反。本研究结果表明, NaCl 胁迫下, 黑麦草幼苗叶片 ASA 含量及 ASA/DHA 随胁迫时间延长呈先升高后迅速下降变化, DHA 含量则不断增加; 外源 SNP 提高了 NaCl 胁迫下的 ASA 含量和 ASA/DHA, 使 DHA 含量降低, MB 使 SNP 的调节作用被逆转, 表明 NO 可能通过 GC 介导提高叶片 ASA 含量和 ASA/DHA 减轻盐胁迫对黑麦草造成的生理伤害。

GSH 是细胞中含量最丰富的含巯基低分子肽, 与植物抗氧化特性的维持及多种逆境胁迫的忍耐密切相关^[33]。正常生理条件下, GSSG 在 NADPH 存在时被 GR 还原为 GSH 参与 ASA—GSH 循环中 DHA 的再还原, 当细胞处于逆境胁迫而 NADPH 不足时, 胞内 GSH 含量和 GSH/GSSG 下降。有报道认为 GSH 含量及 GSH/GSSG 是激活植物抗性基因的信号之一^[34]。本试验中, NaCl 胁迫下, 黑麦草幼苗叶片 GSH 含量和 GSH/GSSG 降低, 其变化与 GR 活性的升高不一致, 其原因可能与谷胱甘肽过氧化物酶参与的 H_2O_2 清除循环有关; 外源 SNP 显著缓解了盐胁迫下 GSH 含量和 GSH/GSSG 的下降, 使 GSSG 含量降低, 其变化与 GR 一致; MB 却逆转了 SNP 对 NaCl 胁迫下 GSH 含量和 GSH/GSSG 的提高作用, 表明 NO 可能通过 GC 介导提高盐胁迫下 GSH 水平和 GSH/GSSG 是其增强黑麦草耐盐性的又一重要机制。

综上所述, 外源 NO 可能通过 GC 介导提高 NaCl 胁迫下黑麦草叶片的 APX、GR 等酶活性和 ASA、GSH 水平及 ASA/DHA、GSH/GSSG, 维持了 ASA—GSH 循环的有效运转, 使 H_2O_2 的清除能力增强, 从而缓解了由盐

胁迫所引起的氧化伤害,提高了植株的耐盐性。

参考文献:

- [1] 刘一明,程凤枝,王齐,等. 四种暖季型草坪植物的盐胁迫反应及其耐盐阈值[J]. 草业学报, 2009, 18(3): 192-199.
- [2] Jiang M, Zhang J. Effect of abscisic acid on active oxygen species, antioxidative defense system and oxidative damage in leaves of maize seedlings[J]. Plant Cell Physiology, 2001, 42: 1265-1273.
- [3] 张军,王建波,陈刚,等. Na_2CO_3 胁迫下星星草幼苗叶片电解质外渗率与 PSII 光能耗散的关系[J]. 草业学报, 2009, 18(3): 200-206.
- [4] 刘延吉,张蕾,田晓艳,等. 盐胁迫对碱茅幼苗叶片内源激素、NAD 激酶及 Ca^{2+} -ATPase 的效应[J]. 草业科学, 2008, 25(4): 51-54.
- [5] Bethke P C, Jones R L. Cell death of barley aleurone protoplasts is mediated by reactive oxygen species[J]. Plant Journal, 2001, 25:19-29.
- [6] Katsuhara M, Kawasaki T. Salt stress induced nuclear and DNA degradation in meristematic cells of barley roots[J]. Plant Cell Physiology, 1996, 37(2): 169-173.
- [7] Besson-Bard A, Pugin A, Wendehenne D. New insights into nitric oxide signaling in plants[J]. Annual Review of Plant Biology, 2008, 59: 21-39.
- [8] 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[J]. Chinese Science Bulletin, 2001, 46(23): 1993-1997.
- [9] Akio U, Andre T J, Takashi H, *et al.* Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice[J]. Plant Science, 2002, 163: 515-523.
- [10] 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): 546-553.
- [11] 吴雪霞,朱月林,朱为民,等. 外源一氧化氮对 NaCl 胁迫下番茄幼苗生理影响[J]. 中国农业科学, 2006, 39(3): 575-581.
- [12] 樊怀福,郭世荣,段九菊,等. 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[J]. 生态学报, 2008, 28(6): 2511-2517.
- [13] 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[J]. 植物研究, 2008, 28(1): 7-13.
- [14] 孙立荣,郝福顺,吕建洲,等. 外源一氧化氮对盐胁迫下黑麦草幼苗生长及生理特性的影响[J]. 生态学报, 2008, 28(11): 5714-5722.
- [15] 刘建新,胡浩斌,王鑫. 外源 NO 对盐胁迫下黑麦草幼苗活性氧代谢、多胺含量和光合作用的影响[J]. 植物研究, 2009, 29(3): 313-319.
- [16] 张远兵,刘爱荣,方蓉. 外源一氧化氮对镉胁迫下黑麦草生长和抗氧化酶活性的影响[J]. 草业学报, 2008, 17(4): 57-64.
- [17] 刘建新,胡浩斌,王鑫. 外源一氧化氮供体对镉胁迫下黑麦草幼苗活性氧代谢、光合作用和叶黄素循环的影响[J]. 环境科学学报, 2009, 29(3): 626-633.
- [18] 刘建新,王鑫,雷蕊霞. 外源一氧化氮供体 SNP 对黑麦草种子萌发和幼苗生长的影响[J]. 生态学杂志, 2007, 26(3): 393-398.
- [19] 马向丽,魏小红,龙瑞军. 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): 1269-1274.
- [20] Du Z Y, Bramlage W J. Modified thiobarbituric acid assay for measuring lipid oxidation in sugar-rich plant tissue extracts[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 1992, 40: 1566-1570.
- [21] Brennan T, Frenkel C. Involvement of hydrogen peroxide in the regulation of senescence in pear[J]. Plant Physiology, 1977, 59: 411-416.
- [22] Jin Y H, Tao D L, Hao Z Q, *et al.* Environmental stresses and redox status of ascorbate[J]. Acta Botanica Sinica, 2003, 45: 795-801.
- [23] Gossett D R, Millhollon E P, Lucas M C. Antioxidant response to NaCl stress in salt-tolerant and salt-sensitive cultivars of cotton[J]. Crop Science, 1994, 34: 706-714.

- [24] Nakano Y, Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts[J]. *Plant Cell Physiology*, 1981, 22: 867-880.
- [25] Miyake C, Asada K. Thylakoid-bound ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts and photoreduction of its primary oxidation product of monodehydroascorbate radicals in thylakoids[J]. *Plant Cell Physiology*, 1992, 33: 541-553.
- [26] Hossain M A, Asada K. Purification of dehydroascorbate reductase from spinach and its characterization as a thiol enzyme[J]. *Plant Cell Physiology*, 1984, 25(1): 85-92.
- [27] Foyer C H, Halliwell B. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: A proposed role in ascorbic acid metabolism[J]. *Planta*, 1976, 133: 21-25.
- [28] Bogdan C. Nitric oxide and the regulation of gene expression[J]. *Trends in Cell Biology*, 2001, 11: 66-75.
- [29] 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[J]. *生命科学*, 2005, 17(2): 176-182.
- [30] Xiang C, Oliver D J. Glutathione metabolite genes coordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell*, 1998, 10: 1539-1550.
- [31] 刘正鲁, 朱月林, 魏国平, 等. NaCl胁迫对茄子嫁接幼苗叶片抗坏血酸和谷胱甘肽代谢的影响[J]. *西北植物学报*, 2007, 27(9): 1795-1800.
- [32] Shalata A, Mittova V, Volokita M, *et al.* Response of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii* to salt-dependent oxidative stress: The root antioxidative system[J]. *Physiologia Plantarum*, 2001, 112: 487-494.
- [33] Sen C K. Glutathione homeostasis in response to exercise training and nutritional supplements[J]. *Molecular Cell Biochemistry*, 1999, 196: 31-42.
- [34] Pukacka S, Ratajczak E. Antioxidative response of ascorbate-glutathione pathway enzymes and metabolites to desiccation of recalcitrant *Acer saccharinum* seeds[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2006, 163: 1259-1266.

Effects of exogenous nitric oxide donor SNP on ascorbate-glutathione cycle metabolism in ryegrass seedling leaves under NaCl stress

LIU Jian-xin, WANG Xin, LI Bo-ping

(Department of Life Science, Longdong University, Qingyang 745000, China)

Abstract: Effects of the exogenous NO donor sodium nitroprusside (SNP) on the ascorbate-glutathione cycle dependent antioxidant enzyme activities, contents of antioxidant substance, H_2O_2 and malondialdehyde (MDA) in leaves of hydroponically-grown perennial ryegrass (*Lolium perenne*) seedlings under 150 mmol/L NaCl stress were investigated. The results showed that 100 μ mol/L SNP slightly reduced the MDA and H_2O_2 contents of ryegrass seedling leaves under normal growth conditions, but exogenous methylene blue (MB), the inhibitor of the key enzyme guanylate cyclase (GC) during signal transfer of NO, increased the MDA and H_2O_2 contents. Exogenous SNP significantly alleviated MDA and H_2O_2 accumulations in ryegrass seedling leaves under NaCl stress, while the activities of APX, GR and DHAR, the contents of ASA and GSH, and the ratios of ASA/DHA and GSH/GSSG were increased. Under NaCl stress, the DHA and GSSG contents were reduced while the activity of MDAR was not affected. MB reversed some effects of SNP under NaCl stress, such as increasing the levels of MDA and H_2O_2 , but reducing the activities of APX and GR, the contents of ASA and GSH, and the ratios of ASA/DHA and GSH/GSSG. The DHA and GSSG contents were increased but the activities of MDAR and DHAR were not significantly affected under NaCl stress. These findings suggested that NO might be involved in regulation of ascorbate-glutathione cycle metabolism dependent on the activities of APX and GR, the contents of ASA and GSH, and the ratios of ASA/DHA and GSH/GSSG through the GC pathway thus alleviating the oxidative damage to ryegrass seedling leaves from salt stress and improving salt resistance of the perennial ryegrass plants.

Key words: nitric oxide(NO); NaCl stress; perennial ryegrass; ascorbate-glutathione cycle