

盐胁迫下内源 NO 对黄瓜幼苗活性氧代谢和光合特性的影响

杨建军, 张国斌, 郁继华, 胡琳莉, 罗石磊, 牛童, 张婧

(甘肃农业大学园艺学院, 兰州 730070)

摘要: 【目的】探讨盐胁迫下黄瓜幼苗内源一氧化氮(NO)的生理生化调节机理及其调控途径, 为揭示黄瓜的抗盐机理和生产应用提供参考。【方法】以黄瓜幼苗为研究对象, 采用一氧化氮合成酶抑制剂(L-NAME, L-硝基精氨酸甲酯)、硝酸还原酶抑制剂(tungstate, 钨酸钠)和一氧化氮清除剂(cPTIO, 4-羧基苯-4,4,5,5-四甲基咪唑-1-氧-3-氧化物)处理盐胁迫下的黄瓜幼苗, 研究处理对黄瓜幼苗叶片内源NO含量、活性氧代谢、光合参数和叶绿素荧光参数的影响。【结果】盐胁迫可诱导黄瓜幼苗叶片内源NO含量增加, 采用 $200\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ L-NAME、 $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ tungstate 和 $200\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ cPTIO 处理均抑制了盐胁迫下的黄瓜幼苗叶片中抗氧化酶(超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT))的活性, 降低了游离脯氨酸(Pro)、可溶性蛋白质的含量, 增加了丙二醛(MDA)含量、超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)产生速率和质膜透性, 使细胞膜脂过氧化加剧, 加重了盐胁迫对黄瓜幼苗的损伤。同时, 气体交换参数 P_n 、 G_s 、 T_r 、 C_i 显著降低, 叶绿素荧光参数 F_v/F_m 、 $\Phi\text{PS II}$ 、 qP 降低, NPQ 显著升高, 导致叶片光合机构受损, 叶片光合速率下降。【结论】在盐胁迫条件下, 内源NO的变化可能直接调节了黄瓜幼苗的抗氧化能力, 有效地缓解了脂膜过氧化伤害和对叶片光合机构的损伤, 且黄瓜幼苗的活性氧代谢和光合特性主要通过一氧化氮合酶途径调控。

关键词: 黄瓜幼苗; 盐胁迫; NO; 光合生理; 活性氧代谢

Effects of Endogenous NO on Reactive Oxygen Metabolism and Photosynthetic Characteristics of Cucumber Seedlings Under Salt Stress

YANG JianJun, ZHANG GuoBin, YU JiHua, HU LinLi, LUO ShiLei, NIU Tong, ZHANG Jing

(College of Horticulture, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070)

Abstract: 【Objective】 The objective of this study is to investigate the physiological and biochemical regulation mechanism and regulation pathway of endogenous NO in cucumber seedlings under salt stress. 【Method】 The effects of nitric oxide synthase inhibitor (L-NAME, *N* ω -nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride), nitrate reductase inhibitor (tungstate) and nitric oxide scavenger (cPTIO, 4-carboxyphenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazole-1-oxyl-3-oxidepotassium salt) on cucumber seedlings under salt stress were studied. The contents of NO, active oxygen metabolism, photosynthetic parameters and chlorophyll fluorescence parameters were used in discussing the results. 【Result】 Salt stress increased endogenous NO content in the leaves of cucumber seedlings. The application of $200\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ L-NAME, $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ tungstate and $200\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ cPTIO inhibited the activities of antioxidant enzymes (SOD, POD and CAT) in cucumber seedlings under salt stress. Malondialdehyde (MDA) content, superoxide anion free radical ($\text{O}_2^{\cdot-}$) production rate and plasma membrane permeability were increased, and the contents of free proline (Pro) and soluble protein were decreased. Peroxidation increased the damage of cucumber seedlings under salt stress. At the same time, the gas exchange parameters P_n , G_s , T_r , C_i , and the chlorophyll fluorescence parameters F_v/F_m , $\Phi\text{PS II}$, qP also decreased. However, the NPQ significantly increased, leading to leaf photosynthetic mechanism damage, and the leaf photosynthetic rate decreased.

收稿日期: 2017-05-02; 接受日期: 2017-08-21

基金项目: 国家自然科学基金(31660584)、国家大宗蔬菜产业体系(CARS-25-C-07)

联系方式: 杨建军, E-mail: yangjianjun91@163.com. 通信作者郁继华, E-mail: yujiuagg@163.com

【Conclusion】 Under the salt stress, the change of endogenous NO could directly regulate the antioxidant capacity of cucumber seedlings, alleviate the damage of lipid peroxidation and damage to photosynthetic organs, and the active oxygen metabolism and photosynthetic characteristics of cucumber seedlings are mainly controlled by nitric oxide synthase pathway.

Key words: cucumber seedlings; salt stress; NO; photosynthetic physiology; active oxygen metabolism

0 引言

【研究意义】盐胁迫是影响农作物生长发育的主要非生物胁迫之一,影响种子萌发和幼苗生长^[1],能破坏植物体内生物膜的正常结构和功能,降低酶活性,影响植物代谢过程^[2]。黄瓜(*Cucumis sativas* L.)是设施栽培的主要蔬菜作物之一,深受消费者喜爱,但黄瓜对盐胁迫抗性较弱,尤其是发芽期和幼苗期对盐胁迫更为敏感^[3],因此对其盐害的研究显得尤其重要。

【前人研究进展】一氧化氮(NO)是广泛存在于植物组织中的信号分子,能够调节植物的生长发育,并参与植物体对各种逆境胁迫的响应^[4]。植物内源 NO 主要通过 NO 合酶(NOS)、硝酸还原酶(NR)催化及其他酶促反应和非酶促反应生成^[5-7]。已有研究表明,NO 在植物生长发育及逆境胁迫等生理过程中起信号传导作用^[8-10],其包括干旱、盐害、高温、低温等多种非生物逆境的响应过程^[11-12];NO 在植物中的某些功能与活性氧代谢水平密切相关^[13]。FAN 等^[14]研究表明,外源 NO 能提高樟树抵抗干旱胁迫的能力;这可能与 NO 的抗氧化性质有关^[15];樊怀福等^[16]提出外源 NO 能显著提高黄瓜幼苗叶片的净光合速率和叶绿素含量,显著降低低温对膜造成的伤害;吴旭红等^[17]报道指出,外源 NO 处理能降低低温胁迫下南瓜幼苗的脂过氧化产物丙二醛的积累,促进脯氨酸和可溶性糖积累,增强抗氧化酶的活性,提高南瓜幼苗的抗寒性;NO 还能减缓盐胁迫对玉竹的氧化损伤^[18],降低盐胁迫对水稻叶绿素的降解和保持叶片光系统 II(PS II)较高的量子产额^[19]。【本研究切入点】大量研究表明 NO 参与调节植物的生长发育过程,响应各种非生物

逆境。然而,有关内源 NO 在植物盐胁迫下对活性氧代谢和光合生理特征的影响及调控途径的研究却鲜有报道。【拟解决的关键问题】本研究针对黄瓜生产中出现的盐害问题,研究内源 NO 对盐害逆境下黄瓜幼苗活性氧代谢及光合生理特征的影响,旨在探讨黄瓜内源 NO 的生理生化调节机理及其调控途径,丰富对黄瓜抗盐机理的理论认识,同时为生产应用提供参考。

1 材料与方法

试验于 2016 年 11 月—2017 年 1 月在甘肃农业大学园艺学院玻璃温室内进行。

1.1 试验材料与处理

选用黄瓜品种‘新春 4 号’为试材。种子经消毒后在 28℃ 恒温箱催芽,将发芽一致的种子播种于盛有育苗基质的营养钵中(口径 10 cm×高 10 cm),温室温度控制在昼温 25—30℃,夜温 15—18℃,进行自然光照。待黄瓜幼苗四叶一心时,选取长势一致的黄瓜幼苗 600 株进行处理,每个处理独立重复 3 次。

试验中所用药剂 L-NAME(L-硝基精氨酸甲酯)和 cPTIO(4-羧基苯-4,4,5,5-四甲基咪唑-1-氧-3-氧化物)购于 Sigma, USA; tungstate(钨酸钠)购于上海中泰化工公司。

试验设 5 个处理,如表 1 所示。

CK 浇蒸馏水 9 d(第 1—9 天),试验组先浇 NaCl 溶液 6 d(第 1—6 天)模拟盐胁迫,后改浇蒸馏水 3 d(第 7—9 天)解除盐胁迫。以上浇蒸馏水或 NaCl 溶液的量均为 100 mL,每 24 h 浇一次;叶面喷施溶液(蒸馏水, L-NAME, tungstate, cPTIO)的量以所有叶片正反面全湿并有溶液下滴为标准,每 48 h 喷一次;以

表 1 试验处理

Table 1 Test treatment

处理 Treatment	方法 Method
对照 CK	浇蒸馏水+叶面喷施蒸馏水 Distilled water +leaf sprayed with distilled water
氧化钠 NaCl	浇 100 mmol·L ⁻¹ NaCl 溶液+喷蒸馏水 100 mmol·L ⁻¹ NaCl solution+ distilled water
NaCl+L-NAME	浇 100 mmol·L ⁻¹ NaCl 溶液+喷 200 μmol·L ⁻¹ L-NAME 溶液 100 mmol·L ⁻¹ NaCl solution+200 μmol·L ⁻¹ L-NAME solution
NaCl+tungstate	浇 100 mmol·L ⁻¹ NaCl 溶液+喷 100 μmol·L ⁻¹ tungstate 溶液 100 mmol·L ⁻¹ NaCl solution+100 μmol·L ⁻¹ tungstate solution
NaCl+ cPTIO	浇 100 mmol·L ⁻¹ NaCl 溶液+喷 200 μmol·L ⁻¹ cPTIO 溶液 100 mmol·L ⁻¹ NaCl solution+200 μmol·L ⁻¹ cPTIO solution

L-NAME: L-硝基精氨酸甲酯; tungstate: 钨酸钠; cPTIO: 4-羧基苯-4,4,5,5-四甲基咪唑-1-氧-3-氧化物。下同 The same as below

上溶液浓度由预试验筛选得出。

1.2 试验方法

试验过程中, 分别于处理的第 0、3、6 和 9 天上午 10:00 从每组处理随机选取 6 株黄瓜幼苗, 取第 3 片真叶进行光合作用相关指标的测定, 与此同时, 用电子天平称取第 3 片真叶, 然后用锡箔纸包住, 放于液氮中, 贮存在 -80°C 的超低温冰箱中备用, 用于以下指标的测定, 每个指标重复测 3 次。

1.2.1 NO 含量的测定 采用 Greiss 试剂法测定 NO 含量, 具体操作参照 ZHOU 等^[20]的方法。

1.2.2 抗氧化酶活性的测定 采用氮蓝四唑光化还原法^[21]测定超氧化物歧化酶 (SOD) 活性; 愈创木酚法^[22]测定过氧化物酶 (POD) 活性; 参考 HAVIR 等^[23]的方法测定过氧化氢酶 (CAT) 活性。

1.2.3 MDA、相对电导率和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的测定 采用硫代巴比妥酸比色法测定 MDA 含量^[24], 浸泡法测定相对电导率^[25]; $\text{O}_2^{\cdot-}$ 含量参照王爱国和罗广华^[26]方法测定。

1.2.4 游离脯氨酸 (Pro) 和可溶性蛋白含量的测定 酸性茚三酮显色法测定 Pro^[24], 考马斯亮蓝 G-250 染色法测定可溶性蛋白质含量^[24]。

1.2.5 气体交换参数的测定 由 CIRAS-2 型 (PP-system, 英国) 便携式光合仪测定气体交换参数, 其参数设定为: 环境温度 25°C 、PFD $800 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、 CO_2 浓度为大气中的 CO_2 (外接 CO_2 缓冲瓶)、相对湿度 75%。

1.2.6 叶绿素荧光参数的测定 叶绿素荧光参数由调制叶绿素荧光成像仪 IMAGING-PAM (德国 WALZ 公司) 测定, 将黄瓜幼苗暗适应 30 min 后, 剪下其第 3 片真叶开始测叶绿素荧光动力学曲线, 获得初始荧光 (F_0)、最大荧光 (F_m)、PS II 最大光化学量子产量 (F_v/F_m)、光化学淬灭系数 (qP) 和非光化学淬灭系数 (NPQ) 等叶绿素荧光参数。测定之前设检测光强度 $0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 光化光强度 $81 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 饱和和脉冲光强度 $2700 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 脉冲光 0.8 s, 每隔 20 s 打 1 次。

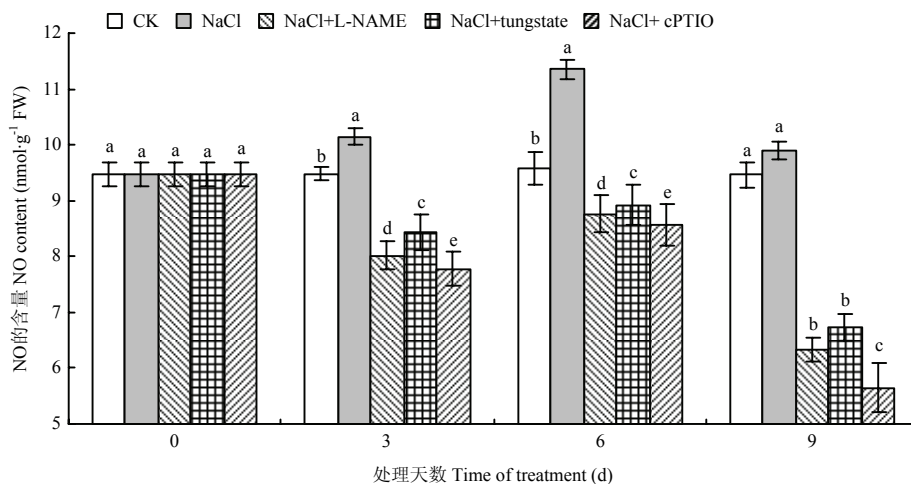
1.3 数据处理

采用 Excel 2010 软件处理数据和绘图, SPSS 19.0 软件进行统计分析, 用 Duncan's 新复极差法进行差异显著性检验 ($P < 0.05$)。

2 结果

2.1 NO 清除剂和合成抑制剂对盐胁迫下黄瓜幼苗叶片 NO 含量的影响

由图 1 可以看出, 经 NO 清除剂和合成抑制剂处理 3 d、6 d 和 9 d 后, 黄瓜幼苗叶片 NO 含量较 CK 相比显著降低。单一盐胁迫处理的叶片在 3 d、6 d 时 NO 含量显著高于 CK, 且 6 d 时最为显著, 比 CK 高 18.5%。6 d 时单一盐胁迫处理的比 L-NAME、tungstate、cPTIO 处理的分别高 30%、27.2%和 32%。



不同字母表示差异达 5% 显著水平。下同
Different letters above the bars indicate significant at 5% level. The same as below

图 1 NO 清除剂和合成抑制剂对盐胁迫下黄瓜幼苗叶片 NO 含量的影响

Fig. 1 Effects of NO scavenger and synthetic inhibitor on NO content in cucumber seedling leaves under salt stress

2.2 NO 清除剂和合成抑制剂对盐胁迫下黄瓜幼苗叶片抗氧化酶活性的影响

总体来看, 0—9 d 内 CK 黄瓜幼苗叶片 SOD 酶活性明显比其他处理高, 且 6 d 时最为显著, 比单一盐胁迫、L-NAME、tungstate、cPTIO 处理的分别高 10.9%、107.3%、45.3%、246.9%。6 d 时单一盐胁迫处理的比 L-NAME、tungstate、cPTIO 处理的分别显著高 87%、31%和 213% (图 2-A)。

图 2-B 表明, 0—9 d 内 CK 黄瓜幼苗叶片 POD 酶活性明显比其他处理高, 且 6 d 时最为显著, 比单一

盐胁迫、L-NAME、tungstate、cPTIO 处理的分别高 15.4%、19.8%、16.9%、27.9%; 6 d 时单一盐胁迫处理的比 L-NAME、tungstate、cPTIO 处理的分别高 3.8%、1.4%和 10.9%。

如图 2-C 所示, 0—9 d 内 CK 黄瓜幼苗叶片 CAT 酶活性明显比单一盐胁迫、L-NAME、tungstate、cPTIO 处理的高, 且 6 d 时最为显著; 6 d 时单一盐胁迫处理的比 L-NAME、tungstate、cPTIO 处理的分别高 79%、15.9%和 280%, 而到 9 d 时 CAT 酶活性有所回升, 可能与取消盐胁迫有关。

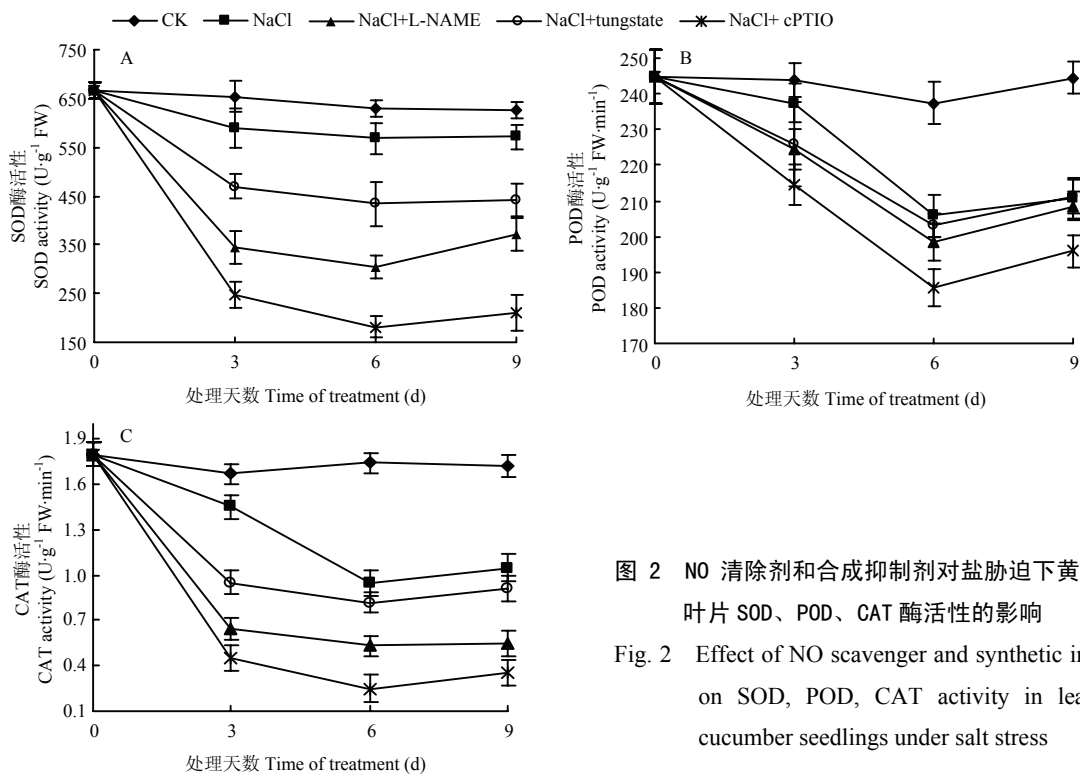


图 2 NO 清除剂和合成抑制剂对盐胁迫下黄瓜幼苗叶片 SOD、POD、CAT 酶活性的影响

Fig. 2 Effect of NO scavenger and synthetic inhibitor on SOD, POD, CAT activity in leaves of cucumber seedlings under salt stress

2.3 NO 清除剂和合成抑制剂对盐胁迫下黄瓜幼苗叶片 MDA、O₂⁻、质膜透性的影响

由图 3-A 可知, CK 的黄瓜幼苗叶片中 MDA 含量最低, 经单一盐胁迫处理的叶片中 MDA 含量显著高于 CK, 且在处理 6 d 时最为显著, 比 CK 高 36.5%, 而经 L-NAME、tungstate、cPTIO 处理的叶片在 6 d 时 MDA 含量均比单一盐胁迫高 21.6%以上, 且差异达显著水平。L-NAME、tungstate、cPTIO 处理的黄瓜幼苗叶片 MDA 含量在 0—6 d 均呈上升趋势, 而 6—9 d 呈下降趋势, 这可能是 6—9 d 取消了盐胁迫引起的。在 0—9 d L-NAME、tungstate、cPTIO 处理的叶片中 MDA 含量从高到低依次为 cPTIO > L-NAME >

tungstate, 表明 NO 清除剂和合成抑制剂处理导致盐胁迫下的黄瓜幼苗叶片 MDA 含量增加, 加剧了盐胁迫对叶片的伤害。

各处理下黄瓜幼苗叶片 O₂⁻产生速率均比 CK 高, 且在 6 d 时最为显著, 比 CK 高 38.2%以上, 而在 6 d 时盐胁迫下经 L-NAME、tungstate、cPTIO 处理的幼苗叶片 O₂⁻产生速率均显著高于单一盐胁迫处理的, 分别达 27.7%、12.8%、42.6% (图 3-B), 结果表明盐胁迫能引起黄瓜幼苗叶片内 O₂⁻过量积累, 且 NO 合成抑制剂和清除剂消除了叶片内源 NO, 使叶片内 O₂⁻的累积更多, 从而导致膜脂过氧化程度加深, 由此证明叶片内源 NO 可能对 O₂⁻的积累产生了一定影响。

在盐胁迫条件下，黄瓜幼苗的质膜透性增加，电解质大量外渗，胁迫 0—6 d 时膜透性持续增加，6—9 d 时膜透性有所减小。在 6 d 时单一盐胁迫、L-NAME、tungstate、cPTIO 处理的分别显著高于 CK 59%、

95.2%、90.4%、113.4%（图 3-C）。说明 L-NAME、tungstate、cPTIO 能有效消除细胞中的 NO，显著增加了黄瓜幼苗叶片的质膜透性，使细胞膜的离子渗漏增加，破坏了细胞结构的完整性。

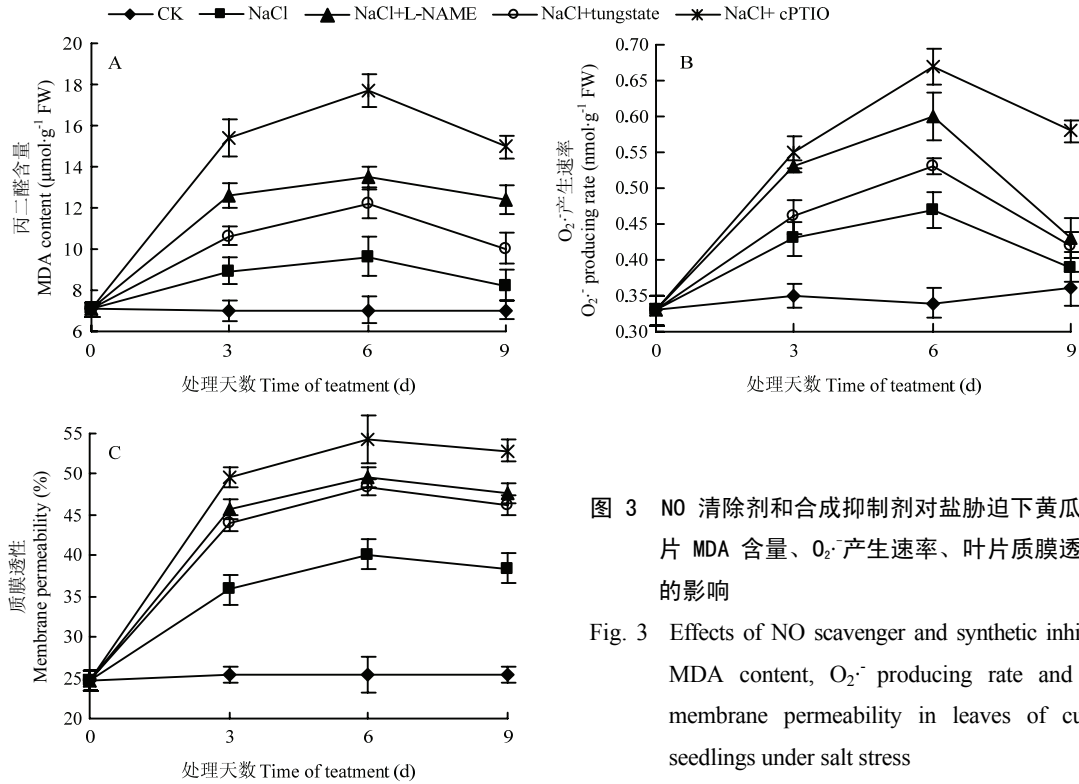


图 3 NO 清除剂和合成抑制剂对盐胁迫下黄瓜幼苗叶片 MDA 含量、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 产生速率、叶片质膜透性含量的影响

Fig. 3 Effects of NO scavenger and synthetic inhibitor on MDA content, $\text{O}_2^{\cdot-}$ producing rate and plasma membrane permeability in leaves of cucumber seedlings under salt stress

2.4 NO 清除剂和合成抑制剂对盐胁迫下黄瓜幼苗叶片脯氨酸 (Pro) 和可溶性蛋白含量的影响

由图 4 可以看出，盐胁迫处理 3 d 后各处理叶片内 Pro 和可溶性蛋白含量明显增加，到 6 d 时 Pro 和可

溶性蛋白的含量最高，与 CK 有显著差异；经 NO 清除剂和合成抑制剂处理后，显著降低了 Pro 和可溶性蛋白的积累。6 d 时，单一盐胁迫处理的黄瓜幼苗 Pro 高于 NO 清除剂和合成抑制剂处理的 24.5% 以上；

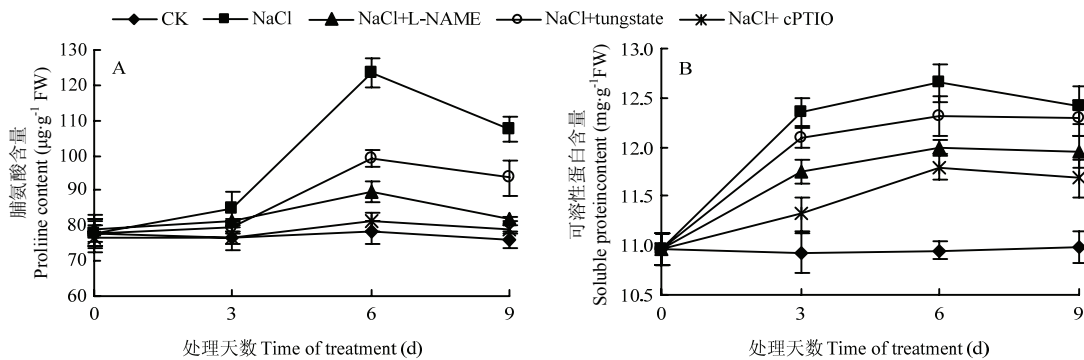


图 4 NO 清除剂和合成抑制剂对盐胁迫下黄瓜幼苗叶片脯氨酸和可溶性蛋白含量的影响

Fig. 4 Effects of NO scavenger and synthetic inhibitor on proline and soluble protein content in cucumber seedling leaves under salt stress

而单一盐胁迫处理的黄瓜幼苗可溶性蛋白含量与 tungstate 处理的相当，但与 L-NAME、cPTIO 处理的有显著性差异，说明 L-NAME 和 cPTIO 能显著抑制和清除黄瓜幼苗内 NO 的含量，使细胞结构的完整性遭到破坏，加剧了盐胁迫导致的膜脂过氧化伤害，致使细胞的正常代谢遭到破坏。

2.5 NO 清除剂和合成抑制剂对盐胁迫下黄瓜幼苗叶片气体交换参数的影响

图 5-A 显示，盐胁迫下黄瓜幼苗的净光合速率 (Pn) 在 0—6 d 内随着处理天数的增加呈下降趋势，

故 6 d 时的 Pn 最低，且此时单一盐胁迫处理的显著低于 CK 59%，而 L-NAME、tungstate、cPTIO 处理的明显比单一盐胁迫处理的低 77.7% 以上；在 0—6 d 内幼苗的气孔导度 (Gs) 也随着处理天数的增加呈下降趋势，因此 6 d 时 Gs 最低，单一盐胁迫处理的显著比 CK 低 43.7%，而 L-NAME、tungstate、cPTIO 处理的分别比单一盐胁迫处理的明显低 23.3%、38%、39.9% (图 5-B)；在 0—6 d 内幼苗的蒸腾速率 (Tr) 也随着处理天数的增加呈下降趋势，6 d 时 Tr 最低，单一盐胁迫处理的比 CK 低 39.2%，差异显著，而 L-NAME、

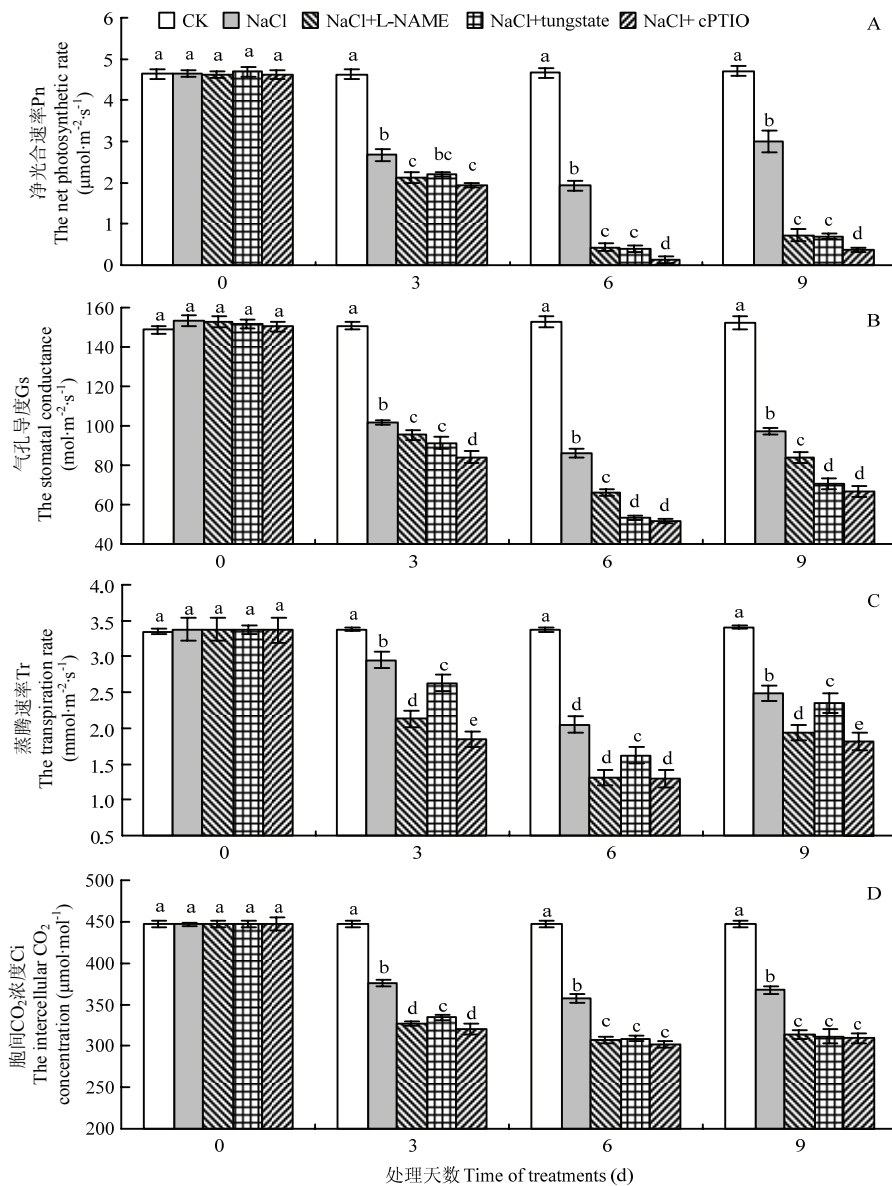


图 5 NO 清除剂和合成抑制剂对盐胁迫下黄瓜幼苗叶片气体交换参数的影响

Fig. 5 Effects of NO scavengers and synthetic inhibitors on gas exchange parameters of cucumber seedling leaves under salt stress

tungstate、cPTIO 处理的比单一盐胁迫处理的明显低 21%以上(图 5-C); 在 0—6 d 内幼苗的胞间 CO_2 (C_i) 也随着处理天数的增加呈下降趋势, 故 6 d 时的 C_i 最低, 单一盐胁迫处理的比 CK 显著低 20.1%, 而 L-NAME、tungstate、cPTIO 处理的分别比单一盐胁迫处理的显著低 13.9%、13.4%和 15.5% (图 5-D); 9 d 时的 P_n 、 G_s 、 Tr 、 C_i 都有所回升, 可能由于取消了盐胁迫引起的。

2.6 NO 清除剂和合成抑制剂对盐胁迫下黄瓜幼苗叶片叶绿素荧光参数的影响

由图 6-A 可以看出, 0—6 d 内黄瓜幼苗在单一盐胁迫和 tungstate 处理下 Fv/Fm 随处理天数的增加而下

降, 但无显著差异, 而在 L-NAME、cPTIO 处理下 Fv/Fm 随处理天数的增加而显著下降, 且 6 d 时分别比 CK 显著降低 5.1%和 6.6%; 在 0—6 d 内幼苗 $\Phi\text{PS II}$ 也随着处理天数的增加呈下降的趋势, 故 6 d 时的 $\Phi\text{PS II}$ 最低, 单一盐胁迫处理的比 CK 明显低 13.1%, 而 L-NAME、tungstate、cPTIO 处理的分别比单一盐胁迫处理的显著低 23.1%、10.2%和 45.9% (图 6-B); 幼苗 qP 值在 6 d 时最低, 单一盐胁迫处理的比 CK 低 15.1%, 而 L-NAME、tungstate、cPTIO 处理的比单一盐胁迫处理的低 24.3%以上 (图 6-C); 在 0—6 d 内幼苗 NPQ 随着处理天数的增加呈上升的趋势, 6 d 时的 NPQ 最高, 单一盐胁迫处理的比 CK 高 58.6%, 而

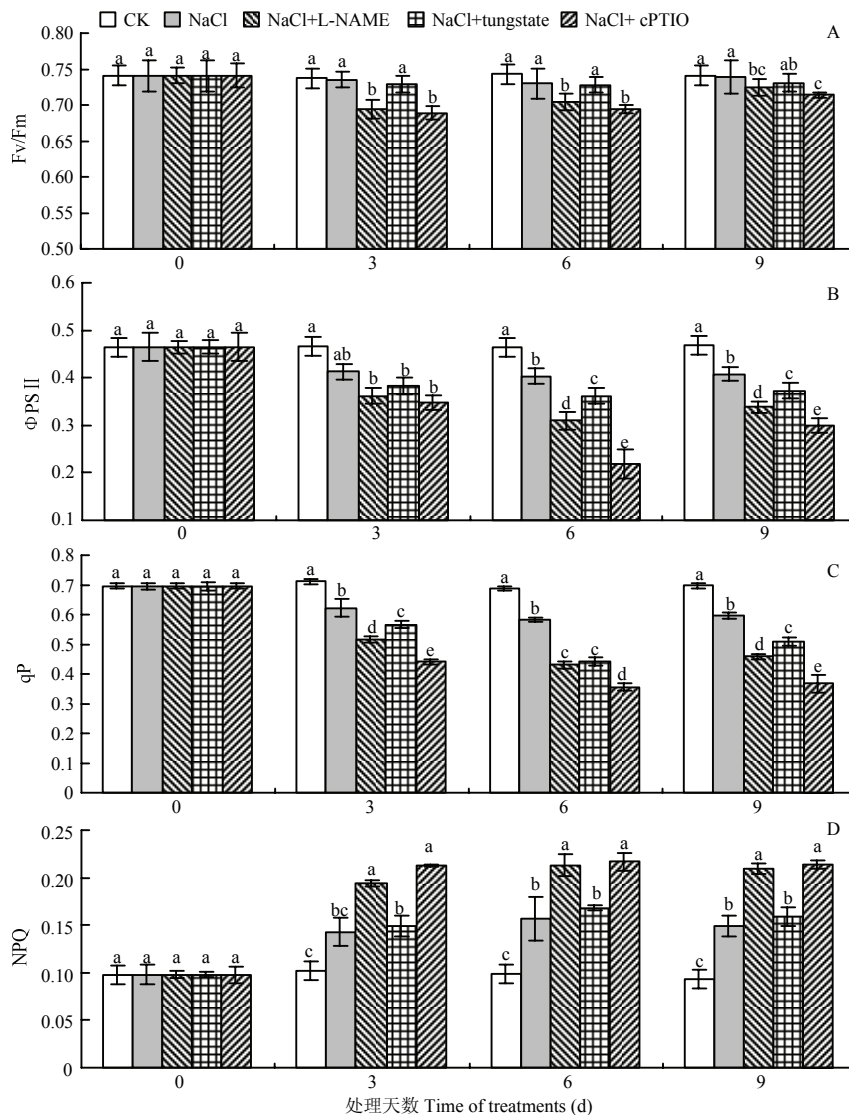


图 6 NO 清除剂和合成抑制剂对盐胁迫下黄瓜幼苗叶片叶绿素荧光参数的影响

Fig. 6 Effects of NO scavengers and synthetic inhibitors on chlorophyll fluorescence parameters of cucumber seedlings under salt stress

L-NAME、tungstate、cPTIO 处理的分别比单一盐胁迫处理的高 35.7%、7%和 38.2%，9 d 时的 NPQ 有所下降（图 6-D）。

3 讨论

L-NAME 为一氧化氮合酶（NOS）抑制剂，能有效地抑制植物体内通过一氧化氮合酶途径产生的一氧化氮；tungstate 为硝酸还原酶（NR）抑制剂，能有效地抑制植物体内通过硝酸还原酶途径产生的一氧化氮；而 cPTIO 为专一地一氧化氮清除剂，能有效地清除植物体内产生的一氧化氮^[27]。本研究表明，NO 清除剂 cPTIO 对盐胁迫下叶片内 NO 含量的影响最显著，而硝酸还原酶抑制剂 tungstate 对盐胁迫下叶片内源 NO 含量的影响较小，一氧化氮合酶抑制剂 L-NAME 对盐胁迫下叶片内源 NO 含量的抑制作用优于 tungstate，由此说明 NO 清除剂和合成抑制剂能有效地清除和抑制叶片内源 NO 的含量，且一氧化氮合酶可能是黄瓜幼苗叶片内源 NO 合成的关键酶。

已有大量研究表明适宜浓度的外源 NO 可显著提高对夏枯草盐害^[28]、小麦干旱^[29]、棉花低温^[13]和小型大白菜弱光^[30]等逆境的抵抗能力，说明 NO 对逆境下的植物具有保护作用。本研究发现，采用 L-NAME、tungstate、cPTIO 喷施盐胁迫下的黄瓜幼苗，降低了黄瓜叶片内源 NO 含量，导致其 SOD、POD 和 CAT 酶活性低于单独盐胁迫处理的，并且一氧化氮合酶抑制剂 L-NAME 处理的其 SOD、POD 和 CAT 酶活性低于硝酸还原酶抑制剂 tungstate 处理的，使其细胞内过量积累 H₂O₂，产生膜脂质过氧化，由此表明黄瓜幼苗在盐胁迫下内源 NO 的变化可能直接调节了幼苗的抗氧化能力，且在盐胁迫下黄瓜幼苗的抗氧化系统可能主要通过一氧化氮合酶途径调控。

王文等^[31]研究表明苯丙烯酸胁迫下添加低浓度外源 NO 后黄瓜幼苗内 MDA 含量显著降低。盐胁迫会对细胞膜造成膜脂过氧化伤害，使细胞膜的透性增大，导致膜内物质向外渗透，最终导致细胞死亡，而 MDA 是膜脂过氧化的主要产物之一，其积累是活性氧毒害作用的表现^[32]；植物在遭受逆境胁迫后体内产生的 O₂⁻，可能通过两种途径被清除，一种途径是 O₂⁻在 SOD 催化下可转变成 O₂ 和 H₂O₂，H₂O₂ 又在 CAT、POD 等的作用下转变成 O₂ 和 H₂O^[33]；另一种途径是 O₂⁻与 NO 结合形成 ONOO⁻，从而减少了 O₂⁻的量^[34-35]。植物细胞的生物膜是一种半透膜，在逆境条件下生物膜透性反映了膜系统的稳定性^[36]。肖雯等^[37]研究表明

细胞膜的通透性可以反映膜系统的完整性及其损伤程度，质膜透性越大植物受损伤程度也就越大。樊怀福等^[38]研究表明外源 NO 显著降低了 NaCl 胁迫下黄瓜幼苗叶片的质膜透性，使细胞膜的离子渗漏减少，保护了细胞结构的完整性。本试验表明，经盐胁迫处理后，黄瓜幼苗 MDA、O₂⁻和质膜透性高于正常条件下生长的幼苗。采用 L-NAME、tungstate、cPTIO 喷施盐胁迫处理下的黄瓜幼苗，其内源 NO 含量减少，导致其 MDA 含量、O₂⁻产生速率和质膜透性显著高于单独盐胁迫处理的，使其细胞膜造成严重的过氧化伤害，由此表明黄瓜幼苗在盐胁迫下内源 NO 的变化可能影响 MDA 的含量、O₂⁻的产生速率和质膜透性。

外源 NO 能促进盐胁迫下玉竹脯氨酸的积累，提高抗盐性^[18]；樊怀福等^[38]报道指出外源 NO 可通过提高盐胁迫下黄瓜幼苗中的脯氨酸含量，增强其耐盐性。杨美森等^[13]研究表明棉花在冷害胁迫下外源 NO 显著提高了可溶性蛋白质含量。本研究表明黄瓜幼苗在单一盐胁迫下脯氨酸和可溶性蛋白的含量显著高于 NO 清除剂和合成抑制剂处理的，说明内源 NO 能有效地缓解脂膜过氧化伤害。

光合作用是植物生长的基础，其生理过程对环境的变化非常敏感^[39]。已有大量研究表明，盐胁迫能引起叶片光合机构受损和光合速率下降^[40]。本研究结果显示，NaCl 胁迫下黄瓜幼苗叶片 Pn、Gs、Tr、Ci 显著降低。吴雪霞等^[41]报道，引起植物叶片 Pn 下降的原因有 Gs 和 Ci 下降导致的气孔限制和 Gs 下降而 Ci 升高导致的非气孔限制。本试验表明，黄瓜幼苗在盐胁迫下叶片 Gs 和 Ci 都呈下降趋势，说明了黄瓜叶片在盐胁迫下 Pn 下降的原因是由气孔限制引起的。而经 L-NAME、tungstate、cPTIO 喷施盐胁迫下处理的黄瓜幼苗，其内源 NO 含量降低，导致叶片 Pn、Gs、Tr、Ci 显著低于单一盐胁迫处理的且 L-NAME 处理的显著低于 tungstate 处理的，由此表明内源 NO 可以抵抗盐胁迫对黄瓜幼苗叶片光合作用的气孔限制且在盐胁迫下光合作用主要是通过一氧化氮合酶途径调控的。

与光合参数相比，叶绿素荧光参数能更直接地反映出植物叶片 PSII 对光能吸收和利用的情况，这有助于更好地分析光合机构受逆境胁迫损伤的部位和程度^[42-43]。本试验结果表明，NaCl 胁迫下黄瓜幼苗叶片 ΦPSII、qP 显著降低，NPQ 显著升高，Fv/Fm 降低但不显著。ΦPSII 呈下降趋势，这表明 PSII 遭到破坏，捕捉光能的能力下降；qP 下降，说明盐胁迫导致黄瓜幼苗叶片 PSII 反应中心的开放程度降低，使积累

在 PSII 反应中心的光能过剩; NPQ 显著升高, 说明黄瓜幼苗热耗散保护机制没有失效, 有效地保护了光合机构, 而 L-NAME、tungstate、cPTIO 喷施盐胁迫下处理的黄瓜幼苗, 其内源 NO 含量降低, Fv/Fm、ΦPS II、qP 低于单一盐胁迫处理的, NPQ 高于单一盐胁迫处理的, 与 tungstate 处理的相比, L-NAME 处理的更为显著, 表明内源 NO 可以有效抵抗盐胁迫对黄瓜幼苗叶片光合机构的损伤, 且进一步反映了盐胁迫下光合作用主要是通过一氧化氮合酶途径调控的。

4 结 论

在单一盐胁迫下黄瓜幼苗叶片内源 NO 含量增加, 而采用 L-NAME、tungstate、cPTIO 喷施的盐胁迫下黄瓜幼苗叶片内源 NO 含量显著降低, 抑制了叶片中抗氧化酶的活性且降低了脯氨酸、可溶性蛋白的含量, 增加了丙二醛含量、超氧阴离子自由基产生速率和质膜透性, 使细胞膜脂过氧化加剧, 加重了盐胁迫对黄瓜幼苗的损伤。此外, 气体交换参数显著降低, 叶绿素荧光参数 Fv/Fm、ΦPS II、qP 降低, NPQ 显著升高, 导致叶片光合机构受损, 叶片光合速率下降, 且 L-NAME 处理的比 tungstate 处理的更为显著。可见, 黄瓜幼苗内源 NO 能减轻盐胁迫对黄瓜幼苗的伤害; 在盐胁迫下, 黄瓜幼苗的活性氧代谢和光合特性主要是通过一氧化氮合酶途径调控的。

References

- [1] YAMAGUCHI T, BLUMWALD E. Developing salt-tolerant crop plants: Challenges and opportunities. *Trends in Plant Science*, 2005, 10: 615-620.
- [2] MUNNS R. Physiological processes limiting plant growth in saline soils: Some dogmas and hypotheses. *Plant Cell and Environment*, 1993, 16: 15-24.
- [3] BAYSAL G, TIPIRDAMAZ R. The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidative enzyme activities in two cucumber cultivars. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, 2004, 33: 119-129.
- [4] HE J Y, REN Y F, CHEN X L, CHEN H. Protective roles of nitric oxide on seed germination and seedling growth of rice (*Oryza sativa* L.) under cadmium stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2014, 108: 114-119.
- [5] BAUDOUIN E. The language of nitric oxide signalling. *Plant Biology*, 2011, 13(2): 233-242.
- [6] BELLIN D, ASAI S, DELLEDONNE M, YOSHIOKA H. Nitric oxide as a mediator for defense responses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2013, 26 (3): 271-277.
- [7] HORCHANI F, PRE'VOT M, BOSCARI A, EVANGELISTI E, MEILHOC E, BRUAND C, RAYMOND P, BONCOMPAGNI E, ASCHI-SMITI S, PUPPO A, BROUQUISSE R. Both plant and bacterial nitrate reductases contribute to nitric oxide production in *Medicago truncatula* nitrogen-fixing nodules. *Plant Physiology*, 2011, 155: 1023-1036.
- [8] YULIYA A K, ALLA I Y, YAROSLAV B B. Cell mechanisms of nitric oxide signaling in plants under abiotic stress conditions. *Girdhar Pandey*, 2017, 1(1): 371-397.
- [9] 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.
- [10] 刘建新, 王金成, 王瑞娟, 贾海燕. 外源一氧化氮对渗透胁迫下黑麦草幼苗光合和生物发光特性的影响. *草业学报*, 2013, 22(1): 210-216.
LIU J X, WANG J C, WANG R J, JIA H Y. Effects of exogenous nitric oxide on photosynthetic and bioluminescent characteristics in ryegrass seedlings under osmotic stress. *Acta Prataculturae Sinica*, 2013, 22(1): 210-216. (in Chinese)
- [11] ZHANG T, CHE F B, ZHANG H, PAN Y, XU M Q, BAN Q Y, HAN Y, RAO J P. Effect of nitric oxide treatment on chilling injury, antioxidant enzymes and expression of the CmCBF1 and CmCBF3 genes in cold-stored Hami melon (*Cucumis melo* L.) fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 2017, 127: 88-98.
- [12] TIAN Q Y, SUN D H, ZHAO M G, ZHANG W H. Inhibition of nitric oxide synthase (NOS) underlies aluminum-induced inhibition of root elongation in *Hibiscus moscheutos*. *New Phytologist*, 2007, 174: 322-331.
- [13] 杨美森, 王雅芳, 干秀霞, 罗宏海, 张亚黎, 张旺锋. 外源一氧化氮对冷害胁迫下棉花幼苗生长、抗氧化系统和光合特性的影响. *中国农业科学*, 2012, 45(15): 3058-3067.
YANG M S, WANG Y F, GAN X X, LUO H H, ZHANG Y L, ZHANG W F. Effects of exogenous nitric oxide on growth, antioxidant system and photosynthetic characteristics in seedling of cotton cultivar under chilling injury stress. *Scientia Agricultura Sinica*, 2012, 45(15): 3058-3067. (in Chinese)
- [14] FAN Q J, LIU J H. Nitric oxide is involved in dehydration/drought tolerance in *Poncirus trifoliata* seedlings through regulation of antioxidant systems and stomatal response. *Plant Cell Reports*, 2012, 31(1): 145-154.

- [15] NEILL S J, DESIKAN R, CLARKE A, HURST R D, HANCOCK J T. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signaling molecules in plants. *Journal of Experimental Botany*, 2002, 53(372): 1237-1247.
- [16] 樊怀福, 杜长霞, 朱祝军. 外源 NO 对低温胁迫下黄瓜幼苗生长、叶片膜脂过氧化和光合作用的影响. *浙江农业学报*, 2011, 23(3): 538-542.
- FAN H F, DU C X, ZHU Z J. Effects of exogenous nitric oxide on plant growth, membrane lipid peroxidation and photosynthesis in cucumber seedling leaves under low temperature. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2011, 23(3): 538-542. (in Chinese)
- [17] 吴旭红, 吕成敏, 冯晶旻. 外源一氧化氮(NO)对低温胁迫下南瓜幼苗氧化损伤的保护效应. *草业学报*, 2016, 25(12): 161-169.
- WU X H, LV C M, FENG J M. Protective effect of exogenous nitric oxide against oxidative damage in pumpkin seedlings under chilling stress. *Acta Prataculturae Sinica*, 2016, 25(12): 161-169. (in Chinese)
- [18] 闫永庆, 赵奕翔, 杜玉玲, 李丹阳, 潘晨慧, 高梦蕾. 外源 NO 对盐胁迫下玉竹氧化损伤缓解效应. *东北农业大学学报*, 2017, 48(1): 23-32.
- YAN Y Q, ZHAO Y X, DU Y L, LI D Y, PAN C H, GAO M L. Effect of exogenous nitric oxide on oxidative damage in *Polygonatum odoratum* under NaCl stress. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2017, 48(1): 23-32. (in Chinese)
- [19] UCHIDA A, JAGENDORF A T, HIBINO T. Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice. *Plant Science*, 2002, 163(3): 515-523.
- [20] ZHOU B, GUO Z, XING J, HUANG B. Nitric oxide is involved in abscisic acid-induced antioxidant activities in *Stylosanthes guianensis*. *Journal of Experimental Botany*, 2005, 56(422): 3223-3228.
- [21] PINHEIRO H A, DAMATTA F M, CHAVES A R M, FONTES E P B, LOUREIRO M E. Drought tolerance in relation to protection against oxidative stress in clones of *Coffea canephora* subjected to long-term drought. *Plant Science*, 2004, 167: 1307-1314.
- [22] LIMA G P P, BRASIL O G, OLIVEIRA A M. Polyamines and peroxidase activity in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown under saline stress. *Scientia Agricola*, 1999, 56(1): 21-26.
- [23] HAVIR E A, MCHALE N A. Biochemical and development alcharacterization of multiple forms of catalase in tobacco-leaves. *Plant Physiology*, 1987, 84: 450-500.
- [24] 高俊凤. 植物生理学实验指导. 北京: 高等教育出版社, 2006: 142-231.
- GAO J F. *Plant Physiology Experiment Guidance*. Beijing: Higher Education Press, 2006: 142-231. (in Chinese)
- [25] 徐新娟, 李勇超. 2 种植物相对电导率测定方法比较. *江苏农业科学*, 2014, 42 (7): 311-312.
- XU X J, LI Y C. Comparison of relative conductivity determination methods for two kinds of plants. *Journal of Jiangsu Agricultural Sciences*, 2014, 42 (7): 311-312. (in Chinese)
- [26] 王爱国, 罗广华. 植物的超氧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.
- WANG A G, LUO G H. Quantitative relation between the reaction of hydroxylamine and superoxide anion radicals in plants. *Plant Physiology Communications*, 1990(6): 55-57. (in Chinese)
- [27] CUI J X, ZHOU Y H, DING J G, XIA X J, SHI K, CHEN S C, ASAMI T, CHEN Z X, YU J Q. Role of nitric oxide in hydrogen peroxide-dependent induction of abiotic stress tolerance by brassinosteroids in cucumber. *Plant Cell and Environment*, 2010, 34(2): 347-358.
- [28] 常青山, 张利霞, 杨伟, 周姗姗, 黄青哲, 吕凤娟, 黄玥, 葛淑慧, 张天蒙. 外源 NO 对 NaCl 胁迫下夏枯草幼苗抗氧化能力及光合特性的影响. *草业学报*, 2016, 25(7): 121-130.
- CHANG Q S, ZHANG L X, YANG W, ZHOU S S, HUANG Q Z, LV F J, HUANG Y, GE S H, ZHANG T M. Effects of exogenous nitric oxide on antioxidant activity and photosynthetic characteristics of *Prunella vulgaris* seedlings under NaCl stress. *Acta Prataculturae Sinica*, 2016, 25(7): 121-130. (in Chinese)
- [29] ZHANG H, SHEN W B, XU L L. Effects of nitric oxide on the germination of wheat seeds and its reactive oxygen species metabolisms under osmotic stress. *Acta Botanica Sinica*, 2003, 45(8): 901-905.
- [30] 王丽梅, 胡琳莉, 朱永超, 董爱玲, 廖伟彪, 张国斌, 郁继华. 一氧化氮对弱光下小型大白菜幼苗生长及光合作用的影响. *西北植物学报*, 2016, 36(8): 1615-1622.
- WANG L M, HU L L, ZHU Y C, DONG A L, LIAO W B, ZHANG G B, YU J H. Influence of nitric oxide on growth and photosynthesis of *brassica pekinensis* seedlings under low light intensity. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2016, 36(8): 1615-1622. (in Chinese)
- [31] 王文, 陈振德, 罗庆熙. 外源一氧化氮对苯丙烯酸胁迫下黄瓜幼苗生长及活性氧代谢的影响. *中国农业科学*, 2010, 43(17): 3677-3683.
- WANG W, CHEN Z D, LUO Q X. Effects of exogenous NO on growth and active oxygen metabolism in cucumber seedlings under cinnamic acid stress. *Scientia Agricultura Sinica*, 2010, 43(17): 3677-3683. (in Chinese)
- [32] 时振振, 李胜, 杨柯, 马绍英, 刘会杰, 张品南, 杨晓明. 盐胁迫下豌豆幼苗对内外源 NO 的生理生化响应. *草业学报*, 2014, 23(5):

- 193-200.
- SHI Z Z, LI S, YANG K, MA S Y, LIU H J, ZHANG P N, YANG X M. Physiological and biochemical response of pea seedling to endogenous and exogenous NO under salt stress. *Acta Prataculturae Sinica*, 2014, 23(5): 193-200. (in Chinese)
- [33] 陈世军, 张明生. 植物一氧化氮及其对活性氧代谢的影响. *安徽农业科学*, 2008, 36(17): 7116-7118, 7179.
- CHEN S J, ZHANG M S. Nitric oxide and its effects on reactive oxygen species metabolism in plants. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2008, 36(17): 7116-7118, 7179. (in Chinese)
- [34] DELLEDONNE M, ZEIER J, MAROCCO A, LAMB C. Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98: 13454-13459.
- [35] BELLIN D, ASAI S, DELLEDONNE M, YOSHIOKA H. Nitric oxide as a mediator for defense responses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2013, 26: 271-277.
- [36] 王霞, 侯平, 尹林克, 冯大千, 潘伯荣. 水分胁迫对柽柳组织含水量和膜透性的影响. *干旱区研究*, 1999, 16(2): 12-15.
- WANG X, HOU P, YI L K, FENG D Q, PAN B R. Effect of tissue relative water content and membrane permeation of *tamarix* under soil-water stress slowly. *Arid Zone Research*, 1999, 16(2): 12-15. (in Chinese)
- [37] 肖雯, 贾恢先, 蒲陆梅. 几种盐生植物抗盐生理指标的研究. *西北植物学报*, 2000, 20(5): 818-825.
- XIAO W, JIA H X, PU L M. Studies on physiological index of some halophytes. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2000, 20(5): 818-825. (in Chinese)
- [38] 樊怀福, 郭世荣, 焦彦生, 张润花, 李娟. 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.
- FAN H F, GUO S R, JIAO Y S, ZHANG R H, LI J. 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. (in Chinese)
- [39] 邵瑞鑫, 李蕾蕾, 郑会芳, 张寄阳, 杨慎娇, 马野, 信龙飞, 苏小雨, 冉午玲, 毛俊, 郑博元, 杨清华. 外源一氧化氮对干旱胁迫下玉米幼苗光合作用的影响. *中国农业科学*, 2016, 49(2): 251-259.
- SHAO R X, LI L L, ZHENG H F, ZHANG J Y, YANG S J, MA Y, XIN L F, SU X Y, RAN W L, MAO J, ZHENG B Y, YANG Q H. Effects of exogenous nitric oxide on photosynthesis of maize seedlings under drought stress. *Scientia Agricultura Sinica*, 2016, 49(2): 251-259. (in Chinese)
- [40] 车永梅, 唐静, 陈康, 柏素花, 刘新. 一氧化氮对盐胁迫下玉米幼苗叶绿素荧光参数和光合特性的影响. *玉米科学*, 2009, 17(3): 91-94.
- CHE Y M, TANG J, CHEN K, BAI S H, LIU X. Effects of nitric oxide on chlorophyll fluorescence parameters and photosynthetic characteristics of maize seedling under salt stress. *Journal of Maize Sciences*, 2009, 17(3): 91-94. (in Chinese)
- [41] 吴雪霞, 朱为民, 朱月林, 陈建林. 外源一氧化氮对 NaCl 胁迫下番茄幼苗光合特性的影响. *植物营养与肥料学报*, 2007, 13(6): 1105-1109.
- WU X X, ZHU W M, ZHU Y L, CHEN J L. Effects of exogenous nitric oxide on photosynthetic characteristics of tomato seedlings under NaCl stress. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 2007, 13(6): 1105-1109. (in Chinese)
- [42] VAN K O, SNEL J F H. The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *Photosynthesis Research*, 1990, 25: 147-150.
- [43] KALAJI M H, GOLTSEV V N, ŽUK-GOLASZEWSKA K, ZIVCAK M, BRESTIC M. Chlorophyll fluorescence: Understanding crop performance-Basics and applications. *CRC Press*, 2017, 11: 222.

(责任编辑 赵伶俐)