

外源一氧化氮对干旱胁迫下苜蓿幼苗抗氧化酶活性和叶绿素荧光特性的影响

姜义宝, 杨玉荣, 郑秋红

(河南农业大学牧医工程学院, 河南 郑州 450002)

摘要: 外源一氧化氮(NO)处理苜蓿幼苗, 进行不同土壤含水量条件的干旱胁迫, 探讨外源 NO 对提高苜蓿幼苗抗旱性的作用, 结果表明: 0.1 mmol/L 硝普钠(SNP)减缓干旱胁迫下苜蓿幼苗细胞膜透性的增加, 使过氧化氢酶(CAT)先升后降, 超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化物酶(POD)活性持续升高, 减缓叶绿素含量和叶绿素荧光参数 F_v/F_m 、 F_v/F_o 的降低, 表明外源 NO 处理提高了苜蓿的抗旱性。

关键词: 一氧化氮; 干旱胁迫; 苜蓿; 抗氧化酶; 叶绿素; 荧光参数

中图分类号: S551⁺.701 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7601(2008)02-0065-04

一氧化氮(nitric oxide, NO)是广泛分布于生物体的一种气体类生物活性分子, 是植物体重要的生物活性分子, 植物体内通过酶促和非酶促途径产生 NO^[1,2]。大量的实验证明 NO 参与了植物生长发育的各个生理过程, 如种子萌发、叶扩展、根生长、细胞凋亡、防御相关基因的表达以及植物的耐逆反应^[3,4]。NO 作为信号分子参与了植物适应逆境的生理调节过程, 适当浓度 NO 能够提高植物对环境的适应能力^[5]。樊怀福等研究认为 NO 可缓解盐胁迫对黄瓜造成的伤害, 提高其生长量和抗氧化酶活性^[6], 王罗霞等研究表明低浓度 NO 能够对渗透胁迫下小麦叶片膜脂过氧化有明显的缓解效应^[7]。

苜蓿(*Medicago sativa*)是一种多年生豆科牧草, 在我国苜蓿产区水资源紧缺已成为苜蓿高产的主要限制性因素之一, 提高苜蓿的抗旱能力是我国当今乃至今后相当长一段时期内所面临的重大科研课题和关键技术问题。NO 能够提高植物的抗逆性, 多以大田作物为材料, 在苜蓿上少有报道, 本文以紫花苜蓿为材料, 通过外源喷施 NO, 研究干旱胁迫下苜蓿叶片的抗氧化酶活性和叶绿素荧光特性, 探讨 NO 对苜蓿抗旱性的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料为敖汉苜蓿(*Medicago sativa* CV. *AoHan*), 由北京中种草业有限公司提供, NO 供体硝普钠(SNP, Sigma 公司) 随用随配。

1.2 方法

1.2.1 处理 挑选籽粒饱满、健康无病虫害种子, 按照苜蓿的播种技术, 播种于花盆中, 土壤预先高压灭菌, 为沙壤土, 采于河南农业大学科教实验园区表土耕作层, 田间持水量为 23.9%。将花盆放在培养箱中培养, 昼夜温度为 25/20℃, 每天光照 12 h, 黑暗 12 h。当苜蓿生长到 4 叶期, 每盆留苗 10 株, 每个处理 4 盆, 3 次重复。用 0.1 mmol/L SNP 溶液喷洒, 喷后用塑料薄膜保湿 2~3 h, 连续喷施 3 d, 对照喷施蒸馏水。喷施 SNP 后将材料放到干旱棚中, 采用称重法控制土壤含水量, 设置土壤含水量(相对含水量即相对于田间持水量)3 个水平, 分别为 75%、50%、35%, 实际操作中控制含水量为 70%~75%、50%~55%、35%~40%, 待土壤水分自然干燥至设定标准, 开始控水, 每天 18:00 时称取花盆重量, 补充当天失去水分, 使保持设定含水量, 第 5 天进行采样分析。

1.2.2 测量方法与指标 细胞膜相对透性的测定用 DDS-11C 电导仪测定电导率, 以相对电导率来表示细胞膜相对透性; 叶绿素含量的测定参照张宪政分光光度计法^[8]; SOD 活性测定采用氮蓝四唑(NBT)光化还原抑制法, 以抑制 NBT 光化还原的 50%为 1 个酶活性单位(U)^[9]; CAT 活性测定采用紫外吸收法测定, 酶活性单位为(U)^[10]; POD 活性测定采用愈创木酚法, 以每分钟内 470 nm 下的光密度变化 0.01 为 1 个 POD 活性单位(U)^[11]。

测量选定的植株上取相同部位的叶片(第 2 片

收稿日期: 2007-06-21; 修改日期: 2007-08-08

基金项目: 河南省科技厅重大科技攻关项目 (0422010300)

作者简介: 姜义宝(1976—), 男, 山东巨野县人, 硕士, 讲师, 从事草业科学方面的教学与研究。E-mail: yibaojiang@sina.com。

叶),用 OS1-FL 调制式叶绿素荧光分析仪测定各荧光参数,测定前各叶片皆先暗适应 20 min。根据已测得荧光参数 F_v/F_m (原初光能转化效率)、 F_o (初始荧光)和 F_m (最大荧光),并计算 PS II 潜在光化学活性 F_v/F_o ,每个荧光参数测定皆重复 6 次。

2 结果与分析

2.1 外源 NO 对细胞膜相对透性的影响

细胞膜相对透性的变化可以作为植物受伤害程度的指标之一。由图 1 可知,在正常供水(75%)条件下两组叶片细胞膜相对透性相近,随着土壤相对

含水量的减少,叶片细胞膜相对透性升高,但处理组始终低于对照组。在 35%土壤含水量时,处理组和对照组细胞膜相对透性分别为 50.18%和 62.53%,表明处理组细胞膜受伤害程度相对较小。

2.2 外源 NO 对叶绿素含量的影响

在 75%土壤含水量条件下,苜蓿叶片叶绿素含量各组之间差别不大(如图 2),随着土壤含水量的减少,叶绿素含量降低,处理组的降低速度低于对照组,在 50%和 35%土壤含水量条件下比对照组高出 23.07%、28.46%。由此可以表明 NO 减轻了干旱胁迫对叶绿素的破坏。

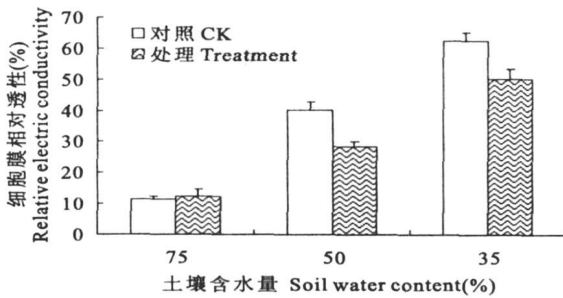


图 1 NO 对苜蓿细胞膜相对透性的影响

Fig.1 Effect of NO on relative electric conductivity of alfalfa

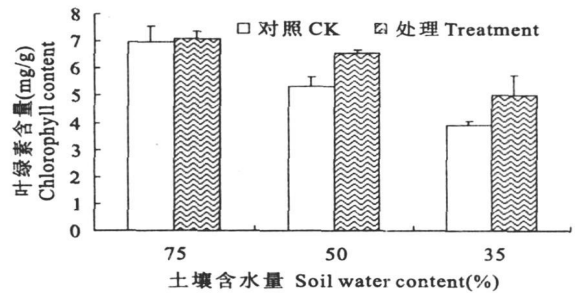


图 2 NO 对苜蓿叶绿素含量的影响

Fig.2 Effect of NO on chlorophyll content of alfalfa

2.3 外源 NO 对抗氧化酶活性的影响

POD、CAT、SOD 是植物体重要的活性氧清除酶,能减轻细胞由于膜脂过氧化作用而引起的伤害程度。试验结果表明(图 3),在 75%土壤含水量时处理组 POD 活性低于对照组,在 50%和 35%土壤含水量下处理组比对照高 34.23%、31.21%。随干旱程度增加,CAT 活性随干旱程度增高而降低,并且处理组始终高于对照组,在 50%和 35%土壤含水

量下 CAT 活性比对照高 39.06%、15.20%。SOD 活性随着干旱程度的增加处理组呈现先增高后降低的趋势,而对照组在持续降低,处理组在 75%土壤含水量时低于对照组,在 50%和 35%土壤含水量比对照高出 46.63%、20.96%。由此可见在干旱条件下,外源 NO 提高了 SOD、CAT、POD 的活性,以此来减少干旱胁迫的伤害。

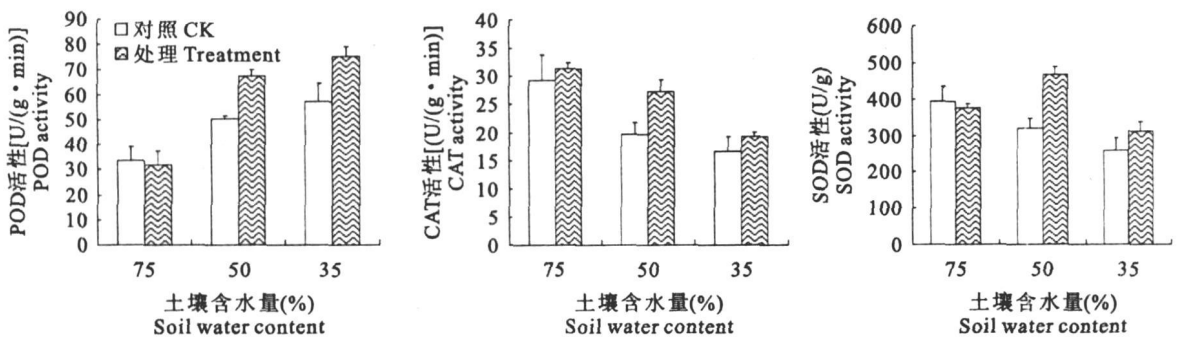


图 3 NO 对苜蓿 POD、CAT、SOD 活性的影响

Fig.3 Effect of NO on activities POD、CAT、SOD of alfalfa

2.4 外源 NO 对叶绿素荧光特性的影响

F_v/F_m 值是 PS II 最大光化学量子产量,常用

于度量植物叶片 PS II 原初光能转换效率。由图 4 可知,随着干旱胁迫的加重, F_v/F_m 比值呈下降趋

势,在胁迫期间处理组 F_v/F_m 比对照组高于 6.84%和 8.00%。 F_v/F_o 比值随着干旱胁迫的加强总体呈现下降的趋势,在 50%和 35%土壤含水量时处理组的 F_v/F_o 比值分别比对照组高出

30.30%、31.16%。 F_v/F_o 是指 PS II 潜在活性,胁迫下该参数下降,可能与水分胁迫使 PS II 捕光色素蛋白复合体的含量降低有关,外源 NO 处理延缓了其降低速度。

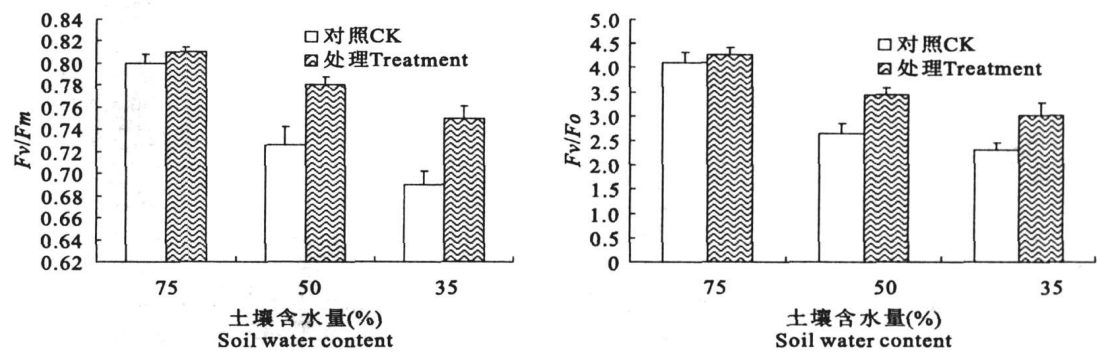


图 4 NO 对苜蓿 F_v/F_m 、 F_v/F_o 变化的影响
Fig.4 Effect of NO on F_v/F_m 、 F_v/F_o of alfalfa

3 讨 论

干旱胁迫下植物细胞内大量富集活性氧,引发膜脂过氧化,使细胞膜系统损伤,通透性增加,严重时引起叶绿素蛋白质复合体结合松弛,叶绿素含量明显降低,甚至导致植物死亡。植物内源保护酶系,如 POD、CAT、SOD 等,它们协同起作用共同抵抗干旱胁迫诱导的氧化伤害^[11]。一般来讲,干旱胁迫下植物体内 SOD 等酶的活性与植物抗氧化胁迫能力呈正相关。抗旱性强的植物,在干旱胁迫下,POD、CAT、SOD 的活性较高^[12],因而能有效地清除活性氧,阻抑膜脂过氧。本试验表明,在干旱胁迫下与对照组相比,喷施外源 NO 提高了苜蓿叶片抗氧化酶的活性和叶绿素含量,降低了细胞膜的透性,表明外源 NO 可以调节植物体内的活性氧代谢来减轻胁迫对细胞膜的伤害,缓解了膜透性增大和离子外漏。Mata 等^[13]认为 NO 缓解干旱胁迫下小麦幼苗的氧化损伤与 NO 同活性氧自由基发生反应,从而中断氧化胁迫而减轻细胞膜损伤有关。汤绍虎等对渗透胁迫下黄瓜的研究也得出相一致的结果^[14]。

外源 NO 缓解膜脂过氧化、提高保护酶系活性,可能是由于 NO 对含铁的相关酶类有很高的亲和性,NO 可通过调节 CAT 和抗坏血酸过氧化物酶 (APX) 等含血红素铁的酶类活性和抑制含非血红素铁的顺乌头酸酶等活性来参与植物抗性生理反应^[15]。

叶绿素含量的高低在很大程度上反映了植株的生长状况和叶片的光合能力^[16]。土壤干旱胁迫下,叶绿素含量下降^[17],本研究表明,干旱胁迫下苜蓿

叶绿素含量降低,施加外源 NO 有助于保护叶绿体膜,保持其结构的完整性,使苜蓿叶片有较高的叶绿素含量,从而对维持干旱胁迫下苜蓿幼苗较高的光合速率有一定的促进作用。

叶绿素荧光是光合作用的探针,逆境对光合作用各过程产生的影响都可通过体内叶绿素荧光诱导动力学变化反映出来。因此,叶绿素荧光参数可作为逆境条件下植物抗逆反应的指标之一。相昆等研究认为外源 NO 可以缓解干旱胁迫下叶绿素荧光参数的下降程度^[18]。本实验说明干旱胁迫下植物的 PSII 原初光能转换效率、潜在活性降低,进而影响光合电子传递的正常进行。外源 NO 处理提高了干旱胁迫下 F_v/F_m 、 F_v/F_o ,缓解了干旱胁迫对光合机构的伤害,提高了苜蓿的抗旱性。

NO 能明显缓解干旱胁迫造成的氧化损伤,提高了苜蓿叶片叶绿素含量和光合能力,增强了苜蓿的抗旱性,SNP 作为一种常用的外源 NO 供体,在苜蓿抗旱栽培中具有潜在的应用价值。由于植物细胞对干旱胁迫的响应涉及许多复杂的信号转导途径,包括许多复杂的生理生化过程,NO 提高苜蓿的抗旱性机制有待于进一步深入研究。

参 考 文 献:

[1] Chandokm R, Ytterberg A J, Van Wijk K J. The pathogen-inducible nitric oxide synthase (iNOS) in plants is variant of the protein of the glycine decarboxylase complex[J]. Cell. 2003, 113 (4), 1380—1384.
[2] Wojtaszek O. Nitric oxide in plants to NO or not to NO[J]. Phytochemistry, 2000, 54(1), 1—4.
[3] Corpas F J, Barroso I B, Carreras A, et al. Constitutive arginine-

- dependent nitric oxide syntheses activity in different organs of pea seedlings during plant development [J]. *Planta*, 2006, 224 (2): 246—254.
- [4] Laxalt A M, Beligni M V, Lamattina L. Nitric oxide preserves the level of chlorophyll in potato leaves infected by phytophthora infestans[J]. *European Journal of Plant Pathology*, 1997, 103: 643—651.
- [5] Beligni M V, Lamattina L. Nitric oxide counteracts cytotoxic processes mediated by reactive oxygen species in plant tissues[J]. *Planta*, 1999, 208: 337—344.
- [6] 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—557.
- [7] 王罗霞, 赵志光, 王锁民. 一氧化氮对水分胁迫下小麦叶片活性氧代谢及膜脂过氧化的影响[J]. *草业学报*, 2006, 15 (4): 104—108.
- [8] 张宪政. 植物生理学实验指导[M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 1989. 103—105.
- [9] 王爱国, 罗广华, 邵从本, 等. 大豆种子超氧化物歧化酶的研究[J]. *植物生理学报*, 1983, 9(9): 77—83.
- [10] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社出版, 2000. 165—167.
- [11] Gong Hai ju, Zhu Xue yi, Chen Kun ming, et al. Silicon alleviates oxidative damage of wheat plants in pots under drought [J]. *Plant Science*, 2005, 169: 313—321.
- [12] 单长卷, 任永信, 戚建华. 土壤干旱对冬小麦幼苗生长和叶片生理特性的影响[J]. *干旱地区农业研究*, 2006, 24(5): 105—108.
- [13] Mata C G, Lamattina L. Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress [J]. *Plant Physiology*, 2001, 126: 1196—1204.
- [14] 汤绍虎, 周启贵, 孙 敏, 等. 外源 NO 对渗透胁迫下黄瓜种子萌发、幼苗生长和生理特性的影响[J]. *中国农业科学*, 2007, 40(2): 419—425.
- [15] Clark D, Durner J, Navarre D A, et al. Nitric oxide inhibition of tobacco catalase and ascorbate peroxidase[J]. *Molecular Plant—Microbe Interactions*, 2000, 13: 1380—1384.
- [16] 徐惠风, 刘兴土, 金研铭, 等. 向日葵叶片叶绿素和比叶重及产量研究[J]. *农业系统科学与综合研究*, 2003, 19 (2): 97—100.
- [17] 蒲光兰, 周兰英, 胡学华, 等. 干旱胁迫对金太阳杏叶绿素荧光动力学参数的影响[J]. *干旱地区农业研究*, 2005, 23(3): 44—48.
- [18] 相 昆, 李宪利, 王晓芳, 等. 水分胁迫下外源 NO 对核桃叶绿素荧光的影响[J]. *果树学报*, 2006, 23(4): 616—619.

Effects of exogenous nitric oxide on antioxidase and chlorophyll fluorescence of seedling of alfalfa under drought stress

JIANG Yi-bao, YANG Yu-rong, ZHENG Qiu-hong

(College of Animal Science, Henan Agriculture University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: This experiment investigated the effects of nitric oxide (NO) on alfalfa seedling under drought stress. The results showed that 0.1 mmol/L sodium nitroprusside (SNP) treatment could alleviate the rise of alfalfa seedling membrane permeability; the activity of catalase (CAT) enhanced first and declined then. SNP treatment could enhance the activity of superoxide dismutase (SOD) and peroxydase (POD), and decline of chlorophyll content and chlorophyll fluorescence parameter F_v/F_m and F_v/F_o of alfalfa seedling. These results indicated exogenous NO may improve the alfalfa seedling drought resistance.

Key words: nitric oxide(NO); drought stress; alfalfa; antioxidase; chlorophyll; fluorescence parameter