

外源一氧化氮对 Na_2CO_3 胁迫下 南瓜幼苗碳氮代谢的影响

吴旭红¹, 罗贵强¹, 冯晶旻²

(1. 齐齐哈尔大学生命科学与农林学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006; 2. 齐齐哈尔市卫生监督所, 黑龙江 齐齐哈尔 161005)

摘要: 为探讨外源 NO 对 Na_2CO_3 胁迫下南瓜幼苗碳氮代谢过程的影响, 以银辉 2 号南瓜品种为材料, 采用盆栽法研究了 $80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SNP 对 $60 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Na_2CO_3 胁迫下南瓜幼苗生长、叶绿体色素含量、碳氮代谢相关酶活性及代谢产物量的变化规律。结果表明: Na_2CO_3 胁迫 12 d, 南瓜幼苗地上和地下部分干重、相对生长量、根冠比、Ru-bisco 羧化活力、光合色素含量和氮代谢相关酶活性均不同程度下降; Rubisco 氧化活力、游离氨基酸总量和蛋白水解酶活性显著上升。80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SNP 外源处理能明显缓解 Na_2CO_3 胁迫对南瓜幼苗生长及光合作用的抑制, 增加了干物质的积累和光合色素的含量。与 Na_2CO_3 胁迫处理相比, 干物质积累量、相对生长量、叶绿素和类胡萝卜素(carotenoid)含量、硝酸还原酶(NR)、谷氨酰胺合成酶(GS)、Rubisco 羧化酶、淀粉酶(AMY)活性和可溶性蛋白含量分别提高了 26.72%、30.45%、17.69%、46.15%、46.43%、30.70%、38.75%、70.0%、65.37%; Rubisco 加氧酶、蛋白水解酶活性和游离氨基酸总量分别降低了 18.29%、31.76%、28.57%。外源 NO 通过促进淀粉酶和 Rubisco 羧化活性的提高和氧化活性的下降, 维持了可溶性总糖含量的稳定; 通过增强 NR、GS 和谷氨酸合酶(GOGAT)活性、抑制蛋白水解酶和谷氨酸脱氢酶(GDH)活性, 降低叶片中游离氨基酸含量, 增加了蛋白质的积累。本研究结论: 碱性盐胁迫下, 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 SNP 通过增强南瓜幼苗的光合碳代谢, 促进了酮酸转化为氨基酸。通过提高氮代谢相关酶 NR、GS、GOGAT 活性, 促使碳流由光合碳代谢转向氮代谢, 维持了盐害下南瓜幼苗碳氮代谢的正常进行, 增强了南瓜幼苗抵御 Na_2CO_3 胁迫的能力。

关键词: 一氧化氮; Na_2CO_3 胁迫; 碳氮代谢; 南瓜; 代谢产物

中图分类号: Q945.78 **文献标志码:** A

Effects of exogenous nitric oxide on the growth and carbon and nitrogen metabolism of pumpkin seedlings under Na_2CO_3 stress

WU Xu-hong¹, LUO Gui-qiang¹, FENG Jing-min²

(1. College of Life Sciences, Agriculture and Forestry, Qiqihar University, Qiqihar, Heilongjiang 161006, China;

2. Qiqihaer Sanitary Supervision Institute, Qiqihaer, Heilongjiang 161006, China)

Abstract: In order to explore the effects of exogenous nitric oxide on metabolism process of carbon and nitrogen of pumpkin seedlings, a pot experiment was conducted to study the effects of $80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SNP on the growth of seedlings, the contents of chloroplast pigments, the activities of carbon and nitrogen metabolism related enzymes and the amount of metabolites of pumpkin (cv. Yinhui No.2) seedlings under the stress of $60 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Na_2CO_3 . The results showed that aboveground and underground dry weight, relative growth rate, root shoot ratio, Rubisco carboxylase activity, light enzyme activity of photosynthetic pigment contents and nitrogen metabolism were decreased in different degrees, while Rubisco oxidation activity, total free amino acids and proteolytic enzyme activity were significantly increased when the seedlings exposed to $60 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Na_2CO_3 for 12 d. Application of $80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SNP obviously alleviated the inhibition effects of Na_2CO_3 stress on the seedling growth and photosynthesis, as it increased the plant dry matter and leaf chlorophyll content. Compared with Na_2CO_3 stress treatment, $80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SNP considerably increased dry matter accumulation, relative dry weight, chlorophyll content, carotenoid content, nitrate reductase, glutamine synthetase, carboxylase, amylase activity and soluble protein accumulation by 26.72%, 30.45%, 17.69%, 46.15%, 46.43%, 30.70%, 38.75%, 70.0%, 65.37%, respectively, while decreased protease, oxygenase activity, free amino acid content by

18.29%, 31.76%, 28.57%。Meanwhile, exogenous NO maintained the stability of total soluble sugar content by increasing the activity of amylase and Rubisco carboxylation and decreasing the oxidative activity. Exogenous NO also inhibited the activity of proteolytic enzymes and glutamate dehydrogenase (GDH), decreased the content of free amino acids in leaves, and increased the accumulation of protein by increasing the activity of NR, GS and glutamate synthase (GOGAT). Under alkaline salt stress, $80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SNP promoted the keto acid translating into amino acids through the enhancement of pumpkin seedlings photosynthetic carbon metabolism. Meanwhile, by improving the activity of related enzymes NR, GS, GOGAT, $80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SNP caused the switch of carbon to nitrogen, maintaining the balance between them under salt stress of Na_2CO_3 .

Keywords: nitric oxide; Na_2CO_3 stress; carbon and nitrogen metabolism; pumpkin; metabolic substances

盐碱危害是制约农作物生长和产量的重要非生物胁迫因子,全球受盐渍化土壤面积可达 8 亿 hm^2 ,其中 50% 以上是由 Na_2CO_3 等碱性盐构成的苏打盐碱土。我国的盐碱荒地和盐碱问题耕地已超过 3 000 万 hm^2 ,在我国的东北、西北、华北均有分布,尤其是东北的松嫩平原,是世界三大苏打盐碱地之一^[1]。碱性盐除可造成渗透调节失衡、光合机构受损、离子的吸收及区隔化等代谢紊乱外,高 pH 值对非盐生植物在种子萌发和幼苗生长阶段是更加高危的生态逆境,因此其破坏力更强。幼苗阶段是植物感受逆境信号最敏感的时期,由于碱胁迫造成碳素和氮素的同化和吸收障碍,养分的生理缺乏和代谢受阻导致生长发育受到抑制^[1-2];此阶段也是适应环境变化进行生理调节的活跃期。通过促控手段增加光合产物的积累,为氮代谢提供充足的碳架和还原力是改善和减轻碱胁迫危害的重要途径。一氧化氮(nitric oxide, NO)作为一种分子信号,参与了多种植物对盐碱胁迫的生理适应性和耐受性的调节过程。如: NO 通过提高根系和叶片的抗氧化酶活性,增强了黄瓜幼苗对 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 胁迫的耐性^[2];缓解了 NaCl 胁迫对番茄幼苗生长的抑制^[3]和小麦(Yangmai 158)根系发育的氧化损伤^[4];促进了盐胁迫下莢藜苜蓿种子萌发过程中淀粉和可溶性蛋白的水解,加速了萌发进程^[5];上调了水稻(jiafuzhan)根叶保护酶活力,增强了其对盐害逆境的适应力^[6];参与了碱胁迫下光合功能的调控,增强了黑麦草的耐碱性^[7]。而 NO 对碱胁迫下南瓜幼苗碳氮代谢的影响未见报道。NO 对逆境下禾谷类、牧草及部分蔬菜如番茄、黄瓜、辣椒的生理生化响应的研究较多,南瓜是集蔬菜、油料、饲料兼用作物,种植区域广泛,尤其在东北和西北地区,苗期与耕作层土壤返盐期叠加,加重了对南瓜幼苗的伤害。本试验以南瓜幼苗为实验材料,以外源 NO 供体硝普钠为调控手段,研究其对 Na_2CO_3 胁迫下南瓜幼苗早期碳氮代谢及相关酶活性的影响,探讨外源 NO 在南瓜幼苗碳素代谢和氮素代谢中的作用及对碳氮代谢相互关系的调节机

制,分析和探索提高南瓜耐碱性的生理因素和代谢机制,为在盐碱地区南瓜的抗盐栽培措施提供技术支撑和理论依据。

1 材料和方法

1.1 供试材料

供试南瓜品种为“银辉 2 号”(Yinhui 2),由齐齐哈尔市种子经销处提供。NO 供体为硝普钠($\text{Na}_2\text{Fe}(\text{CN})_5$)(Sodium nitroprusside, SNP),购自 Sigma 公司,纯度为 98.5%。先配制成 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 母液,4℃ 保存,用时按所需浓度稀释。

1.2 实验设计

1.2.1 Na_2CO_3 和 SNP 浓度的筛选 精选饱满、大小均匀的南瓜种子,先经 0.1% 的 HgCl_2 消毒 10 min,室温下蒸馏水浸泡 8 h,于培养皿中 25℃ 恒温箱内催芽。将发芽一致的种子选出,继续用蒸馏水培养 2 d 后,改用浓度分别为 30、60、90、120、150 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Na_2CO_3 培养,3 d 后剔除影响轻微和严重盐害的处理,在 60 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Na_2CO_3 处理中,分别添加 0、40、60、80、100、120、140 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 SNP,培养 4d 后选出 SNP 浓度为 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

1.2.2 试验处理 将催芽后的种子播于细砂经清水浸泡 1 h,高温灭菌(130℃, 3 h)定量称重的花盆中(12 粒/盆),于实验室室温下(21℃ ± 2℃)自然光照培养,出苗后每隔 2 d 浇灌 Hongland 营养液 500 ml。待幼苗至二叶一心时,每盆保留生长整齐一致的幼苗 8 株,共 30 盆。

试验共设 4 个处理:分别为处理 I (对照): Hongland 营养液(CK);处理 II: Hongland 营养液 + 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 SNP;处理 III: Hongland 营养液 + 60 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Na_2CO_3 ;处理 IV: Hongland 营养液 + 60 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Na_2CO_3 + 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 SNP。于每天 8:30 和 16:30 用相应的处理液定量浇灌 2 次,每次 100 ml/盆。每处理 60 株苗,每次取样 4 株,3 次重复。于处理的 3、6、9、12 d 分别进行 Rubisco、AMY、蛋白水解酶活性和可溶性糖、可溶性蛋白、游离氨基酸总量

的测定。处理结束后,做相对生长量、干物质积累、光合色素含量及氮代谢关键酶活性的测定。

1.3 测定项目和方法

1.3.1 生长指标的测定 于处理结束后取出幼苗,将地上、地下部分分开,迅速用蒸馏水洗净并吸干表面水分,称取鲜重后,105℃烘箱杀青 15 min 后转至 75℃烘干至衡重,称干重。相对生长量、地上部鲜重和干重及根冠比以 4 株幼苗的平均值表示,单位为 g·株⁻¹。

1.3.2 碳代谢相关酶活性及指标的测定 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶(Rubisco)活力的测定:取南瓜叶片 2.0 g,迅速加入 2.0 ml 提取液研磨成匀浆。将匀浆过滤,滤液离心后取上清进行 Rubisco 活力测定^[8]。淀粉酶(amylase, AMY)活性测定采用 3,5 二硝基水杨酸比色法^[9]。可溶性糖利用蒽酮比色法测定^[8]:取 0.1 g 南瓜叶片剪碎,用乙醇丙酮混合液暗提取 24 h,分别在 663、645、470 nm 处测光吸收值,叶绿素、类胡萝卜素按李合生的公式计算^[9]。

1.3.3 氮代谢及相关酶活性及指标的测定 硝酸还原酶(nitrate reductase, NR)活性采用活体法^[8]。谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase, GS)活性测定参照汤章诚的方法^[10]。谷氨酸合成酶(glutamate synthase, GOGAT)活性参照赵全志等的方法^[11]。谷氨酸脱氢酶(glutamic dehydrogenase, GDH)参照 Majerowicz 等的方法^[12]。可溶性蛋白和游离氨基酸总量采用李合生的考马斯亮蓝和水合茚三酮法测定^[9]。蛋白水解酶的活性采用张志刚等的方法^[13]。

1.4 统计分析

实验数据用 Microsoft Excel 2003 进行统计,所有数据以平均数±标准差表示,用 Spss 17.0 统计分析软件进行统计分析,Duncan 新复极差法进行多重比较($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 Na₂CO₃ 胁迫下外源 NO 对南瓜幼苗生长的影响

表 1 可见,在 Na₂CO₃ 胁迫下,南瓜幼苗地上部分和根系鲜、干重均明显下降,分别比正常生长条件(CK)鲜重下降了 28.69% 和 26.11%,干重降幅达 32.89% 和 41.17%;地下部分相对生长量降幅最大;根冠比降至最低;与正常生长条件均达差异显著水平,说明碱性盐 Na₂CO₃ 不仅显著抑制了南瓜幼苗对水分和养分的吸收,而且对干物质积累的影响根系比地上部分更加严重。SNP 单独处理,对幼苗地上、地下部鲜重无明显影响,但显著促进了植株地上部分和根系干物质的积累($P < 0.05$)。SNP 复合处理,使碱胁迫导致的生长抑制明显缓解,南瓜幼苗地上及根系鲜、干重分别比 Na₂CO₃ 胁迫下提高了 19.18%、15.52% 和 25.49%、35.71% ($P < 0.05$),根系相对生长量增幅为 25.48%、36.01%,根冠比加大,表明外源一氧化氮供体 SNP 可以减轻 Na₂CO₃ 胁迫对南瓜幼苗生长的抑制作用,使受害幼苗的水分和养分状况得到改善,且在处理时段内对根系生长的促进作用更加显著。

表 1 外源 NO 对 Na₂CO₃ 胁迫下南瓜幼苗生长的影响(平均数±SE)

Table 1 Effects of NO on the growth of pumpkin seedlings under Na₂CO₃ stress(mean±SE)

处理 Treatment	地上部鲜重 Shoot fresh weight /(g·plant ⁻¹)	地上部干重 Shoot dry weight /(g·plant ⁻¹)	根系鲜重 Root fresh weight /(g·plant ⁻¹)	根系干重 Root dry weight /(g·plant ⁻¹)	相对生长量 Relative dry weight/%		根冠比 R/S ratio
					地上部分 Shoot	根系 Root	
CK	8.26±0.45a	0.76±0.02b	1.57±0.06a	0.119±0.007b	100b	100b	0.156±0.033a
SNP	8.41±0.31a	0.84±0.07a	1.65±0.12a	0.133±0.010a	110.53±1.55a	110.92±1.13a	0.158±0.008a
Na ₂ CO ₃	5.89±0.24c	0.51±0.05c	1.16±0.08c	0.070±0.002d	67.11±0.68d	58.82±0.87d	0.137±0.029c
Na ₂ CO ₃ + SNP	7.02±0.18b	0.64±0.09c	1.34±0.13b	0.095±0.009c	84.21±1.79c	80.07±1.22c	0.148±0.005b

注:同一列数据后小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。下同
Note: Values with different lowercases letters of the same column indicate significant differences ($P < 0.05$). The same as below.

2.2 外源 NO 对 Na₂CO₃ 胁迫下南瓜幼苗叶片 Rubisco 和 AMY 活性及可溶性糖含量的影响

Na₂CO₃ 胁迫处理使南瓜叶片 Rubisco 羧化活性明显受抑,并呈现出随处理时间延长而降低(见图 1a)。与正常生长条件相比较,在胁迫 6 d 和 12 d 时,酶活性分别丧失了 38.95%、59.58% ($P < 0.05$),但在胁迫处理后期相对降幅收窄(7.48%)。单纯 SNP 处理,在处理初期(3 d)对酶活性并未形成

明显影响,当达 6 d 时酶活显著升高,从酶活力随时间的变化上比较,6~12 d 各处理与对照之间差异显著($P < 0.05$)。Na₂CO₃ + SNP 处理 3~6 d, Rubisco 羧化活性分别较 Na₂CO₃ 处理上调 10.13%、34.90%,虽然仍表现为随时间延长酶活下降,但 9~12 d 时增幅已达 49.66%、38.75%,说明 SNP 能显著延缓碱胁迫导致的 Rubisco 羧化活性的丧失,一定程度上修复了 Na₂CO₃ 对 Rubisco 羧化活力的损伤。

对比而言,碱性盐处理显著激活了 Rubisco 的氧化活性,处理达 9~12 d 时,样品的氧化酶活性分别比对照提高了 59.30%、34.43%。而复合处理则仅为 Na₂CO₃ 处理组的 74.82%、81.72% ($P < 0.05$),结果显示,SNP 明显抑制了 Rubisco 氧化活性的上升。

淀粉酶可将叶片中的淀粉水解为小分子的糖,为氮素代谢和器官发育提供碳架和能量。从图 2a 可见,碱胁迫初始,淀粉酶活力激增了 29.41%,此后持续下降,9~12 d 时仅为对照的 40.00%、38.46%;Na₂CO₃ + SNP 处理明显抑制了胁迫导致的淀粉酶活力的下降,6 d 时酶活显著高于对照和 SNP 单独处理,达 Na₂CO₃ 胁迫 1.92 倍 ($P < 0.05$)。处理

后期虽然酶活力已显著低于对照,但与碱胁迫仍差异显著。可溶性糖走势图 2b 在正常生长条件和 SNP 单独处理条件下均表现为随生育进程上升—平稳—上升的相同趋势,SNP 各处理都显著高于对照。碱胁迫下南瓜叶片可溶性糖含量先升后降,处理 6 d 时达到峰值,12 d 后降至对照的 73.11%。可溶性糖是植物体内重要的渗透调节剂,胁迫初期参与了南瓜幼苗对盐害的应激调节。复合 SNP 处理 3~6 d 时,叶片糖含量较胁迫处理下降了 16.18%、13.83%;9~12 d 时,叶片糖含量较胁迫处理增加了 25.43%、44.04% ($P < 0.05$)。

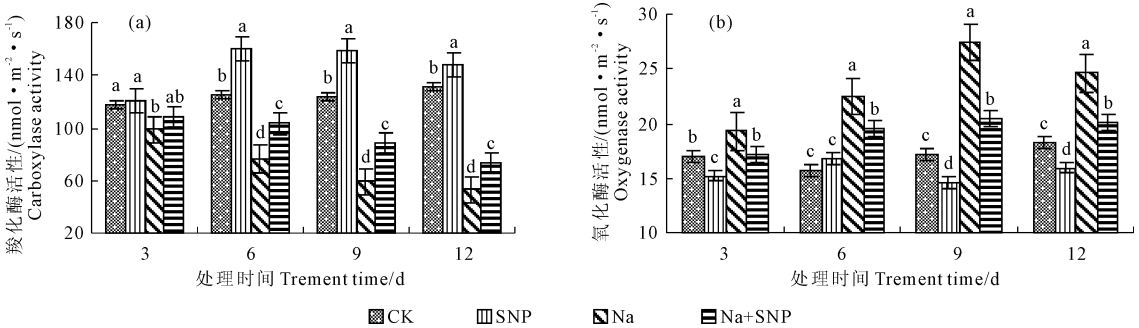


图 1 外源 NO 对 Na₂CO₃ 胁迫下南瓜叶片中 Rubisco 羧化酶(a)和氧化酶(b)酶活性的影响
Fig.1 The interaction between exogenously NO and Na₂CO₃ stress on the activities of ribulose - 1, 5 - bisphosphate carboxylase (a) and oxygenase (b) in pumpkin

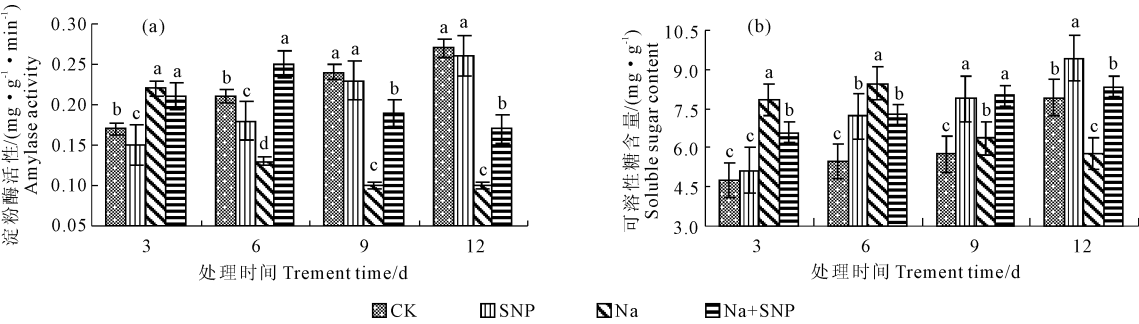


图 2 外源 NO 对 Na₂CO₃ 胁迫下淀粉酶活性(a)和可溶性糖含量(b)的影响

Fig.2 Effects of NO on amylase activity(a) and soluble sugar content(b) in leaves of pumpkin seedlings under Na₂CO₃ stress

比较淀粉酶活力和可溶性糖含量变化可发现,两者之间并无精确的对应关系,即在叶片中可溶性糖的积累并非完全来自于淀粉的水解,可能的途径源于 Rubisco 羧化活性的提高,光合碳代谢的高效进行所致。SNP 在盐害逆境下上调了淀粉酶活力,下调了总糖在叶片中的积累量,促进了碳流由光合碳代谢向氮代谢的转变;抑制淀粉酶活力的下降,维持可溶性总糖含量的稳定效应既为氮同化提供了主要由光合碳代谢中间产物(MAL - OAA)穿梭产生的还原力 NADH 和电子,同时有机氮化物对同化力和 α

- KG 的消耗不断减少了碳同化产物的量,协调了碳氮代谢之间的关系,维持了南瓜幼苗的碳氮平衡。

2.3 外源 NO 对 Na₂CO₃ 胁迫下南瓜幼苗叶片光合色素含量的影响

叶绿素是光合作用中最有效和最重要的色素,其含量在一定水平上影响南瓜苗期同化外源物质和进行光合积累的能力,并最终影响南瓜的产量。Na₂CO₃ 胁迫下,Chl a、Chl b 及 Caro 含量分别比对照降低了 22.34%、19.75%、27.78%,说明渗透胁迫、离子毒害及高 pH 造成了南瓜叶片的光合机构受

损,电子传递和光合磷酸化的偶联机制遭到破坏。非碱胁迫下外加 SNP,一定程度上提高了叶片的叶绿素总量,但与正常生长条件比差异不显著,但显著促进了 Caro 积累并大幅提高了 Chla/b ($P < 0.05$)。复合 SNP 处理,Chl a、Chl b 含量分别提高了 18.87%、13.85% ($P < 0.05$),Chla/b 显著上升。说明膜结构得以修复和稳定。Caro 含量比 Na₂CO₃ 胁迫增加了 46.15%,Caro 既是光合色素,又是内源性的非酶系统 ROS 清除剂,可以发挥淬灭 ROS 的作用。

2.4 外源 NO 对 Na₂CO₃ 胁迫下南瓜幼苗叶片氮代谢相关酶活性的影响

绿色植物氮代谢中,无机氮(NO₃⁻、NH₄⁺)必须转变为有机氮(氨基酸、酰胺等),才能参与蛋白质、

核酸等生物大分子的合成。硝酸还原酶(NADH/NR,EC 1.6.6.1)是存在于细胞质中的黄素蛋白酶,能将 NO₃⁻ 还原为 NO₂⁻,再由叶绿体中的 NiR 将 NO₂⁻ 还原为 NH₄⁺。硝态氮高速同化时,需大量碳架,因此叶片内碳流会由合成糖类流向合成氨基酸^[14],因此 NR 不仅直接调节硝酸盐的还原,是氮代谢的限速酶,酶活性高低在一定程度上体现蛋白质的代谢强度,而且与光合碳代谢紧密相连。Na₂CO₃ 胁迫对叶片 NR 活性产生了明显的抑制作用,处理 12 d 时,酶活性仅为对照的 59.27%,复合 SNP 处理 NR 活性上调了 46.43%,但仍显著低于对照。由表 3 可以看出,SNP 对 NR 活性具有明显的诱导作用,外源添加 SNP 使 NR 被抑制的活力重新激活,比正常生长条件提高了 16.61% ($P < 0.05$)。

表 2 外源 NO 对 Na₂CO₃ 胁迫下南瓜叶片光合色素含量的影响(平均数 ± SE)
Table 2 Effects of NO on photosynthetic pigment content in leaves of pumpkin seedlings under Na₂CO₃ stress

处理 Treatment	叶绿素 a 含量 Chlorophyll a /(mg·g ⁻¹)	叶绿素 b 含量 Chlorophyll b /(mg·g ⁻¹)	叶绿素总量含量 Chl a + b /(mg·g ⁻¹)	叶绿素 a/b	类胡萝卜素含量 Carotene content /(mg·g ⁻¹)
CK	2.73 ± 0.13a	0.81 ± 0.08a	3.54 ± 0.07a	3.370c	0.72 ± 0.02b
SNP	2.82 ± 0.09a	0.79 ± 0.03a	3.61 ± 0.16a	3.570a	0.88 ± 0.03a
Na ₂ CO ₃	2.12 ± 0.15c	0.65 ± 0.01c	2.77 ± 0.19c	3.262d	0.52 ± 0.06c
Na ₂ CO ₃ + SNP	2.52 ± 0.07b	0.74 ± 0.04b	3.26 ± 0.22b	3.405b	0.76 ± 0.05b

表 3 外源 NO 对 Na₂CO₃ 胁迫下南瓜幼苗叶片氮代谢酶活性的影响(平均数 ± SE)
Table 3 Effects of NO on nitrogen metabolism key enzyme activity in leaves of pumpkin seedlings under Na₂CO₃ stress(mean ± SE)

处理 Treatment	硝酸还原酶 Nitrate reductase /(μg·g ⁻¹ ·h ⁻¹)	谷氨酰胺合成酶 Glutamine synthetase /(μmol·g ⁻¹ ·h ⁻¹)	谷氨酸合酶 Glutamate oxoglutarate /(μmol·min ⁻¹ ·g ⁻¹)	谷氨酸脱氢酶 Glutamic dehydrogenase /(μmol·min ⁻¹ ·g ⁻¹)
CK	19.15 ± 0.91b	1.81 ± 0.04a	1.315 ± 0.071b	0.632 ± 0.018c
SNP	22.33 ± 0.12a	1.79 ± 0.21a	1.478 ± 0.046a	0.583 ± 0.051d
Na ₂ CO ₃	11.35 ± 0.34d	1.14 ± 0.11c	0.787 ± 0.013d	1.109 ± 0.026a
Na ₂ CO ₃ + SNP	16.62 ± 0.19c	1.49 ± 0.28b	0.976 ± 0.023c	0.818 ± 0.037b

由 NR 和 NiR 还原生成的铵要进一步通过 GS - GOGAT 循环才能参入有机氮代谢,形成氨基酸进而合成蛋白质及转变成其它次生代谢产物,因此,GS 是氮代谢的枢纽。因 GS 对氨的亲合力更强,故 GS - GOGAT 循环是植物体内氨同化更为普遍和重要的方式^[14]。正常生长条件下 SNP 处理叶片的 GS 活性并未受到明显影响,经 60 mmol·L⁻¹ Na₂CO₃ 处理后,与对照比较,胁迫使叶片的 GS 活性下降了 37.02% ($P < 0.05$)。添加 80 μmol·L⁻¹ 的 SNP,明显逆转了 GS 下降的趋势,使 GS 酶活性提高了 30.70%。GS - GOGAT 的运转使铵处于较低水平,既避免了由铵的积累引起的光合磷酸化解偶联,又避免了对 NR 的产物抑制。GOGAT 是与 GS 偶联的

氨同化途径,催化 Gln 和 α - KG 生成 2 分子的 Glu。60 mmol·L⁻¹ Na₂CO₃ 胁迫 12 d,叶片 GOGAT 活力仅为对照的 58.08%,抑制作用显著 ($P < 0.05$)。SNP 对正常生长条件的幼苗 GOGAT 活力亦呈现促进作用,在处理周期后期酶活性提高幅度达 12.40%。而 Na₂CO₃ + SNP 组 GOGAT 活力比碱害下提高了 24.02%,说明 SNP 能有效缓解 GOGAT 由碱害造成的活力下降,促进碳流的快速运转。

植物组织中有氨积累时,GDH 催化铵的共同受体 α - KG 的还原胺化,当机体碳架不足时,也能使 Glu 脱氢脱氨形成 α - KG,故 GDH 被认为是植物体内氨同化为有机氮化物的初始环节。Na₂CO₃ 处理,GDH 活性不降反升,分别为对照和 SNP 单独处理的

1.75 倍、2.08 倍,复合处理使 GDH 活性得到显著抑制,比碱胁迫下调了 26.24% ($P < 0.05$),但仍显著高于对照。在处理时段内无论是正常生长状态添加 SNP,还是碱胁迫时复合处理,均使 GDH 活性受到不同程度的抑制。推测一方面由于碱胁迫逆境造成苗期光合碳代谢受阻,CO₂ 同化的速率直接影响到氨基酸合成所需碳架和能量的供应,使 Glu 大量氧化脱羧,释放同化力 NADH 和 α -KG,转运至叶绿体供应氨基酸的生物合成;另一方面由于 GDH 与氨的亲合力很低,碱害逆境下 GS、GOGAT 等铵态氮同化酶活力下降,NH₄⁺ 的积累激活了 GDH 活力的提升,发挥了解除氨毒的重要作用。

南瓜叶片可溶性蛋白和游离氨基酸随幼苗生长而积累。从图 3a 可以看出,碱处理初期使蛋白含量增加了 14.65%,6 d 时达到峰值,此时已高于对照 37.73%,9~12 d 则呈显著下降的态势,分别仅为对照的 83.22%、73.43% ($P < 0.05$)。推测碱胁迫诱

导了逆境蛋白的合成使之含量升高,随胁迫强度加大提升了蛋白水解酶的活性,引发了蛋白质的大量降解。SNP 无论是单独还是复合处理,均促进了蛋白质的积累,尤其是复合处理中后期,其含量已达碱胁迫的 1.60 倍以上。碱胁迫初期(3 d),蛋白水解酶活性仅高于对照 8.42% ($P > 0.05$),此后活性大幅上升,处理结束时剂量累加效应更加明显,酶活性达到对照的 1.85 倍(图 3c);游离氨基酸总量由初始处理对照的 1.77 倍升至峰值的 2.08 倍。单纯 SNP 对蛋白水解酶和游离氨基酸总量未形成趋势性影响。复合 SNP 下调了蛋白酶活性,调节效应从 6~12 d 比碱害下分别降低了 13.22%、21.80%、31.76%;由于复合处理抑制了蛋白水解酶活性的升高,使游离氨基酸的积累量显著下降,尤其是处理的中后期(9~12 d),游离氨基酸总量分别仅为碱处理的 75.81%、71.43% ($P < 0.05$)(图 3b)。

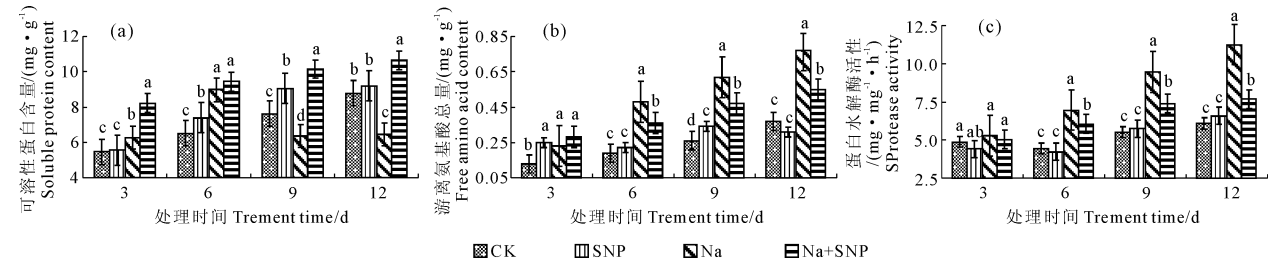


图 3 外源 NO 对 Na₂CO₃ 胁迫下南瓜幼苗叶片可溶性蛋白(a)、游离氨基酸总量(b)及蛋白水解酶活性(c)的影响

Fig.3 Effects of NO on soluble protein(a), free amino acid content(b) and protease activity(c) in leaves of pumpkin seedlings under Na₂CO₃ stress

3 讨论

生长抑制是非盐生植物对盐碱胁迫的直观表现,一定程度可体现植物的受害程度。Na⁺ 盐胁迫时过量的 Na⁺ 可取代细胞膜上的 Ca²⁺,膜结构和功能受损,Na⁺/Ca²⁺ 升高不仅使有机溶质外渗,还会造成对水分和矿质元素的吸收和代谢障碍^[15]。张春霞等^[1]发现,在 Na₂CO₃ 胁迫下,甜高粱种子萌发过程明显受到抑制,发芽率、发芽势及活力指数大幅下降。赵利等^[16]研究了 NaCl、Na₂SO₄、Na₂CO₃ 三种 Na⁺ 盐对南瓜幼苗的生理效应,通过对干物质积累、叶绿素含量、根系活力及膜脂过氧化程度的比较,得出了 Na₂CO₃ 对南瓜危害最大、NaCl 次之、Na₂SO₄ 最小的结论。

一氧化氮(NO)是普遍存在于动植物体内的胞内和胞间信使分子,在植物的种子萌发、生长发育、逆境的胁迫应答及细胞的程序性死亡等过程中发挥重要的调节作用^[17]。有研究发现,外源 NO 可通过

激活抗氧化系统和增强质膜 H⁺ - ATPase 活性,改善 Na⁺、K⁺ 平衡,提高裸燕麦的耐碱性^[18];还通过提高光合色素含量和净光合速率,缓解 NaCl 胁迫对黄瓜幼苗造成的光合碳代谢的抑制^[19];林燕等^[20]的研究证明,外源 NO 还能缓解 NaHCO₃ 胁迫对黄瓜幼苗氮代谢的抑制,提高其耐盐性。对苜蓿的研究也表明,外源 NO 能明显缓解盐胁迫对苜蓿幼苗生长和光合作用的抑制,通过对参与氮代谢关键酶活性的调控,促进了苜蓿幼苗的氮代谢^[21]。植物可通过一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)、硝酸还原酶或亚硝酸还原酶(nitrate/nitrite, NR/NiR)等酶促和非酶途径产生 NO^[22],其对植物碳氮代谢的影响会因植物种类、逆境种类、胁迫强度、处理剂量而不同。本研究表明,60 mmol·L⁻¹ Na₂CO₃ 显著抑制了南瓜幼苗的生长。以 0.5 mmol·L⁻¹ SNP 可产生 2.0 μmol·L⁻¹ NO 计^[23],80 μmol·L⁻¹ 的 SNP(约 0.32 μmol·L⁻¹ NO),明显促进了南瓜幼苗地上尤其是地下部干物质的积累,相对生长量大幅度提高,推测一方面

与 NO 通过抑制 ROS 的积累、提高抗氧化酶活性及降低过氧化产物对膜结构的损伤,维持了膜结构的完整性和流动性,促进了细胞生长有关;另一方面由于 NO 参与了对光合过程的调节,光化学活性的提高促进了南瓜幼苗对养分和水分的吸收^[18]。

碳氮代谢是植物体内两大代谢途径,两者相互依存,紧密联系。光合碳代谢为有机氮代谢提供能量和碳架;有机氮代谢为碳素同化提供必要的酶类并争夺和共用碳素代谢生成的同化力和中间产物^[14]。

催化植物光合碳同化的双功能酶 Rubisco 对环境极为敏感,在非生物胁迫条件下极易被降解^[24]。盐胁迫导致 Rubisco 与叶绿体内膜上的可溶性酶复合物交联和易位,并迅速被降解^[25]。本研究同发现,在 $60 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Na}_2\text{CO}_3$ 胁迫下,南瓜幼苗叶片 Rubisco 羧化活性降低 59.58%,氧化活性升高了 34.43%, $80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 SNP 处理明显延缓了 Rubisco 羧化活性的下降和氧化活性的上升,外源 NO 一定程度上修复了 Na_2CO_3 胁迫造成的损伤,这与熊大斌等脯氨酸对盐胁迫下大麦叶片 Rubisco 酶活性的研究结果一致^[24],说明在植物生长发育以碳代谢为主的早期,NO 的调控不仅为氮代谢提供了充足的碳架,更为光合产物的还原提供了还原力。

AMY 负责将叶绿体中积累的光合产物转化为单糖,一方面直接作为氨基受体形成有机碳氮化合物,另一方面依环境变化间接调节细胞渗透压,维持细胞正常代谢,是碳代谢强度的重要指标^[26]。本试验结果表明, Na_2CO_3 胁迫初期,AMY 活性急剧升高,是南瓜幼苗对逆境胁迫的应激反应,通过加速淀粉水解和转化增加胞内可溶性糖的含量来抵御渗透胁迫,这与钼胁迫对烟草叶片 AMY 活力的影响趋势一致^[26]。外源 NO 上调了 Na_2CO_3 胁迫下的 AMY 活性,由于 CO_2 同化及氮代谢的大部分反应均在叶绿体中进行,碳代谢的中间产物为氨基酸的合成提供了前体。

叶绿体的类囊体膜是对环境最为敏感和脆弱的生物膜, Na_2CO_3 胁迫破坏了南瓜幼叶的叶绿体结构,造成叶片的光合损伤,从而致使叶绿素和类胡萝卜素含量下降。外源 SNP 显著提高了碱性盐环境下的 Chl a、Chl b 及 Caro,说明 NO 对 Na_2CO_3 胁迫下南瓜幼苗光合作用的下降具有缓解作用,这与芦翔等^[27]在燕麦上的研究结果一致。

NR 是硝态氮同化的关键酶,本试验结果显示,由于 Na_2CO_3 环境造成南瓜幼苗功能叶片蛋白质合成受阻,降解加强,故 NR 活力下降。添加外源 NO 显著提高了 NR 活力,这是因为 NO 一定程度修复了

碱性盐所造成的氧化损伤,促进了根系对 NO_3^- 的吸收和转运^[4],从而诱导 NR 活性升高。NR 及 NiR 还原胺化的产物须经 GS/GOGAT 循环来解除氨毒。由于 Na_2CO_3 胁迫严重制约了碳代谢,而 CO_2 同化速率直接影响 NO_3^- 还原的能量和碳架供应,且碳代谢产物必须转化成氨基共同受体 $\alpha\text{-KG}$ 才能供氨基酸合成之用,故导致 GS、GOGAT 活力同步降低,与 NR 表现出协同效应。添加 NO 后缓解了酶活抑制,推测与 NO 促进了南瓜幼苗早期碳代谢,促进了光合积累,协调了库源关系。NR 对硝态氮的持续同化,使碳流从合成糖转向合成氨基酸的方向。由于有机酸尤其是 $\alpha\text{-KG}$ 较糖的氧化水平高,故由糖转化成 $\alpha\text{-KG}$ 可释放出较多的同化力,满足了 GS/GOGAT 循环的需求,实现了碳流的快速运转^[14]。樊怀福^[19]和刘建新等^[7]的研究证实了外源 NO 通过提高叶片净光合速率(P_n)、蒸腾速率(Tr)、叶绿素含量和光能的捕获及转换而使盐害得以缓解,促进了黄瓜和黑麦草的生长。GDH 既催化 Glu 氧化脱氨,又可将 $\alpha\text{-KG}$ 还原胺化。Robinson 等^[28]认为,逆境下 GDH 活性调控与碳的供应同化有关。本试验中, Na_2CO_3 环境导致南瓜叶片 GDH 活性急剧升高,原因为光合碳代谢受阻、碳架不足,此时碳流由氮代谢转而流向碳代谢,Glu 脱氢脱氨形成 $\alpha\text{-KG}$,一是为 TCA 循环补充中间代谢物,二是蛋白水解酶活性的升高加速了蛋白质的降解,造成 NH_4^+ 的快速积累,此时启动了 GDH 途径,而造成 GDH 活性的升高。 $80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 SNP 缓解酶活大幅升高的作用与提高了南瓜幼苗碳同化能力密切相关,由于光合作用加强、光合产物增加,为铵的同化提供了能量和物质,调节了能量和新合成的碳的流向,光合作用可同时向碳代谢及氨基酸合成提供还原力和电子,最大限度地缓解了伤害,满足了碳氮代谢的同时需要。

氨基酸的合成既取决于氨的生成和 $\alpha\text{-KG}$ 的碳架供应,同时又与蛋白质的降解密切相关。前者受 NR 和 GS 活性调节,而蛋白质的积累程度则取决于其合成和降解的相对强弱。 $60 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Na}_2\text{CO}_3$ 胁迫处理,南瓜叶片可溶性蛋白首先表现为激增之后剧降,可能为在相对短时间内诱导南瓜叶片产生和积累了逆境蛋白,如渗透调蛋白(OSM)、水通道蛋白等,这在番茄、甜菜、豌豆等植物中已被证明 OSM 的存在具有普遍性^[15]。随胁迫强度加大,一是光合碳代谢受阻,光合链及光合代谢产物提供的还原剂匮乏,降低了蛋白质的合成速率,导致可溶性蛋白含量大幅下降;二是蛋白水解酶活性的上调也加速了原有蛋白质的降解,从而使游离氨基酸总量上升;三是

高 pH 的蛋白质变性作用。外源 SNP 复合处理,一定程度上逆转了可溶性蛋白的下降和氨基酸的积累,使碳流向氮代谢方向运转,促进了南瓜幼苗的早期发育和形态建成,提高了幼苗的耐碱性,这与刘建新^[18]、郑春芳等^[29]外源 NO 对裸燕麦 (*Avena nuda*) 及小麦在 NaCl 及 NaHCO₃ 胁迫下可溶性蛋白积累的影响研究结果一致,但游离氨基酸含量的变化趋势则不相同。

综上所述,碳氮代谢是植物体内同时进行、相互依存的生化过程,碳氮代谢失调是南瓜幼苗受到碱胁迫的重要表现。60 mmol·L⁻¹ Na₂CO₃ 致使南瓜幼苗光合产物的合成、积累受到严重影响,光合碳同化提供的电子不足,使处于碳氮代谢偶联节点的 NR 不能及时还原 NO₃⁻→NH₄⁺, GS、GOGAT 的胺化过程受阻。80 μmol·L⁻¹ 的 SNP 增强了 Na₂CO₃ 胁迫下的南瓜幼苗的光合作用,使光合碳代谢中合成的酮酸转化为氨基酸。通过提高氮代谢相关酶 NR、GS、GOGAT 活性,加快了胺化过程,减少了氨基酸的积累和 NH₄⁺ 的细胞毒性。可溶性糖、可溶性蛋白含量的提高为南瓜苗期发育中的物质和能量代谢及形态建成提供了还原力和 ATP,协调了 CO₂ 同化和 NO₃⁻ 还原之间因竞争中间代谢物而产生的相互抑制。光合碳代谢的促进为氮代谢——氨基酸、蛋白质的合成提供了充足的原料,提高了南瓜幼苗的耐碱性,为在实际生产中南瓜的抗盐碱栽培提供可行性途径。

参 考 文 献:

[1] 张春霞,边鸣镝,于 慧,等.碳酸钠胁迫对甜高粱种子萌发和幼苗期生理特性的影响[J].吉林农业大学学报,2011,33(2):134-138,143.

[2] 杜长霞,邵俏赛,樊怀福,等.外源 NO 对 Ca(NO₃)₂ 胁迫下黄瓜幼苗生长和抗氧化系统的影响[J].核农学报,2013,27(6):854-860.

[3] 吴雪霞,陈建林,查丁石,等.外源一氧化氮对 NaCl 胁迫下番茄幼苗活性氧代谢的影响[J].植物营养与肥料学报,2009,15(2):422-428.

[4] 陈 明,沈文飏,阮海华,等.一氧化氮对盐胁迫下小麦幼苗根生长和氧化损伤的影响[J].植物生理和分子生物学报,2004,30(5):569-576.

[5] 刘文瑜,杨宏伟,魏小红,等.外源 NO 调控盐胁迫下藜藜苜蓿种子萌发生理特性及抗氧化酶的研究[J].草业学报,2015,24(2):85-95.

[6] 肖 强,陈 娟,吴飞华,等.外源 NO 供体硝普钠(SNP)对盐胁迫下水稻幼苗中叶绿素和游离脯氨酸含量及抗氧化酶的影响[J].作物学报,2008,34(10):1849-1853.

[7] 刘建新,王金成,王 鑫,等.外源 NO 对 NaHCO₃ 胁迫下黑麦草幼苗光合生理响应的调节[J].生态学报,2012,32(11):3460-3466.

[8] 张志良,瞿伟菁,李小方.植物生理学实验指导[M].第 4 版.北京:高等教育出版社,2009:76-79.

[9] 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,2000:169-172.

[10] 汤章诚.现代植物生理学实验指导[M].北京:科学出版社,2004.

[11] 赵全志,陈静蕊,刘 辉,等.水稻氮素同化关键酶活性与叶色变化的关系[J].中国农业科学,2008,41(9):2607-2616.

[12] Majerowicz N, Kerbauy G B, Nievola C C, et al. Growth and nitrogen metabolism of *Catasetum fimbriatum* (Orchidaceae) grown with different nitrogen sources[J]. Environmental and Experimental Botany, 2000,44:195-206.

[13] 张志刚,芮 琪,徐朗莱.小麦叶片老化期间的内肽酶与 H₂O₂ 的关系[J].植物学报,2001,43(2):127-131.

[14] 宋建民,田纪春,赵世杰.植物光合碳和氮代谢之间的关系及其调节[J].植物生理学通讯,1998,34(3):230-238.

[15] 杨晓慧,蒋卫杰,魏 珉,等.植物对盐胁迫的反应及其抗盐机理研究进展[J].山东农业大学学报(自然科学版),2006,37(2):302-305.

[16] 赵 利,陈贵林,李卫欣,等.NaCl、Na₂SO₄ 和 Na₂CO₃ 对南瓜幼苗的生理胁迫效应[J].河北农业大学学报,2006,29(6):21-24.

[17] Qiao W H, Fan L M. Nitric oxide signaling in plant responses to abiotic stresses[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2008,50:1238-1246.

[18] 刘建新,王金成,王瑞娟,等.外源一氧化氮提高裸燕麦幼苗的耐碱性[J].草业学报,2015,24(8):110-117.

[19] 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、活性氧代谢和光合作用的影响[J].生态学报,2007,27(2):546-553.

[20] 林 燕,洪艳艳,史庆华,等.SNP 对 NaHCO₃ 胁迫下黄瓜幼苗生长及氮代谢酶活性的影响[J].植物营养与肥料学报,2010,16(5):1294-1298.

[21] 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[J].应用生态学报,2012,23(11):3003-3008.

[22] Palavan – Unsal N, Arisan D. Nitric oxide signalling in plants[J]. Botanical Review, 2009,75:203-229.

[23] Delledonne M, Xia Y, Dixon R A, et al. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance[J]. Nature, 1998,394:585-588.

[24] 熊大斌,曹玲珑,李冬兵,等.脯氨酸对盐胁迫条件下大麦叶片 Rubisco 酶活性的影响[J].河南农业大学学报,2015,49(4):443-449.

[25] Mehta R A, Fawcett T W, Porath D, et al. Oxidative stress causes rapid membrane translocation and in vivo degradation of ribulose – 1, 5 – biphosphate carboxylase/oxygenase[J]. J Biol Chem, 1992,267(4):2810-2816.

[26] 武 丽,张西仲,唐兴贵,等.钼胁迫对烟草含钼酶和碳氮代谢关键酶的影响[J].核农学报,2015,29(12):2385-2393.

[27] 芦 翔,石卫东,王宜伦,等.外源 NO 对 NaCl 胁迫下燕麦幼苗抗氧化酶活性和生长的影响[J].草业科学,2011,12(28):2150-2156.

[28] Robinson S A, Stewart G R, Phillips R. Regulation glutamate dehydrogenase activity in relation to carbon limitation and protein catabolism in carrot cell suspension culture[J]. Plant Physiology, 1992,98:1190-1195.

[29] 郑春芳,姜 东,戴廷波,等.外源一氧化氮供体硝普钠浸种对盐胁迫下小麦幼苗碳氮代谢及抗氧化系统的影响[J].生态学报,2010,30(5):1174-1183.