

外源NO供体硝普钠(SNP)对铜胁迫下番茄幼苗生理生化指标的影响

张敏, 姜春辉, 崔秀敏*

山东农业大学资源与环境学院, 土肥资源高效利用国家工程实验室, 山东泰安271018

摘要: 采用营养液培养番茄, 通过检测不同铜处理下番茄植物螯合肽、根系分泌物、氨基酸、激素含量的变化, 研究外源NO (SNP为供体)缓解铜胁迫的生理生化机制。结果表明, 与铜处理相比, 外施100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SNP能显著提高番茄幼苗根系和叶片植物螯合肽、叶片氨基酸、根系分泌物中糖(果糖、葡萄糖和蔗糖)及根系ABA和叶片IAA、 GA_3 、ZR的含量; 显著降低根系氨基酸、根系分泌物中有机酸(草酸、苹果酸、柠檬酸和琥珀酸)及叶片ABA和根系IAA、 GA_3 、ZR的含量。添加NO清除剂牛血红蛋白后, 能显著消除NO的缓解效果。表明外源NO可以诱导番茄幼苗根系和叶片抗性物质的分泌, 增强根系与叶片组织对过多铜的螯合能力, 从而减缓铜胁迫对番茄幼苗的抑制作用。

关键词: 番茄幼苗; 一氧化氮; 铜胁迫; 植物螯合肽; 根系分泌物; 氨基酸; 激素

Effects of Exogenous Nitric Oxide Donor SNP on Physiological and Biochemical Indexes in Tomato Seedlings under Copper Stress

ZHANG Min, JIANG Chun-Hui, CUI Xiu-Min*

National Engineering Laboratory for Efficient Utilization of Soil and Fertilizer Resources, College of Resources and Environment, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China

Abstract: Through the tomato culture with nutrient solution in greenhouse, the sodium nitroprusside (SNP) was used as NO donor to investigate the physiological and biochemical mechanism of exogenous NO alleviate copper stress. The changes in contents of phytochelatin (PCs), root exudates, amino acids and hormones of tomato seedlings with different Cu treatments were detected. The results showed that addition of 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SNP could significantly increase the PCs contents in roots and leaves, amino acids contents in leaves, exudates of sugars contents (fructose, glucose and sucrose) in roots, and the contents of ABA in roots and IAA, GA_3 , ZR in leaves. Besides, the contents of amino acids, exudates of organic acid (oxalic acid, malic acid, citric acid and amber acid), IAA, GA_3 , ZR in roots, and ABA contents in leaves were reduced. NO scavenger Hb could significantly eliminate the alleviating effects of SNP. These results suggested exogenous NO could induced the secretion of resistant material and the chelating capacity in roots and leaves to alleviate the inhibitory effect on tomato seedlings under Cu stress.

Key words: tomato seedlings; nitric oxide; copper stress; phytochelatin; root exudates; amino acid; hormone

铜既是植物生长发育必需的微量营养元素, 参与着各种生命活动, 同时, 又是环境污染的重金属元素, 铜含量过高会对植物造成危害。当植物吸收并积累铜超过一定量时, 可引起叶绿素含量下降, 活性氧产生速率上升, 电解质渗透率及游离脯氨酸含量升高等, 严重时会造成机体死亡(Cui等2010; 陈玉胜2012)。

一氧化氮(nitric oxide, NO)是广泛分布于生物体内的小分子信号物质。近年发现NO广泛参与植物对外界胁迫应答等多种生理过程。NO能够调节植物的生长和发育(Beligni和Lamattina 2001; 敬岩等2007), 参与植物激素的调控(桑建荣2007; 张艳艳2007), 提高植物对镉毒害、盐害、缺铁的抗性

或耐性(Laspina等2005; Zhao等2007; Graziano和Lamattina 2007)。重金属胁迫下, 植物体内会产生大量活性氧, 引起膜脂过氧化、破坏蛋白质、核酸等生物大分子, 抑制植物生长, 而NO作为信号分子响应胁迫条件而产生, 极易透过细胞膜进行扩散, 清除胁迫条件下产生的过量活性氧, 使植物免受其害(张艳艳等2012)。研究表明, 外源NO可以缓解番茄铜胁迫, 但铜的含量和累积并未降低(张义凯2009), 推测这些累积的铜在组织细胞中转化

收稿 2012-11-15 修定 2013-01-24
资助 国家自然科学基金(31201619)和泰安市科技发展计划(32606)。

* 通讯作者(E-mail: xiumincui@sdau.edu.cn; Tel: 0538-8241546)。

成化合态或络合态的形式, 以降低铜的有效性和生物毒性, 但究竟是哪种代谢途径参与了铜胁迫的缓解效应还不清楚。

本文以番茄为试验材料, 采用营养液培养, 研究外源NO对铜胁迫下番茄幼苗植物螯合态、根系分泌物、氨基酸和激素等代谢产物的影响, 探讨外源NO缓解番茄幼苗铜胁迫的作用机理。

材料与方法

1 供试材料

供试番茄(*Solanum lycopersicum* L.)为‘改良毛粉802F1’。Hoagland改良营养液组成: $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、 KNO_3 、 NH_4NO_3 、 KH_2PO_4 、 MgSO_4 、微量元素, 以上试剂均为分析纯, 用蒸馏水配制适宜浓度待用。NO和 Cu^{2+} 的供体及适宜浓度已由预备试验确定: CuCl_2 提供 Cu^{2+} , 硝普钠($[\text{Na}_2\text{Fe}(\text{CN})_5]\text{NO}$, SNP, 购自Sigma公司)提供NO, 先用蒸馏水配成 $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的母液, 4°C 避光保存, 用时按所需浓度稀释。牛血红蛋白(Hb, 购自Sigma公司)为NO的清除剂。

2 试验设计

试验在山东农业大学温室内进行。种子经 55°C 温汤浸种消毒15 min, 然后在润湿的吸水纸上 26°C 催芽。待种子露白后, 播于洗净的细砂中, 出苗后用1/4 Hoagland营养液浇灌。当幼苗具有3~4片真叶时, 挑选生长一致的植株洗净根部细砂后, 移栽于5 L塑料盆中, 用厚度为3 cm的泡沫塑料板做成楔形盖子, 覆盖在塑料盆顶部。每盆栽5株, 用1/2 Hoagland营养液进行栽培。1周后换成完全营养液, 此后每3天更换一次营养液。营养液栽培期间用电动气泵24 h连续通气。

植株具有5~6片真叶时, 对番茄幼苗进行胁迫处理。试验设置4个处理: (1)对照, Hoagland完全营养液; (2) $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{CuCl}_2$; (3) $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{CuCl}_2 + 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{SNP}$; (4) $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{CuCl}_2 + 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{SNP} + 0.1\% \text{Hb}$, 分别用对照、Cu、Cu+SNP和Cu+SNP+Hb表示, 3次重复, 在温室内随机排列。处理期间每隔2 d更换营养液, 用低浓度KOH或HCl调节至pH (5 ± 0.2)。温室内光照(光照强度为 $320 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)约12 h, 白天最高温度 32°C , 夜间最低温度 15°C 。处理8 d后, 取相同节位的

叶片用于分析测定。

3 主要测定项目及方法

3.1 植物螯合肽(phytochelatin, PCs)测定

将收获后的植株置于预冷的冰盘上, 快速分解为根系、茎、叶柄和叶片四部分, 各称取鲜样组织1.000 g, 采用差减法(孙琴等2004)测定植物组织内PCs的诱导合成量, 即 $\text{PCs-SH} = \text{非蛋白质态巯基总量(TNP-SH)} - \text{谷胱甘肽含量(GSH)}$ 。非蛋白质态巯基总量(TNP-SH)的测定采用比色法(Keltjens和Beusichem 1998)。谷胱甘肽(glutathione, GSH)的测定采用比色法(赵旭东等2000)。

3.2 根系分泌物的收集与测定

参照Rengel等(1998)的方法收集根系分泌物, 用高效液相色谱仪检测有机酸和糖含量。

3.3 根系和叶片氨基酸含量测定

植株收获后先用自来水洗净, 再用蒸馏水冲洗2遍。分别称取根、叶各1.000 g鲜样用于氨基酸的测定。氨基酸自动分析仪为Amersham公司生产的Biochrom 3.0。

3.4 幼苗中激素含量测定

根据何钟佩(1993)方法并略作修改。胁迫处理1、2、3、5和7 d后, 称取番茄幼苗根和叶1.000 g, 加入4 mL提取液(80%甲醇, 内含 $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ BHT)冰浴下研磨成匀浆, 放入 4°C 冰箱中提取12 h。收集提取液并在 $10\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 下离心20 min, 收集上清液转移至另一离心管中。在剩余的沉淀中再加入2 mL提取液, 4°C 冰箱中再提取1 h, 离心, 收集上清液, 合并2次上清液并记录体积, 残渣弃去。收集的上清液用于间接酶联免疫测定脱落酸(abscisic acid, ABA)、生长素(auxins, IAA)、赤霉素(gibberellic acid, GA_3)和玉米素核苷(zeatin riboside, ZR)。试剂盒由中国农业大学农学与生物技术学院化学控制实验室提供。

4 数据处理

采用Microsoft Excel软件对数据进行处理及绘图, 采用DPS统计软件对平均数用LSD极差法进行多重比较。

实验结果

1 外源NO对铜胁迫下番茄幼苗植物螯合肽的影响

如图1所示, 与对照相比, $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的Cu胁

迫使番茄幼苗根系、茎、叶柄和叶片PCs的含量分别提高15.2%、14.7%、18.3%和10.7%，差异达显著水平。而外施100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的SNP能促进Cu胁迫下PCs的合成，番茄幼苗根系和叶片中PCs含量分别比Cu胁迫提高11.3%和19.8%，差异达显著水平，而茎和叶柄中PCs的含量无显著变化。Cu+SNP+Hb处理显著消除根系和叶片中SNP对PCs合成的激发效应。这说明铜胁迫促进了番茄幼苗各器官PCs的生成，外源NO加剧根系和叶片PCs的合成，从而提高番茄幼苗对过多铜的整合能力，降低铜的生物毒性。

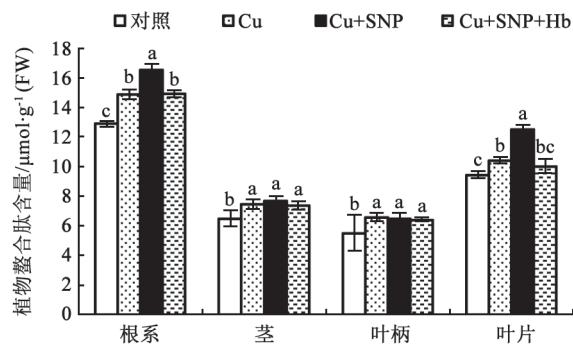


图1 外源NO对铜胁迫下番茄幼苗植物螯合肽的影响

Fig.1 Effect of exogenous NO on phytochelatin in tomato seedlings under copper stress

不同字母表示处理间差异显著($P < 0.05$)。下图同此。

2 外源NO对铜胁迫下番茄幼苗根系分泌物的影响

2.1 外源NO对铜胁迫下番茄幼苗根系分泌物中有机酸的种类及含量的影响

从表1可知，对照的番茄幼苗根系可检测出7种有机酸，即草酸、酒石酸、苹果酸、乳酸、乙酸、柠檬酸和琥珀酸。其中乙酸含量最多，草酸最少，低分子量有机酸的总分泌量为210.20~585.30 μg 。铜胁迫下有机酸总量最高，比对照处理提高了50.6%，其中草酸、苹果酸、柠檬酸和琥珀酸含量急剧上升，分别比对照提高12.2倍、0.34倍、1.75倍和2.59倍，乙酸和乳酸含量分别降低33.6%、25.3%。与铜胁迫相比，外施100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SNP使有机酸总量降低64.1%，其中草酸、苹果酸、柠檬酸和琥珀酸的含量分别降低66.1%、79.6%、71.3%、58.6%，根系分泌物中检测到酒石酸。Cu+SNP+Hb处理下，有机酸的种类也发生了显著变化，未检测到苹果酸和柠檬酸，而草酸、乳酸、乙酸和琥珀酸含量较高，成为优势种类。

2.2 外源NO对铜胁迫下番茄幼苗根系分泌物中糖的种类及含量的影响

从表2可知，番茄幼苗根系分泌物中可以检测出的糖有3种，即果糖、葡萄糖和蔗糖，低分子量糖的总分泌量为25.4~54.5 mg 。与对照相比，铜胁迫处理显著提高番茄幼苗根系分泌物中果糖和蔗

表1 外源NO对铜胁迫下番茄幼苗根系分泌物中有机酸的种类及含量的影响

Table 1 Effect of exogenous NO on organic acids varieties and contents in root exudates of tomato seedlings under copper stress

处理	有机酸含量/ μg							总量
	草酸	酒石酸	苹果酸	乳酸	乙酸	柠檬酸	琥珀酸	
对照	9.20±0.20 ^d	25.24±2.47 ^a	54.75±9.21 ^b	90.67±7.58 ^a	138.40±15.80 ^a	26.56±3.94 ^b	43.84±15.20 ^c	388.60
Cu	121.60±5.21 ^a	—	73.11±6.83 ^a	67.74±10.40 ^b	92.18±4.39 ^b	73.12±9.43 ^a	157.50±4.29 ^a	585.30
Cu+SNP	41.26±6.73 ^c	18.01±3.87 ^b	14.95±1.39 ^c	3.61±0.75 ^d	56.94±8.23 ^c	21.02±6.61 ^b	65.28±8.19 ^b	210.20
Cu+SNP+Hb	73.64±8.02 ^b	7.18±1.29 ^c	—	17.45±5.97 ^c	67.76±11.00 ^c	—	74.48±3.85 ^b	251.30

同列数值后不同小写字母表示差异达5%显著水平；—：未检测出。下表同此。

表2 外源NO对铜胁迫下番茄幼苗根系分泌物中糖的种类及含量的影响

Table 2 Effect of exogenous NO on sugar varieties and contents in root exudates of tomato seedlings under copper stress

处理	果糖含量/ mg	葡萄糖含量/ mg	蔗糖含量/ mg	总糖含量/ mg
对照	6.33±0.92 ^d	13.44±1.13 ^b	5.60±0.30 ^d	25.36±0.35 ^c
Cu	8.77±0.51 ^c	10.98±0.47 ^c	11.97±0.57 ^c	31.72±0.46 ^b
Cu+SNP	13.14±0.41 ^a	15.99±0.15 ^a	25.41±2.18 ^a	54.54±2.44 ^a
Cu+SNP+Hb	9.96±0.15 ^b	7.47±0.61 ^d	14.59±0.66 ^b	32.02±1.38 ^b

糖的含量, 分别提高38.6%和113.7%, 而葡萄糖含量显著降低18.3%。与铜胁迫处理相比, 外施 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SNP使番茄幼苗根系分泌物中果糖、葡萄糖和蔗糖的含量显著提高49.9%、45.6%和112.3%。Cu+SNP+Hb处理显著消除SNP的缓解效果。

3 外源NO对铜胁迫下番茄幼苗根系和叶片氨基酸含量的影响

3.1 外源NO对铜胁迫下番茄幼苗根系氨基酸含量的影响

番茄幼苗各处理中, 天冬氨酸、谷氨酸和缬氨酸为优势氨基酸, 占氨基酸总量的31.8%~39.2% (表3)。铜胁迫处理中氨基酸总量最高, 比对照处理提高了101.4%, 其中, 天冬氨酸、谷氨酸和缬氨酸比对照处理提高68.4%、87.5%和83.9%。与Cu胁迫处理相比, Cu+SNP使氨基酸总量降低了23.4%, 其中, 天冬氨酸、谷氨酸和缬氨酸分别降低1.3%、0.4%和19.9%。Cu+SNP+Hb处理消除SNP对Cu胁迫的缓解效果, 氨基酸总量比Cu+SNP处理提高25.9%, 天冬氨酸、谷氨酸和缬氨酸分别提高19.0%、12.0%和26.3%。

3.2 外源NO对铜胁迫下番茄幼苗叶片氨基酸含量的影响

番茄幼苗各处理中, 叶片天冬氨酸、谷氨酸、缬氨酸和异亮氨酸始终为优势氨基酸, 占氨基酸总量的38.2%~41.8% (表4)。与对照处理相比, Cu胁迫处理使氨基酸总量提高8.6%, 其中, 谷氨酸、缬氨酸和异亮氨酸比对照处理提高3.2%、9.2%和13.1%, 而天冬氨酸降低4.1%; Cu+SNP处理氨基酸总量比Cu胁迫处理提高38.6%, 其中, 天冬氨酸、谷氨酸、缬氨酸和异亮氨酸分别提高28.1%、25.5%、41.3%和28.1%; Cu+SNP+Hb处理后消除SNP对Cu胁迫的缓解效果, 氨基酸总量比Cu+SNP处理降低13.6%, 而天冬氨酸、谷氨酸、缬氨酸和异亮氨酸分别降低5.6%、2.0%、23.7%和12.5%。

4 外源NO对铜胁迫下番茄幼苗激素含量的影响

4.1 外源NO对铜胁迫下番茄幼苗根系和叶片ABA含量的影响

由图2-A可知, 对照处理番茄幼苗根系ABA含量变化相对平稳。Cu胁迫下的ABA含量开始急剧升高, 处理2 d后, 根系ABA含量出现最高峰[272.19

$\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW)], 然后平缓下降。而Cu+SNP处理使番茄幼苗根系ABA含量在第1天急剧升高, 然后渐变平稳。Cu+SNP+Hb处理延缓Cu+SNP处理的诱导效果, 与Cu胁迫下ABA含量的变化渐趋一致。

对照处理番茄幼苗叶片ABA含量变幅较小, 处理3 d后, 各处理叶片ABA开始出现明显差异(图2-B)。Cu和Cu+SNP+Hb处理的叶片ABA在第7天开始显著升高, 而Cu+SNP处理叶片ABA含量开始趋于下降, 同对照类似。Cu+SNP+Hb处理延缓Cu+SNP处理的诱导效果, 使Cu和Cu+SNP+Hb处理ABA含量在7 d后的变化趋势基本一致。

4.2 外源NO对铜胁迫下番茄幼苗根系和叶片IAA含量的影响

由图3-A可知, 对照处理番茄幼苗根系IAA含量变化平稳。Cu胁迫下番茄幼苗根系IAA含量在第5天开始有显著升高的趋势。Cu+SNP处理使番茄幼苗根系IAA含量几乎恢复到对照水平。Cu+SNP+Hb处理延缓Cu+SNP处理的诱导效果, 同Cu胁迫下IAA含量的变化趋于一致。

由图3-B可见, 对照处理的番茄幼苗叶片IAA含量变化剧烈(先降低后升高再降低), 处理1 d后IAA含量降到最低[$136.6 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW)], 处理第5天上升到最高[$268.8 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW)]。Cu胁迫下番茄幼苗叶片IAA含量先降低后平稳上升, 处理第2天IAA含量降到最低[$130.8 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW)], 处理第7天最高[$304.6 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW)]。Cu+SNP处理使番茄幼苗叶片IAA含量恢复到对照的变化趋势。Cu+SNP+Hb处理延缓Cu+SNP处理的诱导效果, 使Cu和Cu+SNP+Hb处理IAA含量在5 d内的变化趋势基本一致。

4.3 外源NO对铜胁迫下番茄幼苗根系和叶片GA₃含量的影响

由图4-A可知, 对照处理番茄幼苗根系GA₃含量在第2天开始迅速升高。Cu胁迫下番茄幼苗根系GA₃含量在第2天升高, 然后下降。Cu+SNP处理使番茄幼苗根系GA₃含量在前3 d显著低于Cu胁迫处理, 在第5天开始迅速升高。Cu+SNP+Hb处理延缓Cu+SNP处理的诱导效果。

对照处理番茄幼苗叶片GA₃含量先降低后升高再降低, 在第1天降至最低[$12.43 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW)], 在第5天达到最大值[$36.16 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW)] (图4-B)。Cu胁迫下番茄幼苗叶片GA₃含量先降低后升高然后开始变得平

表3 外源NO对铜胁迫下番茄幼苗根系氨基酸含量的影响

Table 3 Effect of exogenous NO on amino acid contents in roots of tomato seedlings under copper stress

处理	天冬氨酸		苏氨酸		丝氨酸		谷氨酸		脯氨酸		甘氨酸		丙氨酸		半胱氨酸		缬氨酸	
	含量/mg·g ⁻¹ (FW)	比例/%	含量/mg·g ⁻¹ (FW)	比例/%	含量/mg·g ⁻¹ (FW)	比例/%	含量/mg·g ⁻¹ (FW)	比例/%	含量/mg·g ⁻¹ (FW)	比例/%	含量/mg·g ⁻¹ (FW)	比例/%	含量/mg·g ⁻¹ (FW)	比例/%	含量/mg·g ⁻¹ (FW)	比例/%	含量/mg·g ⁻¹ (FW)	比例/%
对照	9.50	9.91	3.20	3.34	3.00	3.13	15.20	15.80	—	—	4.40	4.59	4.90	5.11	14.20	14.80	9.30	9.70
Cu	16.00	8.29	5.90	3.06	7.20	3.73	28.50	14.70	10.20	5.28	7.50	3.89	9.90	5.13	15.70	8.13	17.10	8.86
Cu+SNP	15.80	10.70	4.10	2.77	3.90	2.63	28.40	19.20	6.50	4.39	6.30	4.25	7.70	5.20	9.70	6.55	13.70	9.25
Cu+SNP+Hb	18.80	10.10	5.60	3.00	4.90	2.63	31.80	17.10	1.30	0.70	7.80	4.18	11.80	6.33	12.30	6.60	17.30	9.28
	总计																	
处理	含量/mg·g ⁻¹ (FW)	比例/%	含量/mg·g ⁻¹ (FW)	比例/%	含量/mg·g ⁻¹ (FW)	比例/%	含量/mg·g ⁻¹ (FW)	比例/%	含量/mg·g ⁻¹ (FW)	比例/%	含量/mg·g ⁻¹ (FW)	比例/%	含量/mg·g ⁻¹ (FW)	比例/%	含量/mg·g ⁻¹ (FW)	比例/%	含量/mg·g ⁻¹ (FW)	比例/%
对照	4.60	4.80	8.00	8.34	2.80	2.92	—	—	5.10	5.32	1.70	1.77	5.90	6.15	4.10	4.28	95.90	100.00
Cu	12.70	6.58	13.50	6.99	18.60	9.64	5.00	2.59	8.50	4.40	3.20	1.66	8.20	4.25	5.40	2.80	193.10	100.00
Cu+SNP	4.10	2.77	10.10	6.82	15.60	10.50	1.10	0.74	7.30	4.93	2.30	1.55	6.50	4.39	4.90	3.31	148.00	100.00
Cu+SNP+Hb	10.20	5.47	11.50	6.17	21.10	11.30	3.80	2.04	9.50	5.10	3.60	1.93	8.90	4.77	6.20	3.33	186.40	100.00

表4 外源NO对铜胁迫下番茄幼苗叶片氨基酸含量的影响

Table 4 Effect of exogenous NO on amino acid contents in leaves of tomato seedlings under copper stress

处理	天冬氨酸		苏氨酸		丝氨酸		谷氨酸		脯氨酸		甘氨酸		丙氨酸		半胱氨酸		缬氨酸	
	含量/mg·g ⁻¹ (FW)	比例/%	含量/mg·g ⁻¹ (FW)	比例/%	含量/mg·g ⁻¹ (FW)	比例/%	含量/mg·g ⁻¹ (FW)	比例/%	含量/mg·g ⁻¹ (FW)	比例/%	含量/mg·g ⁻¹ (FW)	比例/%	含量/mg·g ⁻¹ (FW)	比例/%	含量/mg·g ⁻¹ (FW)	比例/%	含量/mg·g ⁻¹ (FW)	比例/%
对照	14.50	9.28	5.80	3.71	4.80	3.07	19.00	12.20	3.70	2.37	7.60	4.87	9.50	6.08	10.00	6.40	14.20	9.09
Cu	13.90	8.22	5.90	3.49	4.90	2.90	19.60	11.20	8.60	5.09	8.50	5.03	10.80	6.39	10.10	5.92	15.50	9.17
Cu+SNP	17.80	7.57	7.80	3.32	6.30	2.68	24.60	10.50	14.00	5.95	12.20	5.19	15.10	6.42	17.00	7.23	21.90	9.31
Cu+SNP+Hb	16.80	8.26	7.50	3.69	7.10	3.49	24.10	11.80	17.60	8.66	9.60	4.72	12.40	6.10	8.20	4.03	16.70	8.21
	总计																	
处理	含量/mg·g ⁻¹ (FW)	比例/%	含量/mg·g ⁻¹ (FW)	比例/%	含量/mg·g ⁻¹ (FW)	比例/%	含量/mg·g ⁻¹ (FW)	比例/%	含量/mg·g ⁻¹ (FW)	比例/%	含量/mg·g ⁻¹ (FW)	比例/%	含量/mg·g ⁻¹ (FW)	比例/%	含量/mg·g ⁻¹ (FW)	比例/%	含量/mg·g ⁻¹ (FW)	比例/%
对照	3.70	2.37	10.10	6.47	17.60	11.30	6.90	4.42	8.70	5.57	3.50	2.24	8.70	5.57	7.90	5.06	156.20	100.00
Cu	4.10	2.43	12.00	7.10	19.90	11.80	7.80	4.62	9.60	5.68	3.30	1.95	8.40	4.97	6.80	4.02	169.70	100.00
Cu+SNP	5.90	2.51	16.10	6.85	25.50	10.80	11.20	4.76	12.40	5.27	5.00	2.13	11.60	4.93	10.80	4.59	235.20	100.00
Cu+SNP+Hb	4.20	2.07	13.40	6.59	22.30	10.90	9.30	4.57	11.90	5.85	3.50	1.72	9.50	4.67	9.20	4.53	203.30	100.00

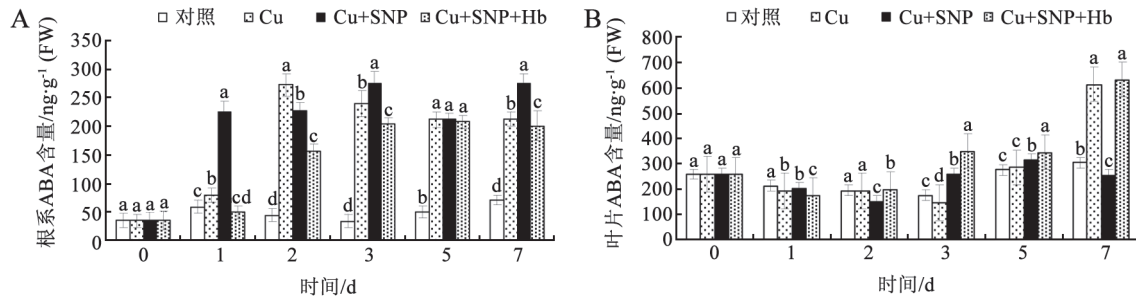


图2 外源NO对铜胁迫下番茄幼苗根系和叶片ABA含量的影响

Fig.2 Effect of exogenous NO on the contents of ABA in roots and leaves of tomato seedlings under copper stress

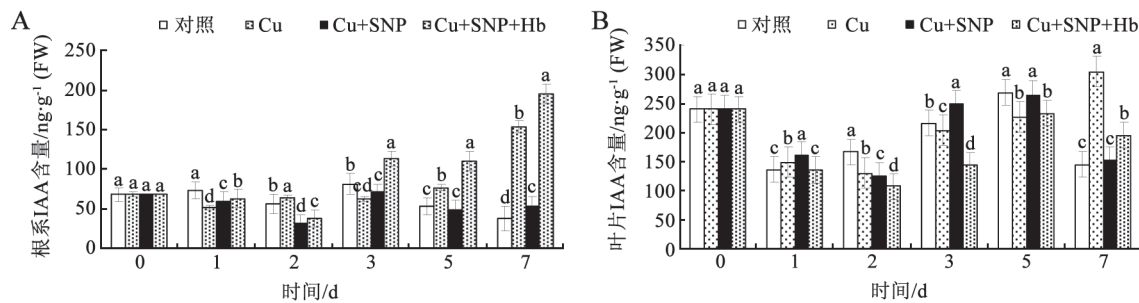
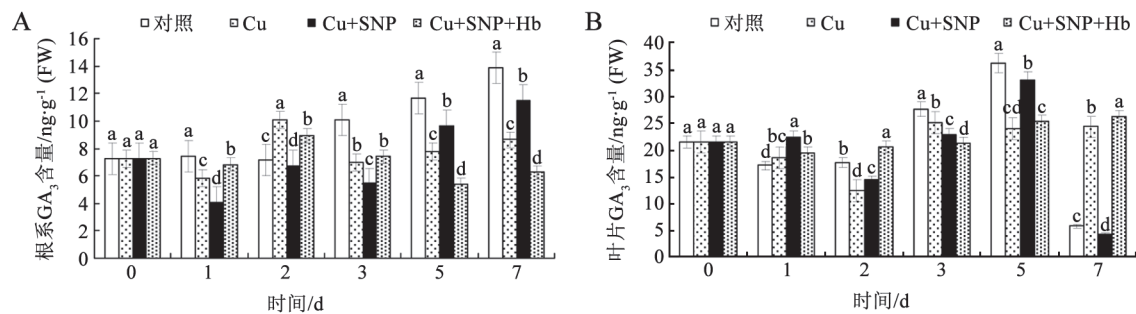


图3 外源NO对铜胁迫下番茄幼苗根系和叶片IAA含量的影响

Fig.3 Effect of exogenous NO on the contents of IAA in roots and leaves of tomato seedlings under copper stress

图4 外源NO对铜胁迫下番茄幼苗根系和叶片GA₃含量的影响Fig.4 Effect of exogenous NO on the contents of GA₃ in roots and leaves of tomato seedlings under copper stress

稳。Cu+SNP处理使番茄幼苗叶片GA₃含量恢复到对照处理的变化趋势。Cu+SNP+Hb处理使番茄幼苗叶片GA₃含量趋于平稳。

4.4 外源NO对铜胁迫下番茄幼苗根系和叶片ZR含量的影响

由图5-A可知, 对照处理番茄幼苗根系ZR的含量先升高后降低, 在第5天达到最大[44.97 ng·g⁻¹ (FW)]。Cu胁迫下番茄幼苗根系ZR的含量也是同样的趋势, 在第3天达到最大。Cu+SNP处理使番

茄幼苗根系ZR含量恢复到对照的变化趋势, 同样在第5天达到最大。Cu+SNP+Hb处理延缓Cu+SNP处理的诱导效果。

由图5-B可见, 不同处理的番茄幼苗叶片ZR含量的变化趋势基本一致, 都在第3天达到最大值。与对照相比, Cu胁迫处理显著降低番茄幼苗叶片ZR含量。Cu+SNP处理使番茄幼苗叶片ZR含量显著提高。Cu+SNP+Hb处理延缓Cu+SNP处理的诱导效果。

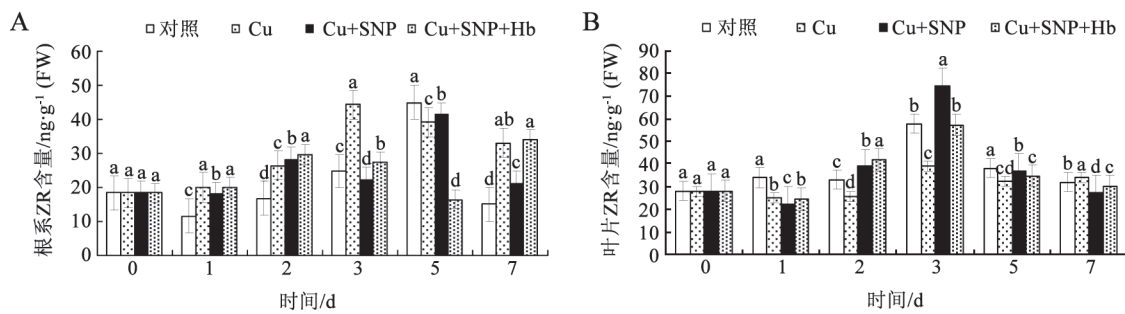


图5 外源NO对铜胁迫下番茄幼苗根系和叶片ZR含量的影响

Fig.5 Effect of exogenous NO on the contents of ZR in roots and leaves of tomato seedlings under copper stress

讨 论

植物螯合肽(PCs)是植物体内重要的金属结合蛋白,与植物重金属抗(耐)性关系密切。同PCs螯合后的金属离子有激活酶活性的功能,PC与金属离子结合后形成的高分子量(HMW)螯合物与植物的抗性关系更为紧密。进入植物体的重金属离子将在植物体内建立一个由源到库的低分子量(LMW)复合物、PC和高分子量(HMW)复合物之间传递的传递链,最终将重金属离子通过低毒性复合物的形式贮存在植物特定组织(库)中(Cobbett 2000)。本试验中,经 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cu和 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SNP处理后番茄幼苗根系和叶片中PCs的含量显著提高,暗示外施SNP可以促进根系和叶片中PCs合成,PCs与金属离子、 S^{2-} 等形成HMW复合物,不断消耗植物体内游离的重金属离子,降低其活性,再通过区室化固定(龙新究等2003;张敏等2012),减轻过多铜离子对番茄胞质生理生化代谢的伤害。

有机酸是一类重要的金属配位体,它主要在线粒体中通过三羧酸循环产生,可参与重金属离子的细胞区域化分布,通过与金属元素发生螯合,使离子态金属转变成低毒或无毒的螯合态,降低金属污染物的有效性和毒性(孙瑞莲和周启星2006)。重金属逆境条件下,植物根系会分泌一系列有机酸,如草酸、柠檬酸、苹果酸、酒石酸、琥珀酸等(徐卫红等2006)。大量研究暗示,植物对重金属的累积与有机酸释放之间存在着良好的相关性。Zeng等(2008)发现,水稻根际pH和有机酸的分泌明显受营养液中重金属浓度的影响,草酸、苹果酸、柠檬酸含量的增加可以促进水稻对重金属的积累。Yang等(2005)报道菠菜在受到重金属

胁迫后30 min内迅速分泌草酸从而保护根尖免受重金属的毒害。本试验中,番茄幼苗根系分泌的有机酸主要有草酸、酒石酸、苹果酸、乳酸、乙酸、柠檬酸和琥珀酸,不同处理下有机酸种类及含量各异。Cu处理显著增加番茄幼苗根系分泌物中有机酸总量,优势种类为草酸、苹果酸、柠檬酸和琥珀酸;而外施SNP则显著降低Cu胁迫下有机酸总量,优势种类为草酸、苹果酸、柠檬酸和琥珀酸。由此可以推断,Cu处理可促进番茄根系产生和释放优势有机酸改善其根际环境的pH值、氧化还原电位等物理化学性质,并通过螯合、沉淀等作用将铜滞留在根外,以缓解铜的毒害;而外施SNP可能通过改变番茄根系细胞壁结构和提高根系纤维素含量来增强番茄幼苗对铜胁迫的耐性(Correa-Aragunde等2008),也可能与溶液中的铜发生化学反应,降低铜的毒害浓度(有待研究),从而缓解铜对根系的过敏刺激,使根系向外分泌的优势有机酸减少。

糖是根系分泌物的重要组分,已知可溶性糖主要包括果糖、葡萄糖和蔗糖。张玲等发现,铜胁迫下小麦根系分泌糖的量会发生变化(张玲和王焕校2002)。Gibbs和Greenway (2003)研究表明,水稻在逆境下根部可积累高浓度碳水化合物,蔗糖、葡萄糖、果糖和淀粉含量的变化是其对不良环境的适应性反应。黑麦草叶片在受到铅胁迫后其可溶性糖明显增加(刘慧芹等2012)。本试验中,Cu胁迫处理显著提高番茄幼苗根系分泌物中糖总量,这可能与 Ca^{2+} 的作用有关(贾夏等2011)。另外,根系分泌的糖类黏胶状物质可与铜离子竞争性结合,使铜离子滞留于根外。而外施SNP显著提高根系分泌物中蔗糖、葡萄糖和果糖含量,推测外

施SNP可通过调控Ca²⁺信号的传递, 调节细胞膜的透性, 增强番茄幼苗对铜胁迫的耐性。同时, SNP可提高番茄幼苗叶片叶绿素的含量(张义凯等2010), 增强叶片光合作用能力, 使更多的碳水化合物运输到根系中, 而根系中可溶性糖的增加更有利于纤维素的合成, 使次生壁加厚, 以抵抗Cu胁迫对细胞组织的破坏(Albrecht和Mustroph 2003a, b)。因而, Cu胁迫下外施SNP可通过提高根系蔗糖、葡萄糖和果糖的含量, 从而间接减轻Cu胁迫对番茄幼苗的伤害。

根系分泌到根际环境中去的氨基酸可与金属发生PCs络合反应或形成配位化合物, 以降低金属离子的含量和活度(张维亚等2003)。王玉云(2011)研究发现, 根系氨基酸分泌量与重金属的积累量呈正相关, 当重金属离子进入细胞后, 能和细胞质中的组氨酸和谷胱甘肽(GSH)等小分子物质形成复杂的稳定络合物, 降低金属的毒性。本试验中, Cu胁迫下番茄幼苗根系和叶片中的氨基酸总量比对照处理增多; 而外施SNP使根系氨基酸总量降低, 叶片中的氨基酸总量进一步提高。Cu胁迫下, 番茄幼苗根系和叶片中氨基酸总量明显提高是对重金属伤害的一种应激性生理响应, PCs生物合成亦增加; 同时, 番茄幼苗可以通过产生胁迫蛋白和可溶性渗透物质清除活性氧或阻止活性氧对细胞结构的损害, 维持细胞正常代谢(陈英旭2008)。根系氨基酸含量降低暗示外源NO通过调节质膜的透性, 增加根系氨基酸外排量, 使根际环境中氨基酸与铜发生PCs络合反应, 缓解铜毒害(张绪成等2005); 并且, NO能够进一步提高叶片中氨基酸含量, 而缬氨酸作为提高幅度最大的氨基酸, 可能与NO促进氨基酸代谢有关, 即通过改变氨基酸的代谢途径来调控Cu在叶细胞内的有效性和毒性。

植物激素(plant hormones)作为植物体内的痕量信号分子, 参与调控作物对生物和非生物性胁迫的适应性, 同时植物激素之间通过此消彼长的变化过程, 调节植物代谢及生长, 增加植物的抗逆性(萧浪涛和王三根2004; Liu等2005)。NO能够调节植物的生长发育, 并与激素相互作用影响植物生长。研究表明, NO可抑制月季花瓣内ABA含量的升高, 延缓IAA含量的下降, 并保持组织中相对较低的ZR和GA水平(张少颖和饶景萍2009)。本试

验中, Cu胁迫显著提高根系和叶片中ABA、IAA含量, 降低根系和叶片中GA₃和ZR的含量。ABA、IAA含量提高可能是由于番茄幼苗受到Cu胁迫时, 促使大量ABA诱导基因表达, 细胞内ABA含量迅速增加(Bueno等1998), 且GA₃能抑制吲哚乙酸氧化酶和过氧化物酶的活性, 促进IAA的合成并抑制其降解, 提高IAA的含量(Sakakibara 2006)。而叶片和根系GA₃和ZR含量的降低与刘瑞香等(2005)和闫志利等(2009)报道干旱胁迫沙棘和豌豆研究结果一致。外施SNP显著提高根系ABA和叶片IAA、GA₃和ZR含量; 降低叶片ABA和根系IAA、GA₃和ZR含量。SNP处理使番茄幼苗内源ABA、IAA、GA₃和ZR的含量发生了变化, 说明NO参与铜胁迫下番茄幼苗根系和叶片中内源激素的变化并使其含量水平达到了一个新的平衡, 内源激素不仅可以作为植物胞间信号物质介导植株整体的抗逆反应, 也能作为细胞逆境信号物质直接介导许多抗逆基因的表达(雍山玉2007; 杨甲定等2005), 因此推测NO可能是通过诱导内源激素的变化影响植物的重金属胁迫响应的。

参考文献

- 陈英旭(2008). 土壤重金属的植物污染化学. 北京: 科学出版社, 147~148
- 陈玉胜(2012). 外源谷胱甘肽对大豆种子萌发过程中铜毒害的缓解效应. 大豆科学, 31 (2): 247~251
- 何钟佩(1993). 农作物化学控制实验指导. 北京: 中国农业大学出版社, 11~14
- 贾夏, 周春娟, 董岁明(2011). 镉胁迫对小麦的影响及小麦对镉毒害响应的研究进展. 麦类作物学报, 31 (4): 786~792
- 敬岩, 孙宝腾, 符建荣(2007). 一氧化氮改善铁胁迫玉米光合组织结构及其活性. 植物营养与肥料学报, 13 (5): 809~815
- 刘慧芹, 沈高峰, 梁宝发, 康欣然(2012). 铅胁迫对黑麦草叶绿素和可溶性糖含量的影响. 湖北农业科学, 51 (3): 556~558
- 刘瑞香, 杨劼, 高丽(2005). 中国沙棘和俄罗斯沙棘叶片在不同土壤水分条件下脯氨酸、可溶性糖及内源激素含量的变化. 水土保持学报, 19 (3): 148~151, 169
- 龙新宪, 杨肖娥, 叶正钱(2003). 超积累植物的金属配位体及其在植物修复中的应用. 植物生理学通讯, 39 (1): 71~77
- 桑建荣(2007). 一氧化氮在水分胁迫和脱落酸诱导玉米叶片抗氧化防护中的作用[硕士论文]. 南京: 南京农业大学
- 孙琴, 王晓蓉, 袁信芳, 丁士明(2004). 有机酸存在下小麦体内Cd的生物毒性和植物络合素(PCs)合成的关系. 生态学报, 24 (12): 2804~2809
- 孙瑞莲, 周启星(2006). 高等植物金属抗性中有机酸的作用及其机理. 生态学杂志, 25 (10): 1275~1279
- 王玉云(2011). Cd胁迫对不同水稻根系分泌有机酸和氨基酸及根

- 系Cd含量的影响[硕士论文]. 雅安: 四川农业大学
- 萧浪涛, 王三根(2004). 植物生理学. 北京: 中国农业出版社, 336
- 徐卫红, 刘吉振, 黄河, 熊治庭(2006). 高锌胁迫下不同大白菜品种生长、Zn吸收及根系分泌物的研究. 中国农学通报, 22 (8): 458~463
- 闫志利, 轩春香, 牛俊义, 席玲玲, 刘建华, 赵天武(2009). 干旱胁迫及复水对豌豆根系内源激素含量的影响. 中国生态农业学报, 17 (2): 297~301
- 杨甲定, 云建英, 赵哈林(2005). 一氧化氮(NO)在植物逆境响应中的作用. 植物生理学通讯, 41 (1): 116~120
- 雍山玉(2007). 外源一氧化氮(NO)对盐胁迫下辣椒种子萌发和幼苗生理特性的影响[硕士论文]. 兰州: 甘肃农业大学
- 张玲, 王焕校(2002). 镉胁迫下小麦根系分泌物的变化. 生态学报, 22 (4): 496~502
- 张敏, 姜春辉, 李晓云, 崔秀敏(2012). 外源NO对铜胁迫下番茄幼苗根系构型及其超微结构的影响. 植物生理学报, 48 (11): 1105~1112
- 张少颖, 饶景萍(2009). 外源NO对瓶插期间的月季切花中内源激素含量的影响. 植物生理学通讯, 45 (7): 635~638
- 张维亚, 陈拓, 汤红官, 冯虎元, 安黎哲, 王勋陵(2003). Cd胁迫和增UV-B辐射对大豆根系分泌物的影响. 植物生态学报, 27 (3): 293~298
- 张绪成, 上官周平, 高世铭(2005). NO对植物生长发育的调控机制. 西北植物学报, 25 (4): 812~818
- 张艳艳(2007). 植物磷酸酶D、一氧化氮和过氧化氢在转导ABA、盐胁迫信号中的关系[硕士论文]. 南京: 南京农业大学
- 张艳艳, 章文华, 薛丽, 傅向荣(2012). 一氧化氮在植物生长发育和抗逆过程中的作用研究进展. 西北植物学报, 32 (4): 835~842
- 张义凯(2009). 外源一氧化氮对番茄幼苗铜、镉毒害缓解效应的研究[硕士论文]. 泰安: 山东农业大学
- 张义凯, 韩小娇, 金洪, 陈秀灵, 崔秀敏, 吴小宾, 徐艳如(2010). 外源NO对铜胁迫下番茄光合、生物发光特性及矿质元素吸收的影响. 植物营养与肥料学报, 16 (1): 172~178
- 赵旭东, 魏东芝, 万群, 俞俊棠(2000). 谷胱甘肽的简便测定法. 药物分析杂志, 1 (20): 34~37
- Albrecht G, Mustroph A (2003a). Sucrose utilization via invertase and sucrose synthase with respect to accumulation of cellulose and callose synthesis in wheat roots under oxygen deficiency. Russ J Plant Physiol, 50 (6): 813~820
- Albrecht G, Mustroph A (2003b). Localization of sucrose synthase in wheat roots: increased in situ activity of sucrose synthase correlates with cell wall thickening by cellulose deposition under hypoxia. Planta, 217 (2): 252~260
- Beligni MV, Lamattina L (2001). Nitric oxide: a non-traditional regulator of plant growth. Trends Plant Sci, 6 (11): 508~509
- Bueno P, Piqueras A, Kurepa J, Savouré A, Verbruggen N, Van Montagu M, Inzé D (1998). Expression of antioxidant enzymes in response to abscisic acid and high osmoticum in tobacco BY-2 cell cultures. Plant Sci, 138 (1): 27~34
- Cui XM, Zhang YK, Wu XB, Liu CS (2010). The investigation of the alleviated effect of copper toxicity by exogenous nitric oxide in tomato plants. Plant Soil Environ, 56 (6): 274~281
- Cobbett CS (2000). Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. Plant Physiol, 123 (3): 825~832
- Correa-Aragunde N, Lombardo C, Lamattina L (2008). Nitric oxide: an active nitrogen molecule that modulates cellulose synthesis in tomato roots. New Phytol, 179 (2): 386~396
- Gibbs J, Greenway H (2003). Mechanisms of anoxia tolerance in plants. I. Growth, survival and anaerobic catabolism. Funct Plant Biol, 30 (1): 1~47
- Graziano M, Lamattina L (2007). Nitric oxide accumulation is required for molecular and physiological responses to iron deficiency in tomato roots. Plant J, 52 (5): 949~960
- Keltjens WG, Beusichem ML (1998). Phytochelatins as biomarker for heavy metal stress in maize (*Zea mays* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.): combined effects of copper and cadmium. Plant Soil, 203 (1): 119~126
- Laspina NV, Groppa MD, Tomaro ML, Benavides MP (2005). Nitric oxide protects sunflower leaves against Cd-induced oxidative stress. Plant Sci, 169 (2): 323~330
- Liu X, Shi WL, Zhang SQ, Lou CH (2005). Nitric oxide involved in signal transduction of jasmonic acid-induced stomatal closure of *Vicia faba* L. Chin Sci Bull, 50 (6): 520~525
- Rengel Z, Romheld V, Marschner H (1998). Uptake of zinc and iron by wheat genotypes differing in tolerance to zinc efficiency. J Plant Physiol, 152 (4~5): 433~438
- Sakakibara H (2006). Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. Annu Rev Plant Biol, 57: 431~449
- Yang JL, Zheng SJ, He YF, Matsumoto H (2005). Aluminium resistance requires resistance to acid stress: a case study with spinach that exudes oxalate rapidly when exposed to Al stress. J Exp Bot, 414 (56): 1197~1203
- Zeng FR, Chen S, Miao Y, Wu FB, Zhang GP (2008). Changes of organic acid exudation and rhizosphere pH in rice plants under chromium stress. Environ Pollut, 155 (2): 284~289
- Zhao MG, Tian QY, Zhang WH (2007). Nitric oxide synthase-dependent nitric oxide: production is associated with salt tolerance in Arabidopsis. Plant Physiol, 144 (1): 206~217