

NO参与玉米幼苗对盐胁迫的应答

侯丽霞, 车永梅, 赵方贵, 唐静, 刘新*

青岛农业大学生命科学学院, 山东青岛266109

摘要: 以玉米幼苗为材料, 研究盐胁迫下其内源NO含量、NR和NOS活性的变化; NOS专一性抑制剂L-NAME和NR非专一性抑制剂NaN₃对玉米幼苗内源NO含量的影响; 利用激光共聚焦显微技术观测盐胁迫下玉米幼苗根部NO含量的变化及其分布特点。结果表明, 盐胁迫下玉米幼苗根尖和叶片中NO含量有猝发现象, NOS活性也随之显著提高, NR活性则显著降低; L-NAME或NaN₃均可降低盐胁迫所引起的玉米幼苗NO水平的增加, L-NAME对NO含量的影响比NaN₃更显著。推测, NO参与玉米幼苗对盐胁迫的应答, NOS途径是盐胁迫下玉米幼苗内源NO合成的主要途径。

关键词: 玉米幼苗; 盐胁迫; 一氧化氮; 一氧化氮合酶

NO Involved in the Response of Maize Seedlings to Salt Stress

HOU Li-Xia, CHE Yong-Mei, ZHAO Fang-Gui, TANG Jing, LIU Xin*

School of Life Sciences, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109, China

Abstract: The changes of endogenous nitric oxide (NO) content, nitrate reductase (NR) and nitric oxide synthase (NOS) activity, effects of NOS inhibitor N_ω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) and NR inhibitor NaN₃ on NO content in maize seedlings under salt stress were studied. The results showed that NO content and NOS activity in root tip and leaf of maize seedlings increased under salt stress, but NR activity decreased. After treated with L-NAME and NaCl together, NO content in maize seedlings decreased significantly, yet NO content decreased a little after treated with NaN₃ and NaCl. In order to prove salt stress-induced NO synthesis in root, the distribution of NO in root of maize seedlings was researched by confocal laser scanning microscope. NO is mainly distributed in root epidermis and hairs. The content of NO treated with L-NAME decreased more significantly than that treated with NaN₃. These results suggested that salt stress could promote the synthesis of NO in maize seedlings by stimulating the NOS pathway, and NO participated in salt signal transduction in maize seedlings.

Key words: maize seedlings; salt stress; nitric oxide; nitric oxide synthase

一氧化氮(nitric oxide, NO)是植物体内一种重要的信号分子, 参与植物对多种生物胁迫与非生物胁迫的应答过程(李慧等2009)。许多研究表明, 外源NO供体硝普钠(sodium nitroprusside, SNP)可以缓解盐胁迫诱导的大麦叶片离子渗漏和丙二醛的积累(Li等2008); SNP预处理可以促进盐胁迫下玉米幼苗生长, 提高植株干重(Zhang等2006)。但目前鲜见关于内源NO是否参与植物体对盐胁迫应答的报道, 盐胁迫下NO来源也不明确。

植物细胞中NO的合成分为酶途径和非酶途径, 酶途径主要是依赖于硝酸盐/亚硝酸盐途径和依赖于L-精氨酸的途径。前者的关键酶主要是胞质的硝酸还原酶(nitrate reductase, NR)及根部特异性的亚硝酸盐NO还原酶(nitrite NO reductase, Ni-NOR); 后者相应的关键酶可能包括类一氧化氮合酶

(nitric oxide synthase, NOS), 且在多种植物组织及细胞器中检测到其活性(Besson-Bard等2008a)。如线粒体、细胞核和过氧化物酶体中均存在依赖于L-精氨酸的NOS活性(Corpas等2006), 且动物NOS的抑制剂L-NAME同样可抑制植物中NO的产生(Yan等2007)。基于此已有研究表明在植物生长发育(Corpas等2006)、对生物胁迫的病原激发子的响应(Besson-Bard等2008b)和非生物胁迫过程中均存在依赖于精氨酸的NO合成途径。有研究表明, NOS途径产生的NO参与了镉离子诱导的拟南

收稿 2010-03-25 修定 2010-04-12

资助 山东省教育厅基金(J04C13)和国家自然科学基金(30970228)。

* 通讯作者(E-mail: liuxin6080@yahoo.com.cn; Tel: 0532-88030224)。

芥悬浮细胞的程序性细胞凋亡(De等2009)。而且, NOS途径产生的NO参与拟南芥的盐适应过程(Zhao等2007)。水分胁迫可导致玉米叶肉细胞中NO积累, NOS和NR抑制剂均可逆转NO含量的升高, 推测水分胁迫下玉米中NO来源于NOS途径和NR途径(Sang等2008); Liu等(2006)研究表明, 在茉莉酸(jasmonic acid, JA)诱导蚕豆气孔关闭的过程中有NO参与, 并且NO的产生主要依赖于NR途径。本文研究了盐胁迫下玉米幼苗体内NO含量、NR和NOS的活性变化及NOS专一性抑制剂 N_{ω} -硝基-L-精氨酸-甲酯(N_{ω} -nitro-L-arginine methyl ester, L-NAME)和NR非专一性抑制剂 NaN_3 对玉米幼苗内源NO含量的影响, 探究盐胁迫下玉米幼苗体内NO的来源, 为阐明盐胁迫下NO信号转导机制提供理论依据。

材料与方 法

1 实验材料和处理

供试玉米(*Zea mays* L.)品种为‘鲁单50’。玉米种子经0.1% HgCl_2 消毒10 min, 反复漂洗, 25 °C浸种, 催芽。挑选露白整齐的种子用1/4 Hoagland营养液水培, 昼/夜温度27 °C/18 °C, 光/暗周期12 h/12 h, 光照强度400 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 处理期间每天更换营养液, 待玉米幼苗长至三叶一心期, 取长势一致的玉米幼苗为实验材料。进行以下处理:

(1)用1/4 Hoagland溶液(对照)和含150 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl的1/4 Hoagland溶液处理玉米幼苗, 每隔12 h取样一次, 分别测定各样品中NO含量、NOS和NR活性, 每个处理重复3次。

(2)分别用1/4 Hoagland溶液(对照)、含150 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl的1/4 Hoagland溶液、含0.025 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ L-NAME (或0.1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaN_3)的1/4 Hoagland溶液、含0.025 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ L-NAME (或0.1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaN_3)加150 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl的1/4 Hoagland溶液处理玉米幼苗, 24 h取样, 研究各处理对玉米幼苗NO含量及根中NO分布的影响, 每个处理重复3次。

2 实验方法

2.1 NO含量测定 试剂盒法测定NO含量, 试剂盒购自南京建成生物工程研究所。考马斯亮兰法测定蛋白质含量, 计算每克蛋白含NO的量。

2.2 NOS活性测定 试剂盒法测定NOS活性, 试剂

盒购自南京建成生物工程研究所, 酶活性用 $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ (蛋白)表示。

2.3 NR活性测定 参照郝再彬等(2002)方法。

2.4 玉米根部NO分布测定 用激光共聚焦显微技术测定NO的分布。取处理24 h的根进行徒手切片, 将切片转入pH为7.5的HEPES-NaOH缓冲液(含20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ HEPES、NO特异性荧光探针10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DAF-2DA及其他处理液), 在室温(25 °C)黑暗条件下孵育1 h以上。孵育结束后用HEPES-NaOH缓冲液冲洗3次, 清洗干净后制片。于激光共聚焦扫描显微镜(Confocal Laser Scanning Microscopy, CLSM) (Zeiss-LSM 510 META)下观察, 扫描, 拍照(激发光波长488 nm, 发射波长515~560 nm)。应用Confocal assistant system和Photoshop 7.0软件进行分析。每个处理至少重复5次, 选取其中一张照片进行分析。

3 数据统计分析方法

测定结果用DPS数据处理系统进行方差分析。

结果与讨论

1 盐胁迫下玉米幼苗体内NO的含量变化

图1表明, 在一定时间范围内, 对照组玉米幼苗根尖和叶片中NO含量均无显著变化($P>0.05$), 150 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl处理的玉米幼苗根尖和叶片中NO含量均呈先增加后减少的趋势, 具有NO的猝发。根尖中NO的猝发时间早于叶片, 且含量也高于叶片, 推测这可能由于根尖是盐胁迫诱导NO合成的原初部位。

业已证明, 植物体可通过酶促反应或非酶促反应产生NO, NOS和NR是植物体内调节NO合成的关键酶(Qiao和Fan 2008)。有报道, 番茄斑点病菌(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, Xcv)可诱导水稻细胞NOS活性及NO合成相关基因(*nos*和*nr*)的表达, 促进NO的迸发(孟威等2007); 低温促进大豆NOS活性的提高及NO的积累(Corpas等2008)。NR和NOS是否参与盐胁迫下玉米幼苗体内NO的猝发? 本文进一步研究了盐胁迫下玉米幼苗体内NR和NOS活性变化及NR非专一性抑制剂 NaN_3 和NOS专一性抑制剂L-NAME对NO含量的影响。

2 NaCl处理对玉米幼苗NR活性的影响

图2显示, 150 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl处理玉米幼苗,

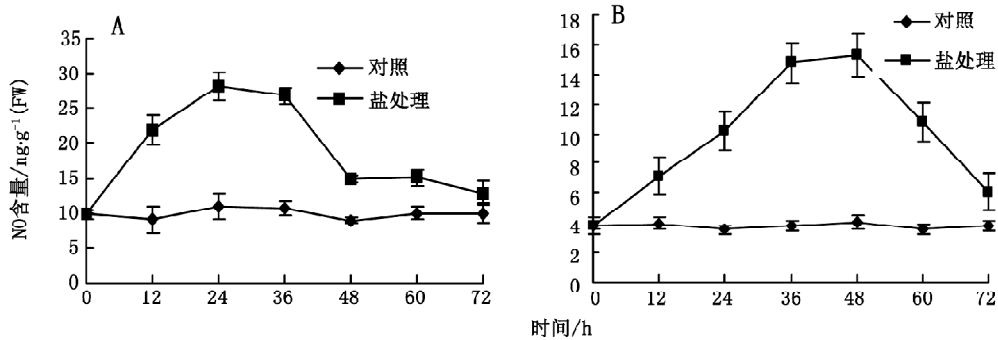


图1 NaCl处理对玉米幼苗根尖(A)和叶片(B)NO含量的影响

Fig.1 Effects of NaCl on NO contents in root tip (A) and leaf (B) of maize seedlings

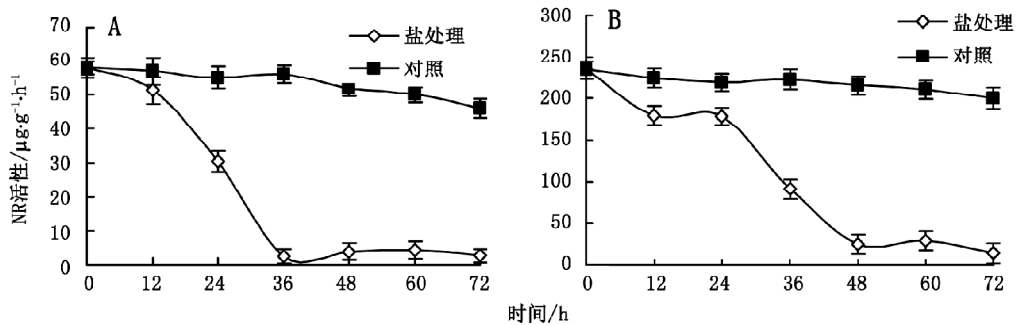


图2 NaCl对玉米幼苗根尖(A)和叶片(B)中NR活性的影响

Fig.2 Effects of NaCl on NR activity in root tip (A) and leaf (B) of maize seedlings

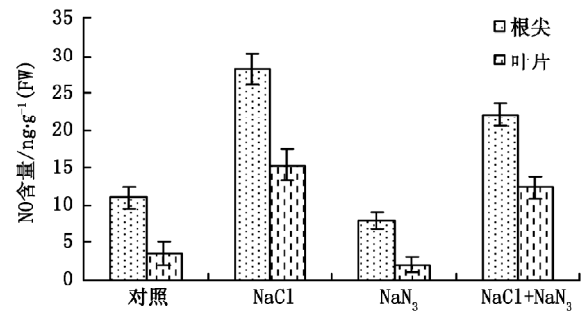
其根尖和叶片中NR的活性均逐渐降低。在处理36 h时,根尖中NR活性降至最低,叶片中NR活性在处理48 h时已降至较低水平($P < 0.05$)。推测,在玉米应答盐胁迫中NO的猝发与NR无关。

3 NR抑制剂对盐胁迫下玉米幼苗NO含量的影响

为进一步探明是否有来源于NR途径的NO参与玉米幼苗应答盐胁迫过程,检测了NR抑制剂NaN₃对盐胁迫下玉米幼苗根尖和叶片NO含量的影响。实验结果表明,0.1 mmol·L⁻¹ NR的非专一性抑制剂NaN₃处理玉米幼苗24 h后,根尖和叶片中NO的含量与对照相比有所降低,但变化不显著($P > 0.05$) (图3)。综合图1~3的实验结果,NR途径不是盐胁迫诱导NO释放的主要途径。

4 NaCl处理对玉米幼苗NOS活性的影响

图4表明,150 mmol·L⁻¹ NaCl处理的玉米幼苗,根尖和叶片中NOS的活性均迅速升高($P < 0.05$),且根尖中NOS活性变化快于叶片,这可能与根尖中NOS较早感受到盐胁迫有关。

图3 NaN₃对盐胁迫下玉米幼苗根尖和叶片NO含量的影响
Fig.3 Effects of NaN₃ on NO contents in root tip and leaf of maize seedlings

5 NOS抑制剂对盐胁迫下玉米幼苗NO含量的影响

L-NAME是NOS的专一性抑制剂。图5显示,0.025 mmol·L⁻¹的L-NAME处理玉米幼苗24 h,其根尖和叶片中NO含量均显著低于对照,表明NOS是玉米幼苗体内NO合成的一条重要途径。0.025 mmol·L⁻¹ L-NAME与150 mmol·L⁻¹ NaCl共处理玉米幼苗24 h,其叶片和根尖NO含量显著低于150

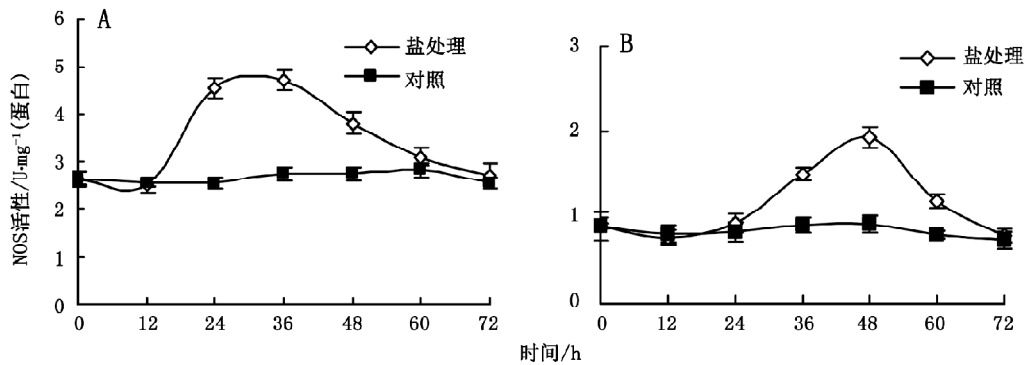


图4 NaCl对玉米幼苗根尖(A)和叶片(B)中NOS活性的影响
Fig.4 Effects of NaCl on NOS activity in root tip (A) and leaf (B) of maize seedlings

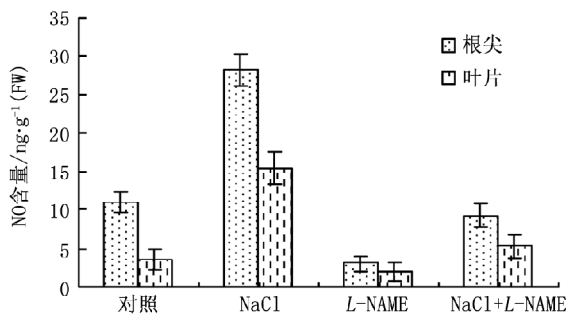


图5 L-NAME对盐胁迫下玉米幼苗根尖和叶片中NO含量的影响
Fig.5 Effects of L-NAME on NO contents of root tip and leaf of maize seedlings

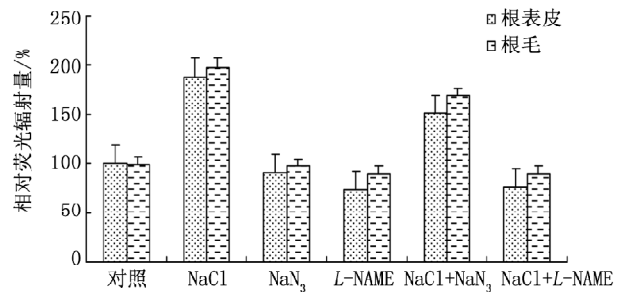


图6 盐胁迫对玉米幼苗根表皮中NO含量的影响
Fig.6 Effects of NaCl on NO contents in root epidermis and root hairs of maize seedlings

mmol·L⁻¹ NaCl处理的($P<0.05$), 表明NOS途径是盐胁迫下玉米幼苗根尖和叶片NO的主要来源。

6 盐胁迫对玉米幼苗根部NO分布的影响

作为植物体内调节NO合成的主要酶, NR主要存在于胞质中, 后来发现在烟草根质膜上有NR (PM-NR, PM-bound nitrate reductase)活性(Stöhr等2001), NOS的分布具有较强的组织特异性(Corpas等2004; Flores等2008)。为进一步证明NO参与玉米对盐胁迫的应答, 并探明盐胁迫所引起NO猝发的来源。用NO专一性荧光探针DAF-2DA结合激光共聚焦显微技术检测盐胁迫下玉米幼苗根部NO含量的变化。结果表明, 150 mmol·L⁻¹ NaCl处理玉米幼苗24 h, 其根表皮及根毛中绿色荧光均有较大幅度增加($P<0.05$); 0.025 mmol·L⁻¹ L-NAME或0.1 mmol·L⁻¹ NaN₃与150 mmol·L⁻¹ NaCl共处理24 h绿色荧光均有下降, 而且L-NAME对荧光的削弱作用比NaN₃显著($P<0.05$) (图6~8)。进一步证实, 盐

胁迫下, 玉米幼苗体内有NO生成, 并且NO主要通过NOS途径合成。

综合看来, 盐胁迫下玉米幼苗根尖和叶片中均有NO猝发, 根尖中NO的猝发早于叶片, 且含量高于叶片; 内源NO参与植物对盐胁迫应答反应, 根尖是NO的主要合成部位, NOS途径是NO的主要来源。

最近, Kolbert等(2010)利用拟南芥及其NR突变体(*nia1*, *nia2*)研究发现渗透胁迫(PEG6000)引起的根系NO的变化与NR途径有关。NO是否参与植物对盐胁迫的适应及盐胁迫下植物体内NO的来源还需利用遗传学和分子生物学手段来进一步论证。Corpas等(2009)研究发现盐胁迫下NOS途径参与拟南芥胞质NO的增加, 并且过氧化物与NOS转运相关, 那么玉米等单子叶植物是否存在同样的机理? 另外, 植物体以多种方式、通过多种信号分子或信号转导途径抵御各种逆境, 活性氧参与植物对盐胁迫的应答(Tanou等2009), 并且, 在

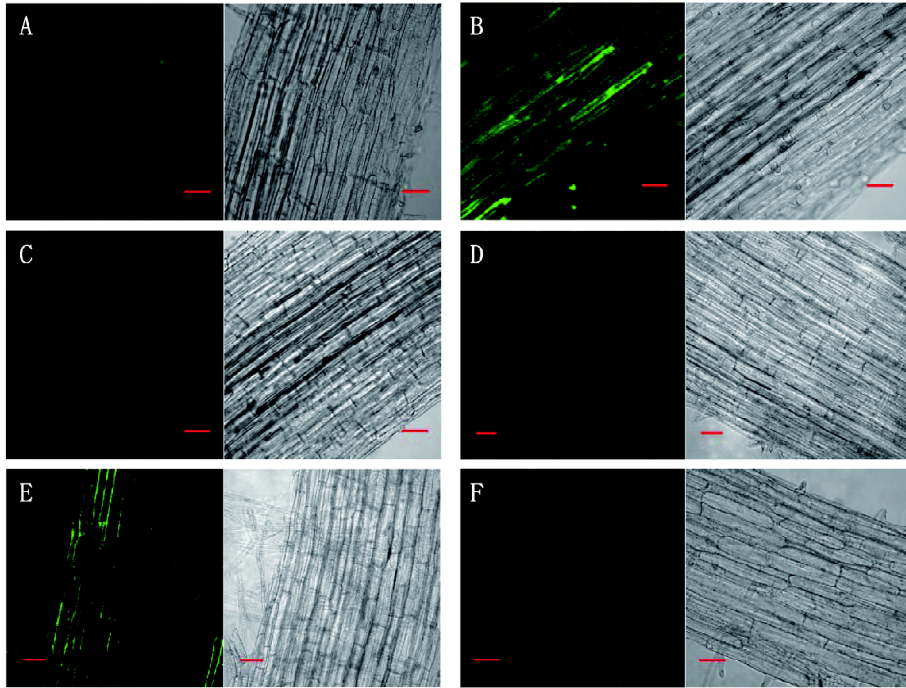


图7 盐胁迫对玉米幼苗根表皮NO分布的影响(比例尺100 μm)

Fig.7 Effects of salt stress on the distribution of NO in root epidermis of maize seedlings (bar 100 μm)

A: 对照; B: NaCl 处理; C: NaN_3 处理; D: L-NAME 处理; E: NaCl+ NaN_3 处理; F: NaCl+L-NAME 处理。A~F 中左边的小图是荧光图, 右边的小图是透射图。图8 同。

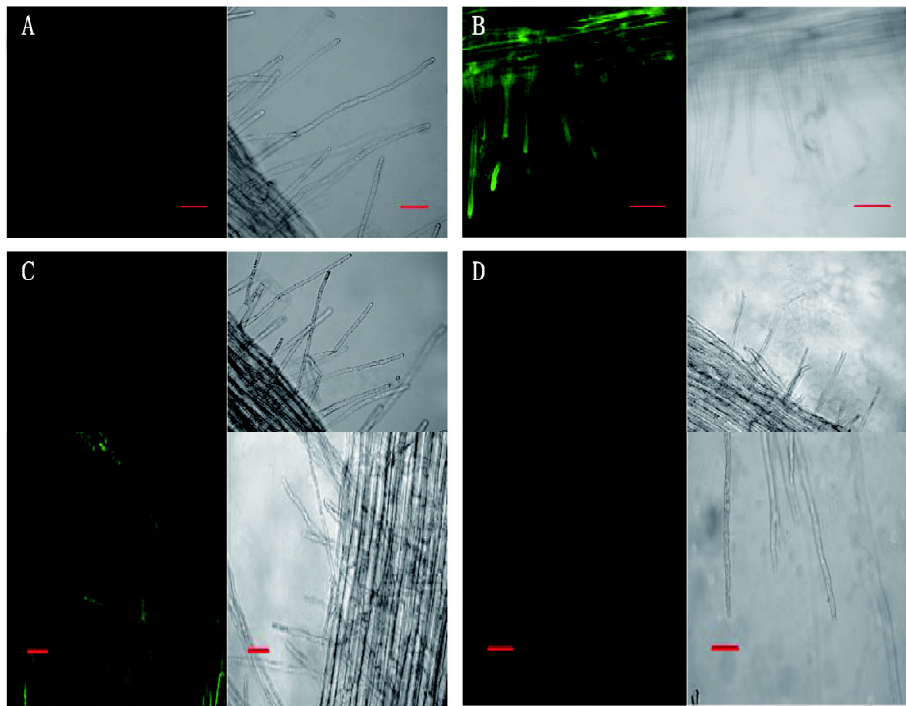


图8 盐胁迫对玉米幼苗根毛NO分布的影响(比例尺100 μm)

Fig.8 Effects of salt stress on the distribution of NO in root hair of maize seedlings (bar 100 μm)

许多生理过程中NO与ABA、乙烯、H₂O₂等信号分子之间存在相互作用(陈康等2006; Ederli等2006; Lu等2009)。那么盐胁迫下, NO与这些信号分子之间的关系怎样? 关于盐胁迫下植物体内NO的来源, 不同植物体内NO的合成途径是否存在差异? 在植物抵御盐胁迫的信号转导途径中NO的上下游信号组分有那些? NO如何实现下游组分的调控? 这些都是值得深入探讨的问题。

参考文献

- 陈康, 李杰, 唐静, 赵方贵, 刘新(2006). 一氧化氮参与调节盐胁迫诱导的玉米幼苗脱落酸积累. 植物生理与分子生物学学报, 32 (5): 577~582
- 郝再彬, 苍晶, 徐仲(2002). 植物生理学理论与技术(B册): 植物生理实验技术. 哈尔滨: 哈尔滨出版社, 50~53
- 李慧, 赵文才, 赵会杰, 韩燕来, 谭金芳(2009). 外源一氧化氮供体硝普钠对干旱胁迫下小麦幼苗叶中ATP酶活性和膜脂过氧化的影响. 植物生理学通讯, 45 (5): 455~458
- 孟威, 文景芝, 吴茂森, 何晨阳(2007). 两种黄单胞病菌诱导水稻一氧化氮产生和防卫基因表达的比较研究. 中国农业科学, 40 (6): 1159~1165
- Besson-Bard A, Courtois C, Gauthier A, Dahan J, Dobrowolska G, Jeandroz S, Pugin A, Wendehenne D (2008a). Nitric oxide in plants: production and cross-talk with Ca²⁺ signaling. Mol Plant, 1 (2): 218~228
- Besson-Bard A, Griveau S, Bedioui F, Wendehenne D (2008b). Real-time electrochemical detection of extracellular nitric oxide in tobacco cells exposed to cryptogin, an elicitor of defence responses. J Exp Bot, 59 (12): 3407~3414
- Corpas FJ, Barroso JB, Carreras A, Valderrama R, Palma JM, León AM, Sandalio LM, del Río LA (2006). Constitutive arginine-dependent nitric oxide synthase activity in different organs of pea seedlings during plant development. Planta, 224 (2): 246~254
- Corpas FJ, Barroso JB, Carreras A, Quirós M, León AM, Romero-Puertas MC, Esteban FJ, Valderrama R, Palma JM, Sandalio LM et al (2004). Cellular and subcellular localization of endogenous nitric oxide in young and senescent pea plants. Plant Physiol, 136 (1): 2722~2733
- Corpas FJ, Chaki M, Fernández-Ocaña A, Valderrama R, Palma JM, Carreras A, Begara-Morales JC, Airaki M, del Río LA, Barroso JB (2008). Metabolism of reactive nitrogen species in pea plants under abiotic stress conditions. Plant Cell Physiol, 49 (11): 1711~1722
- Corpas FJ, Hayashi M, Mano S, Nishimura M, Barroso JB (2009). Peroxisomes are required for *in vivo* nitric oxide (NO) accumulation in the cytosol following salinity stress of *Arabidopsis* plants. Plant Physiol, 151 (4): 2083~2094
- De MR, Vurro E, Rigo C, Costa A, Elvirio L, Valentin MD, Careri M, Zottini M, Toppi LS, Schiavo FL (2009). Nitric oxide is involved in cadmium-induced programmed cell death in *Arabidopsis* suspension cultures. Plant Physiol, 150 (1): 217~228
- Ederli L, Morettini R, Borgogni A, Wasternack C, Miersch O, Reale L, Ferranti F, Tosti N, Pasqualini S (2006). Interaction between nitric oxide and ethylene in the induction of alternative oxidase in ozone-treated tobacco plants. Plant Physiol, 142 (2): 595~608
- Flores T, Todd CD, Tovar-Mendez A, Dhanoa PK, Correa-Aragunde N, Hoyos ME, Brownfield DM, Mullen RT, Lamattina L, Polacco JC (2008). Arginase-negative mutants of *Arabidopsis* exhibit increased nitric oxide signaling in root development. Plant Physiol, 147 (4): 1936~1946
- Kolbert Z, Ortega L, Erdei L (2010). Involvement of nitrate reductase (NR) in osmotic stress-induced NO generation of *Arabidopsis thaliana* L. roots. J Plant Physiol, 167 (1): 77~80
- Li QY, Niu HB, Yin J, Wang MB, Shao HB, Deng DZ, Chen XX, Ren JP, Li YC (2008). Protective role of exogenous nitric oxide against oxidative-stress induced by salt stress in barley (*Hordeum vulgare*). Colloids Surf B Biointerfaces, 65 (2): 220~225
- Liu X, Wang YQ, Jia WS, Lou CH, Zhang SQ (2006). Localization of NOS like protein in guard cells of *Vicia faba* L. and its possible function. Chin Sci Bull, 51 (21): 2495~2500
- Lu S, Su W, Li H, Guo Z (2009). Abscisic acid improves drought tolerance of triploid bermudagrass and involves H₂O₂- and NO-induced antioxidant enzyme activities. Plant Physiol Biochem, 47 (2): 132~138
- Qiao WH, Fan LM (2008). Nitric oxide signaling in plant responses to abiotic stresses. J Integr Plant Biol, 50 (10): 1238~1246
- Sang J, Jiang M, Lin F, Xu S, Zhang A, Tan M (2008). Nitric oxide reduces hydrogen peroxide accumulation involved in water stress-induced subcellular anti-oxidant defense in maize plants. J Integr Plant Biol, 50 (2): 231~243
- Stöhr C, Strube F, Marx G, Ullrich WR, Rockel R (2001). A plasma membrane-bound enzyme of tobacco roots catalyses the formation of nitric oxide from nitrite. Planta, 212: 835~841
- Tanou G, Molassiotis A, Diamantidis G (2009). Hydrogen peroxide- and nitric oxide-induced systemic antioxidant prime-like activity under NaCl-stress and stress-free conditions in citrus plants. J Plant Physiol, 166 (17): 1904~1913
- Yan J, Tsuichihara N, Etoh T, Iwai S (2007). Reactive oxygen species and nitric oxide are involved in ABA inhibition of stomatal opening. Plant Cell Environ, 30 (10): 1320~1325
- Zhang YY, Wang LL, Liu YL, Zhang Q, Wei QP, Zhang WH (2006). Nitric oxide enhances salt tolerance in maize seedlings through increasing activities of proton-pump and Na⁺/H⁺ antiport in the tonoplast. Planta, 224 (3): 545~555
- 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