

## 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影响

李慧<sup>1</sup>, 赵文才<sup>1</sup>, 赵会杰<sup>2</sup>, 韩燕来<sup>1</sup>, 谭金芳<sup>1,\*</sup>

河南农业大学<sup>1</sup> 资源环境学院, <sup>2</sup> 生命科学学院, 郑州 450002

**摘要:** 研究外源一氧化氮(NO)供体硝普钠(SNP)对干旱胁迫下小麦幼苗叶片ATP酶活性和膜脂过氧化影响的结果表明, 15% 聚乙二醇-6000 (PEG-6000)模拟的干旱胁迫下小麦幼苗叶中H<sup>+</sup>-ATP酶和Ca<sup>2+</sup>-ATP酶活性显著升高后迅速下降, 硫代巴比妥酸反应产物(TBARS)和质量膜透性增加; 0.1 mmol·L<sup>-1</sup> SNP可提高干旱胁迫下小麦幼苗叶中超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)活性, 降低超氧阴离子(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)和过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)水平, 缓解膜脂过氧化, 稳定生物膜的结构和功能, H<sup>+</sup>-ATP酶和Ca<sup>2+</sup>-ATP酶也可以保持更高的活性。

**关键词:** 一氧化氮; 干旱胁迫; 小麦幼苗叶片; ATP酶活性; 膜脂过氧化

## Effects of Exogenous Nitric Oxide Donor Sodium Nitroprusside on ATPase Activity and Membrane Lipid Peroxidation in Wheat (*Triticum aestivum* L. cv. 'Luohan 6') Seedling Leaves under Drought Stress

LI Hui<sup>1</sup>, ZHAO Wen-Cai<sup>1</sup>, ZHAO Hui-Jie<sup>2</sup>, HAN Yan-Lai<sup>1</sup>, TAN Jin-Fang<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>College of Environmental and Resource Sciences, <sup>2</sup>College of Life Sciences, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China

**Abstract:** The effects of nitric oxide (NO) donor sodium nitroprusside (SNP) on ATPase activity and membrane lipid peroxidation in the wheat (*Triticum aestivum* cv. 'Luohan 6') seedling leaves under drought stress were investigated. Results showed that the 15% PEG-6000 treatment apparently enhanced the H<sup>+</sup>-ATPase and Ca<sup>2+</sup>-ATPase activities before period of deterioration, accelerated the accumulation of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and membrane permeability in wheat seedling leaves under drought stress. 0.1 mmol·L<sup>-1</sup> SNP could enhance the activities of superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD) and catalase (CAT), lower O<sub>2</sub><sup>-</sup> production rate, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content and membrane lipid peroxidation, stabilize the structure and function of biomembranes, increase the activities H<sup>+</sup>-ATPase and Ca<sup>2+</sup>-ATPase.

**Key words:** nitric oxide; drought stress; wheat seedling leaves; ATPase activity; membrane lipid peroxidation

一般来说,在我国北方地区,干旱常是导致小麦产量下降的主要原因之一。干旱胁迫下植物活细胞原生质膜结构和功能受到影响,脂肪酸的不饱和程度急剧下降,膜的流动性变差,从而影响膜的正常生理功能。另外,植物细胞质膜上的功能蛋白很多,如质膜H<sup>+</sup>-ATP酶和Ca<sup>2+</sup>-ATP酶等(龚月桦和高俊凤 2002),它们在维持细胞膜两侧离子平衡、调节细胞渗透压、保持细胞膜完整性以及信号传导中起作用(Zhao等 2004; Huang等 2006; 宰学明等 2007)。一氧化氮(nitric oxide, NO)作为一种信息传递的信使分子,不仅参与植物生长和发育过程中的生理代谢过程,而且可提高植物的抗逆性(Garcia-Mata和Lamattina 2001),有研究表明,外源NO可通过植物叶中抗氧化酶系统(王宪叶等 2004)、渗

透调节(Tan等 2008)、气孔开闭(Garcia-Mata和Lamattina 2001; Neill等 2002)等生理调控机制提高其抗旱性,但是ATP酶如何参与干旱胁迫下的膜脂过氧化过程以及外源NO供体SNP对干旱胁迫下ATP酶活性的调控机制尚不清楚,为此,本文研究NO供体硝普钠(sodium nitroprusside, SNP)对干旱胁迫下小麦幼苗叶中H<sup>+</sup>-ATP酶、Ca<sup>2+</sup>-ATP酶活性以及膜脂过氧化的影响。

收稿 2009-01-15 修定 2009-04-20

资助 国际植物营养研究所(IPNI)项目(30200108)、“十一五”国家科技支撑计划(30200166)和河南省农业科技成果转化基金项目(0536000006)。

\* 通讯作者(E-mail: tanjf@henau.edu.cn; Tel: 0371-63554088)。

## 材料与方法

SNP 购自 Sigma 公司, 现用现配, 通常是  $0.15 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  SNP 大约可产生小于  $0.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 NO (Garcia-Mata 和 Lamattina 2001)。经过我们的前期实验确定 SNP 的浓度为  $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 实验中聚乙二醇-6000 (PEG-6000) 的浓度为 15% (轻度胁迫, 约为  $-0.40 \text{ MPa}$ )。

精选的小麦品种‘洛旱6号’ (*Triticum aestivum* L. cv. ‘Luohan 6’) 种子以 0.1% 氯化汞消毒 5 min, 用蒸馏水反复冲洗 3 次,  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  浸种暗催芽, 待种子露白后, 选择露白一致的种子用 Hoagland 营养液在恒温的培养皿中培养, 7 d 后移植到盆钵中, 在人工气候箱(光照强度为  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , 光照  $12 \text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$ , 温度  $(20\pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$ , 相对湿度 60%) 中培养, 长至三叶一心时挑选长势一致的幼苗分组进行处理, 每组重复 3 次, 每天更换 1 次处理液。实验处理有: (1) 对照为 Hoagland 营养液; (2) SNP 为 Hoagland 营养液 +  $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  SNP; (3) PEG 为 Hoagland 营养液 + 15% PEG; (4) PEG+SNP 为 Hoagland 营养液 + 15% PEG +  $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  SNP。处理后的 12、24、48 和 72 h 分别取第 2 片叶的混合样品用于各项生理生化指标测定。

参照王宪叶等(2004)文中方法测定质膜相对透性; 赵世杰等(1994)文中方法测定硫代巴比妥酸反应产物(thiobarbituric acid reactive substances, TBARS)含量; 王爱国和罗广华(1990)文中方法测定超氧自由基( $\text{O}_2^-$ )产生速率; 刘俊等(2000)文中方法测定过氧化氢( $\text{H}_2\text{O}_2$ )含量; Giannopolitis 和 Ries (1977)文中方法测定超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性; 阮海华等(2001)文中方法测定过氧化物酶(peroxidase, POD)活性; Egley 等(1983)的方法测定过氧化氢酶(catalase, CAT)活性; 胡章立等(1993)文中方法测定  $\text{H}^+$ -ATP 酶活性; 赵士诚等(2008)文中方法测定  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶活性。

## 结果与讨论

### 1 外源 NO 供体 SNP 对干旱胁迫下小麦幼苗叶中 ATP 酶活性的影响

如图 1 所示, PEG 处理 12 h 的小麦幼苗叶中  $\text{H}^+$ -ATP 酶和  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶活性分别升高 33.54% ( $P < 0.01$ ) 和 118.87% ( $P < 0.01$ ), 达到极显著水平, 后其活性随胁迫时间的延长迅速下降。ATP 酶活性在

干旱胁迫初期的升高可能是由于小麦叶中的膜系统还未受到不可逆损伤的情况下, 表现出最敏感, 是植物对胁迫的适应性反应, 但是随着胁迫时间的延长, 小麦叶中氧化损伤加剧, 细胞膜透性增加(图 2), ATP 酶为泵出离子消耗减少, 所以其活性迅速下降。而在添加  $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  SNP 后, 小麦幼苗叶中  $\text{H}^+$ -ATP 酶和  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶活性同样于处理 12 h 时达到最高后缓慢下降, 但在处理 72 h 分别比 PEG 处理的高 12.78% ( $P < 0.05$ ) 和 16.98% ( $P < 0.05$ ), 这表明, 外源 NO 供体 SNP 可促进干旱胁迫下小麦幼苗叶中  $\text{H}^+$ -ATP 酶和  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶活性。

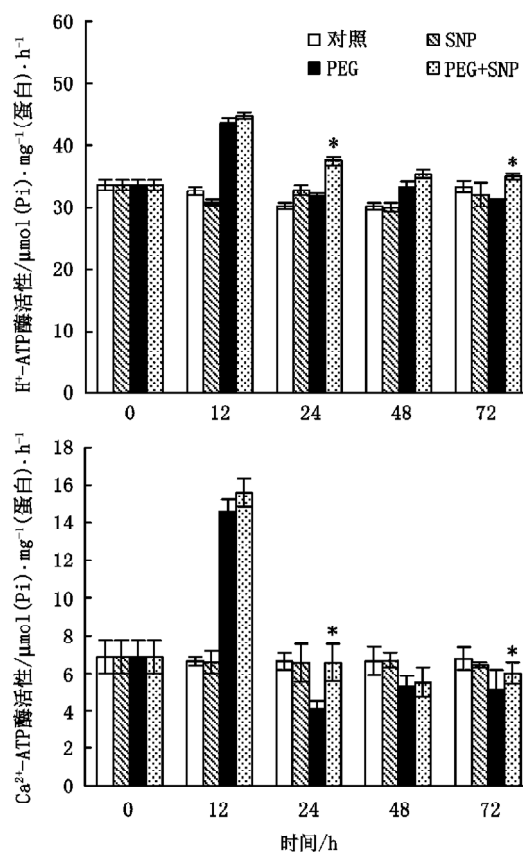


图 1 外源 NO 供体 SNP 对干旱胁迫下小麦幼苗叶中  $\text{H}^+$ -ATP 酶和  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶活性的影响

Fig. 1 Effects of exogenous NO donor SNP on  $\text{H}^+$ -ATPase and  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activities in wheat seedling leaves under drought stress

\* 与 PEG 处理的显著性差异 (\* $P < 0.05$ , Student's *t*-test)。图 2~4 同此。

### 2 外源 NO 供体 SNP 对干旱胁迫下小麦幼苗叶中膜脂过氧化的影响

如图 2 所示, 正常水分条件下, 添加 SNP 后小

麦幼苗叶中TBARS含量和膜透性变化不显著; PEG处理后, 小麦幼苗叶中TBARS含量和质膜相对透性不断增加。此外, 如果外施 SNP 则可缓解干旱胁迫下小麦幼苗叶中 TBARS 含量的升高, 处理 72 h 后比 PEG 处理降低 18.08% ( $P < 0.05$ )。同样, 0.1 mmol·L<sup>-1</sup> SNP 可延缓干旱胁迫下叶中质膜相对透性的增加, 处理 72 h 后比 PEG 处理的降低 11.98% ( $P < 0.05$ )。这表明, 外源 NO 供体 SNP 对于干旱胁迫下小麦幼苗叶中的膜脂过氧化有缓解作用。

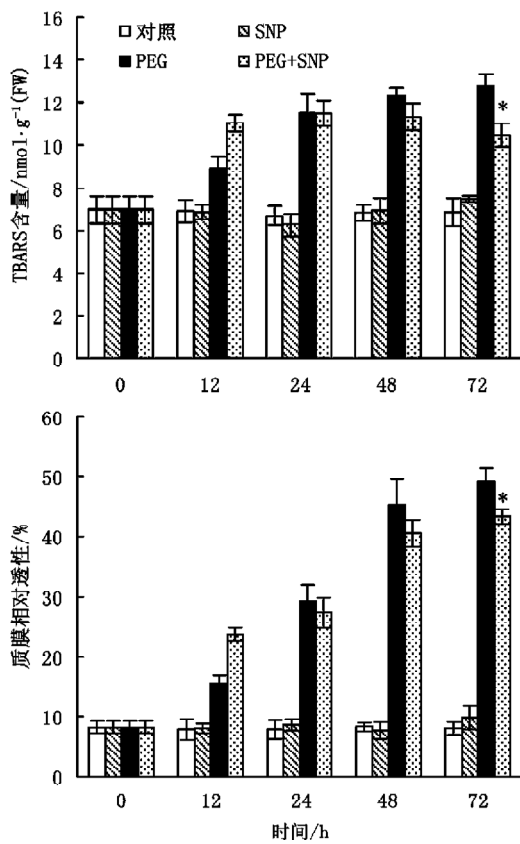


图2 外源 NO 供体 SNP 对干旱胁迫下小麦幼苗叶中 TBARS 含量和膜透性的影响  
Fig.2 Effects of exogenous NO donor SNP on TBARS content and membrane permeability in wheat seedling leaves under drought stress

### 3 外源 NO 供体 SNP 对干旱胁迫下小麦幼苗叶中 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 产生速率和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量的影响

图 3 表明, 15% PEG 促进小麦幼苗叶中 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 的释放, 并在处理后 12 h 达到最高, 其含量升高 56.08% ( $P < 0.01$ ), 叶中 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量也不断提高, 但在时间上稍有后滞性, 处理 72 h 的小麦幼苗叶中 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量提高 73.80% ( $P < 0.01$ ), 达到极显著水平; 添加 SNP 后

干旱胁迫下的小麦幼苗叶中 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 产生速率和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量下降, 处理 72 h 后两者分别比 PEG 处理降低 14.96% ( $P < 0.05$ ) 和 26.13% ( $P < 0.05$ )。这表明, 外源 NO 供体 SNP 可削弱干旱胁迫下小麦幼苗叶中 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 水平和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量, 从而缓解干旱胁迫造成的膜脂过氧化, 对于干旱胁迫下小麦的氧化损伤起保护作用。

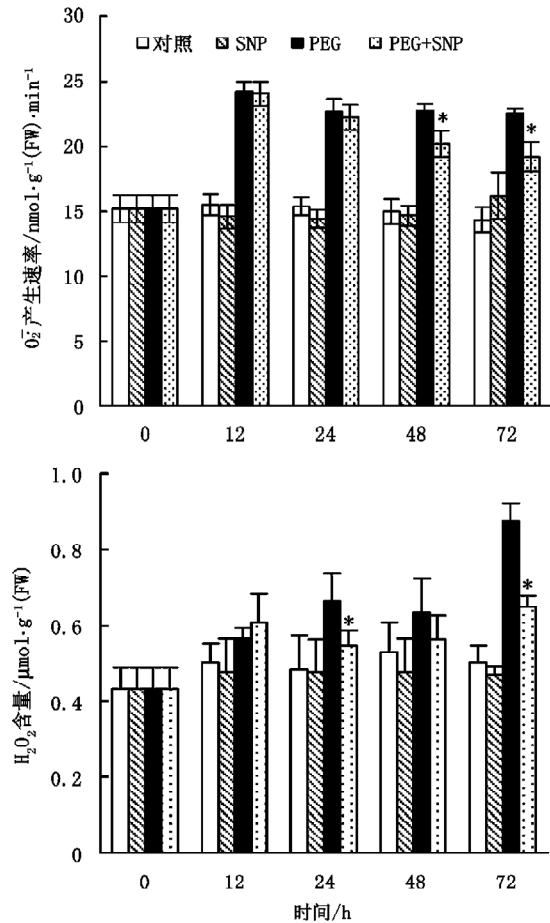


图3 外源 NO 供体 SNP 对干旱胁迫下小麦幼苗叶中 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 产生速率和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量的影响  
Fig.3 Effects of exogenous NO donor SNP on O<sub>2</sub><sup>-</sup> production rate and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content in wheat seedling leaves under drought stress

### 4 外源 NO 供体 SNP 对干旱胁迫下小麦幼苗叶中 SOD、POD 和 CAT 活性的影响

图 4 表明, PEG 处理后小麦幼苗叶中 SOD 活性急剧下降后缓慢回升, 处理 72 h 后高于未作干旱处理的水平; 外施 SNP 的叶中 SOD 活性也是先下降后升高, 但比 PEG 处理的显著提高 30.10% ( $P < 0.05$ ), 这与刘鹏程等(2004)的结果一致。另外, 从图 4 还可看出, PEG 胁迫处理后小麦幼苗叶中 POD

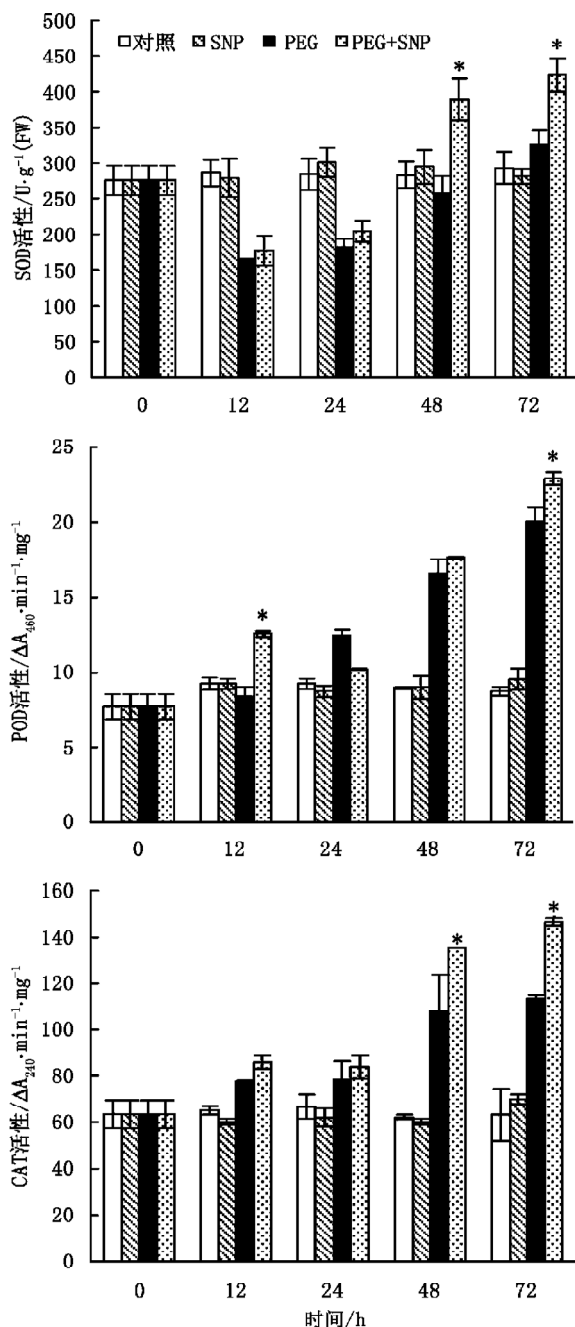


图4 外源NO供体SNP对干旱胁迫下小麦幼苗叶中SOD、POD和CAT活性的影响

Fig.4 Effects of exogenous NO donor SNP on SOD, POD and CAT activities in wheat seedling leaves under drought stress

和CAT活性呈不断上升趋势,处理72 h后分别升高129.46% ( $P<0.01$ )和79.53% ( $P<0.01$ ),而添加SNP则可提高干旱胁迫下的小麦幼苗叶中POD和CAT活性,处理72 h后比PEG处理的分别提高14.11%和29.16% ( $P<0.05$ )。表明外源NO供体SNP可通过提高干旱胁迫下小麦幼苗叶中SOD、

POD和CAT的活性而削弱叶片中 $O_2^-$ 水平和 $H_2O_2$ 含量,从而缓解活性氧自由基对膜的氧化损伤,ATP酶保持较高活性(图1),这可能是ATP酶属于膜结合蛋白,逆境胁迫下生物膜结构以及稳定性发生的变化也同样会影响到ATP酶活性所致(邓林和陈少良2005)。

### 参考文献

- 邓林,陈少良(2005). ATPase与植物抗盐性. 植物学通报, 22 (增刊): 11~21
- 龚月桦,高俊凤(2002). 干旱胁迫下植物膜功能蛋白研究现状. 西北植物学报, 22 (3): 682~692
- 胡章立,李琳,荆家海,焦新之(1993). 水分胁迫对玉米幼叶生长区细胞质膜 $H^+$ -ATPase活性的影响. 植物生理学报, 19 (2): 124~130
- 刘俊,吕波,徐朗莱(2000). 植物叶片中过氧化氢含量测定方法的改进. 生物化学与生物物理进展, 27 (5): 548~551
- 刘鹏程,王辉,程佳强,黄久常(2004). NO对小麦叶片干旱诱导膜脂过氧化的调节效应. 西北植物学报, 24 (1): 141~145
- 阮海华,沈文飏,叶茂炳,徐朗莱(2001). 一氧化氮对盐胁迫下小麦叶片氧化损伤的保护效应. 科学通报, 46 (23): 1993~1997
- 王爱国,罗广华(1990). 植物的超氧化物自由基与羟胺反应的定量关系. 植物生理学通讯, (6): 55~57
- 王宪叶,沈文飏,徐朗莱(2004). 外源一氧化氮对渗透胁迫下小麦幼苗叶片膜脂过氧化的缓解作用. 植物生理与分子生物学学报, 30 (2): 195~200
- 宰学明,钦佩,吴国荣,王光,闫道良(2007). 高温胁迫对花生幼苗光合速率、叶绿素含量、叶绿体 $Ca^{2+}$ -ATPase、 $Mg^{2+}$ -ATPase及 $Ca^{2+}$ 分布的影响. 植物研究, 27 (4): 416~420
- 赵士诚,孙静文,王秀斌,汪洪,梁国庆,周卫(2008). 镉对玉米苗中钙调蛋白含量和 $Ca^{2+}$ -ATPase活性的影响. 植物营养与肥料学报, 14 (2): 264~271
- 赵世杰,许长城,邹琦,孟庆伟(1994). 植物组织中丙二醛测定方法的改进. 植物生理学通讯, 30 (3): 207~210
- Egley GH, Paul RN, Vaughn KC, Duke SO (1983). Role of peroxidase in the development of water-impermeable seed coats in *Sida spinosa* L.. Planta, 157 (3): 224~232
- Garcia-Mata C, Lamattina L (2001). Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress. Plant Physiol, 126 (3): 1196~1204
- Giannopolities CN, Ries SK (1977). Superoxide dismutase. I. Occurrence in higher plants. Plant Physiol, 59: 309~314
- Huang Y, Zhang DH, Zhou JQ (2006). Characterization of ATPase activity of recombinant human Pif1. Acta Biochim Biophys Sin, 38 (5): 335~341
- Neill SJ, Desikan R, Clarke A, Hancock JT (2002). Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signaling in stomatal guard cells. Plant Physiol, 128 (1): 13~16
- Tan JF, Zhao HJ, Hong JP, Han YL, Li H, Zhao WC (2008). Effects of exogenous nitric oxide on photosynthesis, antioxidant capacity and proline accumulation in wheat seedlings subjected to osmotic stress. World J Agr Sci, 4 (3): 307~313
- Zhao ZQ, Zheng HL, Zhu YG (2004). Changes of plasma membrane ATPase activity, membrane potential and transmembrane proton gradient in *Kandelia candel* and *Avicennia marina* seedlings with various salinities. J Environ Sci, 6 (5): 742~745