

研究报告 Original Papers

盐胁迫下小麦幼苗NO和胞间ROS的相互作用及其对元素含量的调节

滕玉瑾¹, 李翠祥¹, 马婷¹, 张丽¹, 姚健¹, 高天鹏², 杨颖丽^{1,*}¹西北师范大学生命科学学院, 兰州730070; ²兰州城市学院化学与环境科学学院, 兰州730070

摘要: 以小麦‘西早3号’为材料, 分析了PTIO (NO清除剂)、过氧化氢酶(CAT, H₂O₂清除剂)和DPI (质膜NADPH氧化酶抑制剂)对NaCl胁迫下小麦幼苗元素含量、根一氧化氮(NO)水平和质外体活性氧(ROS)产生的影响。结果显示, 50和150 mmol·L⁻¹ NaCl均诱导小麦根、叶的Na含量增加而Ca含量减少, 但50 mmol·L⁻¹ NaCl胁迫诱导根K含量减少而叶K含量增多, 根叶K/Na比减少。PTIO、CAT和DPI的加入导致150 mmol·L⁻¹ NaCl胁迫的小麦根Na和Ca含量减少而叶中的含量增多; PTIO和CAT处理增加根K量而DPI降低其含量, 这三种试剂均增加150 mmol·L⁻¹ NaCl胁迫下幼苗叶K含量。进一步研究发现, 根的NO荧光强度在150 mmol·L⁻¹ NaCl胁迫下显著增强, 50 mmol·L⁻¹ NaCl胁迫的根中一氧化氮合酶(NOS)类似蛋白活性降低约19%, 而150 mmol·L⁻¹ NaCl胁迫诱导酶活性升高约30%。PTIO或CAT减弱了150 mmol·L⁻¹ NaCl胁迫下根的NO荧光, 却刺激了NOS类似蛋白活性, 而NaCl+DPI处理诱导小麦根最大的NO荧光强度和最高的NOS类似蛋白活性。此外, NaCl胁迫的根质外体H₂O₂、O₂⁻和·OH含量增加。与150 mmol·L⁻¹ NaCl单独胁迫相比, 添加PTIO可减少根质外体H₂O₂和O₂⁻含量, 却增加·OH含量, 添加CAT只提高了质外体O₂⁻含量, 而DPI的加入使根质外体H₂O₂和·OH增加而O₂⁻减少。这表明, 不同的盐浓度使小麦幼苗对Na、K和Ca吸收发生了变化; 盐胁迫促进小麦根NO及质外体ROS的积累, 它们之间相互影响, 可能共同调控植物在盐胁迫响应过程中根对Na、K和Ca的吸收及其向地上部分的转运。

关键词: NO; ROS; 小麦幼苗; 元素含量; 盐胁迫

Interaction of Nitric Oxide and Apoplastic Reactive Oxygen Species Associated With Regulation of Element Contents in Wheat Seedlings under Salt Stress

TENG Yu-Jin¹, LI Cui-Xiang¹, MA Ting¹, ZHANG Li¹, YAO Jian¹, GAO Tian-Peng², YANG Ying-Li^{1,*}¹College of Life Sciences, Northwest Normal University, Lanzhou 730070, China; ²College of Chemistry and Environmental Science, Lanzhou City University, Lanzhou 730070, China

Abstract: Wheat seedlings were used to investigate the changes of element, nitric oxide (NO) and apoplastic reactive oxygen species (ROS) contents in response to NaCl treatment with or without 2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazole-3-oxide-1-oxyl (PTIO), catalase (CAT) or diphenylene iodonium (DPI). All NaCl concentrations resulted in the increase of Na content and the decrease of Ca level in roots and leaves; differently, the amount of K reduced in roots but elevated in leaves only in 50 mmol·L⁻¹ NaCl-stressed seedlings. In comparison with 150 mmol·L⁻¹ NaCl treatment alone, the presence of PTIO, CAT or DPI decreased root Na and Ca contents but increased these two parameters in leaves in salinity-stressed seedlings. In contrast, K content rose in response to NaCl treatment together with PTIO or CAT but lowered to NaCl+DPI in roots, and K level increased in leaves in the presence of these three reagents. Moreover, NO fluorescence in roots increased in response to salinity, which could be reversed by PTIO or CAT. The activity of nitric oxide synthase (NOS)-like proteins decreased about 19% in 50 mmol·L⁻¹ NaCl-stressed roots but increased about 30% due to 150 mmol·L⁻¹ NaCl, which could be further stimulated by PTIO or CAT. However, the maximum increase of NO fluorescence and the highest activity of NOS-like proteins were found in NaCl+DPI-treated roots. Apoplastic hydrogen peroxide (H₂O₂), superoxide anion (O₂⁻) and hydroxyl radical (·OH) levels significantly rose in salinity-treated roots. Compared with 150 mmol·L⁻¹ NaCl stress alone, NaCl+PTIO led to the decreases of H₂O₂ and O₂⁻ contents along with the increase of ·OH level in the apoplast of wheat roots, NaCl stress in combination with CAT

收稿 2015-03-30 修定 2015-10-02

资助 国家自然科学基金(31470464、31360094和31160118)。

* 通讯作者(E-mail: yangyingli2006@sohu.com; Tel: 0931-7971575)。

further increased apoplastic O_2^- content. In addition, the highest amount of H_2O_2 and $\cdot OH$ together with the lowest level of O_2^- was observed in the apoplast of NaCl+DPI-stressed roots. Taken together, different NaCl concentrations caused the changes of Na, K and Ca absorption in wheat seedlings. Here, it was also suggested that the accumulation of NO and the increase of apoplastic ROS induced by salinity interacted each other and both of them might be associated with the regulation of Na, K and Ca absorption as well as the translocation of these elements to aboveground plant parts in wheat seedlings under NaCl treatment.

Key words: nitric oxide; reactive oxygen species; wheat seedlings; element contents; salt stress

盐分是影响植物生长发育的主要环境胁迫因子之一(李彦等2008)。盐胁迫能打破植物的营养平衡,抑制植物对离子的吸收和转运,造成细胞内离子紊乱,进而导致膜完整性的破坏和某些酶功能的丧失(Lu等2002)。据文献报道,NaCl胁迫诱导植物体内积累大量的 Na^+ ,高浓度的 Na^+ 既产生离子毒害作用,又发挥着渗透调节作用(Faleiros等2010)。陈晓亚和薛红卫(2012)认为,盐分过多破坏 Na^+ 的平衡,抑制 K^+ 的吸收并造成植物缺乏必需的大量元素K,使 Ca^{2+} 的吸收也有所下降。 K^+ 作为细胞内主要的渗透调节物质之一,其累积过程参与了细胞对胁迫的适应(Higgins等1987)。 Ca^{2+} 作为第二信使,能有效地抵御 Na^+ 的毒害作用(Tester和Davenport 2003),同时促进 K^+ 在植物体内的吸收,维持植物矿物离子平衡(Cachorro等1994)。

一氧化氮(nitric oxide, NO)是参与许多植物生理过程的关键因素或信号分子,涉及植物对非生物胁迫的应答反应(De Michele等2009)。刘建新等(2008)研究发现,外源NO能显著降低盐胁迫下黑麦草幼苗根尖Na含量,提高K含量,从而使K/Na比提高,增强植物的抗盐性。在胡杨愈伤组织中,外源NO诱导提高了愈伤组织的K/Na比和耐盐能力(Zhang等2007)。一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)可催化精氨酸合成NO,与植物体内源NO的产生有关。Zhao等(2007)以野生型拟南芥为材料,研究发现盐胁迫下拟南芥内源NO含量随着NOS活性的抑制而降低,进而导致K/Na比降低。活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生是植物对盐胁迫响应的主要反应之一。质外体作为植物感受和响应生物或非生物信号的最初防线,是植物体ROS产生的主要场所。例如,盐胁迫诱导质外体ROS [包括过氧化氢(hydrogen peroxide, H_2O_2)、超氧阴离子(superoxide anion, O_2^-)和羟自由基(hydroxyl radical, $\cdot OH$)]的产生,并调节质外体抗氧化酶水平(Hernández等2001)。王瑞刚(2007)的

研究表明,盐诱导群众杨质外体中 O_2^- 和 H_2O_2 大量产生,而抗氧化酶的活性不足以有效控制ROS的伤害,从而使叶片出现了伤害症状。更为重要的是,胞间产生的ROS能通过质膜进入胞质,作为重要的信号分子参与细胞生命过程的调节(周丛义等2010)。因此,质外体及其ROS的产生受到越来越多研究者的关注。

到目前为止,有许多的研究关注盐胁迫下植物生理变化及胁迫应答,但植物的抗盐机理仍不清楚。本实验以小麦‘西旱3号’为材料,利用试剂2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-3-oxide-1-oxyl (PTIO)、过氧化氢酶(catalase, CAT)和diphenylene iodonium (DPI)分析内源性NO的产生、胞间 H_2O_2 水平及质膜NADPH氧化酶与小麦在盐胁迫响应过程中元素含量变化之间的关系,分析NO的产生与胞间 H_2O_2 积累之间的关系,期为揭示植物的耐盐机理提供理论依据。

材料与方法

1 植物材料的培养及处理

小麦‘西旱3号’(*Triticum aestivum* L., cv Xihan 3)种子购自甘肃省农业大学干旱作物育种实验室。将籽粒饱满的种子用0.1%氯化汞($HgCl_2$)表面消毒10 min,流水冲洗10 h后,黑暗中萌发24 h。挑选萌发一致的种子置于 $(24\pm 2)^\circ C$ 、12 h/12 h(光照/黑暗)和 $300 \mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ 的光照培养箱中培养,分别用含有 $50 mmol \cdot L^{-1}$ NaCl、 $150 mmol \cdot L^{-1}$ NaCl、 $150 mmol \cdot L^{-1}$ NaCl+ $250 \mu mol \cdot L^{-1}$ PTIO、 $150 mmol \cdot L^{-1}$ NaCl+ $500 U \cdot L^{-1}$ CAT和 $150 mmol \cdot L^{-1}$ NaCl+ $10 \mu mol \cdot L^{-1}$ DPI的1/4Hoagland营养液胁迫处理小麦幼苗,同时设置1/4Hoagland营养液为对照,每处理3个重复。每隔2 d更换处理液,6 d后取小麦的根和叶测定各个生理指标。

2 Na、K和Ca含量测定

小麦幼苗根和叶中元素含量的测定参照

Achary等(2008)的方法, 略有改动。将植物材料用去离子水清洗干净后在80 °C烘箱中烘干至恒重, 取干样品加入12 mL硝酸(HNO₃)、4 mL氢氟酸和4 mL H₂O₂ 溶解并置于微波消解罐中消解2.5 h, 冷却后的样品转移至坩埚中蒸干, 将残余的部分用1 mol·L⁻¹ HNO₃溶解并定容到100 mL容量瓶, 用原子吸收分光光度计(WFX-210)测定Na、K和Ca的含量。

3 NO荧光检测

使用NO探针二氨基荧光素双乙酸钠(DAF-FM DA, Sigma)对内源NO含量进行检测。小麦根在含10 μmol·L⁻¹ DAF-FM DA的溶液中孵育20 min, 用磷酸缓冲液(PBS, pH 7.4)将残留的DAF-FM DA冲洗干净。在装有红光滤光片(激发光: 450~490 nm, 发射光: 500~530 nm)的Leica MPS60荧光显微镜下获取荧光图片。

4 NOS类似蛋白活性测定

NOS类似蛋白活性的检测参照王芳妹(2012)的方法。取1 g新鲜小麦根加入50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl [pH 7.5, 含0.5 mmol·L⁻¹ 乙二胺四乙酸(EDTA)、7 mmol·L⁻¹ 还原性谷胱甘肽、0.2 mmol·L⁻¹ 苯甲基磺酰氟]研磨, 6 882×g离心30 min, 上清液即为酶提取物。参照氧合血红蛋白捕捉法(Murphy和Noack 1994), 立即用100 U CAT和100 U超氧化物歧化酶孵育酶提取物5 min, 除去影响测量的内源活性氧。加入氧合血红蛋白至终浓度为10 μmol·L⁻¹, 37 °C孵育5 min, 在401和421 nm处测定光吸收值以计算酶活性。

5 蛋白含量的检测

蛋白含量的检测参照Bradford (1976)的方法, 在波长595 nm处测定光吸收值, 并以牛血清白蛋白为标准计算蛋白含量。

6 质外体H₂O₂、O₂⁻和·OH含量检测

质外体流体的提取参考Córdoba-Pedregosa等(2005)的方法, 略有改动。取1 g小麦根浸于10 mmol·L⁻¹ PBS (pH 6.0, 含有1% 聚乙烯吡咯烷酮、1 mmol·L⁻¹ EDTA), 用真空泵抽滤40 min, 使溶液充满质外体。用滤纸吸干表面液体后装入大小适宜的离心管, 放入10 mL离心管内, 在12 000×g离心10 min, 收集流出的液体备用。

H₂O₂含量检测参照Sergiev等(1997)的方法, 取质外体液并加入1 mol·L⁻¹ 碘化钾和10 mmol·L⁻¹ PBS (pH 7.0), 在390 nm下测定溶液的吸光值。

O₂⁻的检测参照Achary等(2012)的方法, 将质外体液加入50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl缓冲液[pH 6.4, 内含250 mmol·L⁻¹ 蔗糖、0.2 mmol·L⁻¹ 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)和0.2 mmol·L⁻¹ 氮蓝四唑], 光照后在530 nm测定反应液的吸光值。

·OH的检测参照Halliwell等(1987)的方法, 将质外体液置于37 °C条件下孵育2 h后, 加入硫代巴比妥酸沸水浴30 min, 冷却后测定OD₅₃₂。

7 数据分析

每个处理均设3个重复(n=3), 结果用平均值±标准误(SE)表示, 实验数据用SPSS 17.0进行统计分析, P<0.05表示有显著性差异。

实验结果

1 不同处理诱导小麦幼苗根、叶Na和K含量的变化

如表1所示, 随着NaCl浓度升高, 小麦根中Na含量显著增加, 其中150 mmol·L⁻¹ NaCl处理使其含量增至对照的3.4倍。与150 mmol·L⁻¹ NaCl处理相比, NaCl+PTIO处理使根中Na含量显著降低, NaCl+CAT略微提高了根中Na含量, 而NaCl+DPI处理

表1 不同处理下小麦幼苗根中Na和K含量的变化

Table 1 Changes of Na and K contents in wheat roots under different treatments

处理	Na含量/μg·g ⁻¹ (DW)	K含量/μg·g ⁻¹ (DW)	K/Na比
对照	276.77±14.17 ^d	787.47±27.26 ^b	2.85 ^a
50 mmol·L ⁻¹ NaCl	907.50±2.78 ^b	664.96±8.54 ^c	0.73 ^c
150 mmol·L ⁻¹ NaCl	952.35±2.68 ^a	867.07±41.08 ^b	0.91 ^d
150 mmol·L ⁻¹ NaCl+PTIO	916.82±2.84 ^b	1 054.46±51.70 ^a	1.15 ^b
150 mmol·L ⁻¹ NaCl+CAT	964.63±3.31 ^a	976.31±25.82 ^a	1.01 ^c
150 mmol·L ⁻¹ NaCl+DPI	742.67±6.72 ^c	490.85±6.80 ^d	0.66 ^f

数据为平均数±标准误(n=3)。同列不同小写字母表示不同处理间差异显著(P<0.05)。下表同此。

使根中Na含量显著降低约22%。与对照相比, 50 mmol·L⁻¹ NaCl使小麦根中K含量降低约16%, 而150 mmol·L⁻¹ NaCl处理增加了根中K含量, 但差异不明显。与150 mmol·L⁻¹ NaCl处理相比, 添加PTIO或CAT使NaCl处理根中K含量分别提高约22%和13%, 但DPI的加入使根中K含量降到最低。进一步分析显示, 50和150 mmol·L⁻¹ NaCl处理根中K/Na比值较对照分别减小约74%和68%, PTIO或CAT的加入使盐处理根中K/Na比值增大, 而NaCl+DPI处理导致根K/Na比降到最小。

与对照相比, 小麦叶片中Na含量随着NaCl处理浓度的增大而增加, 但含量总低于根(表2)。

PTIO、CAT或DPI的加入使叶中Na含量较150 mmol·L⁻¹ NaCl单独处理分别增加约35%、32%和23%, 差异均达到显著水平($P<0.05$)。与根中变化情况不同, 50 mmol·L⁻¹ NaCl处理下叶片K含量显著高于对照, 150 mmol·L⁻¹ NaCl对叶中K含量无明显影响。CAT或DPI的加入不同程度增加了K含量, 而PTIO的使用对K含量没有明显影响。此外, 小麦叶中K/Na比随着盐处理浓度的增加而降低(表2)。与根中变化趋势恰好相反, NaCl+PTIO或NaCl+CAT处理使叶中K/Na比低于单独盐处理, 而NaCl+DPI处理使K/Na比值较150 mmol·L⁻¹ NaCl处理升高。

表2 不同处理下小麦幼苗叶中Na和K含量的变化

Table 2 Changes of Na and K contents in wheat leaves under different treatments

处理	Na含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW)	K含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW)	K/Na比
对照	40.50±6.76 ^c	1 636.77±49.09 ^d	40.41 ^a
50 mmol·L ⁻¹ NaCl	418.95±9.07 ^d	1 749.82±22.81 ^e	4.18 ^b
150 mmol·L ⁻¹ NaCl	671.18±26.32 ^e	1 582.99±34.70 ^d	2.36 ^d
150 mmol·L ⁻¹ NaCl+PTIO	903.68±6.20 ^a	1 646.23±29.38 ^d	1.82 ^f
150 mmol·L ⁻¹ NaCl+CAT	888.01±16.79 ^a	1 891.53±16.38 ^b	2.13 ^e
150 mmol·L ⁻¹ NaCl+DPI	826.75±5.27 ^b	2 270.41±32.03 ^a	2.75 ^c

2 不同处理诱导小麦幼苗根和叶Ca含量的变化

从表3可以看出, 50 mmol·L⁻¹ NaCl诱导小麦根Ca含量减少, 但与对照比差异不明显; 而150 mmol·L⁻¹ NaCl处理使Ca含量较对照减少约23%。PTIO、CAT或DPI的加入使小麦根Ca含量较150 mmol·L⁻¹ NaCl单独处理分别下降约29%、21%和34%, 差异均达到显著水平($P<0.05$)。相似地, 50和150 mmol·L⁻¹ NaCl处理使小麦叶Ca含量较对照分

别减少约24%和75%, 差异均达到显著水平($P<0.05$); 但外源PTIO、CAT或DPI的加入诱导150 mmol·L⁻¹ NaCl处理的幼苗叶Ca含量明显增加。

3 小麦幼苗根尖NO荧光检测

小麦根经探针DAF-FM DA孵育, 在Leica MPS60荧光显微镜下检测NO荧光。未经NaCl处理的根中检测到较弱的NO荧光信号(图1-A和G)。随着NaCl处理浓度的升高, 小麦根中NO的荧光强度呈增强趋势(图1-B、C和G), 且150 mmol·L⁻¹ NaCl处理使小麦幼苗根NO荧光强度较对照显著提高约33% (图1-G)。与150 mmol·L⁻¹ NaCl单独处理相比, NaCl+PTIO或NaCl+CAT处理使小麦根尖NO荧光强度减弱(图1-D、E和G), 而NaCl+DPI处理的小麦根NO荧光最强, 与单独盐处理相比提高约84% (图1-F和G), 表明根中积累了较多的NO。

4 不同处理诱导小麦幼苗根NOS活性的变化

如图2所示, 与对照相比, 50 mmol·L⁻¹ NaCl处理使小麦幼苗根NOS类似蛋白活性降低了19%, 而150 mmol·L⁻¹ NaCl使酶活性提高约30%。PTIO、

表3 不同处理下小麦幼苗根、叶中Ca含量的变化

Table 3 Changes of Ca content in roots and leaves of wheat seedlings under different treatments

处理	Ca含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW)	
	根	叶
对照	1 743.99±10.32 ^a	2 473.54±27.60 ^a
50 mmol·L ⁻¹ NaCl	1 674.77±14.80 ^a	1 878.71±56.18 ^b
150 mmol·L ⁻¹ NaCl	1 349.91±44.87 ^b	615.16±14.91 ^e
150 mmol·L ⁻¹ NaCl+PTIO	956.62±36.98 ^{cd}	923.19±46.28 ^{cd}
150 mmol·L ⁻¹ NaCl+CAT	1 072.91±14.74 ^c	857.22±36.70 ^d
150 mmol·L ⁻¹ NaCl+DPI	895.68±20.35 ^d	1 035.79±13.02 ^c

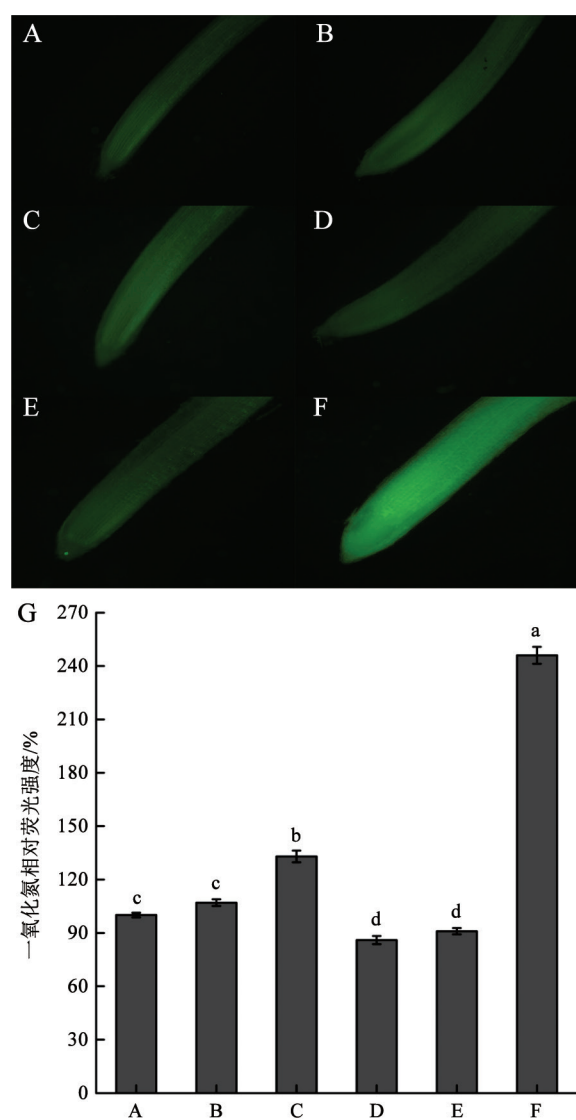


图1 不同处理对小麦幼苗根NO产生的影响
Fig.1 Effects of different treatments on NO production in wheat roots

G中平均相对DAF-FM DA荧光密度以对照作为100%, 分别对应于图A~F。数据为平均数±标准误($n=3$), 不同小写字母表示不同处理间差异显著($P<0.05$)。A: 对照; B: 50 mmol·L⁻¹ NaCl; C: 150 mmol·L⁻¹ NaCl; D: NaCl+PTIO; E: NaCl+CAT; F: NaCl+DPI。图2同此。

CAT或DPI的加入进一步增强了150 mmol·L⁻¹ NaCl处理下NOS类似蛋白活性, 其中NaCl+DPI处理的小麦根NOS类似蛋白活性最强, 为单独盐处理下该酶活性的2.19倍。

5 不同处理诱导小麦幼苗根质外体H₂O₂、O₂⁻及·OH含量的变化

如表4所示, 50和150 mmol·L⁻¹ NaCl处理后小

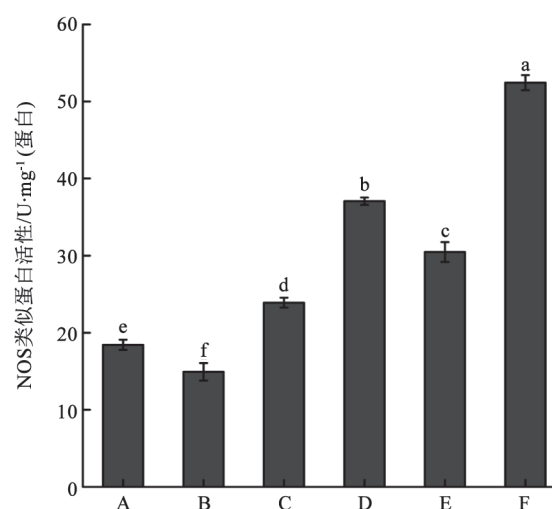


图2 不同处理对小麦幼苗根NOS类似蛋白活性的影响
Fig.2 Effects of different treatments on the activity of NOS-like proteins in wheat roots

麦幼苗根质外体H₂O₂含量较对照提高约31%和59%。与150 mmol·L⁻¹ NaCl单独处理相比, NaCl+PTIO处理使根质外体H₂O₂含量降低, NaCl+CAT处理使H₂O₂含量略有增加, 但差异未达到显著水平($P<0.05$), 而NaCl+DPI处理的根中质外体H₂O₂含量最高。

盐胁迫也引起了小麦幼苗根质外体O₂⁻显著积累(表4)。与150 mmol·L⁻¹ NaCl单独处理相比, NaCl+PTIO使根质外体O₂⁻含量降低约35%, NaCl+CAT使小麦根质外体O₂⁻含量显著增加, 但DPI的加入使NaCl处理根质外体O₂⁻含量降低约67%, 差异达到显著水平($P<0.05$)。

50和150 mmol·L⁻¹ NaCl诱导小麦根质外体·OH的产生分别增加为对照的141%和189% (表4)。与150 mmol·L⁻¹ NaCl单独处理相比, NaCl+PTIO和NaCl+DPI处理诱导小麦根中·OH增加约32%和42%, 差异均达到显著水平($P<0.05$), 而NaCl+CAT处理对小麦根质外体·OH含量无明显影响。

讨 论

植物细胞内的离子平衡与其对盐分的适应密切相关(Zhang等2007)。盐胁迫可导致植物细胞内离子紊乱, 影响Na、K、Ca等元素在胞内的分布, 破坏植物的营养平衡(陈晓亚和薛红卫2012)。王艳青等(2001)发现, 刺槐体内Na⁺含量随环境Na⁺浓

表4 不同处理下小麦幼苗根质外体H₂O₂、O₂⁻及·OH含量的变化Table 4 Changes of apoplastic H₂O₂, O₂⁻ and ·OH contents in wheat roots under different treatments

处理	H ₂ O ₂ 含量/ng·g ⁻¹ (FW)	O ₂ ⁻ 含量/μmol·g ⁻¹ (FW)	·OH含量/nmol·g ⁻¹ (FW)
对照	93.54±2.44 ^e	1.10±0.03 ^e	6.99±0.22 ^d
50 mmol·L ⁻¹ NaCl	122.16±3.59 ^d	1.25±0.04 ^d	9.83±0.30 ^c
150 mmol·L ⁻¹ NaCl	149.02±5.19 ^b	2.12±0.04 ^b	13.18±0.65 ^b
150 mmol·L ⁻¹ NaCl+PTIO	135.30±3.60 ^c	1.38±0.04 ^c	17.44±1.38 ^a
150 mmol·L ⁻¹ NaCl+CAT	151.33±1.13 ^b	2.27±0.05 ^a	11.54±0.11 ^{bc}
150 mmol·L ⁻¹ NaCl+DPI	163.31±2.68 ^a	0.70±0.03 ^f	18.69±0.24 ^a

度的增加而上升,且根部的含量较高。殷立娟等(1993)的研究表明,随着土壤盐量或Na⁺增加,进入羊草体内的Na⁺主要积累在根、老叶及分蘖芽等器官,以增加细胞溶质浓度。与这些研究相似,我们在本实验中观察到,盐胁迫诱导小麦根、叶Na含量增加,且根中Na的积累高于叶片。这些表明植物吸收的Na较多地积累在根部,可能因此而减少了叶片中Na的积累,减弱盐对地上部分的伤害。K是植物必须的元素之一,在细胞的生长及代谢中发挥着重要的作用。盐处理的植物细胞胞质需保持足够的K和有利的K/Na比,以避免细胞损伤和营养缺乏(王晓冬等2011)。本实验中,低浓度的NaCl诱导小麦根K含量降低而叶K含量升高,但高浓度的盐对小麦根叶中的K量无明显影响,表明小麦幼苗在低盐环境中有能力转运较多的K进入地上部分,以维持渗透平衡。有研究者认为,耐盐植物可选择性地向叶运输更多的K,以维持较高的K/Na来进行渗透调节,从而提高耐盐性(彭云玲等2014)。然而,NaCl处理导致小麦根、叶K/Na比值显著减小,且盐浓度越高该比值越低(表1和2)。这可能是盐对小麦幼苗造成伤害的主要原因之一,因为盐胁迫诱导植物K吸收减少而Na吸收增加,组织中K/Na比明显下降,导致生长受到抑制(Botella等1997)。此外,Ca作为第二信使参与植物逆境胁迫响应机制的研究受到普遍关注。据文献报道,黄瓜根、叶和构树全株Ca²⁺含量随着NaCl浓度升高而下降(El-Baz等2003;杨帆等2009)。与此相似,本实验中盐胁迫抑制小麦幼苗对Ca的吸收,且盐浓度越高,抑制效应越强。Chen等(2007)认为适量增加Ca²⁺可以增强植物对盐胁迫的响应,减轻盐胁迫对植物的伤害。因此,小麦Ca量的减少可能是盐胁迫造成伤害的原因之一。

NO作为一种普遍存在于生物体胞内和胞间的信使分子,参与植物对各种生物和非生物胁迫应答的信息传递(Qiao和Fan 2008)。植物根尖是NO的主要合成部分(侯丽霞等2010)。本实验中,盐处理的小麦根尖NO荧光强度较对照增强,说明盐诱导了NO的产生。植物内源NO的产生与多种途径有关,包括NOS、硝酸还原酶催化合成途径及其他非酶促合成途径(Palavan-Unsal和Arisan 2009; Wendehenne等2001)。Zhao等(2007)的研究显示,拟南芥NOS活性随着NaCl浓度的增加而降低。与拟南芥的反应不同,低浓度的盐诱导小麦幼苗根NOS类似蛋白活性降低,而150 mmol·L⁻¹ NaCl使酶活性增强(图2),表明NOS类似蛋白活性可能参与了高盐诱导的小麦根NO的积累。PTIO能够与NO相互作用产生NO₂以清除NO的作用(Mitaka等1997)。进一步研究发现,PTIO导致盐处理小麦根NO荧光强度减弱,却使NOS类似蛋白活性增强。Zhao等(2004)的研究中也有相似结果,PTIO减少芦苇愈伤组织NO的含量,而使NOS活性增强。CAT是一种H₂O₂清除剂,但不易透过细胞膜(Zhang等2010)。DPI是一种NADPH氧化酶特异抑制剂(Jakubowska等2015)。我们在本实验中观察到,CAT的加入也导致盐处理小麦根NO荧光强度减弱和NOS类似蛋白的活性增强,而DPI+NaCl处理下小麦根NO含量和NOS类似蛋白活性均达到最大。这些结果表明在盐胁迫的小麦根中,NOS类似蛋白可能不是NO产生的唯一来源,且类似蛋白活性可能受NO及胞间ROS的调节。

质外体由细胞壁及其间隙的液相和气相空间组成,具有保持细胞形状、进行水分等物质运输、防御病原侵入等功能(张峰等2008)。质外体ROS的产生与积累可能是植物对非生物胁迫的反

应。例如, 盐胁迫可导致群众杨质外体中 O_2^- 和 H_2O_2 的积累(王瑞刚2007)。本研究结果显示, 盐胁迫诱导小麦根质外体 H_2O_2 、 O_3^- 和 $\cdot OH$ 显著积累。质膜NADPH氧化酶以NADPH为电子供体催化分子氧的单电子还原产生 O_2^- , 随后被超氧化物歧化酶转变成 H_2O_2 , 参与了质外体中 H_2O_2 的产生(Park和Doke 2005)。Zhang等(2007)研究表明, 盐胁迫下产生的NO可以作为第二信使通过介导质膜NADPH氧化酶的表达以诱导 H_2O_2 的产生。本实验可能支持Zhang等(2007)的研究, 因为PTIO对NaCl处理的小麦根NO的清除伴随着胞间 H_2O_2 和 O_3^- 的减少及 $\cdot OH$ 的增加。此外, CAT的加入对盐诱导的胞间 H_2O_2 和 $\cdot OH$ 的产生无明显影响, 却使胞间 O_3^- 的产生增多; 而DPI对NADPH氧化酶的抑制只减少了 $150\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl处理根胞间 O_3^- 的产生, 却增加了胞间 H_2O_2 和 $\cdot OH$ 的含量。由这些结果可以推测, 盐诱导小麦根NO的产生可能参与了胞间ROS水平的调节, 但胞间ROS水平的维持是复杂的, 可能与其产生的酶的种类繁多、产生过程调控复杂有关。

已有的研究证明, NO和ROS作为信号分子参与植物离子水平的调节。有文献报道, NaCl诱导芦苇愈伤组织中离子的转运受NO和质膜NADPH氧化酶产生的 H_2O_2 调控(Zhao等2004)。另据报道, 质膜NADPH氧化酶内源性 H_2O_2 的产生作为信号分子, 激活质膜 Na^+/H^+ 转运蛋白的表达, 进而调节盐诱导的拟南芥的离子转运(Li等2013)。我们在本实验中观察到, PTIO和CAT诱导 $150\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl处理小麦根Na和Ca含量显著减少, 而叶中这两种元素含量增多, 暗示盐处理下小麦根NO和胞间 H_2O_2 的产生可能减弱了根吸收的Na和Ca向植物地上部分的转运, 因此防止叶中Na的过度积累而造成伤害, 也导致吸收的Ca积聚在根中以缓解根的盐害。与本研究结果相似, 外源NO可能通过减少根系对 Na^+ 的吸收和向上运输来降低番茄幼苗叶片中 Na^+ 的含量, 以减弱离子毒害作用(孙德智等2014)。Chen等(2013)的研究表明, NO通过减少胞质 K^+ 的流失, 提高 K^+ 的吸收来增加盐处理红树植物的K量。然而, Xia等(2014)研究发现, NO在拟南芥减少AKT1介导的K吸收。本实验中, PTIO导致 $150\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl处理的根中K量增多而叶K量无

显著变化, 表明根NO的产生可能参与调节盐处理抑制根对K的吸收作用, 但不影响根K向地上部分的转运。CAT的加入进一步提高了盐处理小麦根、叶中的K量, 表明盐处理小麦根胞间 H_2O_2 的产生即限制了根对K的吸收又减弱了K向植物地上部分的转运。此外, DPI导致 $150\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl处理根中Na、K和Ca的含量降到最小(表1和3), 这可能与这些元素向地上部分的转运有关, 因为NaCl+DPI处理的小麦叶中3种元素的含量与单独NaCl处理相比极显著增高(表2)。同时, 这些结果也说明质膜NADPH氧化酶ROS的产生参与了植物在盐胁迫响应过程中根对Na、K和Ca的吸收及其向地上部分转运的调节。PTIO和CAT导致盐处理小麦根K/Na比增大, 叶的比值减小, 而DPI对根、叶K/Na比值的效应相反。

总之, NaCl处理诱导小麦根、叶Na含量增多而Ca含量降低, 只有 $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl处理导致根K含量减少而叶K量增多。此外, 盐胁迫促进了小麦根NO及质外体ROS的积累, 它们之间相互影响, 可能共同调控植物在盐胁迫响应过程中根对Na、K和Ca的吸收及这些元素向地上部分的转运。

参考文献

- 陈晓亚, 薛红卫(2012). 植物生理与分子生物学. 第4版. 北京: 高等教育出版社
- 侯丽霞, 车永梅, 赵方贵, 唐静, 刘新(2010). NO参与玉米幼苗对盐胁迫的应答. 植物生理学通讯, 46 (6): 549-554
- 李彦, 张英鹏, 孙明, 高弼模(2008). 盐分胁迫对植物的影响及植物耐盐机理研究进展. 中国农学通报, 24 (1): 258-265
- 刘建新, 胡浩斌, 王鑫(2008). 外源NO对盐胁迫下黑麦草幼苗根生长抑制和氧化损伤的缓解效应. 植物研究, 28 (1): 7-13
- 彭云玲, 保杰, 叶龙山, 王永健, 燕利斌(2014). NaCl胁迫对不同耐盐性玉米自交系萌动种子和幼苗离子稳态的影响. 生态学报, 34 (24): 7320-7328
- 孙德智, 杨恒山, 彭靖, 范富, 马玉露, 韩晓日(2014). 外源SA和NO对NaCl胁迫下番茄幼苗生长、光合及离子分布的影响. 生态学报, 34 (13): 3519-3528
- 王芳妹(2012). 大豆铝毒胁迫响应的一氧化氮信号调控机理[硕士论文]. 浙江金华: 浙江师范大学
- 王瑞刚(2007). 盐诱导氧化胁迫与杨树耐盐性研究[博士论文]. 北京: 北京林业大学
- 王晓冬, 王成, 马智宏, 侯瑞锋, 高权, 陈泉(2011). 短期NaCl胁迫对不同小麦品种幼苗 K^+ 吸收和 Na^+ 、 K^+ 积累的影响. 生态学报, 31 (10): 2822-2830

- 王艳青, 蒋湘宁, 李悦, 周晓阳, 曾端香, 周金池(2001). 盐胁迫对刺槐不同组织及细胞离子吸收和分配的变化. 北京林业大学学报, 23 (1): 18~23
- 杨帆, 丁菲, 杜天真(2009). 盐胁迫下构树幼苗各器官中 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Na^+ 和Cl含量分布及吸收特征. 应用生态学报, 20 (4): 767~772
- 殷立娟, 石德成, 王萍(1993). 盐碱化草地羊草生长的适应性与耐盐渗透调节. 植物学报, 35 (8): 619~625
- 张峰, 蔡宇杰, 廖祥儒, 刘尚, 王臻, 张大兵(2008). 一种具有热滞活性的女贞叶质体外过氧化物酶. 植物生理学通讯, 44 (1): 45~50
- 周丛义, 吴国利, 段壮芹, 吴丽丽, 高永生, 陈坤明(2010). H_2O_2 -NOX系统: 一种植物体内重要的发育调控与胁迫响应机制. 植物学报, 45 (5): 615~631
- Achary VMM, Jena S, Panda KK, Panda BB (2008). Aluminium induced oxidative stress and DNA damage in root cells of *Allium cepa* L. Ecotox Environ Saf, 70: 300~310
- Achary VMM, Patnaik AR, Panda BB (2012). Oxidative biomarkers in leaf tissue of barley seedlings in response to aluminum stress. Ecotox Environ Saf, 75 (1): 16~26
- Botella MA, Martinez V, Pardines J, Cerdá A (1997). Salinity induced potassium deficiency in maize plants. J Plant Physiol, 150: 200~205
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, 72: 248~254
- Cachorro P, Ortiz A, Cerdá A (1994). Implications of calcium nutrition on the response of *Phaseolus vulgaris* L. to salinity. Plant Soil, 159: 205~212
- Chen HX, Li PM, Gao HY (2007). Alleviation of photoinhibition by calcium supplement in salt-treated *Rumex* leaves. Physiol Plant, 129: 386~396
- Chen J, Xiong DY, Wang WH, Hu WJ, Martin S, Xiao Q, Chen J, Liu TW, Liu X, Zheng HL (2013). Nitric oxide mediates root K^+/Na^+ balance in a mangrove plant, *Kandelia obovata*, by enhancing the expression of AKT1-type K^+ channel and Na^+/H^+ antiporter under high salinity. PLoS ONE 8 (8): e71543
- Córdoba-Pedregosa MC, Villalba JM, Córdoba F, González-Reyes JA (2005). Changes in intracellular and apoplastic peroxidase activity, ascorbate redox status, and root elongation induced by enhanced ascorbate content in *Allium cepa* L. J Exp Bot, 56 (412): 685~694
- De Michele R, Vurro E, Rigo C, Costa A, Elviri L, Di Valentin M, Careri M, Zottini M, Sanità di Toppi L, Lo Schiavo F (2009). Nitric oxide is involved in cadmium-induced programmed cell death in *Arabidopsis* suspension cultures. Plant Physiol, 150: 217~228
- El-Baz FK, Mohamed AA, Aly AA (2003). Development of biochemical markers for salt stress tolerance in cucumber plants. Pak J Biol Sci, 6 (1): 16~22
- Faleiros RO, Goldman MHS, Furriel RPM, McNamara JC (2010). Differential adjustment in gill Na^+/K^+ and V-ATPase activities and transporter m-RNA expression during osmoregulatory acclimation in the cinnamon shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae). J Exp Biol, 213: 3894~3905
- Halliwell B, Gutteridge JMC, Aruoma OI (1987). The deoxyribose method: a simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. Anal Biochem, 165 (1): 215~219
- Hernández JA, Ferrer MA, Jiménez A, Barceló AR, Sevilla F (2001). Antioxidant systems and O_2^-/H_2O_2 production in the apoplast of pea leaves. Its relation with salt-induced necrotic lesions in Minor Veins. Plant Physiol, 127: 817~831
- Higgins CF, Cairney J, Stirling DA, Sutherland L, Booth IR (1987). Osmotic regulation of gene expression: ionic strength as an intracellular signal?. Trends Biochem Sci, 12 (9): 339~344
- Jakubowska D, Janicka-Russak M, Kabała K, Migocka M, Reda M (2015). Modification of plasma membrane NADPH oxidase activity in cucumber seedling roots in response to cadmium stress. Plant Sci, 234: 50~59
- Li JS, Jia HL, Wang J, Cao QH, Wen ZC (2013). Hydrogen sulfide is involved in maintaining ion homeostasis via regulating plasma membrane Na^+/H^+ antiporter system in the hydrogen peroxide-dependent manner in salt-stress *Arabidopsis thaliana* root. Protoplasma, 251: 899~912
- Lu CM, Qiu NW, Lu QT, Wang BS, Kuang TY (2002). Does salt stress lead to increased susceptibility of photosystem II to photoinhibition and changes in photosynthetic pigment composition in halophyte *Suaeda salsa* grown outdoors. Plant Sci, 163: 1063~1068
- Mitaka C, Hirata Y, Yokoyama K, Nagura T, Tsunoda Y, Amaha K (1997). Beneficial effect of carboxy-PTIO on hemodynamic and blood gas changes in septic shock dogs. Crit Care, 1: 1~6
- Murphy ME, Noack E (1994). Nitric oxide assay using hemoglobin method. Method Enzymol, 233: 240~250
- Palavan-Unsal N, Arisan D (2009). Nitric oxide signalling in plants. Bot Rev, 75: 203~229
- Park H-J, Doke N (2005). Convenient assay of O_2^- generated on potato tuber tissue slices treated with fungal elicitor by electron spin resonance—no secondary oxidative burst induction by H_2O_2 treatment. Plant Pathol J, 21 (3): 283~287
- Qiao WH, Fan LM (2008). Nitric oxide signaling in plant responses to abiotic stresses. J Integr Plant Biol, 50 (10): 1238~1246
- Sergiev I, Alexieva V, Karanov E (1997). Effect of spermine, atrazine and combination between them on some endogenous protective

- systems and stress markers. *Compt Rend Acad Bulg Sci*, 51 (3): 121~124
- Tester M, Davenport R (2003). Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Ann Bot*, 91: 503~527
- Wendehenne D, Pugin A, Klessig DF, Durner J (2001). Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. *Trends Plant Sci*, 6 (4): 177~183
- Xia JC, Kong DD, Xue SW, Tian W, Li N, Bao F, Hu Y, Du J, Wang Y, Pan XJ et al (2014). Nitric oxide negatively regulates AKT1-mediated potassium uptake through modulating vitamin B6 homeostasis in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 11: 16196~16201
- Zhang A, Zhang J, Ye NH, Cao JM, Tan MP, Zhang JH, Jiang MY (2010). ZmMPK5 is required for the NADPH oxidase-mediated self-propagation of apoplastic H₂O₂ in brassinosteroid-induced antioxidant defence in leaves of maize. *J Exp Bot*, 61: 4399~4411
- Zhang F, Wang YP, Yang YL, Wu H, Wang D, Liu JQ (2007). Involvement of hydrogen peroxide and nitric oxide in salt resistance in the calluses from *Populus euphratica*. *Plant Cell Environ*, 30: 775~785
- Zhao LQ, Zhang F, Guo JK, Yang YL, Li BB, Zhang LX (2004). Nitric oxide functions as a signal in salt resistance in the calluses from two ecotypes of reed. *Plant Physiol*, 134: 849~857
- Zhao MG, Tian QY, Zhang WH (2007). Nitric oxide synthase-dependent nitric oxide production is associated with salt tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 144: 206~217