

外源 NO 缓解秋茄低温胁迫伤害的生理机制研究

余 敏^a, 杜照奎^{a,b,c}, 王丽佳^a, 祝 庆^a

(台州学院, a. 生命科学学院; b. 浙江省植物进化生态学与保护重点实验室; c. 生态研究所, 浙江 台州 318000)

摘要: 为探讨外源一氧化氮(NO)提高红树植物抗低温的生理机制,以秋茄(*Kandelia obovata*)为试验材料,对其施加不同浓度(0、0.1、0.5、1.0 和 1.5 mmol/L)的外源 NO 供体(SNP),并进行 4 °C 低温处理,研究外源 NO 对低温胁迫下秋茄幼苗叶片的相对电导率、丙二醛(MDA)含量、抗氧化酶活性和渗透调节物质含量的影响。结果表明,SNP 处理降低了秋茄幼苗叶片相对电导率和 MDA 含量,提高了叶片超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)和抗坏血酸过氧化物酶(APX)的活性以及可溶性蛋白质、可溶性糖和游离脯氨酸的含量,从而降低了低温胁迫对秋茄幼苗的伤害,以 0.5 mmol/L SNP 处理效果最佳。低温胁迫下,适宜浓度的外源 NO 通过提高抗氧化酶活性,促进渗透调节物质的合成,降低膜透性和膜脂过氧化水平,保护了细胞膜结构的稳定性,从而提高秋茄幼苗抗低温胁迫的能力。

关键词: 红树植物; 秋茄(*Kandelia obovata*); 低温; 外源硝普钠; 抗氧化酶; 渗透调节物质

中图分类号: Q949.761.7; Q945.78

文献标识码: A

文章编号: 0439-8114(2017)03-0490-04

DOI: 10.14088/j.cnki.issn0439-8114.2017.03.024

Physiological Mechanism of Exogenous Nitric Oxide on Alleviating Low Temperature Stress of *Kandelia obovata*

YU Min^a, DU Zhao-kui^{a,b,c}, WANG Li-jia^a, ZHU Qing^a

(a. School of Life Sciences; b. Zhejiang Provincial Key Laboratory of Plant Evolutionary Ecology and Conservation; c. Institute of Ecology, Taizhou University, Taizhou 318000, Zhejiang, China)

Abstract: Aiming to explore the physiological mechanism of exogenous NO donor sodium nitroprusside(SNP) improving the ability of low temperature endurance of mangrove, *Kandelia obovata* seedlings were chosen as experimental materials, different concentrations of sodium nitroprusside(SNP) (0, 0.1, 0.5, 1.0 and 1.5 mmol/L) was employed as exogenous nitric oxide(NO) donor to study the effects of different concentrations of exogenous NO on the plant relative electrical conductivity, MDA content, the activities of antioxidative enzymes and the contents of osmotic adjustment substance of *K. obovata* seedlings under 4 °C low-temperature stress. The results showed that, the treatment of SNP could reduce the relative electrical conductivity and content of MDA; increase the activities of SOD, POD, CAT and APX, and the content soluble protein, soluble sugar and free praline of the seedlings under low-temperature stress to reduce the damage caused by chilling. It was also found that the cold resistance effect of treatment with 0.5 mmol/L SNP was the best. It indicated that the exogenous NO with proper concentration could enhance the *K. obovata* seedlings' adaptability for low temperature stress through improving the activities of antioxidative enzymes, increasing the osmotic adjustment substance contents, to reduce membrane lipid peroxidation and protecting the stability of cell membrane structure.

Key words: mangrove; *Kandelia obovata*; low temperature; exogenous sodium nitroprusside; antioxidative enzyme; osmotic adjustment substance

红树林处于热带、亚热带海洋和陆地过渡区,是一种低纬度海岸带地区特殊的湿地生态系统,具有调节环境气候、维护生态的多样性、防浪稳固海岸、

抵抗自然灾害、降解环境污染、为人类提供多样的生物资源等多功能^[1]。秋茄(*Kandelia obovata*)是红树科秋茄属植物,也是在中国分布最广泛的红树林种

收稿日期: 2016-11-17

基金项目: 浙江省新苗人才计划项目(2016R430014); 浙江省植物进化生态学与保护重点实验室开放课题项目(EEC2014-05); 台州市科技局项目(1403KY03)

作者简介: 余 敏(1994-), 女, 浙江杭州人, 2013 级本科生, 生物科学专业, (电话)15267665532(电子信箱)1763425688@qq.com; 通信作者, 杜照奎(1979-), 讲师, 博士, 主要从事植物生态学的研究工作, (电话)18657681358(电子信箱)duzhaokui@qq.com。

类^[2],多见于中国东南沿海地区,如海南、广西、广东、台湾、福建和浙江等地。鉴于秋茄重要的生态功能和价值,人们一直致力于其向高纬度地区引种。秋茄虽是众多红树植物中耐寒性最强的种类,但高纬度地区冬季极端低温天气会使得秋茄遭受到冻害,甚至引起植株的死亡。

NO 是一种易溶于脂类和水分子的活性小分子气体,在植物对生物和非生物胁迫反应、细胞程序性死亡、呼吸作用、光形态建成、果实成熟、叶片伸展、气孔关闭、植物衰老、开花调控和激素反应等过程中起着重要的调节作用^[3]。近年来研究表明,NO 在提高植物的抗逆性反应中起着重要的作用,因而越来越受到大家的关注^[4],但有关外源 NO 在秋茄抗寒性方面的研究鲜见报道。现以秋茄盆栽幼苗为试材,研究低温胁迫下外源不同浓度的 NO 供体——硝普钠(SNP)对其叶片抗氧化系统及渗透调节物质的影响,阐明低温胁迫时 NO 调控秋茄幼苗抗寒性的机理,旨在提高秋茄幼苗期的耐寒性,并为高纬度秋茄的栽培种植提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 材料培养和处理

试验在浙江省植物进化生态学与保护重点实验室进行。2015年6月上旬,将采自浙江省玉环县茅埭岛的秋茄繁殖体——胚轴扦插至装有海泥的塑料盆中,每盆1株,正常管理。2015年11月初,选取长势整齐的幼苗,分成6组,每组5株,移入人工气候室,光照度为9000 lx,光/暗周期为14 h/10 h,温度为28℃/15℃,相对湿度70%。室内适应3 d后,开始叶面喷施 SNP,以药液附于叶面全部湿润但不下滴为度。

试验设置6个处理:①CK1:28℃培养+喷施蒸馏水;②CK2:4℃培养+喷施蒸馏水;③T1:4℃处理+喷施0.1 mmol/L SNP;④T2:4℃处理+喷施0.5 mmol/L SNP;⑤T3:4℃处理+喷施1.0 mmol/L SNP;⑥T4:4℃处理+喷施1.5 mmol/L SNP。每天上午9:00左右喷1次,连续处理3 d后采集幼苗每枝条的第2片叶片测定各项生理指标,每处理5次重复。

1.2 测定方法

采用电导率仪法^[5]测定叶片相对电导率;采用硫代巴比妥酸法^[5]测定丙二醛(MDA)含量;采用氮蓝四唑法^[6]测定超氧化物歧化酶(SOD)活性;采用愈创木酚法^[7]测定过氧化物酶(POD)活性;采用过氧化氢还原法^[8]测定过氧化氢酶(CAT)活性;参照 NaKano 等^[9]的方法测定抗坏血酸过氧化物酶(APX)活性;采用考马斯亮蓝染色法^[6]测定可溶性蛋白质

的含量;采用蒽酮比色法^[6]测定可溶性糖的含量;采用茚三酮显色法^[6]测定脯氨酸含量。各参数的含量均以鲜重计。

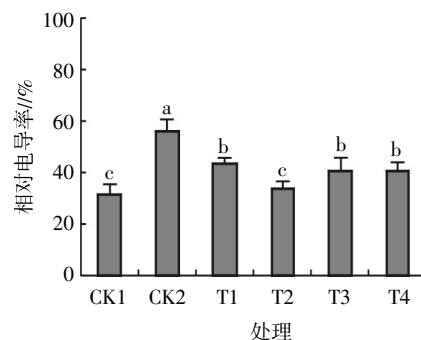
1.3 数据统计分析

采用 Excel 2003 对数据进行整理和绘图,运用 SPSS 13.0 进行显著性检验。文中数值为平均值±标准差($\bar{x}\pm SD$)。

2 结果与分析

2.1 外源 NO 对低温胁迫下秋茄幼苗相对电导率的影响

逆境胁迫通常会引起植物细胞膜结构的破坏,导致细胞内电解质外渗,电导率增大,因此可以用电导率的相对变化来表示植物细胞的受损程度。由图1可知,CK2的相对电导率显著高于CK1,表明低温导致秋茄叶片细胞的破损。而 SNP 处理的相对电导率均低于CK2,T1、T2、T3和T4分别较CK2降低了23.21%、33.93%、26.79%和26.78%,其中T2处理抑制相对电导率增加的效果最好。



处理间不同小写字母表示差异显著($P<0.05$),下同。

图1 SNP对低温胁迫下秋茄幼苗相对电导率的影响

2.2 外源 NO 对低温胁迫下秋茄 MDA 含量的影响

MDA 是细胞膜脂过氧化的产物,可以和细胞膜结构上的蛋白质和酶进行结合,从而破坏植物膜的结构,其含量越高意味着膜损伤程度越重。从图2可知,CK2组MDA含量明显高于CK1和SNP处理组,以T2处理的MDA含量最低,比CK2低40.30%。

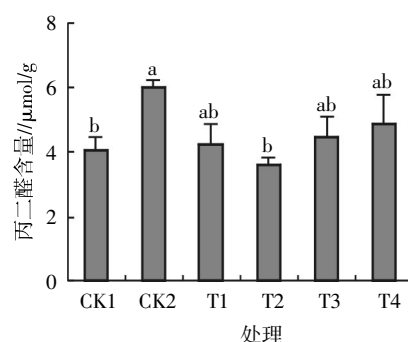


图2 SNP对低温胁迫下秋茄MDA含量的影响

两者差异显著。说明低温胁迫导致秋茄叶片细胞内过氧化产物 MDA 积累的增多,外源 NO 处理可抑制 MDA 的积累,在一定程度上缓解低温对膜的伤害。

2.3 外源 NO 对低温胁迫下秋茄幼苗抗氧化酶类活性的影响

SOD、POD、CAT 和 APX 等抗氧化酶类在植物体内清除活性氧,保护植物免受氧化胁迫方面发挥着重要作用。由表 1 可知,CK2 处理组 SOD 活性显著低于 CK1 组,表明低温处理显著降低了秋茄叶片 SOD 活性;但经外源 NO 处理后,低温胁迫下秋茄幼苗的 SOD 活性均比 CK2 有所提高,特别是 T1 和 T2 处理效果和 CK2 相比有显著差异。温度降低,秋茄叶片 POD 和 CAT 活性均增加,这可能是秋茄低温适应的应对策略,外源 NO 处理后,两者的增幅更大,T2 处理的 POD 活性及 T2 处理的 CAT 活性较 CK2 分别增加 37.86%和 69.32%,均达到显著水平。T1、T2 和 T3 处理下,秋茄幼苗的 APX 活性分别较 CK2 高 20.71%、36.90%、49.52%,但 T4 处理下 APX 活性较 CK2 降低 2.47%,低温下不同浓度的 SNP 对 CAT 和 APX 活性的影响有浓度效应,即低浓度促进,高浓度抑制,并且以 T2 和 T3 处理提高两者活性的效果最好,与 CK2 相比有显著性差异。数据分析表明,秋茄可以通过提高 SOD、POD、CAT 和 APX 等抗氧化酶的活性,清除低温胁迫产生的氧自由基,从而达到保护细胞免受氧化胁迫的目的,以便更好地适应低温环境。

表 1 外源 NO 对低温胁迫下秋茄叶片 SOD、POD、CAT 和 APX 活性的影响 (单位:U/g)

处理	SOD 活性	POD 活性	CAT 活性	APX 活性
CK1	570.92 ± 25.97 a	37.78 ± 7.70 b	5.67 ± 1.45 b	6.75 ± 0.56 b
CK2	521.43 ± 21.71 b	45.56 ± 6.28 b	4.53 ± 0.64 b	7.29 ± 0.66 b
T1	587.74 ± 23.09 a	48.15 ± 6.23 ab	5.83 ± 0.90 b	8.80 ± 1.20 ab
T2	585.15 ± 23.35 a	62.81 ± 8.35 a	7.67 ± 0.42 a	9.98 ± 1.24 a
T3	527.25 ± 9.91 b	40.74 ± 6.42 b	6.07 ± 0.95 ab	10.90 ± 1.31 a
T4	546.98 ± 27.66 ab	48.89 ± 6.78 ab	5.60 ± 1.04 b	7.11 ± 0.87 b

注:表中同列数据后不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。下同。

2.4 外源 NO 对低温胁迫下秋茄渗透调节物质的影响

可溶性蛋白质、可溶性糖和游离脯氨酸等均是植物细胞内重要的渗透调节物质,已有的研究表明,较多植物体内会累积渗透调节物质保护体内组织免受冻害。从表 2 可以看出,CK1 组可溶性蛋白质含量显著高于 CK2 组,表明低温处理降低了秋茄叶片中可溶性蛋白质的量;但 T1、T2、T3 和 T4 组较 CK2 可溶性蛋白质的含量分别提高了 66.56%、101.99%、

87.42%和 63.25%,且均显著高于 CK2,意味着外源 NO 可以有效提高秋茄叶片可溶性蛋白质的含量,其中 T2 甚至恢复到 CK1 的水平,效果最佳。CK2 组较 CK1 组可溶性糖和脯氨酸含量显著提高,增幅分别达到 75.31%和 33.41%。外源 NO 处理后,T1 和 T4 较 CK2 组并没有显著提高可溶性糖和游离脯氨酸的含量,但 T2 和 T3 却显著提高了,表明外源 NO 对于提高该两者的量具有浓度效应。以上数据表明外源 NO 处理可促进可溶性蛋白质、可溶性糖和游离脯氨酸等渗透调节物质在秋茄叶片中的积累,是提高秋茄低温适应的另一重要因素。

表 2 外源 NO 对低温胁迫下秋茄叶片可溶性蛋白质、可溶性糖和游离脯氨酸含量的影响

处理	可溶性蛋白质/mg/g	可溶性糖/mg/g	游离脯氨酸/ μ g/g
CK1	7.85 ± 0.92 a	0.81 ± 0.13 d	81.84 ± 7.11 d
CK2	3.02 ± 0.69 c	1.42 ± 0.23 c	109.18 ± 10.26 c
T1	5.03 ± 0.65 b	1.76 ± 0.22 bc	116.57 ± 12.25 c
T2	6.10 ± 0.95 ab	1.92 ± 0.17 b	157.65 ± 11.90 a
T3	5.66 ± 0.87 b	2.64 ± 0.39 a	143.77 ± 9.35 ab
T4	4.93 ± 0.60 b	1.85 ± 0.21 bc	128.44 ± 10.24 bc

3 小结与讨论

植物遭受逆境胁迫后(如低温、紫外线和重金属等)细胞内产生大量活性氧自由基,引起膜脂质过氧化,蛋白质活性降低甚至丧失,细胞膜受损破裂,胞内电解质外流引起电导率增大,导致植物代谢紊乱^[10]。因而,相对电导率和 MDA 含量是评价细胞膜透性和膜脂过氧化程度的重要指标^[11]。已有研究结果表明,外源 NO 可抑制低温胁迫下苦瓜幼苗叶片 MDA 含量的升高,降低叶片质膜相对透性,提高苦瓜低温适应能力^[12];喷施外源 NO 供体 SNP 能显著提高蝴蝶兰抗低温能力,质膜透性和 MDA 含量均显著降低^[13];外源 NO 可以显著降低低温胁迫下核桃幼苗叶片的质膜相对透性及丙二醛含量,缓解其遭受的冷胁迫损伤^[14];本研究结果与前人研究结果大体相同,即低温胁迫会对秋茄叶片细胞膜造成伤害,具体表现为 MDA 积累,电解质渗漏率增加。喷施外源 NO 供体 SNP 可明显减轻秋茄叶片的电解质渗漏率和 MDA 含量上升的幅度,表明外源 NO 处理可在一定程度上提高秋茄对低温胁迫的适应能力。

植物细胞中 SOD、POD、CAT 和 APX 等是其内源抗氧化酶系统的重要组成部分,能有效清除植物体内的氧自由基和过氧化物^[15],其活性水平在一定程度上代表了细胞清除活性氧自由基的能力,也间接反映了植物对逆境胁迫的适应能力^[16]。本试验结

果表明,低温胁迫处理使得秋茄叶片的 POD、CAT 和 APX 活性均呈上升趋势,但与常温对照相比,差异并不显著,这可能是秋茄主动适应低温的反应;而 SOD 活性则显著下降,这可能是由于活性氧大量生成使细胞抗氧化酶系统明显受到了抑制和破坏,胁迫强度超出秋茄植株的耐受能力,使得酶活下降。研究表明,低浓度 NO 不仅可作为抗氧化剂迅速清除活性氧自由基,而且能诱导抗氧化酶基因的表达,提高酶活性^[17]。本研究中,SNP 处理显著提高了低温胁迫下秋茄幼苗叶片 SOD 活性,有利于促进 O₂⁻歧化生成 H₂O₂,而 H₂O₂ 主要通过 POD、CAT 和 APX 得以清除,减轻了活性氧自由基的破坏作用,提高了秋茄幼苗对寒冷的适应性。

植物细胞内重要的渗透调节物质包括可溶性蛋白质、可溶性糖和游离脯氨酸等^[18]。前人研究表明,很多植物在低温胁迫下会累积可溶性蛋白质、可溶性糖和游离脯氨酸等渗透调节物质以适应寒冷,保护体内组织免受冻害^[18,19]。本研究中,低温胁迫条件下,CK2 较 CK1 组可溶性蛋白质含量显著降低,这可能是低温胁迫的被动反应,但可溶性糖和游离脯氨酸含量却显著上升,可能是秋茄应对低温的适应策略;当外源 NO 处理低温下的秋茄后,无论是可溶性蛋白质、可溶性糖还是游离脯氨酸含量均较 CK2 显著上升。张玲玲等^[20]用外源 NO 对处理 NaCl 胁迫下的秋茄幼苗,发现表明 SNP 处理促进叶片中脯氨酸含量的上升,使秋茄更好地适应盐生环境,这与本研究结果类似。据此认为外源 NO 供体 SNP 处理能够提升低温胁迫条件下秋茄叶片内的渗透调节物质含量,从而进一步提高其叶片细胞渗透调节能力,更有利于秋茄在低温胁迫下维持细胞的结构和功能。

综上所述,外源 NO 可以提高秋茄幼苗叶片 SOD、POD、CAT 和 APX 等 4 种抗氧化酶的活性,清除低温胁迫产生的氧自由基,降低相对电导率和 MDA 含量,保护秋茄幼苗的细胞膜系统;同时增加可溶性蛋白质、可溶性糖和游离脯氨酸等渗透调节物质的含量,维持细胞正常代谢,从而增强了秋茄幼苗对低温胁迫的适应性。本试验是在室内模拟完成的,冬季滩涂上生长的秋茄可能会受到水淹和盐胁迫,甚至于更低温度和更长时间的胁迫,环境更为恶劣,研究结果能否在野外条件下发挥作用有待于进一步探讨。

参考文献:

[1] 陈鹭真,王文卿,张宜辉,等.2008 年低温对我国南方红树植物的

破坏[J].植物生态学报,2010,34(2):186-194.

- [2] 郑春芳,刘伟成,陈少波,等.短期夜间低温胁迫对秋茄幼苗碳氮代谢及其相关酶活性的影响[J].生态学报,2013,33(21):6853-6862.
- [3] 王伟东,蒋 蕊,杜豆林,等.低温对茶树花粉管抑制作用与 NO 关系的研究[J].园艺学报,2013(8):1535-1540.
- [4] 相 昆,徐 颖,李国田,等.外源 NO 对低温胁迫下核桃幼苗活性氧代谢的影响[J].林业科学,2016,52(1):143-149.
- [5] 张志良,瞿伟菁,李小方.植物生理学实验指导[M].北京:高等教育出版社,2012.
- [6] 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.
- [7] 李忠光,龚 明.愈创木酚法测定植物过氧化物酶活性的改进[J].植物生理学通讯,2008,30(3):207-210.
- [8] RADWAN D E M. Salicylic acid induced alleviation of oxidative stress caused by clethodim in maize (*Zea mays* L.) leaves [J].Pesticide Biochemistry & Physiology,2012,102(2):182-188.
- [9] NAKANO Y,ASADA K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts [J].Plant and Cell Physiology,1981,22(5):867-880.
- [10] SHARMA P,SHARMA N,DESWAL R.The molecular biology of the low-temperature response in plants [J].Bioessays,2005,27(10):1048-1059.
- [11] OGWENO J O,SONG X S,HU W H,et al. Detached leaves of tomato differ in their photosynthetic physiological response to moderate high and low temperature stress [J].Scientia Horticulturae,2009,123(1):17-22.
- [12] 杜卓涛,杨 衍,朱国鹏,等.外源一氧化氮对低温胁迫下苦瓜幼苗生长及部分抗逆指标的影响[J].浙江农业学报,2016,28(5):776-781.
- [13] 牟雪姣,刘理想,孟鹏鹏,等.外源 NO 缓解蝴蝶兰低温胁迫伤害的生理机制研究[J].西北植物学报,2015,35(5):978-984.
- [14] 相 昆,徐 颖,李国田,等.外源 NO 对低温胁迫下核桃幼苗活性氧代谢的影响[J].林业科学,2016,52(1):143-149.
- [15] 尚庆茂,陈淑芳,张志刚.硒对高温胁迫下辣椒叶片抗氧化酶活性的调节作用[J].园艺学报,2005,32(1):35-38.
- [16] 顾丽婧.壳聚糖对铬胁迫下番茄幼苗的生理生化指标影响[J].西南农业学报,2011,24(2):519-522.
- [17] 杨美森,王雅芳,干秀霞,等.外源一氧化氮对冷害胁迫下棉花幼苗生长、抗氧化系统和光合特性的影响[J].中国农业科学,2012,45(15):3058-3067.
- [18] 惠竹梅,王智真,胡 勇,等.24-表油菜素内酯对低温胁迫下葡萄幼苗抗氧化系统及渗透调节物质的影响[J].中国农业科学,2013,46(5):1005-1013.
- [19] 张 凯,慕小倩,孙晓玉,等.温度变化对油菜及其伴生杂草种苗生长和幼苗生理特性的影响[J].植物生态学报,2013,37(12):1132-1141.
- [20] 张玲玲,肖 强,叶文景,等.外源一氧化氮对氯化钠处理下秋茄幼苗抗氧化系统的调节效应[J].生态学杂志,2007,26(11):1732-1737.