

高铁血红素对盐胁迫下小麦根部生长受抑的缓解和根尖中离子微域分布的影响

胡冰¹, 贺子义¹, 林国庆¹, 谢彦杰², 齐继艳², 江丹君³, 沈文飏², 黄丽琴^{3,*}

南京农业大学¹生命科学实验中心, 南京农业大学-天美电镜合作示范实验室,²生命科学学院,³理学院, 南京 210095

摘要: 小麦幼苗经不同浓度 NaCl 处理 1 d 再转入 Hoagland 培养液中培养 2 d 后, 浓度相对较低(100 和 200 mmol·L⁻¹)的 NaCl 处理的幼苗根部生长抑制可以恢复, 而浓度相对较高(500 mmol·L⁻¹)的 NaCl 处理的则不能恢复; 预先以高铁血红素(5 μmol·L⁻¹)处理 1 d 就可以缓解随后 200 mmol·L⁻¹ NaCl 处理引起的小麦根部生长受抑。X 射线电子探针检测元素分布的结果表明, 高铁血红素还可缓解由 NaCl 胁迫导致的小麦苗根尖表皮、皮层和中柱细胞中的 K⁺ 流失, 并可提高根系中 K⁺/Na⁺ 比, 从而维持根部的离子稳态。

关键词: 高铁血红素; 盐胁迫; 小麦; 离子微域分布; X 射线电子探针

Effects of Hematin on Mitigation of Growth Inhibition and Ion Micro-distribution of Wheat Roots under Salt Stress

HU Bing¹, HE Zi-Yi¹, LIN Guo-Qing¹, XIE Yan-Jie², QI Ji-Yan², JIANG Dan-Jun³, SHEN Wen-Biao², HUANG Li-Qin^{3,*}

¹Laboratory Center of Life Sciences, Nanjing Agricultural University Cooperative Demonstration Laboratory of HITACHI Electronic Microscope Technique, ²College of Life Sciences, ³College of Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

Abstract: Wheat seedlings subjected to salt stress for 1 d were then transferred to Hoagland solution for another 2 d, the root growth inhibition caused by low concentration of salt stress (100 and 200 mmol·L⁻¹ NaCl) could be recovered, while high concentration (500 mmol·L⁻¹) NaCl exhibited the opposite effect. Furthermore, pretreatment with 5 μmol·L⁻¹ hematin attenuated the root growth inhibition elicited by 200 mmol·L⁻¹ NaCl stress. By using X-ray electron probe analysis, we also discovered that pretreatment of hematin alleviated salinity-induced K⁺ outfluxes in the epidermis, cortex and stele of the root cells, thus K⁺/Na⁺ increased and the ion homeostasis could be reestablished.

Key words: hematin; salt stress; wheat (*Triticum aestivum*); ion micro-distribution; X-ray electron probe

植物盐害包括离子毒害、渗透胁迫和营养不平衡三个方面。植物耐盐性主要涉及 3 个方面, 即维持细胞内稳态(包括离子和渗透两个方面)、解毒(抗氧化防护等)和生长调节(细胞分裂和伸展等)。例如, 盐过度敏感(salt overly sensitive, SOS)途径的生理功能就是通过离子稳态调节来提高植物耐盐性的。因此, 通过各种方法维持植物细胞内稳态、解毒和生长调节均可以提高植物耐盐性(Zhu 2001, 2003)。已经知道, 一氧化氮(nitric oxide, NO)、ABA 和 Ca²⁺ 等能通过上述三种方面来提高植物的耐盐性(Ruan 等 2002; Zhao 等 2007; Zhu 2001, 2003)。

动物中的血红素加氧酶(heme oxygenase, HO, EC 1.14.99.3)有 3 种类型, 包括诱导型的 HO-1 和组成型的 HO-2/3。已经知道, HO 是动物体中催化

血红素降解为一氧化碳(CO)、Fe²⁺ 和胆绿素的起始酶和限速酶。其中, CO 在动物中的调控作用包括参与神经元的传递、调节血管收缩和抗炎作用(Verma 等 1993; Morita 和 Kourembanas 1995; Morita 等 1995; Otterbein 等 2003)。外施的 CO 具有保护和伤害双重生物学效应。Otterbein 等(2003)发现低浓度(0.025%)的 CO 能够缓解老鼠肺部的氧化损伤。此外, 业已证实, HO 也是植物中的 CO 合成酶, 其活性上调可以缓解重金属镍导致的植物组

收稿 2008-05-07 修定 2008-08-25

资助 国家自然科学基金(30671248)、国家基础科学人才培养基金(J0730647)和南京农业大学 SRT 项目(0706A01 和 0712A08)。

* 通讯作者(E-mail: lquangs@njau.edu.cn; Tel: 025-84395207)。

织氧化损伤(Han 等 2008; Noriega 等 2004)。

高铁血红素(hematin, Ht)是动物 HO-1 的诱导物或底物(Lamar 等 1996; Longo 等 1999), 它也能诱导植物 *HO-1* 转录本的增加(Han 等 2007)。最近我们实验室观察到, Ht 共处理能缓解 300 mmol·L⁻¹ NaCl 胁迫导致的小麦品种‘扬麦 158’幼苗叶片的氧化损伤, 诱导过氧化物酶(POD)、超氧化物歧化酶(SOD)、抗坏血酸过氧化物酶(APX)和过氧化氢酶(CAT)等活性氧(reactive oxygen species, ROS)清除酶的活性, 从而缓解盐胁迫导致的幼苗叶片细胞的脂质过氧化; 加入 CO 的清除剂血红蛋白(hemoglobin, Hb)可逆转Ht的缓解效应, 证实上述过程与 CO 有关(Huang 等 2006)。但 Ht 提高小麦耐盐性是否与其对植物在盐害下的生长调节和离子稳态的维持有关还不太清楚。

本文以小麦品种‘扬麦 158’为材料, 研究了不同浓度 NaCl 胁迫后的小麦根系恢复过程中的生长情况; 观察预先以外源 Ht 处理后, 盐胁迫处理下的小麦根部生长受抑制能否得到缓解; 探测以 Ht 预处理的盐胁迫下的小麦幼苗根尖不同部位离子微域分布状况。

材料与方 法

高铁血红素购自 Sigma 公司。植物材料为小麦(*Triticum aestivum* L.)品种‘扬麦 158’。种子用 2% NaClO 消毒 5 min 后, 用蒸馏水漂洗转入 25 暗处催芽培养 1 d。挑取大小一致的露白种子移入光照培养箱中培养(光照强度约为 300 μmol·m⁻²·s⁻¹, 光暗周期为 12 h/12 h, 温度为 25 /18), 用 Hoagland 溶液培养长至两叶一心期进行各种处理。处理有: (1)对照, 持续用 Hoagland 溶液培养 1、2 和 3 d; (2)小麦幼苗用含有 100、200 和 500 mmol·L⁻¹ NaCl 的 Hoagland 溶液分别预处理 1 d 后, 转入 Hoagland 培养液中继续培养 1 和 2 d; (3)在含有 5 μmol·L⁻¹ Ht 的 Hoagland 溶液中处理 1 d 后, 转入 Hoagland 溶液中培养 1 d; (4)含有不同浓度 Ht (1、5、10 和 50 μmol·L⁻¹)的 Hoagland 培养液预处理 1 d 后, 转入含有 200 mmol·L⁻¹ NaCl 的 Hoagland 溶液中培养 1 d; (5)在 Hoagland 溶液中生长 1 d 后, 转入含有 200 mmol·L⁻¹ NaCl 的 Hoagland 溶液中培养 1 d。

根生长速度以每天每棵苗根组织鲜重的增加

量表示。各处理均重复 3 次, 每一重复各取 10 株小麦幼苗为样品。

元素含量分布的检测参照梁永超和丁瑞兴(2002)文中的方法制备样品。NaCl 胁迫 1 d 后, 用双面刀片取距小麦根尖 3~4 mm 的根段, 迅速投入液氮(-196)中冷冻 2~3 min, 利用冷冻断裂获取根的横截面, 以冷冻真空干燥仪(HUS-5GB, Hitachi)干燥 12 h 后, 再用离子溅射仪(E-1010, Hitachi)喷镀金膜, 在扫描电子显微镜(S-3000N, Hitachi)上, 用能谱仪(EMAX-250, Hitachi)分析元素。工作条件为: 加速电压为 20 kV, 束流 40 μA, 工作距离 15 cm, 样品与能谱探头的夹角为 35 。

实验结果

1 不同浓度 NaCl 对小麦幼苗根部生长的抑制以及胁迫解除后的生长恢复

100 和 200 mmol·L⁻¹ NaCl 处理 1 d 后, 小麦幼苗根部生长速度仅为正常生长的 51% 和 43.2%; 将这两种处理的幼苗转移至无 NaCl 的 Hoagland 溶液中恢复培养 1 和 2 d 后, 因盐胁迫受抑制的小麦幼苗根部生长随着时间的增加, 开始逐步恢复至正常水平(图 1); 而用 500 mmol·L⁻¹ NaCl 处理 1 d 的根, 其生长几乎完全受抑, 即使转至无 NaCl 的 Hoagland 培养液中, 根部生长仍然处于停滞状态(图 1)。

2 Ht 对受盐抑制的小麦幼苗根部生长的缓解效应

图 2 显示, 预先以一定浓度的 Ht 处理 1 d 可以不同程度的缓解随后以 200 mmol·L⁻¹ NaCl 处理 1 d 所导致的小麦根部生长的受抑程度。其中,

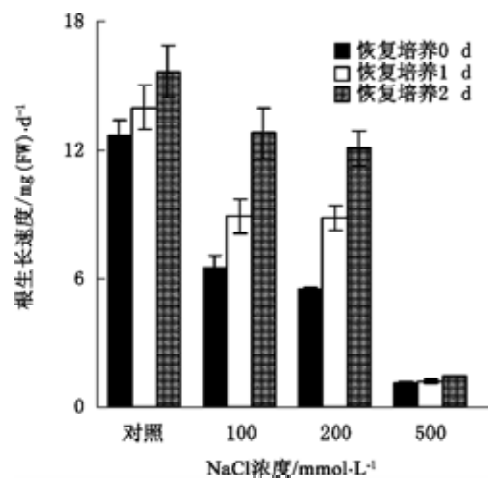


图 1 受盐胁迫的小麦根部生长的恢复

Fig.1 Recovery of growth of wheat roots under salt stress

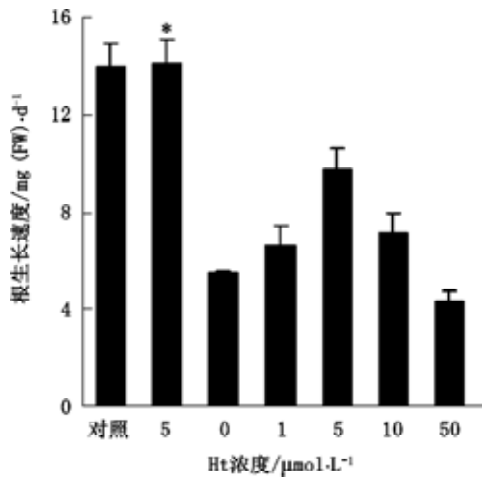


图2 Ht对受盐胁迫小麦根部生长受抑制的缓解效应
Fig.2 Mitigative effect of hematin on the growth inhibition of wheat roots under salt stress
*表示Ht处理后未受NaCl胁迫。

以5 μmol·L⁻¹ Ht的缓解效应最为明显;相反,高浓度Ht反而对根的生长抑制有一定的加剧作用。

3 盐胁迫下小麦根尖中的K⁺离子分布和K⁺/Na⁺比
200 mmol·L⁻¹ NaCl处理的小麦根尖中的K⁺含量下降(图3)。由于K⁺严重流失,小麦根尖中柱区域和横切面中的K⁺/Na⁺比值分别为0.61±0.05和0.87±0.11(图4)。

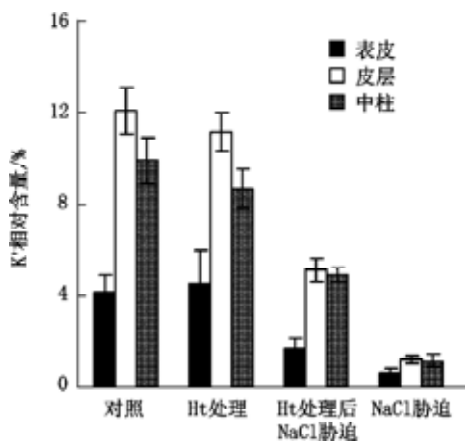


图3 Ht对受盐胁迫小麦根尖表皮、皮层和中柱中K⁺含量分布的影响
Fig.3 Effects of hematin on K⁺ micro-distribution in epidermis, cortex and stele of wheat root tips under salt stress

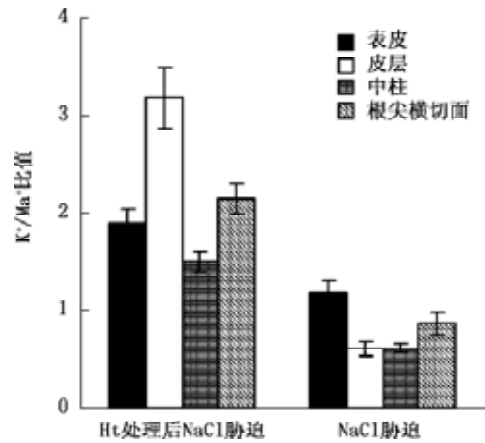


图4 Ht对受盐胁迫小麦根尖表皮、皮层、中柱以及整个根尖横切面中K⁺/Na⁺比值的影响
Fig.4 Effects of hematin on K⁺/Na⁺ ratio in epidermis, cortex, stele and transverse section of wheat root tips under salt stress

4 Ht对盐胁迫下小麦根尖中K⁺离子分布和K⁺/Na⁺比值的影响

与未作Ht处理的相比,5 μmol·L⁻¹ Ht处理的根尖中K⁺含量变化不大,而K⁺的微区分布也未发生明显改变(图3)。与盐胁迫的相比,5 μmol·L⁻¹ Ht预处理可减少由盐胁迫导致的根尖中K⁺的流失(图3),从而导致K⁺/Na⁺比提高(图4)。另外,由于K⁺的流失明显减少,Ht预处理的根尖皮层区域的K⁺/Na⁺比受盐胁迫的高。

讨论

高铁血红素(Ht)对逆境下植物生长的影响已有报道。Huang等(2006)的结果表明,低浓度的Ht与NaCl的共处理能降低由盐胁迫导致的生长抑制。本文的结果也表明,盐胁迫1d后,小麦根部生长速率明显受抑制,并且此种抑制程度随着NaCl浓度的提高而增加(图1)。而以100和200 mmol·L⁻¹ NaCl处理1d后,小麦根部生长经历2d的恢复后基本上可以回复到正常水平;而500 mmol·L⁻¹ NaCl处理1d的,即使是经历2d的恢复期,小麦根部的生长仍然无法恢复。另外,在200 mmol·L⁻¹ NaCl胁迫下,一定浓度的Ht预处理能缓解NaCl胁迫导致的小麦根部生长受抑程度,其中以5 μmol·L⁻¹ Ht效果最好,高浓度Ht对根的生长抑制有一定的加剧现象(图2)。

Chen等(2007)报道,植物体在累积过多的盐分离子的同时,也有大量 K^+ 流失,从而干扰植物细胞的正常生理代谢,加剧盐离子对植物产生的离子毒害效应。因此他们认为, K^+ 含量是衡量植物遭受盐离子毒害程度的标准之一,缓解 K^+ 的流失并维持胞内的 K^+/Na^+ 稳态对植物耐盐性来说是至关重要的。本文用X射线电子探针分析离子的分布表明,在中等浓度盐(200 mmol·L⁻¹ NaCl)胁迫下,小麦根系各个微区 K^+ 的含量大幅下降,这意味着盐胁迫会导致根系细胞中离子平衡的破坏。另以Ht预处理后再进行盐胁迫,小麦根中 K^+ 微区分布即可得到改善, K^+ 含量大幅增加, K^+/Na^+ 比提高(图3、4),重新建立根部细胞的离子平衡,因而小麦抗盐性提高,根的生长部分恢复(图1、2)。

参考文献

- 梁永超, 丁瑞兴(2002). 硅对大麦根系中离子的微域分布的影响及其与大麦耐盐性的关系. 中国科学(C辑), 32 (2): 113~121
- Chen Z, Pottosin II, Cuin TA, Fuglsang AT, Tester M, Jha D, Zepeda-Jazo I, Zhou M, Palmgren MG, Newman IA et al (2007). Root plasma membrane transporters controlling K^+/Na^+ homeostasis in salt-stressed barley. *Plant Physiol*, 145: 1714~1725
- Han Y, Xuan W, Yu T, Fang WB, Lou TL, Gao Y, Chen XY, Xiao X, Shen WB (2007). Exogenous hematin alleviates mercury-induced oxidative damage in the roots of *Medicago sativa*. *J Integr Plant Biol*, 49: 1703~1713
- Han Y, Zhang J, Chen XY, Gao ZZ, Xuan W, Xu S, Ding X, She WB (2008). Carbon monoxide alleviates cadmium-induced oxidative damage by modulating glutathione metabolism in the roots of *Medicago sativa*. *New Phytol*, 177 (1): 155~166
- Huang BK, Xu S, Xuan W, Li M, Cao ZY, Liu KL, Ling TF, Shen WB (2006). Carbon monoxide alleviates salt-induced oxidative damage in wheat seedling leaves. *J Integr Plant Biol*, 48: 249~254
- Lamar CA, Mahesh VB, Brann DW (1996). Regulation of gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) secretion by heme molecules: a regulatory role for carbon monoxide? *Endocrinology*, 137: 790~793
- Longo M, Jain V, Vedernikov YP, Saade GR, Goodrum L, Facchinetti F, Garfield RE (1999). Effect of nitric oxide and carbon monoxide on uterine contractility during human and rat pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, 181: 981~988
- Morita T, Kourembanas S (1995). Endothelial cell expression of vasoconstrictors and growth factors is regulated by smooth muscle cell-derived carbon monoxide. *J Clin Invest*, 96: 2676~2682
- Morita T, Perrella MA, Lee ME, Kourembanas S (1995). Smooth muscle cell-derived carbon monoxide is a regulator of vascular cGMP. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92: 1475~1479
- Noriega GO, Balestrasse KB, Batlle A, Tomaro ML (2004). Heme oxygenase exerts a protective role against oxidative stress in soybean leaves. *Biochem Biophys Res Commun*, 323: 1003~1008
- Otterbein LE, Otterbein SL, Ifedigbo E, Liu F, Morse DE, Fearnside C, Ulevitch RJ, Knickelbein R, Flavell RA, Choi AM (2003). MKK3 mitogen-activated protein kinase pathway mediates carbon monoxide-induced protection against oxidant-induced lung injury. *Amer J Pathol*, 163: 2555~2563
- Ruan HH, Shen WB, Ye MB, Xu LL (2002). Protective effects of nitric oxide on salt stress-induced oxidative damage to wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. *Chin Sci Bull*, 47: 677~681
- Verma A, Hirsch DJ, Glatt CE, Ronnett GV, Snyder SH (1993). Carbon monoxide: a putative neural messenger. *Science*, 259: 381~384
- 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
- Zhu JK (2001). Plant salt tolerance. *Trends Plant Sci*, 6: 66~71
- Zhu JK (2003). Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Curr Opin Plant Biol*, 6: 441~445