

一氧化氮参与外源谷胱甘肽对盐胁迫下番茄幼苗抗氧化损伤的调控

温泽林^{1,2}, 刘慧英^{1,2,*}, 周艳^{1,2}, 陈仙君^{1,2}, 冯玉龙^{1,2}

¹石河子大学农学院园艺系, 新疆石河子832003

²新疆生产建设兵团特色果蔬栽培生理与种植资源利用重点实验室, 新疆石河子832003

摘要: 采用营养液水培, 研究外源谷胱甘肽(GSH)对NaCl和NaCl+Hb(牛血红蛋白, 一种一氧化氮清除剂)处理下番茄(*Lycopersicon esculentum*)幼苗叶片中一氧化氮合酶(NOS)活性及其一氧化氮(NO)水平、膜脂过氧化程度、活性氧(ROS)积累和ROS清除能力的影响。结果表明: 施用Hb使盐胁迫下番茄幼苗叶片的氧化损伤程度加剧, NO含量下调, 但对GSH含量无显著影响。外源GSH的施用显著提高了盐胁迫下番茄幼苗叶中内源GSH与NO水平, 单脱氢抗坏血酸还原酶(MDHAR)和硝酸还原酶(NR)活性, 超氧化物歧化酶(SOD)活性(除72 h), 过氧化氢酶(CAT)活性(除48 h), 处理48和72 h的谷胱甘肽还原酶(GR)、抗坏血酸过氧化物酶(APX)和脱氢抗坏血酸还原酶(DHAR)活性; 降低电解质渗透率、硫代巴比妥酸(TBARS)含量以及处理48和72 h的过氧化氢(H₂O₂)和超氧阴离子(O₂⁻)含量。外源喷施GSH亦显著提高NaCl+Hb处理下番茄叶中抗坏血酸(AsA)、GSH和NO水平, CAT和APX活性, 处理24和48 h的NR活性以及处理48和72 h的NOS活性; 降低电解质渗透率及H₂O₂和TBARS含量。表明外源GSH通过介导内源GSH和NO水平上调, 提高抗氧化酶活性和ROS的清除能力来缓解NaCl和NaCl+Hb处理导致的氧化损伤。因此, NO参与了外源GSH对盐胁迫下番茄幼苗抗氧化损伤的调控。

关键词: GSH; Hb; 盐胁迫; 番茄幼苗; 抗氧化系统

近年来, 在设施蔬菜生长过程中施肥方式和栽培制度的不合理导致土壤次生盐渍化日益严重, 造成蔬菜作物光合作用和抗性下降, 作物产量、品质 and 安全性衰减(郭文忠等2004)。盐胁迫会引起植物营养失衡和渗透调节遭受破坏(Ruiz等2016), 叶片活性氧(reactive oxygen species, ROS)积累, 还原库力降低, 导致氧化损伤加重(何晓玲等2015), 光合电子传递系统失活和光抑制(Kalaji等2016), 蛋白质和核酸变性, 甚至导致细胞死亡(Bethke和Jones 2001)。因此, 提高设施作物耐盐性的研究具有重要的科学和现实意义。

还原型谷胱甘肽(reduced glutathione, GSH)作为生物体内最主要的非蛋白巯基和含量最丰富的低分子量多肽, 通过对细胞内蛋白巯基的抗氧化保护、二硫键的转变调节、氨基酸的跨膜运输和ROS的清除来增强植物抵抗逆境胁迫(Nahar等2015)。GSH可通过抗坏血酸-谷胱甘肽(ascorbate-glutathione, AsA-GSH)循环、硫氧还蛋白(thioredoxin, Trx)系统等直接或间接清除ROS以调节细胞氧化还原(redox)稳态平衡和参与信号传递(Riccillo等2000; Anjum等2012)。因此, GSH被认为是细胞内一种重要的氧化还原缓冲剂(Foyer和Noctor 2011)。许多研究表明外源GSH能提高植物在盐胁迫(周艳等2016)、高温(Zhu等2016)、干旱(Nahar

等2015)、重金属毒害(Estrella-Gómez等2012)等非生物胁迫下的抵抗能力; GSH可作为底物或辅助因子参与生化反应, 也能与激素或氧化还原分子相互作用共同参与逆境诱导的信号传导(Szalai等2009); GSH也可通过谷胱甘肽化修饰来保护蛋白不受氧化, 减少ROS的破坏。

植物的防御应答是一个涉及多种信号分子和信号传导通路的复杂网络。近年来人们关注到GSH可与生物体内重要的信号分子一氧化氮(nitric oxide, NO)及其衍生的活性氮(reactive nitrogen species, RNS)反应, 在一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)催化下形成S-亚硝基谷胱甘肽(S-nitrosoglutathione, GSNO)(严金平等2010)。内源GSNO通过参与GSH、NO、亚硝基硫醇(S-nitrosothiols, SNOs)水平的稳态调节、介导翻译后蛋白质半胱氨酸残基的巯基亚硝基化和巯基谷胱甘肽化修饰, 在生物体多种信号传导和生物体防御应答上发挥重要作用(Donghwan等2009)。植物体内NO来源主要包括两条: 第一, 硝酸盐经酶促和非酶促途径被还原为NO; 第二, L-精氨酸在NOS作用下被氧化为

收稿 2017-10-09 修定 2018-03-26

资助 国家自然科学基金(31360478)和兵团国际合作项目(2014BC002)。

* 通讯作者(hyliuok@aliyun.com)。

NO。此外,当一个亚硝基从GSNO被转移到另一个蛋白质硫醇基时,GSNO会释放NO自由基参与NO运输或转亚硝基反应(Martínez-Ruiz和Lamas 2004)。可见,在调控植物非生物胁迫防御应答反应中GSH和NO必然存在相互影响、相互依赖的关系。近年来,GSH和NO参与生物和非生物胁迫防御应答已有报道(崔秀敏等2011),但有关GSH调控番茄(*Lycopersicon esculentum*)盐适应的作用与NO信号分子的关系尚未见报道。因此,本文通过药理学手段,施用NO清除剂——牛血红蛋白(hemoglobin bovine, Hb)来干扰番茄幼苗体内NO信号水平,研究外源GSH对NaCl和NaCl+Hb处理下番茄幼苗ROS积累和抗氧化能力及NO信号水平的影响,以期为进一步探明GSH缓解植物逆境伤害的作用机理及其与NO的关系提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料培养与试验设计

试验于2016年在石河子大学农学院试验站温室内进行。以番茄(*Lycopersicon esculentum* Mill.)品种‘中蔬四号’为试材。种子催芽后播种于草炭和蛭石(2:1, V/V)混合而成的基质中,待幼苗长至3片真叶完全展开时,挑选长势整齐一致的番茄幼苗移入带泡沫盖板的12 L水桶中,桶中盛装10 L用去离子水配制的Hoagland营养液(pH 6.2)。待缓苗1周后进行不同处理,以 $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl提供盐胁迫条件,于处理时直接加入营养液中。GSH和Hb以叶片喷施的方式于每日10:00进行处理。

试验共设5个处理。(1)对照:营养液培养和叶片喷施蒸馏水;(2)NaCl: $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl处理和叶片喷施蒸馏水;(3)NaCl+GSH: $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl处理和叶片喷施 $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ GSH;(4)NaCl+Hb: $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl处理和叶片喷施0.1% Hb;(5)NaCl+Hb+GSH: $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl处理和叶片喷施0.1% Hb、 $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ GSH。试验采取随机区组设计,每个处理3桶,每桶4株,重复3次。于处理24、48、72 h取样并测定。

1.2 电解质渗透率和硫代巴比妥酸(thiobarbituric acid reactive substance, TBARS)含量测定

分别取处理后24、48、72 h的番茄幼苗叶片(生长点下第3片叶)测定电解质渗透率(邹琦2000)和TBARS含量(赵世杰等2002)。

1.3 过氧化氢(H_2O_2)含量和超氧阴离子(O_2^-)产生速率测定

H_2O_2 含量的测定参照Yu等(2003)的方法; O_2^- 含量的测定采用羟胺氧化法(Rauckman等1979)。

1.4 抗氧化酶活性测定

取叶片0.3 g,置于预冷的研钵中,加3 mL预冷的 $0.05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液(pH 7.8),在冰浴上研磨成匀浆,在 4°C 下 $12\,000\times g$ 离心20 min,分离上清液,即为酶提取液,于 4°C 下保存备用。超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性的测定参照Rao和Sresty (2000)的方法;过氧化氢酶(catalase, CAT)活性的测定参照张宪政(1992)的方法;谷胱甘肽还原酶(glutathione reductase, GR)活性的测定参照Foyer和Halliwell (1976)的方法;抗坏血酸过氧化物酶(ascorbate peroxidase, APX)活性的测定参照Nakano等(1981)的方法;单脱氢抗坏血酸还原酶(monodehydroascorbate reductase, MDHAR)活性和脱氢抗坏血酸还原酶(dehydroascorbate reductase, DHAR)活性测定参照段九菊等(2009)的方法。

1.5 抗氧化剂含量的测定

GSH含量的测定参考Nagalakshmi和Prasad (2001)的DTNB检测法。取叶片0.3 g置于预冷研钵中,加入2 mL 6% (W/W)偏磷酸,于冰浴上研磨,在 4°C 下 $12\,000\times g$ 离心20 min,取上清液测定氧化型谷胱甘肽(oxidized glutathione, GSSG)和总谷胱甘肽(GSH+GSSG)的吸光值并计算其含量,二者含量的差值即为GSH含量。还原型抗坏血酸(ascorbic acid, AsA)含量的测定参考Jiang和Zhang (2001)的二联吡啶法。0.3 g样品中加入3 mL的5% (W/W)偏磷酸,置于冰浴上研磨,在 4°C 下 $15\,000\times g$ 离心15 min,取上清液,测定AsA的吸光值并计算其含量。

1.6 NO含量及其关键合成酶活性的测定

内源NO信号水平测定参考Corpas等(2004)的方法,略作改动。用4,5-二氨基荧光素二乙酸酯(4,5-diaminofluorescein diacetate, DAF-2DA)作为NO的特异性荧光探针。将番茄叶片切成 $5 \text{ mm}\times 5 \text{ mm}$ 后置于含 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DAF-2DA的 $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl缓冲液(pH 7.4)中避光孵育30 min,用不含荧光染料的缓冲液充分漂洗2~3次,以除去多余的荧光探针,在激光共聚焦显微镜(20倍)下观察拍照,激发波长495 nm,发射波长515 nm。并用仪器自带软件LSM510定量分析每个视野的平均荧光强度。

硝酸还原酶(nitrate reductase, NR)和NOS活性均参考试剂盒(购自南京建成生物工程研究所)说明书进行测定。

1.7 数据分析

采用Microsoft Excel 2010和SPSS 19.0对所得数据进行处理和统计分析, Origin 9.0软件绘图。采用单因素方差分析(ANOVA)和Duncan法多重比较各处理间的差异显著性($\alpha=0.05$)。图中结果为平均值 \pm 标准差。

2 实验结果

2.1 不同处理对盐胁迫下番茄幼苗叶片电解质渗透率和TBARS含量的影响

从图1可以看出, 与对照相比, NaCl处理显著

提高了番茄幼苗叶片的电解质渗透率和TBARS含量; 与NaCl处理相比, NaCl+GSH处理和NaCl+Hb处理分别显著降低和提高了电解质渗透率和TBARS含量; 与NaCl+Hb处理相比, NaCl+Hb+GSH处理24 h对电解质渗透率和TBARS含量无明显影响, 但显著降低了处理48和72 h的电解质渗透率和TBARS含量, 且于处理72 h均降低至NaCl+GSH处理的水平。

2.2 不同处理对盐胁迫下番茄幼苗叶片 H_2O_2 含量和 O_2^- 产生速率的影响

由图2可知, 与对照相比, NaCl处理显著提高番茄幼苗叶中 H_2O_2 含量和 O_2^- 产生速率。与NaCl处理相比, NaCl+GSH处理24 h后 H_2O_2 含量和 O_2^- 产生速率无明显变化, 但处理48和72 h后显著降低;

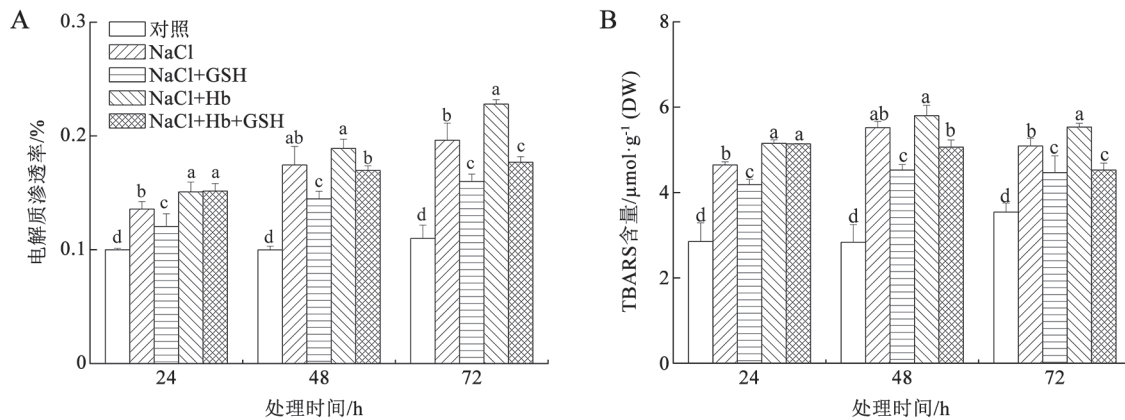


图1 外源GSH和Hb对盐胁迫下番茄幼苗叶片电解质渗透率和TBARS含量的影响

Fig.1 Effects of exogenous GSH and Hb on the electrolyte leakage and TBARS content in leaves of tomato seedlings under salt stress

方柱上不同字母表示差异达到显著水平($P<0.05$, $n=3$); 下同。

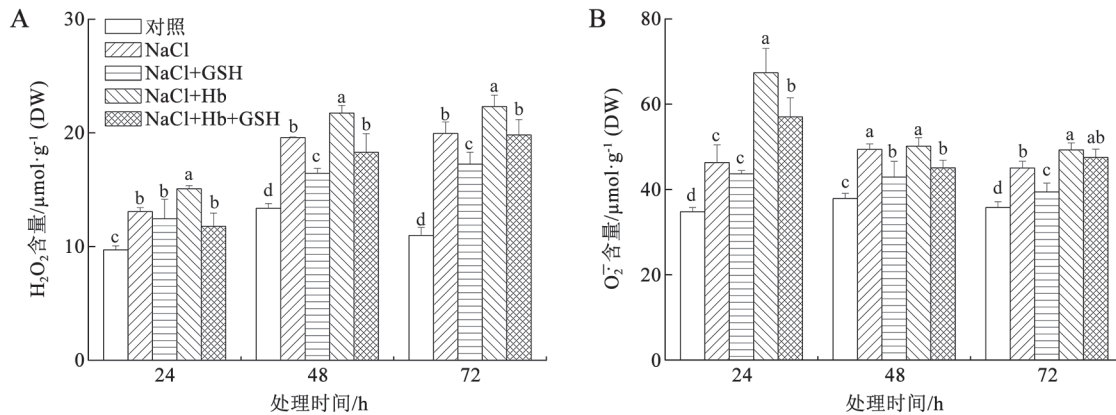


图2 外源GSH和Hb对盐胁迫下番茄幼苗叶片 H_2O_2 和 O_2^- 含量的影响

Fig.2 Effects of exogenous GSH and Hb on H_2O_2 and O_2^- contents in leaves of tomato seedlings under salt stress

NaCl+Hb处理使 H_2O_2 含量和 O_2^- 产生速率显著增加,其中 O_2^- 产生速率在处理24 h增加幅度最大。NaCl+Hb+GSH对整个处理时期的 H_2O_2 含量及处理24和48 h的 O_2^- 产生速率比NaCl+Hb处理的显著降低,且在处理24 h的 H_2O_2 含量和处理48 h的 O_2^- 产生速率均降低至NaCl+GSH处理的水平。

2.3 不同处理对盐胁迫下番茄幼苗叶片抗氧化酶活性的影响

由图3-A和B可以看出,与对照相比,NaCl处理

显著降低番茄叶中SOD和CAT的活性。与NaCl处理相比,NaCl+GSH处理24和48 h的SOD活性以及处理24和72 h的CAT活性显著升高;NaCl+Hb显著降低处理24 h的SOD活性,对处理48和72 h的SOD活性无显著影响,同时显著提高处理24 h下CAT的活性和降低处理72 h下CAT的活性,对处理48 h后CAT活性无显著影响。与NaCl+Hb处理相比,NaCl+Hb+GSH处理显著提高处理24 h下SOD活性和整个处理期间的CAT活性。

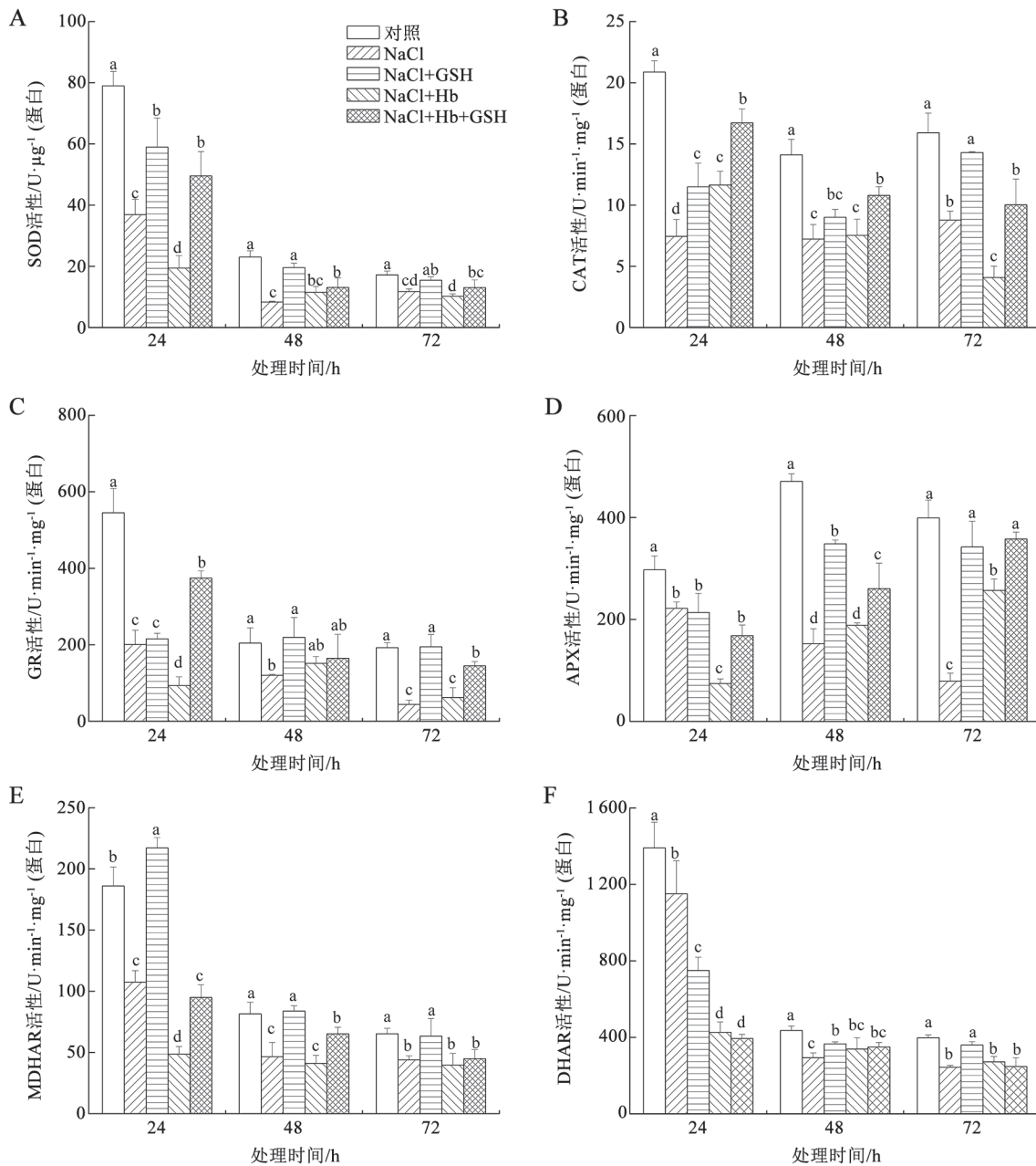


图3 外源GSH和Hb对盐胁迫下番茄幼苗叶中抗氧化酶活性的影响

Fig.3 Effects of exogenous GSH and Hb on the activities of antioxidant enzymes in leaves of tomato seedlings under salt stress

由图3-C~F可以看出,在整个NaCl处理期间,番茄叶中APX、MDHAR、DHAR和GR活性较对照显著降低,并且随着胁迫时间的延长酶活性表现为持续下降的趋势。与NaCl处理相比,NaCl+GSH处理显著提高APX、MDHAR和GR的活性(除处理24 h的APX和GR活性外),随胁迫时间的延长,APX活性逐渐升高,MDHAR、DHAR、GR活性呈逐渐下降的趋势;NaCl+Hb处理24 h后APX、MDHAR、DHAR和GR活性显著降低,处理72 h后APX活性显著升高。与NaCl+Hb处理相比,NaCl+Hb+GSH处理显著提高了整个处理期间的APX活性,处理24和72 h的GR活性及处理24和48 h的MDHAR活性,对DHAR活性无显著影响。

2.4 不同处理对盐胁迫下番茄幼苗叶片抗氧化剂含量的影响

如图4-A所示,与对照相比,NaCl处理24 h的番茄叶中GSH含量显著降低,而处理48和72 h后GSH含量无显著变化;与NaCl处理相比,NaCl+GSH处理后内源GSH含量显著增加,而NaCl+Hb处理对内源GSH含量无显著影响;NaCl+Hb+GSH处理的内源GSH含量较NaCl+Hb处理的显著增加,且在处理48和72 h达到NaCl+GSH处理下的水平。

与对照相比,NaCl处理显著增加番茄叶中AsA含量。与NaCl处理相比,NaCl+GSH处理的AsA含量显著增加,且随胁迫时间的延长呈不断增加的趋势;NaCl+Hb处理24和48 h的AsA含量无显著变化,但处理72 h的AsA含量显著增加。NaCl+Hb+GSH处理的AsA含量较NaCl+Hb处理的显著增加,可达到NaCl+GSH处理的水平(图4-B)。

2.5 不同处理对NaCl胁迫下番茄幼苗叶中NO含量及其合成关键酶活性的影响

2.5.1 内源NO含量的变化

为直接检测外源喷施GSH和Hb对番茄幼苗叶片中内源NO的影响,本试验用NO特异荧光探针DAF-2DA测定组织中NO相对含量。图5-A为不同处理下番茄叶中NO在激光共聚焦显微镜下的荧光分布情况,图5-B为基于图5-A中NO荧光成像结果计算出的不同处理下NO的平均荧光强度。与对照相比,NaCl处理显著降低番茄叶中NO含量;与NaCl处理相比,NaCl+GSH处理后NO含量显著增加,而NaCl+Hb处理24和72 h后NO含量显著降低,处理48 h的NO含量无明显变化;与NaCl+Hb处理相比,NaCl+Hb+GSH处理的NO含量显著增加,并在处理48 h时达到NaCl+GSH处理的水平(图5-A和B)。表明外源GSH的施用可在不同程度上调NaCl和NaCl+Hb处理下番茄叶中NO水平。

2.5.2 NR和NOS活性的变化

与对照相比,NaCl处理使番茄幼苗叶中NR活性显著降低;与NaCl处理相比,NaCl+GSH处理显著提高NR活性,而NaCl+Hb处理对NR活性无显著影响;与NaCl+Hb处理相比,NaCl+Hb+GSH处理48和72 h后NR活性显著升高,分别恢复至NaCl+GSH处理48和72 h的水平(图6-A)。

由图6-B可知,与对照相比,NaCl处理24 h的番茄叶中NOS活性显著降低,处理48和72 h的无明显变化;与NaCl处理相比,NaCl+GSH处理对NOS活性无显著影响,NaCl+Hb处理24和48 h的NOS活性无明显变化,但处理72 h的NOS活性显著升高;

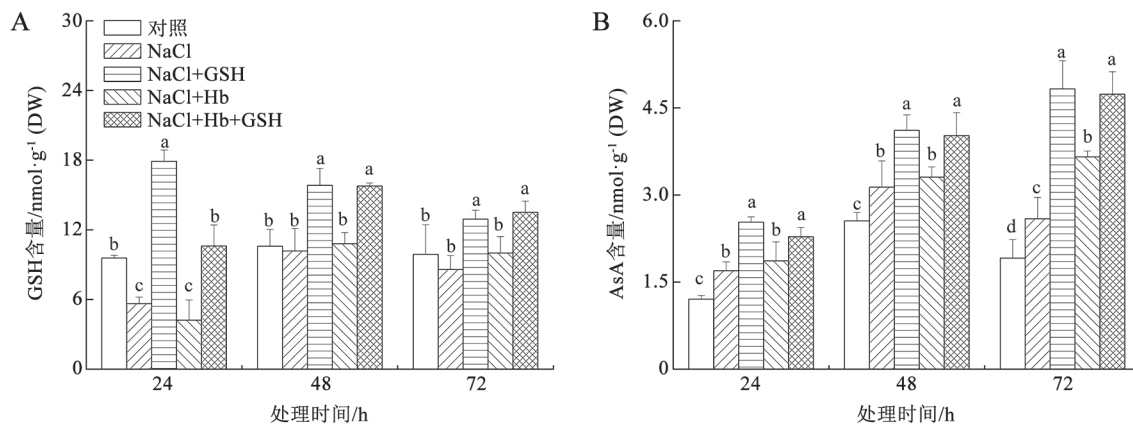


图4 外源GSH和Hb对NaCl胁迫下番茄幼苗叶中GSH和AsA含量的影响

Fig.4 Effects of exogenous GSH and Hb on GSH and AsA contents in leaves of tomato seedlings under salt stress

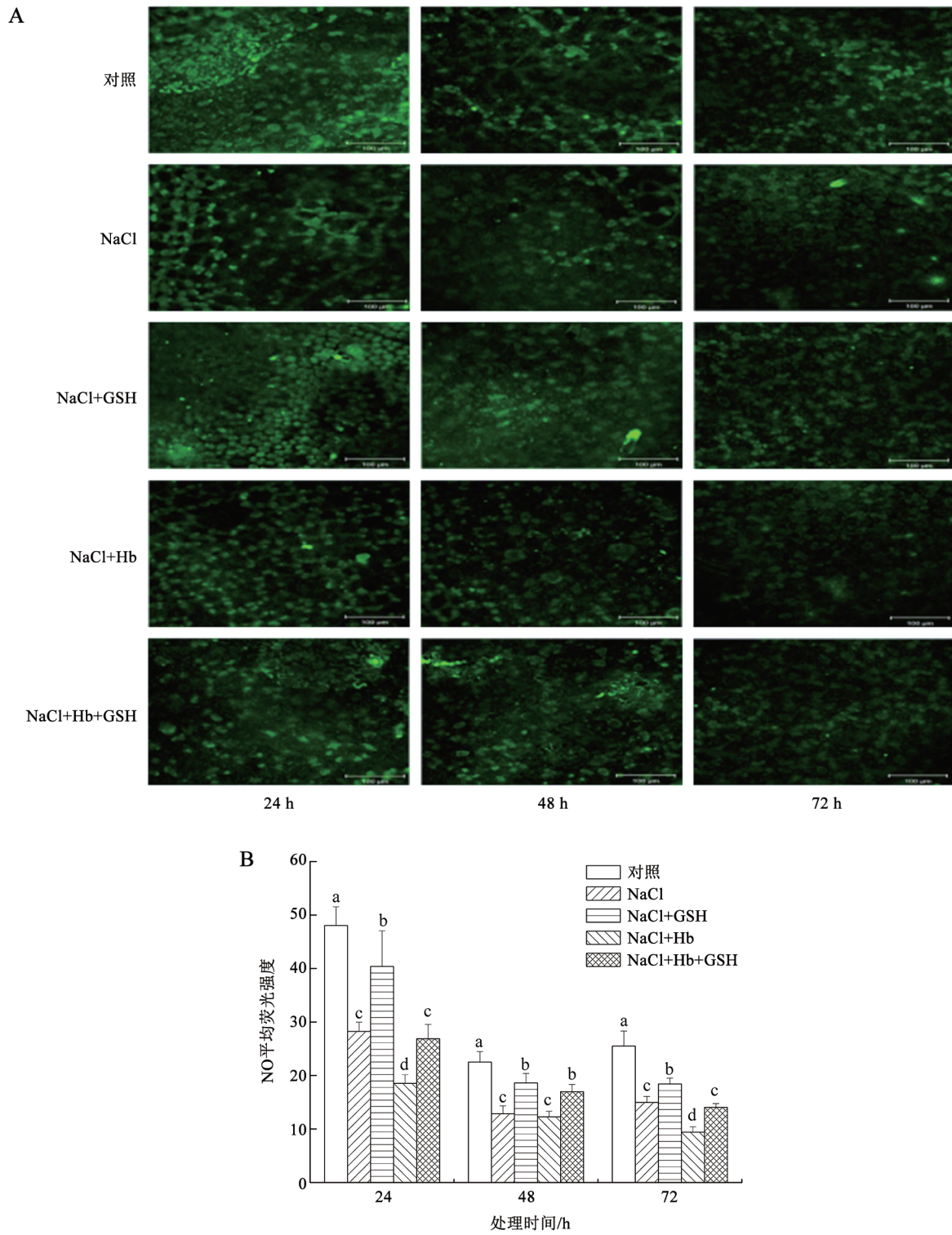


图5 外源GSH和Hb对盐胁迫下番茄幼苗叶片NO荧光成像(A)和荧光强度(B)的影响
Fig.5 Effects of exogenous GSH and Hb on NO fluorescence imaging and intensity in leaves of tomato seedlings under salt stress
标尺=100 μ m。

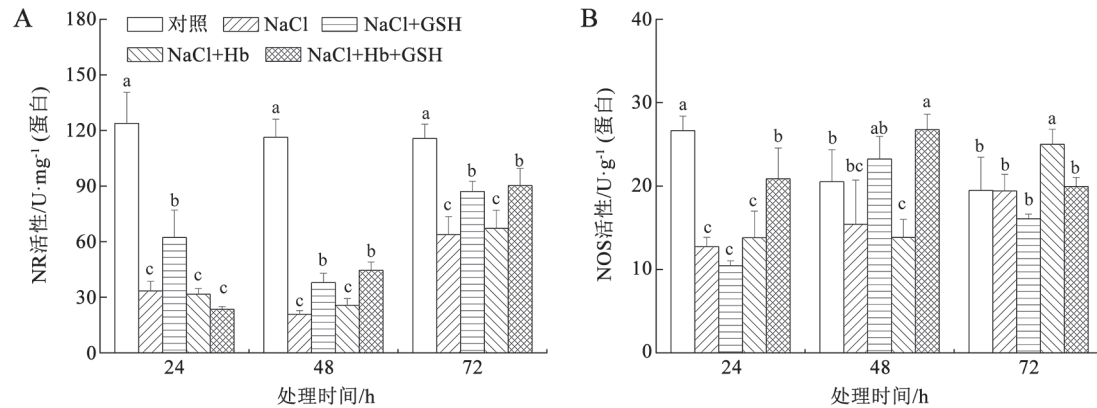


图6 外源GSH和Hb对盐胁迫下番茄幼苗叶片NR和NOS活性的影响

Fig.6 Effects of exogenous GSH and Hb on the activities of NR and NOS in leaves of tomato seedlings under salt stress

NaCl+Hb+GSH处理24和48 h的NOS活性较NaCl+Hb处理的显著增加, 处理72 h的显著降低。

3 讨论

植物在正常生长条件下细胞内自由基的产生与清除处于动态平衡状态。当植物处于盐胁迫下体内的这种平衡被打破, 使得 H_2O_2 和 O_2^- 等ROS大量积累。ROS启动膜脂过氧化作用, 膜内脂质双分子层中含有的不饱和脂肪酸被过氧化分解, 从而造成膜的损伤和破坏, 膜系统的完整性丧失, 进而引起电解质外渗, 严重时会导致植物死亡(宰学明等2001)。TBARS是ROS启动膜脂氧化的主要产物。因此, ROS和TBARS的含量常被作为判断氧化胁迫和膜脂过氧化程度的重要指标。毕会涛等(2007)认为植物抗逆性提高与控制植物体内ROS和TBARS的含量密切相关。在本试验中, NaCl处理下番茄叶片的电解质渗透率、TBARS和ROS含量显著增加, 这与盐胁迫下Sheokand等(2008)在鹰嘴豆、Seckin等(2009)在小麦上的研究结果一致。喷施Hb后番茄叶片的电解质渗透率、 H_2O_2 和TBARS含量及处理24和72 h的 O_2^- 含量进一步显著增加, 而外源喷施GSH显著降低了NaCl处理下的电解质渗透率、TBARS含量以及处理48、72 h的 H_2O_2 含量和 O_2^- 产生速率, 亦显著降低NaCl+Hb处理48和72 h下的电解质渗透率和TBARS含量, 整个处理期间的 H_2O_2 含量以及处理24和48 h下的 O_2^- 产生速率(图1和2), 说明盐胁迫下, Hb的施用加剧了番茄叶中ROS代谢失衡和膜脂过氧化程度。外源

GSH可不同程度地缓解NaCl及NaCl+Hb处理导致的ROS积累和氧化胁迫, 从而降低膜脂过氧化程度, 提高生物膜系统的完整性以及番茄幼苗在盐胁迫下的适应性。这可能与外源GSH诱导的内源GSH、NO信号水平上调以及促进抗氧化酶清除ROS的能力有关, 从而抑制盐胁迫下过氧化物和自由基的积累, 缓解盐胁迫对番茄幼苗的伤害。

ROS代谢失调是逆境下需氧生物受害的普遍表现, 也是逆境损伤的重要原因之一。为维持植物体内氧化还原平衡和保护细胞免受ROS的损害, 细胞自身形成了严密的酶促和非酶促ROS清除系统以平衡和修复ROS导致的氧化损伤。SOD是抗氧化酶防御系统的第一道防线, 它能催化 O_2^- 发生歧化反应产生 H_2O_2 和 O_2 , H_2O_2 随后主要被POD、CAT和AsA-GSH循环清除(Foyer和Halliwell 1976)。在AsA-GSH循环中, APX在清除 H_2O_2 中起着关键的作用, 而MDHAR、DHAR和GR主要通过影响AsA和GSH的再生为APX清除 H_2O_2 提供底物。本研究中, NaCl显著降低整个处理期间番茄叶片中SOD、CAT及AsA-GSH循环的关键酶APX、GR、MDHAR和DHAR活性, 与此伴随的是, 番茄叶片中ROS的积累和TBARS含量的提高, 说明NaCl胁迫下由于抗氧化系统清除ROS的解毒能力下降而导致过量ROS积累。外源喷施Hb进一步显著降低NaCl处理24 h番茄叶片的SOD、APX、GR、MDHAR和DHAR活性, 但对处理48和72 h的无显著影响, 说明在短期(24 h) NaCl胁迫下Hb显著抑制了抗氧化酶活性, 从而导致氧化胁迫。许多研究

表明, NO具有直接清除ROS的作用, 能与 O_2^- 结合形成毒性相对较低的过氧亚硝基阴离子($ONOO^-$)来缓解细胞伤害(马晓丽等2017; 张敏等2012), 因此推测导致处理48和72 h后ROS积累和TBARS含量升高的原因可能是Hb降低了NO对 O_2^- 的清除能力, 而 O_2^- 毒性远大于 H_2O_2 (李西等2014), 从而加剧了ROS积累和膜脂过氧化产物TBARS含量的增加。喷施GSH显著提高NaCl胁迫下番茄叶中SOD活性(除72 h)、CAT活性(除48 h)、处理48和72 h的GR、APX、DHAR活性以及整个处理期间的MDHAR活性。喷施GSH亦显著提高NaCl+Hb处理的CAT和APX活性、处理24 h的SOD活性、处理24和48 h的MDHAR活性以及处理24和72 h的GR活性, 但对DHAR活性无明显调节作用, 说明外源GSH可不同程度地上调NaCl处理和NaCl+Hb处理下CAT和AsA-GSH循环关键酶活性以清除 H_2O_2 。

AsA和GSH是植物氧化还原反应中重要的 H^+ 供体, 因此是重要的抗氧化剂, 其水平的高低是衡量植物还原库力水平高低的重要指标。吴雪霞等(2013)的研究表明, 高温导致茄子幼苗叶中GSH和AsA含量显著高于对照以应对逆境导致的氧化胁迫。赵宝龙等(2015)发现NaCl处理下‘夏黑’与‘里扎马特’叶中AsA含量显著下降, GSH含量明显降低。Shalata等(2001)研究发现, NaCl胁迫下耐盐番茄(*Solanum lycopersicum*)根系中AsA含量明显升高, 表现出较强的耐盐性。我们前期的研究结果已证明, 在较长时间(5、10和15 d)盐胁迫处理下喷施GSH通过上调GSH合成与代谢及AsA-GSH循环关键酶活性, 从而提高番茄幼苗叶片的GSH水平和对盐胁迫的抗性(Zhou等2017)。在本研究中, NaCl显著降低处理24 h的番茄幼苗叶中GSH含量, 对处理48和72 h的GSH含量无显著影响, 且显著提高了整个处理期间的AsA含量, 说明在胁迫初期GSH合成受抑或GSH直接参与了对ROS的清除而致使其浓度下降, 在胁迫后期ROS主要靠抗氧化酶和AsA清除。NaCl胁迫下喷施Hb对整个处理期间的GSH含量和处理24和48 h下的AsA含量均无显著影响, 但处理72h的AsA含量显著增加, 说明Hb对GSH的合成与代谢不具有调控作用。外源喷施GSH显著增加NaCl处理和NaCl+Hb处理下的内源

GSH和AsA含量, 说明外源GSH可诱导NaCl处理和NaCl+Hb处理下番茄幼苗叶片细胞内维持高的还原库力水平和还原环境, 以降低NaCl和NaCl+Hb诱导的氧化胁迫, 从而提高其盐适应能力。

为进一步验证NO参与外源GSH对盐胁迫下番茄幼苗的调控作用, 本研究比较了不同处理下番茄叶片中NO含量及其合成酶活性。王逸筠等(2014)研究发现, 外源NO能够提高 Cu^{2+} 胁迫下番茄叶中NOS和NR活性, 促进NO产生, 而Hb可部分抵消NO的促进作用。吴旭红等(2016)研究表明, 外源NO能促进低温胁迫下植株生长和干物质积累, 提高叶中SOD、POD、CAT、APX活性, 减少 H_2O_2 和MDA的积累。在本试验中, NaCl处理诱导了氧化胁迫且显著降低了整个处理期间NO含量、NR活性和处理24 h的NOS活性, 说明NaCl胁迫通过抑制NOS和NR途径而降低番茄叶中NO含量和抗氧化酶活性, 使ROS和膜脂过氧化产物TBARS积累。NaCl处理下, 喷施Hb进一步加剧了氧化胁迫程度, 除了显著提高处理72 h的NOS活性外, 对其他处理时间的NR和NOS活性均无显著影响, 但处理24和72 h后NO含量显著降低。这表明内源NO水平的降低并非Hb抑制NR和NOS活性所造成, 而是由于还原型氧合血红蛋白[$HbO_2(Fe^{2+})$]与NO反应生成相对稳定的高铁血红蛋白[$Met-Hb(Fe^{3+})$]来降低体内NO信号水平(赵朝宇等2015)。喷施GSH显著提高了NaCl胁迫下NO含量和NR活性, 但对NOS活性无显著影响。喷施GSH亦显著增加了NaCl+Hb处理下NO含量、处理24和48 h的NR活性、处理48和72 h的NOS活性(图5和图6)。同时, 喷施GSH分别不同程度有效缓解NaCl和NaCl+Hb处理诱导的氧化胁迫, 提高了番茄幼苗的盐适应性(图1和图2)。说明NaCl处理和NaCl+Hb处理下, 外源GSH的施用均能够通过提高NR和NOS活性来促进NO合成, 提高番茄叶中NO水平, 从而发挥其作为信号分子参与植物应答非生物胁迫的作用。

综上所述, 本研究认为在NaCl处理和NaCl+Hb处理下外源喷施GSH对番茄幼苗的抗氧化保护效果归因于两个方面: 第一, 内源GSH作为植物体内一种重要的抗氧化剂, 外源GSH可通过上调NaCl和NaCl+Hb处理下番茄幼苗的抗氧化酶活性和内源GSH水平, 提高ROS的清除能力, 缓解氧化胁迫

迫以保持细胞膜结构和功能的稳定, 进而提高其在盐胁迫下的适应能力; 第二, 外源GSH通过诱导NaCl和NaCl+Hb胁迫下番茄叶中NO水平上调, 从而发挥NO信号分子对盐胁迫的应答调节作用, 从而提高番茄在盐胁迫下的适应能力。由此可见, NO参与了外源GSH对盐胁迫下番茄幼苗抗氧化损伤调控, 但NO具体的作用机制尚需进一步研究。

参考文献(References)

- Anjum NA, Ahamad I, Mohmood, et al (2012). Modulation of glutathione and its related enzymes in plants responses to toxic metals and metalloids—a review. *Environ Exp Bot*, 75: 307–324
- Bethke PC, Jones RL (2001). Cell death of barley aleurone protoplasts is mediated by reactive oxygen species. *Plant J*, 25: 19–29
- Bi HT, Huang FQ, Qiu L, et al (2007). Influence of drought stress on activity of cell protective in jujube. *Chin Agric Sci Bull*, 23 (2): 151–155 (in Chinese with English abstract) [毕会涛, 黄付强, 邱林等(2007). 干旱胁迫对灰枣保护性酶活性及膜脂过氧化的影响. *中国农学通报*, 23 (2): 151–155]
- Corpas FJ, Barroso JB, Carreras A, et al (2004). Cellular and subcellular localization of endogenous nitric oxide in young and senescent pea plants. *Plant Physiol*, 136: 2722–2733
- Cui XM, Wu XB, Li XY, et al (2011). Responses of growth, functional enzyme activity in biomembrane of tomato seedlings to excessive copper, cadmium and the alleviating effect of exogenous nitric oxide. *Plant Nutr Fertil Sci*, 17 (2): 349–357 (in Chinese with English abstract) [崔秀敏, 吴小宾, 李晓云等(2011). 铜、镉毒害对番茄生长和膜功能蛋白酶活性的影响及外源的缓解效应. *植物营养与肥料学报*, 17 (2): 349–357]
- Donghwan S, Hwang JU, Lee J, et al (2009). Orthologs of the class A4 heat shock transcription factor HsfA4a confer cadmium tolerance in wheat and rice. *Plant Cell*, 21: 4031–4043
- Duan JJ, Guo SR, Kang YY, et al (2009). Effects of exogenous spermidine on active oxygen scavenging system and bound polyamine contents in chloroplasts of cucumber under salt stress. *Acta Ecol Sin*, 29: 653–661 (in Chinese with English abstract) [段九菊, 郭世荣, 康云艳等(2009). 外源亚精胺对盐胁迫下黄瓜(*Cucumis sativus* L.)叶绿体活性氧清除系统和结合态多胺含量的影响. *生态学报*, 29: 653–661]
- Estrella-Gómez NE, Sauri-Duch E, Zapata-Pérez O, et al (2012). Glutathione plays a role in protecting leaves of *Salvinia minima* from Pb²⁺ damage associated with changes in the expression of *SmGS* genes and increased activity of GS. *Environ Exp Bot*, 75: 188–194
- Foyer CH, Halliwell B (1976). The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta*, 133 (1): 21–25
- Foyer CH, Noctor G (2011). Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant Physiol*, 155 (1): 2–18
- Guo WZ, Liu SF, Li DR, et al (2004). The research status and prospects of facilities vegetable soil secondary salinization mechanism. *Soils*, 36 (1): 25–29 (in Chinese) [郭文忠, 刘声锋, 李丁仁等(2004). 设施蔬菜土壤次生盐渍化发生机理的研究现状与展望. *土壤*, 36 (1): 25–29]
- He XL, Wang S, Wang P, et al (2015). Protective effects of exogenous selenium on oxidative damage in tomato seedling leaves under NaCl stress. *J Shihezi Univ (Nat Sci)*, 33 (3): 281–286 (in Chinese with English abstract) [何晓玲, 王松, 王沛等(2015). 外源硒对NaCl胁迫下番茄幼苗叶片氧化损伤的保护效应. *石河子大学学报(自然科学版)*, 33 (3): 281–286]
- Jiang MY, Zhang JH (2001). Effect of abscisic acid on active oxygen species, antioxidative defence system and oxidative damage in leaves of maize seedling. *Plant Cell Physiol*, 42 (11): 1265–1273
- Kalaji HM, Jajoo A, Oukarroum A, et al (2016). Chlorophyll a fluorescence as a tool to monitor physiological status of plants under abiotic stress conditions. *Acta Physiol Plant*, 38: 102–113
- Li X, Wu YJ, Sun LX (2014). Growth and physiological responses of three warm-season turfgrasses to lead stress. *Acta Pratacult Sin*, 23 (4): 171–180 (in Chinese with English abstract) [李西, 吴亚娇, 孙凌霞(2014). 铅胁迫对三种暖季型草坪草生长和生理特性的影响. *草业学报*, 23 (4): 171–180]
- Lv XH, Lv CM, Feng JM (2016). Protective effect of exogenous nitric oxide against oxidative damage in pumpkin seedlings under chilling stress. *Acta Pratacult Sin*, 25 (12): 161–169 (in Chinese with English abstract) [吕旭红, 吕成敏, 冯晶旻(2016). 外源一氧化氮(NO)对低温胁迫下南瓜幼苗氧化损伤的保护效应. *草业学报*, 25 (12): 161–169]
- Ma XL, Ji RP, Tian BH, et al (2017). Effects of nitric oxide on oxidative damage metabolism in wheat seedling under cadmium stress. *Biotechnol Bull*, 33 (5): 102–107 (in Chinese with English abstract) [马晓丽, 冀瑞萍, 田保华等(2017). 一氧化氮(NO)对镉胁迫下小麦幼苗叶片氧化损伤的影响. *生物技术通报*, 33 (5): 102–107]
- Martínez-Ruiz A, Lamas S (2004). S-nitrosylation: a potential new paradigm in signal transduction. *Cardiovasc Res*, 62: 43–52
- Nagalakshmi N, Prasad MNV (2001). Responses of glutathione cycle enzymes and glutathione metabolism to copper stress in *Scenedesmus hijugatus*. *Plant Sci*, 160 (2): 291–299

- Nahar K, Hasanuzzaman M, Alam MM, et al (2015). Glutathione-induced drought stress tolerance in mung bean: coordinated roles of the antioxidant defence and methylglyoxal detoxification systems. *AoB Plants*, 7: 2041–2851
- Nakano Y, Asada K (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol*, 22: 867–880
- Rao KVM, Sresty TVS (2000). Antioxidant parameters in the seedlings of pigeon pea (*Cajanuscajan* L. Millspaugh) in response to Zn and Ni stresses. *Plant Sci*, 157: 113–128
- Rauckman EJ, Rosen GM, Kitchell BB (1979). Superoxide radical as an intermediate in the oxidation of hydroxylamines by mixed function amine oxidase. *Mol Pharmacol*, 15: 131–137
- Riccillo PM, Muglia CI, Bruijn FJ, et al (2000). Glutathione is involved in environmental stress responses in *Rhizobium tropici*, including acid tolerance. *J Bacteriol*, 182: 1748–1753
- Ruiz KB, Biondi S, Martinez EA, et al (2016). Quinoa—a model crop for understanding salt-tolerance mechanisms in halophytes. *Plant Biosystems*, 150 (2): 357–371
- Seckin B, Sekmen AH, Tukan I (2009). An enhancing effect of exogenous mannitol on the antioxidant enzyme activities in roots of wheat under salt stress. *Plant Growth Regul*, 28: 12–20
- Sheokand S, Kumari A, Sawhney V (2008). Effect of nitric oxide and putrescine on antioxidative responses under NaCl stress in chickpea plant. *Physiol Mol Biol Plant*, 14: 355–362
- Szalai G, Kellos T, Galiba G (2009). Glutathione as an antioxidant and regulatory molecule in plants under abiotic stress conditions. *J Plant Growth Regul*, 28: 66–80
- Wang JY, Li XY, Wang J, et al (2014). Study on the metabolism pathway of ROS and NO of tomato seedlings mediated by exogenous NO under copper ion stress. *Asian J Ecotoxicol*, 9 (4): 678–688 (in Chinese with English abstract) [王逸筠, 李晓云, 王建等(2014). 外源NO介导Cu²⁺胁迫下番茄幼苗活性氧与内源NO代谢的研究. *生态毒理学报*, 9 (4): 678–688]
- Wu XX, Zha DS, Zhu ZW, et al (2013). Effects of exogenous 24-epibrassinolide on plant growth and antioxidant system in eggplant seedlings under high temperature stress. *Plant Physiol J*, 49 (9): 929–934 (in Chinese with English abstract) [吴雪霞, 查丁石, 朱宗文等(2013). 外源24-表油菜素内酯对高温胁迫下茄子幼苗生长和抗氧化系统的影响. *植物生理学报*, 49 (9): 929–934]
- Yan JP, Luo YY, Yang H (2008). Research progress on the function of plant nitroglutathione reductase. *Chin J Trop Crops*, 31 (11): 2066–2071 (in Chinese) [严金平, 罗义勇, 杨华(2010). 植物亚硝基谷胱甘肽还原酶(GSNOR)功能的研究进展. *热带作物学报*, 31 (11): 2066–2071]
- Yu CW, Murphy TM, Lin CH (2003). Hydrogen peroxide induces chilling tolerance in mung beans mediated through ABA-independent glutathione accumulation. *Funct Plant Biol*, 30: 955–963
- Zai XM, Wu GR, Lu CM, et al (2001). Effect of Ca²⁺ on the heat tolerance and active oxygen metabolism of peanut seedlings. *Chin J Crop Sci*, 23 (1): 46–50 (in Chinese) [宰学明, 吴国荣, 陆长梅等(2001). Ca²⁺对花生幼苗耐热性和活性氧代谢的影响. *中国油料作物报*, 23 (1): 46–50]
- Zhang M, Jiang CH, Li XY, et al (2012). Effects of exogenous nitric oxide on tomato seedlings root architecture and ultrastructure under copper stress. *Plant Physiol J*, 48 (11): 1105–1112 (in Chinese with English abstract) [张敏, 姜春辉, 李晓云等(2012). 外源NO对铜胁迫下番茄幼苗根系构型及其超微结构的影响. *植物生理学报*, 48 (11): 1105–1112]
- Zhang XZ (1992). *Research Methodology of Crop Physiology*. Beijing: Agriculture Press (in Chinese) [张宪政(1992). *作物生理研究法*. 北京: 农业出版社]
- Zhao BL, Liu P, Wang WJ, et al (2015). Effects of 5-aminovalulinic acid on the AsA-GSH cycle in grape leaves under salt stress. *Plant Physiol J*, 51 (3): 385–390 (in Chinese with English abstract) [赵宝龙, 刘鹏, 王文静等(2015). 5-氨基乙酰丙酸(ALA)对盐胁迫下葡萄叶片中AsA-GSH循环的影响. *植物生理学报*, 51 (3): 385–390]
- Zhao CY, Wang YZ, Liu H, et al (2015). Research progress of nitric oxide signal transduction in plant. *Food Res Develop*, 36 (22): 180–183 (in Chinese with English abstract) [赵朝宇, 王亚喆, 刘慧等(2015). 植物一氧化氮信号转导的研究进展. *食品研究与开发*, 36 (22): 180–183]
- Zhao SJ, Shi GA, Dong XC (2002). *Plant Physiology Experiment Instruction*. Beijing: China Science and Technology Press, 42–43 (in Chinese) [赵世杰, 史国安, 董新纯(2002). *植物生理学实验指导*. 北京: 中国科学技术出版社, 42–43]
- Zhou Y, Liu HY, Wang S, et al (2016). Effect of exogenous GSH on the plant growth and some physiological indexes of resistance stress of tomato seedlings under salt stress. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 36 (3): 515–520 (in Chinese with English abstract) [周艳, 刘慧英, 王松等(2016). 外源GSH对盐胁迫下番茄幼苗生长及抗逆生理指标的影响. *西北植物学报*, 36 (3): 515–520]
- Zhou Y, Wen ZL, Zhang JW, et al (2017). Exogenous glutathione alleviates salt-induced oxidative stress in tomato seedlings by regulating glutathione metabolism, redox status, and the antioxidant system. *Sci Hortic*, 220: 90–101
- Zhu D, Mei YD, Shi YJ, et al (2016). Involvement of glutathione in β -cyclodextrin-hemin complex-induced lateral root formation in tomato seedlings. *Plant Physiol*, 204: 92–100
- Zou Q (2000). *Techniques of Plant Physiological Experiment*. Beijing: The Agricultural Publishing House of China, 159–160 (in Chinese) [邹琦(2000). *植物生理学试验指导*. 北京: 中国农业出版社, 159–130]

The involvement of nitric oxide in exogenous glutathione regulates antioxidant defense capacity against salt stress in tomato seedlings

WEN Ze-Lin^{1,2}, LIU Hui-Ying^{1,2,*}, ZHOU Yan^{1,2}, CHEN Xian-Jun^{1,2}, FENG Yu-Long^{1,2}

¹Department of Horticulture, College of Agronomy, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832003, China

²Key Laboratory of Special Fruits and Vegetables Cultivation Physiology and Germplasm Resources Utilization of Xinjiang Production and Construction Corps, Shihezi, Xinjiang 832003, China

Abstract: A hydroponic experiment was performed to investigate the effects of exogenous glutathione (GSH) on nitric oxide (NO) levels, the activities of key enzymes related to NO synthesis, the lipid peroxidation level, production of reactive oxygen species (ROS), and the ROS scavenging capacity in leaves of tomato (*Lycopersicon esculentum*) seedlings under NaCl and NaCl+Hb (NO scavenger) treatments. Our results showed that the application of Hb increased the oxidative damage and decreased the NO level, but had no significant effect on GSH contents in the leaves of salt-stressed tomato seedlings. Exogenous GSH application significantly increased the contents of GSH and NO and the activities of nitrate reductase (NR), monodehydroascorbate reductase (MDHAR), superoxide dismutase (SOD) (except 72 h), and catalase (CAT) (except 48 h) during the whole sampling period, as well as the activities of glutathione reductase (GR), ascorbate peroxidase (APX) and dehydroascorbate reductase (DHAR) at 48 and 72 h after treatments, and decreased the electrolyte permeability, the contents of thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) and hydrogen peroxide (H₂O₂) during the whole sampling period and superoxide anion (O₂⁻) at 48 and 72 h in leaves of salt-stressed tomato seedlings. The application of GSH also significantly increased the levels of GSH, ascorbic acid (AsA) and NO, the activities of CAT and APX at all three sampling dates, and the activities of NR at 24 and 48 h and nitric oxide synthase (NOS) at 48 and 72 h, and decreased the electrolyte permeability and the contents of TBARS and H₂O₂ in leaves of tomato seedlings under NaCl+Hb treatment. These results indicate that exogenous GSH could alleviate the oxidative damage induced by NaCl or NaCl+Hb treatments by up-regulating the levels of GSH and NO, and increasing the activities of antioxidant enzymes and the ROS scavenging capacity. In conclusion, NO is involved in the regulation of antioxidant defense capacity against salt stress in tomato seedlings by exogenous GSH.

Key words: GSH; Hb; salt stress; tomato seedling; antioxidant system

Received 2017-10-09 Accepted 2018-03-26

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31360478) and the International Cooperation Project of Xinjiang Production and Construction Corps (2014BC002).

*Corresponding author (hyliuok@aliyun.com).