

文章编号: 0258-7025(2008)07-1111-05

NO 在 CO₂ 激光预处理提高小麦耐旱性中的作用

邱宗波^{1,2} 李方民¹ 刘 晓¹ 岳 明¹

(¹ 西北大学生命科学学院, 陕西 西安 710069; ² 河南师范大学生命科学学院, 河南 新乡 453007)

摘要 用 CO₂ 激光(20.1 mW/mm²)辐照小麦种子 3 min, 待其长至 12 天时, 用质量浓度 10% 聚乙二醇 6000 (PEG6000)胁迫其幼苗, 并通过添加 NO 的供体硝普钠(SNP)和血红蛋白(Hemoglobin, Hb; NO 清除剂), 研究 NO 在 CO₂ 激光预处理提高小麦耐旱性中的作用。结果表明, 外源 NO 和激光预处理可使干旱胁迫的小麦幼苗丙二醛(MDA)含量显著降低 ($p < 0.05$), 而超氧化物歧化酶(SOD), 过氧化物酶(POD), 过氧化氢酶(CAT)活性, 叶绿素 a, 叶绿素 b 含量和根干重却显著增加 ($p < 0.05$)。而经过适当剂量激光辐照干旱胁迫小麦幼苗再加外源血红蛋白(Hb, NO 清除剂)处理则没有这种作用。

关键词 医用光学与生物技术; 激光生物学; NO; 生理实验; CO₂ 激光; 干旱胁迫

中图分类号 Q 631 文献标识码 A doi: 10.3788/CJL20083507.1111

Effect of NO on CO₂ Laser Pretreatment Inducing Drought Tolerance in Wheat Seedlings

Qiu Zongbo^{1,2} Li Fangmin¹ Liu Xiao¹ Yue Ming¹

(¹College of Life Science, Northwest University, Xi'an, Shaanxi 710069, China
²College of Life Science, Henan Normal University, Xinxiang, Henan 453007, China)

Abstract The wheat seeds are irradiated by CO₂ laser with power of 20.1 mW/mm² for 3 min. When the wheat seeds grow about 12 days, the seedlings are treated with the 10% polyethyleneglycol 6000 (PEG6000) stress. And the effects of NO on the CO₂ laser pretreatment inducing drought tolerance are studied through sodium nitroprusside and hemoglobin added with NO. The results show that laser pretreatment and NO donor sodium nitroprusside (SNP) could decrease the concentration of malondialdehyde (MDA) and increase the activities of superoxide dismutase (SOD), peroxidase(POD), catalase (CAT) and the concentration of chlorophyll a, chlorophyll b and root dry weight in the wheat seedlings with drought tolerance. But the promotive effect of laser pretreatment induced drought tolerance in wheat seedlings was not effectively reversed by the addition of hemoglobin (NO scavenger).

Key words medical optics and biotechnology; laser biology; nitric oxide; physiology experiment; CO₂ laser; drought stress

1 引 言

适当剂量的激光辐照可以促进植物种子的萌发率^[1]、提高酶活性和叶绿素含量^[2]。用 He-Ne 激光辐照小麦可提高其酶活性^[3], 对细胞膜损伤具有修复作用, 增强抗逆性。He-Ne 激光辐射蚕豆幼苗可提高超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)活性, 改变超氧化物歧化酶、过

氧化氢酶同工酶谱从而对紫外线-B(UV-B)辐射损伤具有一定的防护和修复作用^[4,5]。CO₂ 激光预处理可提高小麦谷胱甘肽(GSH)和抗坏血酸(AsA)含量以及超氧化物歧化酶、过氧化物酶、过氧化氢酶活性从而对干旱胁迫引起的小麦幼苗脂质过氧化伤害起到一定的防护作用^[6]。

NO 是广泛分布于生物体的一种气体类生物活

收稿日期: 2007-09-25; 收到修改稿日期: 2007-12-05

基金项目: 国家自然科学基金(30670366)资助项目。

作者简介: 邱宗波(1978—), 女, 河南人, 讲师, 博士, 主要从事植物生理生态及分子生物学方面的研究。

E-mail: zongboqiu7711@163.com

导师简介: 岳 明(1967—), 男, 新疆人, 教授, 博士生导师, 主要从事激光生物学和环境生物学方面的研究。

E-mail: yueming@nwu.edu.cn (通信作者)

性分子^[7]。低浓度 NO 可以促进植物的生长发育^[8],也可以缓解盐胁迫诱导的小麦叶片膜脂过氧化,提高耐盐性^[9]。外源 NO 预处理可以提高干旱胁迫条件下植物叶片的保水性,降低离子渗漏,诱导气孔关闭以及增加胚胎发育后期丰富蛋白编码基因的转录本,从而提高耐旱性^[10]。而 CO₂ 激光预处理也可以提高植物的耐旱性,这促使我们研究 NO 参与激光预处理对干旱胁迫的调节作用。所以推测 CO₂ 激光预处理提高植物的耐旱性是否通过激发植物体内 NO 的产生,从而由 NO 发挥作用来提高植物的耐旱性。这将有助于进一步了解激光提高植物抗逆性的生理机制。为此,本研究以小麦为材料,证实 NO 在 CO₂ 激光预处理提高植物耐旱性中的作用。

2 材料与方 法

2.1 材料培养及处理

由杨凌示范区种子公司提供春小麦 (*Triticum*

aestivum L.) 绵阳 26 号为实验材料。

选取籽粒饱满、大小均匀的小麦种子用质量浓度 0.1% HgCl₂ 消毒 10 min 后,用自来水冲洗 50 min,无激光和干旱胁迫处理的种子为对照组 (CK),进行激光照射的种子为处理组。所用 CO₂ 激光器的波长为 10600 nm,光斑直径为 30 mm,辐射剂量为 20.1 mW/mm²,距离为 36 cm,直射小麦种子胚,辐射时间分别为 3 min。然后置于 25 ℃ 恒温箱中浸种 36 h,播种在铺有 2 层滤纸的培养皿中催芽,40 粒/皿,每组 5 个重复,培养皿直径为 18 cm。待出芽后,培养于 25 ± 1 ℃ 人工气候室内,浇以荷格伦特 (Hoagland) 营养液,有效光量子密度为 250 μmol/(m² · s),光暗周期为 12 h/12 h,昼夜温度为 25 ℃/18 ℃,相对湿度为 70%。待幼苗长至 12 天时,用质量浓度 10% 聚乙二醇 PEG6000 溶液进行干旱胁迫处理。在干旱胁迫的第 8 天分别取小麦幼苗叶片和根测定各项指标。具体实验设计见表 1。

表 1 CO₂ 激光预处理、外源 NO 和干旱胁迫处理

Table 1 CO₂ laser pretreatment, NO donor SNP treatment and drought stress

Group/Treatment	CO ₂ laser treatment /min	Drought stress /%	Hemoglobin (NO scavenger) /%	SNP((Na ₂ Fe(CN) ₅)NO (NO donor) /mmol/L
Hoagland (the control, CK)	0	0	0	0
PEG6000 (P)	0	10	0	0
Laser treatment+PEG6000 (L+P)	3	10	0	0
Laser treatment+PEG6000+hemoglobin (L+P+Hb)	3	10	0.5	0
Hoagland+hemoglobin (Hb)	0	0	0.5	0
PEG6000+SNP (P+S)	0	10		0.05

2.2 生理生化指标测定

丙二醛 (MDA) 含量的测定按 Predieri 等的方法^[11]。超氧化物歧化酶活性根据 Giannoplitis 等的方法测定^[12],以每单位时间内抑制光化还原 50% 的氮蓝四唑 (NBT) 为一个酶活性单位 (U)。过氧化物酶活性测定参照文献^[13]的方法。过氧化氢酶活性测定参照 Cakmak 等的方法^[14]。叶绿素和类胡萝卜素含量测定参照 Arnon 的方法^[15]。将根鲜样品材料置于 105 ℃ 烘箱中杀青 10 min,转至 80 ℃ 烘干至恒重,称得根干重。

2.3 统计分析

对所有数据进行方差分析,处理间的差异显著性用新复极差 (Duncan's) 检验。 $p < 0.05$ 表示各处理在 0.05 水平上差异显著。整个计算过程在 SPSS 和 EXCEL 软件系统下完成。

3 结果和分析

从图 1(a) 可以看出 (FW 表示鲜重),干旱胁迫处理 (P) 可使小麦叶片丙二醛含量显著增加 ($p < 0.05$)。而经过激光预处理 (L+P) 和外源 NO 处理 (P+S) 的小麦幼苗丙二醛含量显著下降 ($p < 0.05$)。说明激光预处理和外源 NO 可对干旱胁迫损伤小麦幼苗起到一定的防护作用。而经过激光预处理的小麦幼苗再加 Hb 处理 (L+P+Hb) 丙二醛含量与激光预处理 (L+P) 之间没有显著差异。单独 Hb 处理的小麦幼苗丙二醛含量与对照相比无显著差异。说明激光对干旱胁迫损伤小麦幼苗起到一定的防护作用,但不是通过诱导内源 NO 的产生而起作用。

从图 1(b), (c), (d) 可以看出,经过激光预处理 (L+P) 和外源 NO 处理的干旱胁迫小麦幼苗超氧

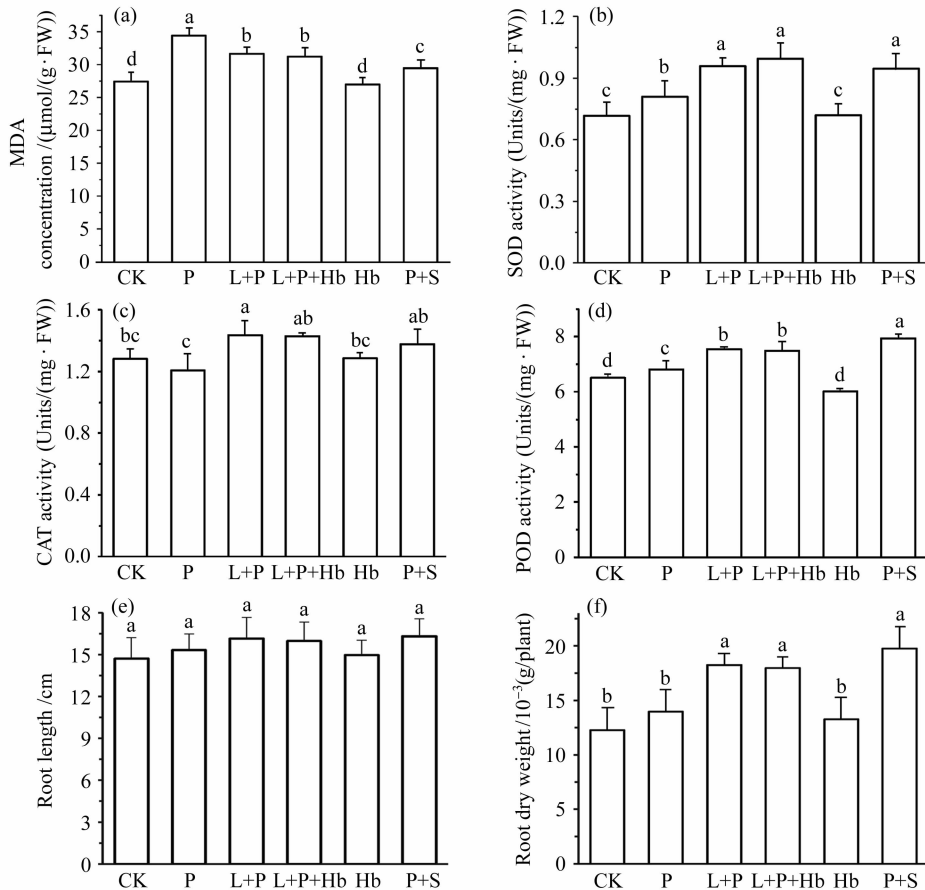


图1 激光预处理和 NO 处理对干旱胁迫小麦幼苗叶片丙二醛含量(a),超氧化物歧化酶(b),过氧化氢酶(c),过氧化物酶活性(d),根长(e)和根干重(f)的影响(注:图中不同字母表示不同处理之间方差分析结果的差异显著性($p < 0.05$, $n = 6$))

Fig.1 Effects of laser pretreatment and NO treatment on the concentration of malondialdehyde (a), activities of superoxide dismutase (b), catalase (c), peroxidase (d) in wheat leaves, root length (e) and root dry weight (f) of wheat seedlings under drought stress (Note: different letters above bars were significantly different at 0.05 level according to Duncan's multiple range test, ($p < 0.05$, $n = 6$))

化物歧化酶、过氧化氢酶和过氧化物酶活性显著增加 ($p < 0.05$)。说明激光辐照和外源 NO 可对干旱胁迫植物起到一定的保护作用。而经过激光预处理的干旱胁迫小麦幼苗再加外源血红蛋白(Hb, NO 清除剂)处理(L+P+Hb)超氧化物歧化酶、过氧化氢酶和过氧化物酶活性与 L+P 处理之间没有显著差异。单独血红蛋白处理的小麦幼苗超氧化物歧化酶、过氧化氢酶和过氧化物酶活性与对照相比无显著差异,对激光预处理提高干旱胁迫下小麦幼苗叶片抗氧化酶活性的影响不大。

表 2 表示不同处理对小麦叶片叶绿素 a, 叶绿素 b 和类胡萝卜素含量的影响。从表 2 可以看出, 干旱处理(P)使小麦叶片叶绿素 a, 叶绿素 b 和类胡萝卜素含量略微下降, 但与对照相比无显著差异。复合处理中, L+P+Hb 的叶绿素 a 和叶绿素 b 含

量与 L+P 处理无显著差异, 而 L+P 和 P+S 处理可使叶绿素 a 和叶绿素 b 含量显著增加 ($p < 0.05$)。单独血红蛋白处理的小麦幼苗叶绿素 a, 叶绿素 b 和类胡萝卜素含量与对照相比无显著差异。这说明激光预处理主要不是通过诱导内源 NO 产生而对植物的光合作用起到一定的防护作用。

从图 1(e), (f) 可以看出, 不同处理对小麦幼苗根长无显著作用。激光预处理和外源 NO 处理可使干旱胁迫小麦幼苗根干重显著增加 ($p < 0.05$)。经过激光预处理的干旱胁迫小麦幼苗再加血红蛋白处理, 其根干重与 L+P 相比无显著差异。单独血红蛋白处理的小麦幼苗其根干重与对照相比无显著差异。说明激光辐照萌发小麦生长点可提高其幼苗生理生化代谢机能, 以及自身抵御胁迫和伤害的能力, 但主要不是通过诱导内源 NO 来实现的。

表 2 激光预处理和外源 NO 处理对干旱胁迫小麦幼苗叶片光合色素含量的影响(mg/(g·FW))
Table 2 Effects of laser pretreatment and NO treatment on photosynthetic pigment content in leaves of wheat seedlings under drought stress (mg/(g·FW))

	CK	P	L+P	L+P+Hb	Hb	P+S
Chla	0.564±0.030bc	0.519±0.066c	0.638±0.033a	0.632±0.054a	0.532±0.049bc	0.593±0.060ab
Chlb	0.390±0.033bc	0.353±0.045c	0.451±0.007ab	0.407±0.044b	0.306±0.016d	0.470±0.056a
Car	1.24±0.11a	1.19±0.07a	1.26±0.05a	1.28±0.01a	1.27±0.04a	1.22±0.06a

Different letters within the same line indicate significant difference at 0.05 level ($p < 0.05, n = 6$).

4 讨 论

水分胁迫是限制作物产量和质量的主要环境因素之一^[16]。干旱胁迫对细胞的第一个作用靶就是细胞膜。膜结构与功能的改变可直接影响细胞的功能与代谢活动。丙二醛含量的高低是反映细胞膜脂质过氧化作用强弱和质膜破坏程度的重要指标^[17]。本研究结果表明,干旱胁迫可使丙二醛含量显著增加,表明小麦幼苗细胞膜受到明显损伤。而适当剂量的激光辐照和外源 NO 可使干旱胁迫植物的超氧化物歧化酶、过氧化物酶和过氧化氢酶活性增强,丙二醛含量降低,从而对干旱胁迫小麦幼苗的氧化损伤有缓解作用。这与 Qiu 等^[18]和 Garcia-Mata 等^[10]的实验结果相一致。NO 作为信号分子参与植物逆境信号转导已受到越来越多的关注^[19]。为了探知 NO 是否参与激光预处理对干旱胁迫的调节作用,用预先经过激光预处理的干旱胁迫小麦幼苗再加外源血红蛋白进行处理(Hb, NO 清除剂)(L+P+Hb)。实验结果表明,预先经过激光预处理的干旱胁迫小麦幼苗再加外源血红蛋白处理(L+P+Hb)丙二醛含量和抗氧化酶活性与 L+P 处理之间没有显著差异。单独血红蛋白处理(Hb)的小麦幼苗丙二醛含量和抗氧化酶活性与对照相比无显著差异。这说明血红蛋白对激光预处理提高干旱胁迫下小麦幼苗叶片膜脂质过氧化和抗氧化酶活性的影响不大。这也可理解为激光预处理对干旱胁迫的作用过程中没有诱导内源 NO 参与,激光预处理不是通过 NO 对膜质过氧化的防护和抗氧化酶活性的提高来调节干旱胁迫下小麦幼苗的耐旱性。

干旱胁迫条件下,植物的光合作用会受到明显影响,而维持光合功能是植物耐旱的重要机制之一^[20]。适当剂量的激光辐射可以提高种子的萌发率、酶的活性、叶绿素含量以及植物的抗逆性^[1,2,4,5,6,18,21]。樊怀福等^[22]研究发现外源 NO 能提高抗氧化酶的活性和叶绿素的含量,显著缓解盐胁迫对黄瓜幼苗造成的伤害。NO 是一种气体小分

子自由基,化学性质活泼,因此常用 NO 释放剂硝普钠(SNP)来对植物进行外源 NO 处理^[23]。本研究中激光预处理和硝普钠处理可使干旱胁迫小麦幼苗叶片叶绿素 a 和叶绿素 b 含量显著增加。复合处理中,L+P+Hb 的叶绿素 a 和叶绿素 b 含量与 L+P 处理无显著差异。单独血红蛋白处理的小麦幼苗叶片叶绿素 a,叶绿素 b 和类胡萝卜素含量与对照相比无显著差异。这说明激光预处理主要不是通过诱导 NO 产生而对植物的光合作用起到一定的防护作用。

适当剂量的激光辐照不但影响干旱胁迫小麦幼苗的膜脂质过氧化、抗氧化酶活性和光合色素的含量,而且还影响小麦幼苗的生理生化代谢。激光预处理可使干旱胁迫小麦幼苗根干重显著增加。而经过适当剂量激光辐照干旱胁迫小麦幼苗再加外源血红蛋白处理则没有这种作用。从而说明激光在生理生化水平上对干旱胁迫损伤具有明显的防护作用且不是主要通过 NO 起作用。

在植物中,NO 和 H₂O₂ 的相互作用已有报道^[19]。Delledonne 等^[24]揭示在蚕豆悬浮细胞中诱导细胞超敏感死亡需要 NO 和活性氧(ROS)两者之间达到某种平衡。Lum 等^[25]发现在绿豆保卫细胞中 H₂O₂ 作为上游信号诱导 NO 的产生。NO 可能作为 H₂O₂ 的下游信号介导植物激素脱落酸(ABA)诱导的蚕豆气孔关闭^[26]。关于激光预处理提高小麦幼苗耐旱性与其他信号分子的关系,如 H₂O₂, ABA, Ca²⁺ 还需进一步研究。

参 考 文 献

- 1 S. R. Govil, D. C. Agrawal, K. P. Rail *et al.*. Physiological responses of vigna radita L. to nitrogen and argon laser irradiation [J]. *Indian J. Plant Physiol.*, 1991, **1**:72~76
- 2 Qi Zhi, Yue Ming, Wang Xunling *et al.*. Protect effect of He-Ne laser pretreatment on broad bean seedling damage by UV-B radiation [J]. *Chinese J. Lasers*, 2002, **A29**(1):91~94
齐智,岳明,王勋陵等.激光对蚕豆幼苗紫外线-B辐射损伤的防护作用[J]. *中国激光*, 2002, **A29**(1):91~94
- 3 Han Rong, Wang Xunling, Yue Ming. Influence of He-Ne laser irradiation on the excision repair of cyclobutyl pyrimidine dimers

- in the wheat DNA [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2002, **47**(6): 435~438
- 韩榕, 王勋陵, 岳明. He-Ne 激光对小麦 DNA 环丁烷嘧啶二聚体切除修复的影响[J]. 科学通报, 2002, **47**(6):435~438
- 4 Zhi Qi, Ming Yue, Xunling Wang. Laser pretreatment protects cells of broad bean from UV-B radiation damage [J]. *J. Photochemistry Photobiology B*, 2000, **59**(1-3):33~37
- 5 Zhi Qi, Ming Yue, Rong Han *et al.*. The damage repair role of He-Ne laser on plants exposed to different intensities of Ultraviolet-B irradiation [J]. *J. Photochem. and Photobiol.*, 2002, **75**(6):680~686
- 6 Z. B. Qiu, X. Liu, X. J. Tian *et al.*. Effects of CO₂ laser pretreatment on drought stress resistance in wheat [J]. *J. Photochemistry Photobiology B; Biology*, 2008, **90**:17~25
- 7 Jiankang Zhu. Salt and drought stress signal transduction in plants [J]. *Annu Rev. Plant Biol.*, 2002, **53**:247~273
- 8 M. V. Beligni, L. Lamattina. Nitric oxide: a non-traditional regulator of plant growth [J]. *Trend Plant Sci.*, 2001, **6**:508~509
- 9 Ruan Haihua, Shen Wensa, Ye Maobing *et al.*. The protective effect of NO on peroxidation damage of wheat leaves under salt stress [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2001, **46**(23):1993~1997
- 阮海华, 沈文懿, 叶茂炳等. 一氧化氮对盐胁迫下小麦叶片氧化损伤的保护效应[J]. 科学通报, 2001, **46**(23):1993~1997
- 10 Carlos García Mata, Lorenzo Lamattina. Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress [J]. *Plant Physiol.*, 2001, **126**:1196~1204
- 11 S. Predieri, H. A. Norman, D. T. Krizek *et al.*. Influence of UV-B radiation on membrane lipid composition and ethylene of evolution in 'Doyenne d'Hiver' pear shoots grown in vitro under different photosynthetic photo fluxes [J]. *Environmental Experimental Botany*, 1995, **35**(2):151~160
- 12 Constantine N. Giannoplitis, Stanley K. Ries. Superoxide dismutase II. Purification and quantitative relationship with water-soluble protein in seedlings [J]. *Plant Physiology*, 1977, **59**(9):315~318
- 13 Jingxian Zhang, M. B. Kirkham. Drought-stress-induced changes in activities of superoxide dismutase, catalase and peroxidase in wheat species [J]. *Plant Cell Physiology*, 1994, **35**(5):785~791
- 14 Ismail Cakmak, Horst Marschner. Magnesium deficiency and high light intensity on enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase and glutathione reductase in bean leaves [J]. *Plant Physiology*, 1992, **98**:1222~1227
- 15 Daniel I. Arnon. Copper enzymes in isolated chloroplasts. polyphenoloxidase in beta vulgaris [J]. *Plant Physiology*, 1949, **24**:1~15
- 16 P. D. Hare, W. A. Cress, J. Van Staden. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress [J]. *Plant Cell and Environment*, 1998, **21**(6):535~553
- 17 Tissa Senaratna, Bryan D. McKersie, Robert H. Stinson. Simulation of dehydration injury to membranes from soybean axes by free radicals [J]. *Plant Physiology*, 1985, **77**(2):472~474
- 18 Zongbo Qiu, Xinjun Zhu, Fangmin Li *et al.*. The optical effect of semiconductor laser on protecting wheat from UV-B radiation damage [J]. *Photochemical Photobiological Sciences*, 2007, **6**:788~793
- 19 Steven J. Neill, Radhika Desikan, Andrew Clarke *et al.*. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signaling molecules in plants [J]. *J. Exp. Bot.*, 2002, **53**(372):1237~1247
- 20 Asish Kumar Parida, Anath Bandhu Das. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2005, **60**(3):324~349
- 21 Qiu Zongbo, Zhu Xinjun, Li Fangmin *et al.*. Precaution against UV-B-induced damage by pre-treating with semiconductor laser in wheat seedlings [J]. *Chinese J. Lasers*, 2007, **34**(8):1163~1168
- 邱宗波, 朱新军, 李方民等. 半导体激光防护小麦幼苗紫外线-B 辐射损伤的作用[J]. 中国激光, 2007, **34**(8):1163~1168
- 22 Fan Huaifu, Guo Shirong, Jiao Yansheng *et al.*. The effects of exogenous nitric oxide on growth, active oxygen metabolism and photosynthetic characteristics in cucumber seedlings under NaCl stress [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2007, **27**(2):546~553
- 樊怀福, 郭世荣, 焦彦生等. 外源一氧化氮对 NaCl 胁迫下黄瓜幼苗生长、活性氧代谢和光合特性的影响[J]. 生态学报, 2007, **27**(2):546~553
- 23 Junming He, Hua Xu, Xiaoping She *et al.*. The role of the interrelationship of hydrogen peroxide and nitric oxide in the UV-B-induced stomatal movement in broad bean [J]. *Functional Plant Biology*, 2005, **32**:237~247
- 24 M. Delledonne, Y. Xia, R. A. Dixon *et al.*. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance [J]. *Nature*, 1998, **394**(6693):585~588
- 25 H. K. Lum, Y. K. Butt, S. C. Lo. Hydrogen peroxide induces a rapid production of nitric oxide in mung bean (*Phaseolus aureus*) [J]. *Nitric Oxide*, 2002, **6**(2):205~213
- 26 Lü Dong, Zhang Xiao, Jiang Jing *et al.*. NO may function in the downstream of H₂O₂ in ABA-induced stomatal closure in *Vicia faba* L. [J]. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 2005, **31**(1):62~70
- 吕东, 张骁, 江静等. NO 可能作为 H₂O₂ 的下游信号介导 ABA 诱导的蚕豆气孔关闭[J]. 植物生理与分子生物学学报, 2005, **31**(1):62~70