西北植物学报,2014,34(3):0536－0542
Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.

文章编号:1000-4025(2014)03-0536-07 **doi**:10.7606/j.issn.1000-4025.2014.03.0536

外源 NO 对铝毒下水稻根系生长和抗氧化系统的影响

吴　坤[1],邢承华[2],饶玉春[1],宋洪明[1],陈晓阳[3],蔡妙珍[4*]

(1 浙江师范大学 化学与生命科学学院,浙江金华 321004;2 金华职业技术学院 农业与生物工程学院,浙江金华 321007;3 浙江省金华市农业科学研究院,浙江金华 321000;4 浙江师范大学 地理与环境科学学院,浙江金华 321004)

摘　要:以水稻品种'浙辐 802'为材料,采用水培法研究铝毒下外源 NO 对幼苗根系生长、活性氧产生和抗氧化酶活性的影响,探讨外源 NO 提高水稻耐铝性的生理生化机制。结果显示:(1)0.05 mmol/L Al 显著抑制水稻根系生长,促使根尖 Al、胼胝质、过氧化氢(H_2O_2)和超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)含量显著增加;而外源 0.1 mmol/L 的 NO 供体亚硝基铁氰化钠(sodium nitroprusside,SNP)预处理能使铝毒下水稻幼苗根相对伸长率及根尖 NO 含量分别增加 34.96%和 12.86%,根尖 Al 和相对胼胝质含量分别下降 83.04%和 31.93%,表明 NO 可部分缓解铝毒害,且这种作用与内源 NO 含量变化有关。(2)外源 NO 同时使铝毒下水稻幼苗根尖 H_2O_2 和 $O_2^{\cdot-}$ 含量分别下降 15.43%和 12.93%,使超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)活性显著上升,且外源 NO 的该种作用可以被 0.075 mmol/L NO 清除剂(carboxy-PTIO,cPTIO)所逆转。研究表明,外源 NO 在调节活性氧代谢以维持细胞膜结构稳定,进而有效减轻 Al 对水稻根系的损伤上起着重要作用。

关键词:水稻;铝毒;NO;活性氧;抗氧化酶

中图分类号:Q945.78　　**文献标志码**:A

Effect of Exogenous Nitric Oxide on Root Growth and Antioxidant System in Rice Seedlings under Aluminum Toxicity

WU Kun[1],XING Chenghua[2],RAO Yuchun[1],SONG Hongming[1],CHEN Xiaoyang[3],CAI Miaozhen[4*]

(1 College of Chemistry and Life Sciences,Zhejiang Normal University,Jinhua,Zhejiang 321004,China;2 Bioengineering Institute,Jinhua College of Vocation and Technology,Jinhua,Zhejiang 321007,China;3 Jinhua Academy of Agricultural Sciences,Jinhua,Zhejiang 321000,China;4 College of Geography and Environmental Sciences,Zhejiang Normal University,Jinhua,Zhejiang 321004,China)

Abstract:To verify the physiological mechanism of exogenous nitric oxide (NO) on ameliorating Al toxicity in rice,we planted cultivar 'Zhefu 802' in hydroponic solutions,and then detected the reactive oxygen species and antioxidase activity. The results showed that:(1)0.05 mmol/L Al significantly inhibited root growth,caused Al and callose accumulation in root tips,and increased the contents of reactive hydrogen peroxide (H_2O_2) and superoxide anion freebase ($O_2^{\cdot-}$). Pretreatment the rice seedlings were applied with 0.1 mmol/L sodium nitroprusside in the presence of Al (SNP,NO donor) increased relative root elongation and NO content by 34.96% and 12.86%,respectively,reduced Al and callose contents by 83.04% and 31.93%,indicating that NO partially alleviated Al toxicity which might be caused by the rising levels of en-

收稿日期:2013-11-28;**修改稿收到日期**:2013-12-27
基金项目:国家自然科学基金(31101599);浙江省自然科学基金(Y3110561)
作者简介:吴　坤(1985－),男,在读硕士研究生,主要从事植物逆境生理研究。E-mail:wukun2007@163.com
*通信作者:蔡妙珍,博士,教授,主要从事植物逆境营养与环境生态的研究。E-mail:mzcai@zjnu.cn

dogenous NO. (2) The exogenous NO decreased H_2O_2 and O_2^- contents by 15.43% and 12.93%, respectively, and significantly enhanced SOD, POD and CAT activities in rice root tips. In contrary, the ameliorating effect was reversed by the addition of NO scavenger (carboxy-PTIO, cPTIO) in the presence of Al. These results showed that exogenous NO played an important role in maintaining cell membrane structure stability by regulating reactive oxygen metabolism under Al toxicity, thereby reducing the Al damage to rice roots.

Key words: rice; aluminum toxicity; nitric oxide; reactive oxygen; antioxidase

铝是地壳中含量最丰富的金属元素，约占地壳总质量的 7.7%，通常以难溶性的硅酸盐或氧化铝形式存在于土壤固相部分。在酸性土壤中，特别是 pH 低于 5 的情况下，土壤铝易被活化为三价铝(Al^{3+})形态，Al^{3+} 浓度过高则对土壤生物生存产生不利影响[1]。在中国，酸性土壤占可耕土壤的 40% 左右，铝毒已成为酸性土壤中限制植物生长的主要因素。在铝对植物的毒害研究中，由于铝在土壤中存在形态复杂并与多种生物组分具高度亲和性，使得铝毒在植物体具有很多潜在的毒害位点[2]，致使铝毒机理至今仍不完全清楚。

NO 是一种具生物活性的气体分子，能够调节植物的生长发育，参与植物的超敏反应、细胞程序性死亡、高温、低温、盐害和干旱等多种生物及非生物胁迫的应答反应[3]。在植物对铝毒害的应答响应中，外源 NO 可明显改善铝对芙蓉葵[4]、决明[5]、水稻[6]、黑麦和小麦[7]根伸长的抑制，降低铝在根尖的积累和细胞壁对铝的吸附量，表明 NO 能够参与植物耐铝毒的调控过程[3]。

铝毒下植物最明显的症状是根伸长迅速受到抑制，其部分原因来自于铝诱导的氧化伤害。Matsumoto 等[8]和 Achary 等[9]指出，铝毒引起的活性氧(ROS)积累是铝诱导根伸长抑制的原因；铝诱导洋葱和黄瓜根尖氧化胁迫，并最终导致细胞 DNA 损伤，细胞死亡；铝对植物细胞的毒害症状之一就是 ROS 积累导致的膜脂过氧化现象。表明植物根尖的 ROS 积累会导致铝毒害的产生及加重。因此，保持植物体内 ROS 平衡，避免 ROS 过量积累是植物抵御铝毒胁迫的重要方式。在逆境胁迫下，NO 可作为抗氧化剂直接清除多余活性氧，或通过调节抗氧化酶活性缓解氧化伤害[3]。而水稻在受到铝诱导的氧化胁迫过程中，NO 是否参与其调控过程以及作用机制还有待进一步研究。水稻是强耐铝的谷类作物，但其耐铝的生理和遗传机制仍不完全清楚，因此开展外源 NO 对铝毒下水稻根系生长和抗氧化的调节机制研究，有助于完善水稻耐铝的信号作用机制，为酸性土壤铝毒害防治提供理论依据。

1　材料和方法

1.1　供试材料与实验设计

供试材料为常规籼稻品种‘浙辐 802’，种子由浙江省农业科学院提供。选取健壮的水稻种子，先以 0.3% H_2O_2 溶液消毒 15 min，蒸馏水浸洗 3 次后平铺于具湿润滤纸的托盘中，上覆保鲜膜并保持适度透气，放在相对湿度为 60% 的培养箱中萌发(25 ℃，黑暗)。待根长至 1 cm 左右转入 pH 4.5 的 1/4 水稻营养液中预培养 3 d。水稻幼苗在光照和黑暗分别为 14 和 10 h 的培养箱中培养，其对应温度分别为 28 ℃和 25 ℃。挑选生长状况接近的幼苗进行试管培养，每支试管装处理液 18 mL，培养 1 株水稻幼苗。

试验设 4 组处理，即(1)CK：为对照，全过程用 0.5 mmol/L $CaCl_2$(pH 4.5)培养；(2)Al：先用 0.5 mmol/L $CaCl_2$(pH 4.5)预处理 12 h，接着用 0.05 mmol/L $AlCl_3$ 处理 24 h；(3)Al＋SNP：先用 0.1 mmol/L NO 供体亚硝基铁氰化钠(SNP)预处理 12 h，接着换用 0.05 mmol/L $AlCl_3$ 处理 24 h；(4)Al＋cPTIO：先用 0.075 mmol/L NO 清除剂 cPTIO (carboxy-PTIO)预处理 12 h，接着换用 0.05 mmol/L $AlCl_3$ 处理 24 h。所有处理均含 0.5 mmol/L $CaCl_2$(pH 4.5)。在 $AlCl_3$ 处理 24 h 后，各处理用 0.5 mmol/L $CaCl_2$ 溶液清洗 30 min 以洗脱幼苗根表的 Al^{3+} 残留，再用蒸馏水冲洗 3 次后测定各相关指标。每个处理重复 3 次。

其中，试验先分别用 0、0.025、0.05、0.075 和 0.1 mmol/L $AlCl_3$(均含 0.5 mmol/L $CaCl_2$，pH 4.5)在水稻上处理 24 h，再依据根相对伸长和 Al 含量确定 Al 的适宜处理浓度为 0.05 mmol/L。而 SNP 和 cPTIO 的浓度是通过前期预实验确定，分别用 SNP(0、0.012 5、0.025、0.05、0.1 和 0.2 mmol/L SNP，均含 0.5 mmol/L $CaCl_2$，pH 4.5)和 cPTIO(0、0.025、0.05、0.075、0.1 和 0.2 mmol/L cPTIO，均含 0.5 mmol/L $CaCl_2$，pH 4.5)预处理 12 h，接着用 0.05 mmol/L $AlCl_3$(含 0.5 mmol/L

$CaCl_2$,pH 4.5)溶液处理 24 h,以根相对伸长率和根尖 Al 含量为指标确定 SNP 和 cPTIO 的最佳浓度分别为0.1 和0.075 mmol/L。

1.2 测定指标及方法

1.2.1 根相对伸长率 分别测量 Al 处理 24 h 前后对应水稻幼苗的初根长及终根长,计算根伸长量,每个处理重复 20 次。

根相对伸长率=(处理组根伸长量/CK 组根伸长量)×100%

1.2.2 根尖 Al 含量 剪取 10 mm 根尖 20 个,以 0.5 mmol/L $CaCl_2$ 清洗 3 次。再以蒸馏水清洗 3 次,并用滤纸吸干,之后以 1 mL 2 mmol/L HCl 振荡浸提 24 h。浸提液用电感耦合等离子光谱发生仪(ICP)测定根尖 Al 含量($\mu g \cdot g^{-1}$ DW)[10],每个样品重复 3 次。

1.2.3 根尖胼胝质含量 剪取 10 mm 长根尖 40 个,放入 95%乙醇低温(4 ℃)保存过夜。以 1 mL 1.0 mmol/L 的 NaOH 研磨提取并转移至 1.5 mL 离心管中。80 ℃水浴 20 min,待冷却至室温后,12 500×g 离心 10 min。吸取上清液 400 μL 于 10 mL 离心管中,加入 2.5mL 苯胺蓝显色液,同时吸取上清液 400 μL 于 10 mL 离心管加入 2.5 mL 空白液。混匀后于 50 ℃水浴 20 min,室温冷却。用荧光分光光度计测定荧光值,激发光和发射光波长分别为 400 和 485 nm,以荧光强度水平表示胼胝质含量[11]。

1.2.4 根尖 NO 含量 将新鲜的 10 mm 长的根尖切成片段,加入 100 U 过氧化氢酶(CAT)和 100 U 超氧化物歧化酶(SOD),反应 5 min 以除去活性氧。然后,加入氧合血红蛋白(HbO_2)至终浓度为 10 μmol/L,37 ℃孵育 2 min,取 0.1 mL 上清液在 401 和 421nm 处测定光吸收值以计算 NO 的积累量,每个处理重复 3 次[12]。

1.2.5 根尖 H_2O_2 含量的测定及原位观察 剪取 10 mm 长根尖 40 个,用预先冷藏的丙酮研磨至匀浆,10 000×g 离心 20 min,上清液为 H_2O_2 待测液。用二甲酚橙法测定根尖 H_2O_2 的含量[13],每个样品重复 3 次。H_2O_2 原位观察时取 10 mm 长的水稻根尖,用磷酸缓冲溶液(PBS,pH 7.4)稀释 2′,7′-二氯荧光黄双乙酸盐(2′,7′-dichlorofluorescin diacetate,DCFH-DA)母液(碧云天生物技术研究所提供,南通)至 0.01 mmol/L,于 37 ℃孵育 20 min,再以 PBS 洗涤 3 次,之后在荧光显微镜(Motic-BA400,福建)下观察并拍照[14]。

1.2.6 根尖 $O_2^{\cdot-}$ 含量的测定及原位观察 剪取 10 mm 根尖 60 个,用 2 mL 65 mmol/L PBS(pH 7.8)冰浴研磨至匀浆,于 4 ℃以下 6 000×g 离心 15 min,上清液即为待测液。依据羟胺法测定根尖 $O_2^{\cdot-}$ 产生速率[15],每个样品重复 3 次。$O_2^{\cdot-}$ 原位观察时取 10 mm 长水稻根尖,以 0.01 mmol/L 超氧化物阴离子荧光探针(Dihydroethidium),37 ℃下孵育 30 min,接着根尖再以 PBS(pH 7.4)洗涤 3 次,最后在显微镜(Motic-BA400)下观察并拍照。

1.2.7 水稻根尖抗氧化酶活性 水稻根尖可溶性蛋白质含量采用 Bradford 的方法测定[16];超氧化物歧化酶(SOD)活性的测定根据 McCord 和 Fridovich 的方法[17],以抑制氯化硝基四氮唑(Nitrotetrazolium Blue chloride,NBT)光氧化还原 50%的酶量为一个酶活力单位(U);过氧化物酶(POD)活性的测定根据 Tan 等[18]的方法测每分钟吸光度值 $A_{470\ nm}$的变化量;过氧化氢酶(CAT)活性的测定根据 Aebi 的方法测每分钟吸光度值 $A_{240\ nm}$的变化量(ε=39.4 mmol·L^{-1}·cm^{-1})[19]。

1.3 数据分析

各指标测定中,根长每处理重复 20 次,其他指标均重复 3 次,然后通过 Excel 进行平均值和标准误差计算,并使用 SPSS 19.0 统计软件对数据进行方差分析($P<0.05$)。

2 结果与分析

2.1 外源 NO 对水稻幼苗铝毒的缓解作用

2.1.1 根长 图 1 显示,单独 Al 处理显著抑制水稻幼苗根系伸长,其根相对伸长率比CK降低了

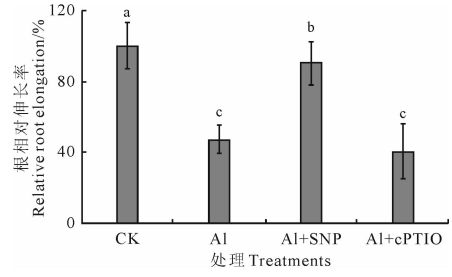

图 1 外源 NO 对铝毒下水稻根相对伸长率的影响

CK. 对照;Al. 0.05 mmol/L $AlCl_3$;SNP. 0.1 mmol/L SNP;cPTIO. 0.075 mmol/L cPTIO;不同小写字母表示处理间在 0.05 水平上差异显著($P<0.05$)。下同

Fig. 1 Effect of exogenous NO on relative root elongation of rice root under Al toxicity

CK. Control;Al. 0.05 mmol/L $AlCl_3$;SNP. 0.1 mmol/L SNP;cPTIO. 0.075 mmol/L carboxy-PTIO;Different lowercase letters above bars indicate difference at 0.05 significance level($P<0.05$). The same as below

52.95%。SNP 预处理 12 h，再经 Al 处理 24 h 后，其根相对伸长率较 Al 组增加 91.70%，但仍显著低于 CK。而经 NO 清除剂 cPTIO 预处理，再以 Al 处理后幼苗的根相对伸长率与 Al 处理组无显著差异。以上结果表明 Al 显著抑制了水稻幼苗的根系伸长，外源 NO 供应能够有效缓解 Al 对水稻根伸长的抑制。

2.1.2　根尖 Al 含量　与 CK 相比，Al 处理下水稻幼苗根尖 Al 含量增加了 193.60%。Al＋SNP 的根尖 Al 含量比单独 Al 处理组下降了 51.62%，而经 Al＋cPTIO 处理的根尖 Al 含量与单 Al 处理相比无显著差异（图 2，A）。此外，桑色素染色结果也显示，单独 Al 处理以及以 cPTIO 预处理的水稻幼苗根尖绿色荧光强度明显较亮，而 SNP 预处理根尖的荧光较暗，与 CK 接近（图 2，B）。可见，Al 处理下有大量 Al 在水稻幼苗根尖积累，而外源 SNP 处理能显著减少铝毒引起的水稻根尖 Al 积累。

2.1.3　根尖胼胝质含量　铝毒会诱导植物体产生胼胝质，因此它常作为植物对铝毒的敏感指标[20]。Al处理使水稻幼苗根尖胼胝质含量显著增加，与 CK 相比增加 43.48%。Al＋SNP 处理的水稻幼苗根尖胼胝质含量比 Al 处理显著降低，并与对照接近。而 Al＋cPTIO 处理的水稻幼苗根尖相对胼胝质含量与 Al 处理无显著差异（图 3）。说明外源 SNP 预处理可显著减少 Al 诱导的根尖胼胝质累积。

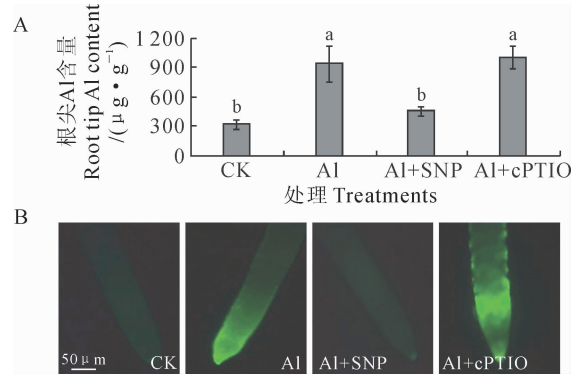

图 2　外源 NO 对 Al 胁迫水稻根尖 Al 含量（A）及桑色素荧光染色（B）的影响

Fig. 2　Effect of exogenous NO on (A) Al content and the Morin fluorescence staining (B) in rice root apex under Al toxicity

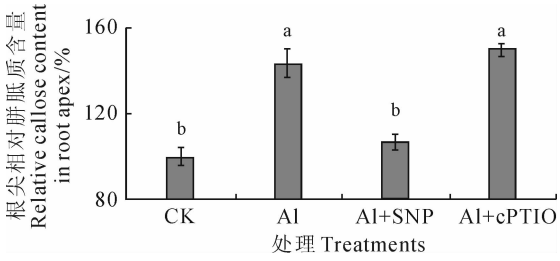

图 3　外源 NO 对铝毒下水稻根尖相对胼胝质含量的影响

Fig. 3　Effect of exogenous NO on the relative callose content in rice root apex under Al toxicity

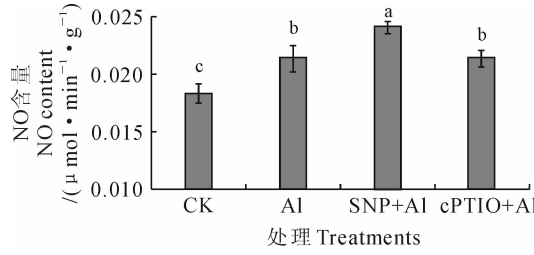

图 4　外源 NO 对铝毒下水稻根尖 NO 含量的影响

Fig. 4　Effect of exogenous NO on NO content in rice root apex under Al toxicity

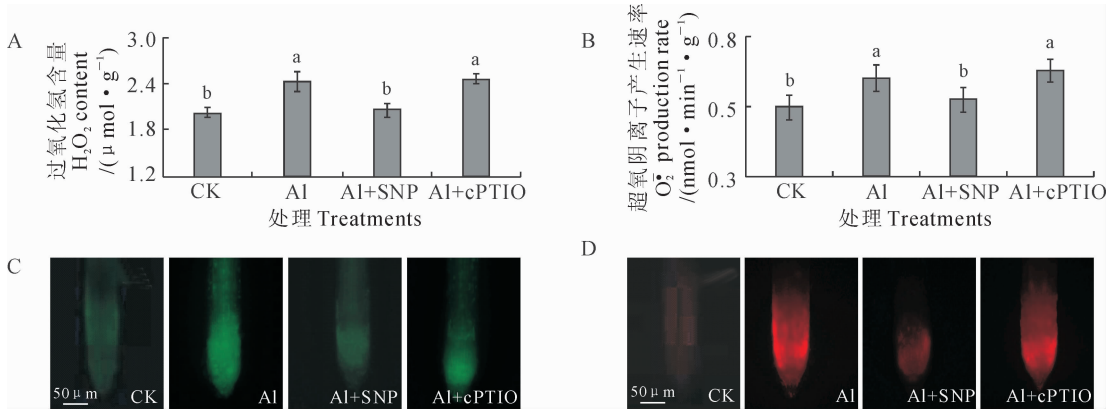

图 5　外源 NO 对铝毒下水稻根尖 H_2O_2（A，C）和 $O_2^{\cdot-}$（B，D）含量的影响及原位观察

Fig. 5　Effect of exogenous NO on H_2O_2 (A, C) and $O_2^{\cdot-}$ (B, D) contents in rice root apex under Al toxicity and *in situ* observation

2.2 外源 NO 对铝毒下水稻根尖 NO 含量影响

图 4 显示，Al 处理下水稻根尖 NO 含量比 CK 增加 9.81%。Al+SNP 处理后根尖 NO 含量比 CK 升高了 23.93%，比 Al 处理升高 12.86%。而 Al+cPTIO 处理下根尖 NO 含量与单独 Al 处理无差异，但仍显著高于 CK 水平。这表明 Al 胁迫处理可诱导水稻幼苗根尖 NO 含量显著升高，外源施入 SNP 可进一步提升 Al 处理下水稻根中 NO 的含量水平。

2.3 外源 NO 对铝毒下水稻根尖 H_2O_2 和 $O_2^{\cdot-}$ 含量的影响

与对照相比，Al 处理下水稻根尖 H_2O_2 含量上升 20.21%（$P<0.05$）；而 Al+SNP 处理下根尖 H_2O_2 含量与单独 Al 处理相比下降15.43%，并与 CK 相近。Al+cPTIO 处理水稻根尖 H_2O_2 含量与 Al 处理相比无显著差异（图 5，A）。另外，采用 DCF-DA 对水稻根尖 H_2O_2 荧光染色结果显示，Al 处理组水稻根尖绿色荧光最亮，其次，Al+cPTIO 组根尖也能明显观察到绿色荧光，而 Al+SNP 处理的根尖绿色荧光暗淡，接近对照（图 5，C）。

同时，对 $O_2^{\cdot-}$ 含量测定发现，Al 处理组根尖 $O_2^{\cdot-}$ 含量比对照上升 20.83%。SNP 预处理后 Al 胁迫下根尖的 $O_2^{\cdot-}$ 含量比单独 Al 处理下降了12.93%。当 cPTIO 预处理再进行 Al 处理，其根尖 $O_2^{\cdot-}$ 含量与单独 Al 处理无显著差异（图 5，B）。进一步采用 Dihydroethidium 荧光染色进行原位观察，结果显示，Al 处理组与 Al+cPTIO 组水稻幼苗根尖均出现较亮的红色荧光，而经 SNP 预处理组的红色荧光明显减弱（图 5，D），且各处理根尖 $O_2^{\cdot-}$ 荧光亮度的变化规律与根尖 H_2O_2 的荧光染色结果一致。以上结果说明 SNP 预处理能有效降低 Al 诱导的水稻根尖 H_2O_2 和 $O_2^{\cdot-}$ 累积。

2.4 外源 NO 对铝胁迫下水稻根尖 SOD、POD 和 CAT 活性的影响

图 6 显示，Al 胁迫处理显著提高水稻根尖 SOD、POD 和 CAT 活性，与对照相比分别显著增加 29.83%、30.95% 和 52.67%。而经外源 NO 供体 SNP 预处理的幼苗根尖保护酶活性均显著高于相应的单独 Al 处理，分别比单独 Al 处理显著增加 16.52%、22.21% 和 15.03%。cPTIO 预处理后，水稻根尖 3 种保护酶活性与 Al 处理无显著差异。以上结果表明 Al 毒害引起根尖活性氧大量积累，对植物产生毒害，从而诱导根尖主要保护酶活性显著增强，而外源NO供应可进一步显著提高根尖抗氧化酶活性，以清除水稻体内不断产生的活性氧，维持体内活性氧代谢的平衡，减轻铝胁迫伤害程度。

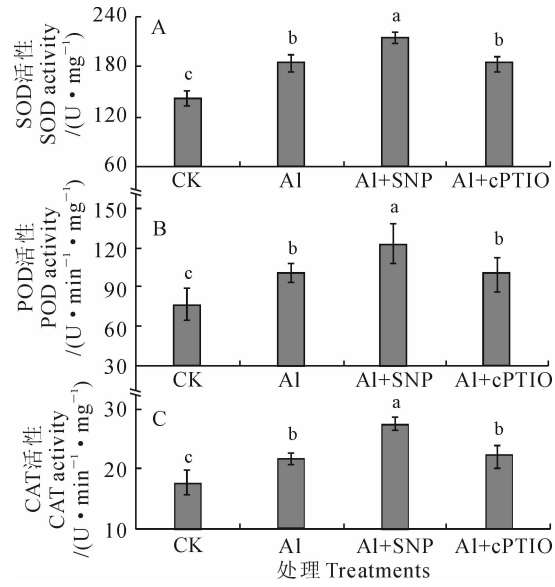

图 6 外源 NO 对铝毒下水稻根尖 SOD(A)、POD(B)和 CAT(C)活性的影响

Fig. 6 Effect of exogenous NO on SOD(A), POD(B) and CAT(C) activities in rice root apex under Al toxicity

3 讨 论

Horst 等[20]指出铝毒导致根伸长受到抑制，大量的 Al 及胼胝质会在根尖积累。本实验中 0.05 mmol/L $AlCl_3$ 对水稻根伸长的抑制率达 25.95%，与此同时根尖Al含量显著升高，根系中胼胝质及活性氧含量随之显著增加，这与在荞麦上的研究结果一致[11]，反映出微摩尔级的 Al 即可对水稻根系产生毒害作用[8]。NO 作为信号分子和活性氧清除剂，参与多种植物的耐铝调节过程[21-23]。SNP 是一种常用的外源 NO 供体，本实验中 0.1 mmol/L SNP 预处理可减轻 Al 对水稻幼苗根系伸长的抑制，根尖 Al 含量大幅下降，铝毒引起的根系胼胝质及活性氧含量显著下降，从而证实外源 NO 能够缓解铝对水稻的毒害作用。另外，NO 对水稻铝毒害的缓解作用可被 0.075 mmol/L cPTIO 预处理所逆转，这也进一步证实 NO 对水稻铝毒害的调控作用。并且实验中 SNP 和 Al 交替处理，可以确定其不是因二者相互螯合而直接降低了 Al 离子的毒性，而是 SNP 产生的 NO 参与了水稻耐铝调控过程。

SNP 预处理下根尖 Al 含量比单独 Al 处理组下降了 83.04%，这可能源于铝胁迫导致水稻根尖细胞壁多糖组分如：果胶增加，铝结合位点增多[24]。

而外源 NO 通过降低根尖果胶、半纤维素含量，提高果胶甲基酯化程度进而降低了铝在体内的积累量[6]。然而，Zhou 等[25]报道 SNP 预处理加剧了铝对饭豆根伸长的抑制和根尖质膜损伤，引起根尖更多 Al 积累，并指出这种加剧并非是 SNP 对有机酸及细胞壁果胶含量的影响造成的。作者认为 NO 在 2 个物种上的不同表现可能与 SNP 的处理浓度有关。NO 具有双重生理效应，低浓度 NO 在防御反应中起保护作用，但高浓度 NO 会对植物体产生严重伤害[26]。在饭豆实验中，SNP 浓度是 0.4 mmol/L[24]，推测外源施入的 NO 可能不是作为信号分子起作用，而是干扰了饭豆自身信号调节系统的内稳态，进而影响到其对铝的反应。本实验中的 SNP 浓度经过预实验筛选，是依据 NO 对水稻铝毒的最佳缓解效果确定的。因此，供试物种的不同和外源 NO 供应浓度的差异使得 NO 对植物铝毒的调节呈现出双重作用，但这其中更具体的机制还有待进一步探索。

Al 处理下水稻根尖内源 NO 含量显著上升，这与 Wang 等[22]在红芸豆上的结果一致，表明铝毒下，植物体内的抗性机制可能诱发了 NO 合成进而做出响应，且也被证明与硝酸还原酶（NR）有关。Al 胁迫导致水稻体内的活性氧含量（H_2O_2 和 O_2^-）增加，而外源 SNP 预处理下其活性氧含量较单 Al 处理显著下降，这说明 NO 对水稻耐铝的调节机制作用可能与活性氧相关，并且 NO 可能会通过调节植物体内活性氧的内稳态参与植物抗逆过程[20,26]。另外，本研究对水稻根系中 SOD、POD 和 CAT 3 种酶活性进一步检测发现，Al 处理能诱导 3 种抗氧化酶活性显著提高，与 Al 处理下的活性氧含量变化规律一致。Al 作用下抗氧化酶活性提升可清除多余的活性氧，有助于增强质膜完整性并延迟细胞壁木质化及细胞衰老[27]。SNP 预处理显著提高 SOD、POD 和 CAT 的活性，降低 H_2O_2 和 O_2^- 含量，其中的 SOD 可歧化 O_2^- 产生 H_2O_2，而 POD 和 CAT 可清除多余的 H_2O_2，抗氧化酶活性提高有利于清除水稻根尖 ROS 的积累，尤其是 H_2O_2 和 O_2^- 的积累。并且，无论是分光光度检测还是荧光染色结果均表明，外源 NO 的确降低了根尖 H_2O_2 和 O_2^- 的积累。此外，NO 也可通过调节抗氧化酶（CAT、POD 和 APX）活性，进而减轻其他重金属引起的氧化胁迫[28-30]，同时，适宜浓度（0.1 mmol/L）的 SNP 处理可诱导根系 CAT、POD 和 SOD 活性的上升，进而提高幼苗根组织的抗氧化能力以缓解氧化损伤[3]。在拟南芥和烟草中，NO 可调节铝诱导的 SOD 活性、烟草过氧化酶基因（*Ntpox*）的表达进而抑制细胞的脂质过氧化作用，减弱铝毒害[21]。在这些过程中，NO 对以上金属毒害的缓解作用是直接作用抗氧化酶以平衡重金属诱导的活性氧迸发占主导地位，还是通过调控相关抗氧化酶基因的表达进而影响蛋白合成过程起主要作用，这有待进一步实验探究。

综上所述，0.1 mmol/L SNP 预处理水稻可明显缓解 Al 对根伸长的抑制，降低根尖 Al 积累和相对胼胝质含量。外源 NO 显著降低水稻根尖 H_2O_2 和 O_2^- 积累，提高 SOD、POD 和 CAT 活性。表明外源 NO 在调节活性氧代谢以维持细胞膜结构稳定，进而有效减轻 Al 对水稻根系的损伤上起着重要作用。

参考文献：

[1] KOCHIAN L V. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants[J]. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 1995, **46**(1): 237－260.

[2] ZHENG S J, YANG J L. Target sites of aluminum phytotoxicity[J]. *Biol. Plantarum*, 2005, **49**(3): 321－331.

[3] HASANUZZAMAN M, GILL S S, FUJITA M. Physiological role of nitric oxide in plants grown under adverse environmental conditions [M]//TUTEJA N, GILL S S. Plant Acclimation to Environmental Stress. Springer New York, 2013: 269－322.

[4] TIAN Q Y, SUN D H, ZHAO M G, *et al*. Inhibition of nitric oxide synthase(NOS) underlies aluminum-induced inhibition of root elongation in *Hibiscus moscheutos*[J]. *New Phytol.*, 2007, **174**(2): 322－331.

[5] WANG Y S, YANG Z M. Nitric oxide reduces aluminum toxicity by preventing oxidative stress in the roots of *Cassia tora* L. [J]. *Plant Cell Physiol.*, 2005, **46**(12): 1 915－1 923.

[6] ZHANG Z, WANG H, WANG X, *et al*. Nitric oxide enhances aluminum tolerance by affecting cell wall polysaccharides in rice roots[J]. *Plant Cell Rep.*, 2011, **30**(9): 1 701－1 711.

[7] HE H Y, HE L F, GU M H, *et al*. Nitric oxide improves aluminum tolerance by regulating hormonal equilibrium in the root apices of rye

and wheat[J]. *Plant Sci.*,2012,183:123－130.

[8] MATSUMOTO H,MOTODA H. Oxidative stress is associated with aluminum toxicity recovery in apex of pea root[J]. *Plant Soil*,2013,**363**(1－2):399－410.

[9] MOHAN MURALI ACHARY V,JENA S,PANDA K K,*et al*. Aluminium induced oxidative stress and DNA damage in root cells of *Allium cepa* L.[J]. *Ecotox. Environ. Safe.*,2008,**70**(2):300－310.

[10] LI G(李 刚),XU F J(徐芳杰),JIANG S S(蒋思丝),*et al*. Effects of aluminum on hydrogen peroxide content and cell wall-bound peroxidase activity in wheat root tips[J]. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*(植物营养与肥料学报),2010,**16**(4):887－892(in Chinese).

[11] MA J F,ZHENG S J,MATSUMOTO H,*et al*. Detoxifying aluminium with buckwheat[J]. *Nature*,1997,**390**(6 660):569－570.

[12] MURPHY M E,NOACK E. Nitric oxide assay using hemo-globin method[J]. *Method Enzymol.*,1994,233:240－250.

[13] LI ZH G(李忠光),SONG Y Q(宋玉泉),GONG M(龚 明). Xylenol orange method used for the measurement of hydrogen peroxide in plant tissue[J]. *Journal of Yunnan Normal University*(Nat. Sci. Edi.)(云南师范大学学报·自然科学版),2007,**27**(3):50－54(in Chinese).

[14] RODR GUEZ-SERRANO M,ROMERO-PUERTAS M C,ZABALZA A,*et al*. Cadmium effect on oxidative metabolism of pea (*Pisum sativum* L.) roots. Imaging of reactive oxygen species and nitric oxide accumulation *in vivo*[J]. *Plant Cell Environ.*,2006,**29**(3):1 532－1 544.

[15] ELSTNER E F,HEUPEL A. Inhibition of nitrite formation from hydroxyla mmoniumch-loride:a simple assay for superoxide dismutase[J]. *Anal. Biochem.*,1976,**70**(2):616－620.

[16] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding[J]. *Anal. Biochem.*,1976,**72**(1):248－254.

[17] MCCORD J M,FRIDOVICH I. Superoxide dismutase:an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein)[J]. *J. Biol. Chem.*,1969,**244**(1):6 049－6 055.

[18] TAN W,LIU J,DAI T,JING Q,*et al*. Alterations in photosynthesis and antioxidant enzyme activity in winter wheat subjected to post-anthesis water-logging[J]. *Photosynthetica*,2008,**46**(1):21－27.

[19] AEBI H. Catalase *in vitro*[J]. *Methods Enzymol.*,1983,**105**(4):121－126.

[20] HORST W J,WANG Y,ETICHA D. The role of the root apoplast in aluminium-induced inhibition of root elongation and in aluminium resistance of plants:a review[J]. *Ann. Bot.*,2010,**106**(1):185－197.

[21] HE H Y,ZHAN J,HE L F,*et al*. Nitric oxide signaling in aluminum stress in plants[J]. *Protoplasma*,2012,**249**(3):483－492.

[22] WANG H H,HUANG J J,BI Y R. Nitrate reductase-dependent nitric oxide production is involved in aluminum tolerance in red kidney bean roots[J]. *Plant Sci.*,2010,**179**(3):281－288.

[23] CAI M Z,ZHANG S N,WANG F M,*et al*. Protective effect of exogenously applied nitric oxide on aluminium-induced oxidative stress in soybean plants[J]. *Russ. J. Plant Physl.*,2011,**58**(5):791－798.

[24] YANG J L,LI Y Y,ZHANG Y J,*et al*. Cell wall polysaccharides are specifically involved in the exclusion of aluminum from the rice root apex[J]. *Plant Physiology*,2008,**146**(2):602－611.

[25] ZHOU Y,XU X Y,CHEN L Q,*et al*. Nitric oxide exacerbates Al-induced inhibition of root elongation in rice bean by affecting cell wall and plasma membrane properties[J]. *Phytochemistry*,2012,76:46－51.

[26] SAXENA I,SHEKHAWAT G S. Nitric oxide (NO) in alleviation of heavy metal induced phytotoxicity and its role in protein nitration[J]. *Nitric Oxide*,2013,32:13－20.

[27] MA J F. Syndrome of aluminum toxicity and diversity of aluminum resistance in higher plants[J]. *Int. Rev. Cytol.*,2007,264:225－252.

[28] TEWARI R K,HAHN E J,PAEK K Y. Modulation of copper toxicity-induced oxidative damage by nitric oxide supply in the adventitious roots of *Panax ginseng*[J]. *Plant Cell Rep.*,2008,**27**(1):171－181.

[29] SINGH H P,BATISH D R,KAUR G,*et al*. Nitric oxide (as sodium nitroprusside) supplementation ameliorates Cd toxicity in hydroponically grown wheat roots[J]. *Environ. Exp. Bot.*,2008,**63**(1):158－167.

[30] ZHANG H,LI Y H,HU L Y,*et al*. Effects of exogenous nitric oxide donor on antioxidant metabolism in wheat leaves under aluminum stress[J]. *Russ. J. Plant Physl.*,2008,**55**(4):469－474.