

韩金龙, 李 慧, 蔺 经, 等. 核黄素对盐胁迫下杜梨叶片抗氧化系统的影响[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(4): 893-898.  
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2015.04.029

## 核黄素对盐胁迫下杜梨叶片抗氧化系统的影响

韩金龙<sup>1,2</sup>, 李 慧<sup>1</sup>, 蔺 经<sup>1</sup>, 杨青松<sup>1</sup>, 常有宏<sup>1</sup>

(1. 江苏省农业科学院园艺研究所/江苏省高效园艺作物遗传改良重点实验室, 江苏 南京 210014; 2. 南京农业大学园艺学院, 江苏 南京 210095)

**摘要:** 为探讨外源核黄素对盐胁迫下杜梨叶片抗氧化系统的影响, 以梨砧木杜梨幼苗为供试材料, 在水培条件下, 研究了外源施加不同浓度核黄素对 200 mmol/L NaCl 胁迫下其叶片抗氧化酶活性、活性氧产生、膜质过氧化和抗氧化物质含量的影响。结果显示: NaCl 胁迫 3 d 后, 杜梨叶片中超氧化物歧化酶(SOD)活性减弱, 过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽还原酶(GR)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、抗坏血酸过氧化物酶(APX)的活性增强, 抗氧化物质谷胱甘肽(GSH)和抗坏血酸(AsA)合成下降, 活性氧( $O_2^{\cdot-}$ 、 $H_2O_2$ )和丙二醛(MDA)大量积累。施加外源核黄素能增强 NaCl 胁迫下杜梨叶片中 SOD、POD、CAT、GR、GSH-Px 和 APX 的活性, 提高 GSH 和 AsA 的含量, 减少  $O_2^{\cdot-}$  和  $H_2O_2$  的产生, 降低脂质过氧化程度, 有效缓解盐胁迫对杜梨叶片的过氧化伤害, 其中以 10  $\mu$ mol/L 浓度的核黄素处理效果最为显著。

**关键词:** 杜梨; 核黄素; 盐胁迫; 过氧化作用; 抗氧化酶

**中图分类号:** S661.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2015)04-0893-06

## The regulatory role of riboflavin in antioxidant system of *Pyrus betulaefolia* in response to salt tolerance

HAN Jing-long<sup>1,2</sup>, LI Hui<sup>1</sup>, LIN Jing<sup>1</sup>, YANG Qing-song<sup>1</sup>, CHANG You-hong<sup>1</sup>

(1. Institute of Horticulture, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Jiangsu Key Laboratory for Horticultural Crop Genetic Improvement, Nanjing 210014, China; 2. College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** To explore the effect of exogenous riboflavin on the antioxidant system in the leaves of *Pyrus betulaefolia* under salt stress, the antioxidant enzymes activities, the production of active oxygen, lipid peroxidation and antioxidants contents of the leaves of *P. betulaefolia* were analysed when its seedlings under 200 mmol/L NaCl stress were exposed to different concentrations (0  $\mu$ mol/L, 5  $\mu$ mol/L, 10  $\mu$ mol/L, 50  $\mu$ mol/L, 100  $\mu$ mol/L) of riboflavin in hydroponic culture, after 3-d salt stress, the activity of superoxide dismutase (SOD) was decreased, the activities of peroxidase (POD), catalase (CAT), glutathione reductase (GR), glutathione peroxidase (GSH-Px) and ascorbic acid peroxidase (APX) were enhanced, the contents of GSH and AsA were reduced, and the accumulation of  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$  and MDA were increased. Riboflavin application alleviated the damage caused by NaCl by improving the activities of SOD, POD, CAT, GR, GSH-Px and APX, increasing the contents of GSH and AsA, reducing the productions of  $O_2^{\cdot-}$  and  $H_2O_2$  were decreased, and decreasing the degree of lipid

peroxidation. The riboflavin with the concentration of 10  $\mu$ mol/L showed the best effects.

**Key words:** *Pyrus betulaefolia*; riboflavin; salt stress; peroxidation; antioxidant enzyme

收稿日期: 2015-01-19

基金项目: 江苏省农业科技自主创新基金项目[ CX(14)5018 ]; 国家自然科学基金项目(31372051)

作者简介: 韩金龙(1989-), 男, 山西霍州人, 硕士研究生, 主要从事果树逆境生理和分子生物学研究。(E-mail) hjiang24@126.com

通讯作者: 常有宏, (E-mail) cyh@jaas.ac.cn

土壤盐渍化是影响农作物生产的主要因素之一<sup>[1]</sup>。目前中国盐渍化土地面积不断扩大, 给农业生

产造成了巨大的经济损失。盐胁迫下,植物细胞膜结构和功能发生变化,细胞内  $\text{Na}^+$  过量积累,导致渗透胁迫、离子毒害、离子不平衡或营养缺乏<sup>[2]</sup>,伤害细胞中的抗氧化系统,影响植物的正常生长发育。为更好地利用盐渍地资源,缓解土壤盐渍化问题,通过施加外源缓解剂以提高植物抗盐性已越来越受到人们的重视。研究发现施用外源赤霉素( $\text{GA}_3$ )<sup>[3]</sup>、油菜素内酯(EBR)<sup>[4]</sup>、5-氨基酮戊酸(ALA)<sup>[5]</sup>、水杨酸(SA)<sup>[6]</sup>、氯化钙<sup>[3]</sup>等均能提高植物的耐盐性,这一调控过程通常与植株叶片中抗氧化酶活性上升有关。

核黄素(Riboflavin, Rib)又称维生素 B2(Vitamin B2),是一种天然水溶性的 B 族维生素。核黄素及其衍生物 FMN 和 FAD 是植物光合作用、能量生成和氧化还原代谢不可或缺的组成部分<sup>[7]</sup>。应用核黄素可以增强植物对病原菌的抗性、提高耐旱及抗涝能力,这可能与促进生理代谢过程,诱发细胞中抗氧化物质的合成有关。在逆境条件下,植物体内存在重新分配核黄素的机制来调控环境胁迫反应<sup>[8-13]</sup>。然而,目前尚无应用核黄素提高植物耐盐能力的报道。

梨是中国重要的果树,土壤盐渍化程度及面积的进一步扩展严重限制其生产<sup>[14-16]</sup>。嫁接为梨树的主要繁殖方式,砧木的抗性对嫁接苗的适应能力至关重要。提高砧木的耐盐性是解决梨树耐盐碱的关键,杜梨(*Pyrus betulaefolia* Bunge)原产中国,以其为嫁接砧木,能够改善梨树的耐盐性<sup>[17-18]</sup>。在盐胁迫条件下,该物种通过减少  $\text{Na}^+$  在根中积累及向地上部运输来适应逆境<sup>[18-20]</sup>,但植株叶片仍会受到氧化伤害<sup>[21]</sup>。本试验通过研究不同浓度的核黄素对盐胁迫下杜梨叶片活性氧产生、抗氧化酶活性和抗氧化物质含量的影响,探讨通过施加核黄素缓解盐胁迫产生氧化伤害的可能性,旨在为核黄素应用于生产实践应用提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料培养和处理

杜梨种子经 1% 次氯酸钠消毒后,播种于培养皿湿润无菌滤纸上。待胚根长至 1 cm 时,将幼苗移植到光照培养箱的水培系统中(培养液为 Hoagland 营养液, pH=5.8),用通气泵补充空气,每 3 d 更换 1 次培养液。培养条件如下:光照周期 16 h 光照/8 h 黑暗,光照度  $300 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ,培养温度  $23 \sim$

$25^\circ\text{C}$ ,空气相对湿度 60% ~ 70%。当植株 8 叶 1 心大小时,选择长势一致的健壮幼苗进行处理,在含 200 mmol/L NaCl 的 Hoagland 营养液中添加 100 mmol/L 的核黄素母液,使其在水培系统中的浓度达到  $0 \mu\text{mol/L}$ 、 $5 \mu\text{mol/L}$ 、 $10 \mu\text{mol/L}$ 、 $50 \mu\text{mol/L}$  和  $100 \mu\text{mol/L}$ 。以生长在不含 NaCl 和核黄素的 Hoagland 营养液中的植株为对照。每个处理设 3 次重复,处理 3 d 后收集植株顶部下第 3、4 叶用于各生理指标的测定。

### 1.2 测定指标及方法

1.2.1 活性氧和丙二醛含量 过氧化氢( $\text{H}_2\text{O}_2$ )含量测定参照 Patterson 等<sup>[22]</sup>的方法,新鲜叶片用 2 ml 预冷丙酮提取后,经 5% 硫酸钛处理所生成的氧化物-钛复合物黄色沉淀,再用 2 mol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$  溶解,在 415 nm 波长下比色测定,通过标准曲线计算叶片中  $\text{H}_2\text{O}_2$  含量。采用羟胺氧化法测定超氧阴离子( $\text{O}_2^{\cdot-}$ )产生速率<sup>[23]</sup>。采用硫代巴比妥酸(TBA)法测定丙二醛(MDA)含量<sup>[24]</sup>。

1.2.2 抗氧化酶活性 蛋白质含量测定采用考马斯亮蓝法<sup>[25]</sup>;超氧化物歧化酶(SOD)活性测定采用氮蓝四唑(Nitroblue tetrazolium chloride, NBT)光氧化还原法,以抑制 NBT 光氧化还原 50% 的酶量为 1 个酶活性单位<sup>[26]</sup>;过氧化物酶(POD)活性测定采用愈创木酚法<sup>[26]</sup>,以 1 min 内  $\text{OD}_{470}$  值变化 0.01 为 1 个酶活性单位;过氧化氢酶(CAT)活性测定参照文献<sup>[27]</sup>的方法,以 1 min 内  $\text{OD}_{240}$  值变化 0.1 为 1 个酶活性单位;谷胱甘肽还原酶(GR)活性测定采用紫外分光光度计法,以 340 nm 处吸光值变化计算 GR 活性<sup>[28]</sup>;谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性测定参考黄爱缨等<sup>[29]</sup>的方法,以 1 mg 蛋白质 1 min 使反应体系中 GSH 浓度降低  $1 \mu\text{mol/L}$  为 1 个活性单位;抗坏血酸过氧化物酶(APX)活性测定参照 Nakano 等<sup>[30]</sup>的方法测定,以 1 min 内  $\text{OD}_{290}$  值变化 0.1 为 1 个酶活性单位。

1.2.3 抗氧化物质含量 总谷胱甘肽(Glutathione, GSH)含量测定采用 5,5-二巯基-2-硝基苯酸(5,5-dithiobis-2-nitrobenoic acid, DTNB)法<sup>[31]</sup>;抗坏血酸(Ascorbic acid, AsA)含量测定采用分光光度法,在红菲咯啉存在的条件下,AsA 所还原的亚铁离子与其反应形成红色螯合物,通过测定  $\text{OD}_{534}$  值计算 AsA 含量<sup>[32]</sup>。

### 1.3 数据分析

采用 Microsoft Office Excel 2007 整理数据和绘

制图表。用 SPSS16.0 统计分析软件进行单因素方差分析 (One-way ANOVA), 并用最小显著差数法 (LSD 法) 进行多重比较。

## 2 结果与分析

### 2.1 核黄素对盐胁迫下杜梨叶片活性氧和 MDA 含量的影响

MDA 是膜脂过氧化作用的主要产物之一, 其含量的高低是反映细胞膜脂过氧化作用强弱和质膜破坏程度的重要指标<sup>[33]</sup>, 而  $O_2^{\cdot-}$  和  $H_2O_2$  是诱发细胞膜脂过氧化的重要因子。在盐胁迫 (200  $\mu\text{mol/L}$  NaCl) 处理 3 d 后, 杜梨叶片中超氧阴离子 ( $O_2^{\cdot-}$ ) 的产生速率是对照的 2.13 倍,  $H_2O_2$  和 MDA 含量分别是对照的 2.24 和 1.64 倍 (表 1), 意味着植株叶片细胞活性氧代谢系统失去平衡, 发生膜脂过氧化。施加 5 ~ 100  $\mu\text{mol/L}$  核黄素 (Rib) 后,  $O_2^{\cdot-}$  的产生速率、 $H_2O_2$  和 MDA 含量随着 Rib 浓度的增加呈现先下降后升高的趋势。当 Rib 浓度为 5 ~ 10  $\mu\text{mol/L}$  时,  $O_2^{\cdot-}$  的产生速率和  $H_2O_2$  含量较盐胁迫处理显著降低 (分别降低了 44.3% ~ 55.2% 和 44.6% ~ 51.4%), MDA 含量亦显著降低 (降低了 9.5% ~ 24.0%), 且 10  $\mu\text{mol/L}$  Rib 处理组中, 上述 3 个指标最低 (表 1)。然而, 当 Rib 浓度为 50 ~ 100  $\mu\text{mol/L}$  时, 反而会刺激活性氧的积累 ( $O_2^{\cdot-}$  产生速率和  $H_2O_2$  含量增加), 加剧膜脂过氧化 (MDA 积累) (表 1)。

### 2.2 核黄素对盐胁迫下杜梨叶片抗氧化酶活性的影响

由表 2 可知, 盐胁迫 (200  $\mu\text{mol/L}$  NaCl) 处理 3 d 后, 杜梨叶片中超氧化物歧化酶 (SOD) 活性显著降低 (仅为对照的 60.4%), 过氧化物酶 (POD)、过

氧化氢酶 (CAT)、谷胱甘肽还原酶 (GR)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px)、抗坏血酸过氧化物酶 (APX) 活性均有不同程度升高 (为对照的 1.18 ~ 1.78 倍)。这表明 NaCl 胁迫可轻微诱导杜梨叶片中 POD、CAT、GR、GSH-Px 和 APX 活性提高, 抑制 SOD 的活性。施加 5 ~ 100  $\mu\text{mol/L}$  Rib 后, 抗氧化酶活性均随着 Rib 浓度的增加呈现先增强后减弱的趋势。当 Rib 浓度为 10  $\mu\text{mol/L}$  时, 抗氧化酶活性与单独盐胁迫处理间的差异最显著 (为盐胁迫下的 1.46 ~ 1.95 倍) (表 2)。然而, 当 Rib 浓度为 50 ~ 100  $\mu\text{mol/L}$  时, 抗氧化酶活性较 10  $\mu\text{mol/L}$  Rib 处理又显著降低, 且 100  $\mu\text{mol/L}$  Rib 处理与单独盐胁迫处理相比较, 抗氧化酶活性无显著差异 (表 2)。

表 1 核黄素 (Rib) 对 NaCl 胁迫下杜梨叶片  $O_2^{\cdot-}$  产生速率、 $H_2O_2$  和 MDA 含量的影响

Table 1 Effects of riboflavin (Rib) on production rate of  $O_2^{\cdot-}$ , contents of  $H_2O_2$  and MDA in the leaves of *Pyrus betulaefolia* under NaCl stress

处理		$H_2O_2$ 含量 (nmol/g)	$O_2^{\cdot-}$ 产生速率 [nmol/(g · min)]	丙二醛含量 (nmol/g)
NaCl ( $\mu\text{mol/L}$ )	Rib ( $\mu\text{mol/L}$ )			
0	0	70.04±5.68 c	2.39±0.23 d	16.73±1.13 cd
200	0	157.07±11.91b	5.67±0.69c	27.38±1.22ab
200	5	87.00±7.62c	3.16±0.28d	24.77±1.23bc
200	10	76.33±5.55c	2.54±0.19d	20.81±1.17c
200	50	196.33±16.64a	6.49±0.41a	30.39±1.61a
200	100	223.00±11.89a	7.78±0.31a	32.10±1.63a

不同小写字母代表不同处理间在 0.05 水平上差异显著。

表 2 核黄素对 NaCl 胁迫下杜梨叶片中抗氧化酶活性的影响

Table 2 Effect of riboflavin on the activities of antioxidative enzymes in the leaves of *P. betulaefolia* under NaCl stress

处理		SOD 活性 [U/(mg · min)]	POD 活性 [U/(mg · min)]	CAT 活性 [U/(mg · min)]	GR 活性 [U/(g · min)]	GSH-Px 活性 [U/(mg · min)]	APX 活性 [U/(g · min)]
NaCl ( $\mu\text{mol/L}$ )	Rib ( $\mu\text{mol/L}$ )						
0	0	104.49±8.22b	18.14±1.30c	15.91±3.17cd	6.16±0.59d	7.57±0.61c	8.87±0.73c
200	0	63.15±6.16c	24.03±1.85bc	21.48±1.44c	10.98±0.98c	8.92±0.84c	10.46±0.78bc
200	5	109.18±9.90b	29.35±2.88b	29.23±2.77ab	14.47±1.07ab	12.27±1.19b	11.20±1.04b
200	10	122.92±7.24a	38.33±2.36a	33.82±2.53a	17.86±0.71a	15.27±1.41a	15.39±1.10a
200	50	105.51±5.52b	26.46±2.50bc	26.32±2.26b	13.10±1.49b	12.70±0.78b	11.89±1.07b
200	100	74.61±6.03c	20.70±1.76c	20.38±2.00c	8.39±0.76cd	9.76±0.85c	10.29±1.11bc

不同小写字母代表不同处理间在 0.05 水平上差异显著。



### 2.3 核黄素对盐胁迫下杜梨叶片抗氧化物质含量的影响

盐胁迫(200  $\mu\text{mol/L}$  NaCl)处理 3 d 后,杜梨叶片中抗氧化物质 GSH 和 AsA 的含量显著降低(仅为无盐胁迫对照的 38.2% ~ 44.9%)(表 3),严重影响了植株自身清除自由基的能力。施加 5 ~ 100  $\mu\text{mol/L}$  核黄素后,抗氧化物质含量随着核黄素浓度的增加呈现先增加后减少的趋势(表 3)。当 Rib 浓度为 5 ~ 50  $\mu\text{mol/L}$  时,GSH 和 AsA 含量较单独盐胁迫处理显著提高,其中以 Rib 浓度为 10  $\mu\text{mol/L}$  时差异最显著,含量分别为盐胁迫下的 3.76 和 2.35 倍。而当 Rib 浓度为 100  $\mu\text{mol/L}$  时,抗氧化物质含量反而降低,与盐胁迫下的无显著差异(表 3)。

表 3 核黄素对 NaCl 胁迫下杜梨叶片中抗氧化物质 GSH 和 AsA 含量的影响

Table 3 Effect of riboflavin on antioxidants (GSH and AsA) contents in the leaves of *P. betulaefolia* under NaCl stress

处理		GSH 含量 ( $\mu\text{mol/g}$ )	AsA 含量 ( $\mu\text{mol/g}$ )
NaCl ( $\mu\text{mol/L}$ )	Rib ( $\mu\text{mol/L}$ )		
0	0	0.55 $\pm$ 0.04b	4.37 $\pm$ 0.35a
200	0	0.21 $\pm$ 0.06d	1.96 $\pm$ 0.32c
200	5	0.76 $\pm$ 0.05a	3.77 $\pm$ 0.21ab
200	10	0.79 $\pm$ 0.03a	4.60 $\pm$ 0.38a
200	50	0.34 $\pm$ 0.04c	3.18 $\pm$ 0.04b
200	100	0.19 $\pm$ 0.02d	1.55 $\pm$ 0.25c

不同小写字母代表不同处理间在 0.05 水平上差异显著。

## 3 讨论

正常生长条件下,植物体内活性氧的产生和清除保持一种动态平衡,而在盐胁迫下,植物体内活性氧的积累是导致伤害的主要原因之一<sup>[34-35]</sup>,细胞内活性氧的爆发,会打破其产生和清除之间的平衡,积累大量的丙二醛(MDA),造成膜脂过氧化<sup>[36]</sup>。对萝卜和小麦的研究结果表明,盐胁迫下  $\text{O}_2^-$  产生速率、 $\text{H}_2\text{O}_2$  和 MDA 含量急剧增加,而外源油菜素内酯(EBR)显著降低了  $\text{O}_2^-$  的产生速率,以及  $\text{H}_2\text{O}_2$  和 MDA 含量<sup>[4,37]</sup>,明确 EBR 能抑制植物细胞膜脂过氧化,起缓解盐胁迫的作用。本试验发现,在盐胁迫下,杜梨叶片中  $\text{O}_2^-$  的产生速率、 $\text{H}_2\text{O}_2$  和 MDA 含量均显著增加;施加 5 ~ 10  $\mu\text{mol/L}$  核黄素后, $\text{O}_2^-$  产生速率及  $\text{H}_2\text{O}_2$  和 MDA 含量显著降低,表明核黄素与 EBR 作用类似,施加低浓度(5 ~ 10  $\mu\text{mol/L}$ )核黄素能有效抑制植物

细胞膜脂过氧化,有提高杜梨耐盐能力的潜能。

SOD 是植物体内清除活性氧的第一道防线<sup>[38-39]</sup>,植物的耐盐性与 SOD 活性的强弱直接相关<sup>[40-41]</sup>,它的主要功能为催化超氧阴离子( $\text{O}_2^-$ )发生歧化反应生成过氧化氢( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), $\text{H}_2\text{O}_2$  进一步通过 CAT、POD 等抗氧化酶转化为水和氧气而被清除<sup>[42]</sup>。同时 CAT、POD、APX 和 GR 是 AsA-GSH 循环不可或缺的组成部分。GSH-Px 可以清除由活性氧和  $\text{OH}^-$  诱发的脂质过氧化物,保护细胞膜结构和功能的稳定性。外源 ALA 处理可提高盐胁迫下菠菜和油菜叶片中 SOD、POD、CAT 和 APX 的活性,这可能是因为 ALA 是血红素生物合成的前体,外源 ALA 处理促进了血红素蛋白分子的活性<sup>[5,43]</sup>。而本试验观察到 10  $\mu\text{mol/L}$  核黄素处理后,杜梨叶片中抗氧化酶(SOD、POD、CAT、GR、GSH-Px 和 APX)活性都较盐胁迫处理和无盐胁迫对照植株显著增强,这可能与核黄素衍生物 FAD 是许多抗氧化酶辅助因子有关<sup>[7]</sup>,从而显著降低活性氧含量,减轻膜质过氧化程度(丙二醛含量下降)。由此可见,核黄素处理能显著提高抗氧化酶活性,增强植株对盐胁迫的防御能力,避免植物体受到伤害。

GSH 和 AsA 是最主要的抗氧化物质,通过参与 AsA-GSH 循环将  $\text{H}_2\text{O}_2$  转化为对细胞无害的水和氧气从而维持细胞功能<sup>[12]</sup>。施用外源油菜素内酯(EBR)可以提高盐胁迫下小麦中抗氧化物质(GSH 和 AsA)的含量,增强活性氧清除能力而保护植物细胞<sup>[4]</sup>。本试验发现,施加 5 ~ 10  $\mu\text{mol/L}$  核黄素后,GSH 含量较盐胁迫处理和对照均显著升高;10  $\mu\text{mol/L}$  核黄素处理后,叶片 AsA 含量较单纯盐胁迫处理显著升高。产生的大量 AsA 和 GSH 参与 AsA-GSH 循环代谢,APX 活性增加,将 AsA 作为电子供体使  $\text{H}_2\text{O}_2$  生成水的能力增强,产生的脱氢抗坏血酸(DHA)通过 GSH 作为电子供体再次生成 AsA,其产物氧化型谷胱甘肽(GSSG)通过 GR 又转变成 GSH,经过这一系列循环反应来清除活性氧<sup>[44]</sup>,从而对植物体内的抗氧化系统起到保护作用。

众所周知,植物体中抗氧化系统包括抗氧化酶和抗氧化物质,它们都参与植物体中的抗氧化反应,清除活性氧,因此抗氧化酶活性与抗氧化物质和活性氧含量在植物体中是息息相关的。核黄素及其衍生物 FAD 和 FMN 是植物光合作用、能量生成和氧化还原代谢不可或缺的组成部分<sup>[7]</sup>。虽然核黄素

是一种光敏剂,在曝光下可以生成单线态氧和超氧化物阴离子<sup>[45-46]</sup>,从而诱导植物细胞产生活性氧<sup>[9,43]</sup>,但是核黄素衍生物 FAD 是许多抗氧化酶调节清除 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 所必需的辅酶<sup>[47-48]</sup>。活性氧在植物体中的作用亦与其含量相关,低浓度活性氧可以调节诱导逆境防御基因,而高浓度活性氧会破坏细胞稳定性,导致细胞死亡<sup>[49-51]</sup>。因此核黄素对植物体抗氧化系统的影响是复杂的。本研究结果显示:200 mmol/L NaCl 盐胁迫下施加 10 μmol/L 核黄素后,杜梨幼苗活性氧 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 产生速率、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 MDA 含量较单纯盐胁迫处理显著降低,而抗氧化酶 (SOD、POD、CAT、GR、GSH-Px 和 APX) 活性和抗氧化物质 (GSH 和 AsA) 含量均较单纯盐胁迫处理显著增高。结合核黄素及活性氧的生理作用,可以推测本研究中,核黄素主要通过控制活性氧产生量来调节植物体中的抗氧化系统,但具体作用机制还有待进一步研究。

综上所述,200 mmol/L 盐胁迫下施加低浓度 (5~10 μmol/L) 核黄素可以有效缓解杜梨叶片的氧化伤害,具体表现为活性氧含量显著降低,膜质过氧化程度减轻,抗氧化酶活性和抗氧化物质含量增加,该过程主要与核黄素参与的活性氧代谢相关。

## 参考文献:

- [1] PARIDA A K, DAS A B. Salt tolerance and salinity effects on plants: A review [J]. *Ecotox Environ Safe*, 2005, 60(3):324-349.
- [2] ZHU J K. Regulation of ion homeostasis under salt stress [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2003, 6(5):441-445.
- [3] KHAN M N, SIDDIQUI M H, MOHAMMAD F, et al. Calcium chloride and gibberellic acid protect linseed (*Linum usitatissimum* L.) from NaCl stress by inducing antioxidative defence system and osmoprotectant accumulation [J]. *Acta Physiol Plant*, 2010, 32(1):121-132.
- [4] TALAAT N B, SHAWKY B T. 24-Epibrassinolide alleviates salt-induced inhibition of productivity by increasing nutrients and compatible solutes accumulation and enhancing antioxidant system in wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Acta Physiol Plant*, 2013, 35(3):729-740.
- [5] NISHIHARA E, KONDO K, PARVEZ M M, et al. Role of 5-aminolevulinic acid (ALA) on active oxygen-scavenging system in NaCl-treated spinach (*Spinacia oleracea*) [J]. *Plant Physiol*, 2003, 160(9):1085-1091.
- [6] SYEED S, ANJUM N A, NAZAR R, et al. Salicylic acid-mediated changes in photosynthesis, nutrients content and antioxidant metabolism in two mustard (*Brassica juncea* L.) cultivars differing in salt tolerance [J]. *Acta Physiol Plant*, 2011, 33(3):877-886.
- [7] SANDOVAL F J, ZHANG Y, ROJE S. Flavin nucleotide metabolism in plants: monofunctional enzymes synthesize FAD in plastids [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(45):30890-30900.
- [8] MORI T, SAKURAI M. Effects of riboflavin and increased sucrose on anthocyanin production in suspended strawberry cell cultures [J]. *Plant Sci*, 1995, 110(1):147-153.
- [9] TAHERI P, TARIGHI S. Riboflavin induces resistance in rice against *Rhizoctonia solani* via jasmonate-mediated priming of phenylpropanoid pathway [J]. *J Plant Physiol*, 2010, 167(3):201-208.
- [10] AZAMI-SARDOOEI Z, FRANCA S C, VLEESSCHAUWER D D, et al. Riboflavin induces resistance against *Botrytis cinerea* in bean, but not in tomato, by priming for a hydrogen peroxide-fueled resistance response [J]. *Physiol Mol Plant P*, 2010, 75(1-2):23-29.
- [11] DENG B, JIN X. Riboflavin spraying impairs the antioxidant defense system but induces waterlogging tolerance in tobacco [J]. *Acta Physiol Plant*, 2013, 35(9):2769-2776.
- [12] DENG B, JIN X, YANG Y, et al. The regulatory role of riboflavin in the drought tolerance of tobacco plants depends on ROS production [J]. *Plant Growth Regul*, 2014, 72(3):269-277.
- [13] WANG S Y, TZENG D D S. Methionine-riboflavin mixtures with surfactants and metal ions reduce powdery mildew infection in straw berry plants [J]. *J Am Soc Sci*, 1998, 123(6):987-991.
- [14] 王鑫, 黄文江, 李梦瑶, 等. 大棚和露地条件下梨叶片生长发育特性 [J]. *江苏农业学报*, 2012, 28(1):166-171.
- [15] 秦善知, 陈斌, 陆道礼, 等. 基于便携式近红外光谱仪检测梨可溶性固形物 [J]. *江苏农业科学*, 2014, 42(8):284-286.
- [16] 田路明, 曹玉芬, 董星光, 等. 梨野生种石细胞团含量及直径大小的比较 [J]. *江苏农业科学*, 2014, 42(1):135-137.
- [17] OKUBO M, SAKURATANI T. Effects of sodium chloride on survival and stem elongation of two Asian pear rootstock seedlings [J]. *Sci Hortic*, 2000, 85(1-2):85-90.
- [18] MATSUMOTO K, TAMURA F, CHUN J P, et al. Enhancement in salt tolerance of Japanese pear by using *Pyrus betulaefolia* rootstock [J]. *Hortic Res (Japan)*, 2007, 6(1):47-52.
- [19] OKUBO M, FURUKAWA Y, SAKURATANI T. Growth, flowering and leaf properties of pear cultivars grafted on two Asian pear rootstock seedlings under NaCl irrigation [J]. *Sci Hortic*, 2000, 85(1-2):91-101.
- [20] MATSUMOTO K, CHUN J P, TAMURA F, et al. Salt tolerance in *Pyrus* species is linked to levels of Na and Cl translocation from roots to leaves [J]. *J Jap Soc Hortic Sci*, 2006, 75(5):385-391.
- [21] WU Q S, ZOU Y N. Adaptive responses of birch-leaved pear (*Pyrus betulaefolia*) seedlings to salinity stress [J]. *Not Bot Horti Agrobi*, 2009, 37(1):133-138.
- [22] PATTERSON B D, MACRAE E A, FERGUSON I B. Estimation of hydrogen peroxide in plant extracts using titanium (IV) [J]. *Anal Biochem*, 1984, 139(2):487-492.

- [23] ELSTNER E F, HEUPEL A. Inhibition of nitrite formation from hydroxylammoniumchloride; a simple assay for superoxide dismutase [J]. *Anal Biochem*, 1976, 70(2):616-620.
- [24] 李合生. 植物生理学实验技术指导 [M]. 北京:高等教育出版社, 2001.
- [25] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Anal Biochem*, 1976, 72(1-2):248-254.
- [26] MA C, WANG Z, KONG B, et al. Exogenous trehalose differentially modulate antioxidant defense system in wheat callus during water deficit and subsequent recovery [J]. *Plant Growth Regul*, 2013, 70(3):275-285.
- [27] AEBI H. Catalase *in vitro* [J]. *Methods Enzymol*, 1984, 105:121-126.
- [28] ALI B, TAO Q, ZHOU Y, et al. 5-Aminolevulinic acid mitigates the cadmium-induced changes in *Brassica napus* as revealed by the biochemical and ultra-structural evaluation of roots [J]. *Ecotox Environ Safe*, 2013, 92:271-280.
- [29] 黄爱雯, 吴珍岭. 水稻谷胱甘肽过氧化物酶的测定法 [J]. *西南农业大学学报*, 1999, 21(4):1-4.
- [30] NAKANO Y, ASADA K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbated specific peroxidase in spinach chloroplasts [J]. *Plant Cell Physiol*, 1981, 22(5):867-880.
- [31] ANDERSON M E. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples [J]. *Method Enzymol*, 1985, 113:548-554.
- [32] LAW M Y, CHARLES S A, HALLIWELL B. Glutathione and ascorbic acid in spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplast. The effect of hydrogen peroxide and of paraquat [J]. *J Biochem*, 1983, 253:109-116.
- [33] AZEVEDO N A D, PRISCO J T, ENEAS-FILHO J, et al. Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes [J]. *Environ Exp Bot*, 2006, 56(1):87-94.
- [34] MOLASSIOTIS A, SOTIROPOULOS T, TANOU G, et al. Boron-induced oxidative damage and antioxidant and nucleolytic responses in shoot tips culture of the apple rootstock EM9 (*Malus domestica* Borkh) [J]. *Environ Exp Bot*, 2006, 56(1):54-62.
- [35] NASIR K M, MANZER H S, MOHAMMAD F, et al. Calcium chloride and gibberellic acid protect linseed from NaCl stress by inducing antioxidative defense system and osmoprotectant accumulation [J]. *Acta Physiol Plant*, 2010, 32(1):121-132.
- [36] SAIRAM R K, SRIVASTAVA G C. Changes in antioxidant activity in sub-cellular fractions of tolerant and susceptible wheat genotypes in response to long term salt stress [J]. *Plant Sci*, 2002, 162(6):897-904.
- [37] RAMAKRISHNA B, RAO S S R. 24-Epibrassinolide alleviated zinc-induced oxidative stress in radish (*Raphanus sativus* L.) seedlings by enhancing antioxidative system [J]. *Plant Growth Regul*, 2012, 68(2):249-259.
- [38] MA L, LI Y, YU C, et al. Alleviation of exogenous oligochitosan on wheat seedlings growth under salt stress [J]. *Protoplasma*, 2012, 249(2):393-399.
- [39] MITTAL S, KUMARI N, SHARMA V. Differential response of salt stress on *Brassica juncea*: photosynthetic performance, pigment, proline, D1 and antioxidant enzymes [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2012, 54:17-26.
- [40] SHALATA A, MITTOVA V, VOLOKITA M, et al. Response of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii* to salt-dependent oxidative stress: the root antioxidative system [J]. *Physiol Plant*, 2001, 112(4):487-494.
- [41] HAMID B G, YAMAUCHI Y, SHIMADA E, et al. Enhanced tolerance to salt stress and water deficit by overexpressing superoxide dismutase in tobacco (*Nicotiana tabacum*) chloroplasts [J]. *Plant Sci*, 2004, 166(4):919-928.
- [42] OUESLATI S, KARRAY-BOURAOU N, ATTIA H, et al. Physiological and antioxidant responses of *Mentha pulegium* (Pennyroyal) to salt stress [J]. *Acta Physiol Plant*, 2010, 32(2):289-296.
- [43] NAEEM M S, RASHEED M, LIU D, et al. 5-Aminolevulinic acid ameliorates salinity-induced metabolic, water-related and biochemical changes in *Brassica napus* L. [J]. *Acta Physiol Plant*, 2011, 33:517-528.
- [44] KUZNIAK E, SKLODOWSKA M. Compartment-specific role of the ascorbate-glutathione cycle in the response of tomato leaf cells to *Botrytis cinerea* infection [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2005, 56(413):921-933.
- [45] HUANG R, CHOE E, MIN D B. Kinetics for singlet oxygen formation by riboflavin photosensitization and the reaction between riboflavin and singlet oxygen [J]. *J Food Sci*, 2004, 69(9):726-732.
- [46] EICHLER M, LAVI R, SHAINBERG A, et al. Flavins are source of visible-light-induced free radical formation in cells [J]. *Las Surg Med*, 2005, 37(4):314-319.
- [47] MITTLER R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance [J]. *Trends Plant Sci*, 2002, 7(9):405-410.
- [48] GILL S, TUTEJA N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2010, 48(12):909-930.
- [49] ABOGADALLAH G M. Antioxidative defense under salt stress [J]. *Plant Signal Behav*, 2010, 5(4):369-374.
- [50] AZEVEDO N A D, PRISCO J T, ENEAS-FILHO J, et al. Hydrogen peroxide pre-treatment induces salt stress acclimation in maize plants [J]. *J Plant Physiol*, 2005, 162(10):1114-1122.
- [51] SHARMA P, JHA A B, DUBEY R S, et al. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions [J]. *J Bot*, 2012, 2012(2012):1-26.

(责任编辑:张震林)