

喷施 SA 对黑麦草抗盐性的影响

付丽娟, 杜红豆, 王 锐, 陈 曦, 池春玉, 丁国华

(哈尔滨师范大学 生命科学与技术学院, 黑龙江 哈尔滨 150025)

摘 要:以 1% NaCl 胁迫黑麦草后, 喷施 100、200 和 300 mg/L 的水杨酸(SA), 测定 5 d 内黑麦草的细胞膜透性、丙二醛含量(MDA)、脯氨酸含量(Pro)、叶绿素含量以及超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)的活性。结果表明: 喷施水杨酸对黑麦草的叶绿素含量没有显著影响, 但能够提高脯氨酸含量, 降低细胞电解质渗透率和丙二醛含量, 提高细胞 SOD、POD、CAT 等多种抗氧化酶的活性。因此喷施水杨酸能够提高黑麦草抗渗透胁迫能力和抗氧化能力, 对黑麦草的抗盐性有较好的促进作用, 其最佳有效处理浓度为 200 mg/L。

关键词: 黑麦草; 水杨酸; 盐胁迫; 抗盐性

中图分类号: S 482.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2011)06-0068-04

逆境(盐胁迫、干旱、低温、高光及病害等)会影响植物的正常代谢, 在所有非生物胁迫中, 盐胁迫对农业生产及社会生活都产生极其重要的影响, 对其造成的损失也最为严重。在盐胁迫条件下, 植物常常因生理性缺水、离子吸收不平衡、活性氧种类(Reactive Oxygen Species, ROS)积累及其不良链式反应等而生长不良。其中, ROS 代谢失衡是盐胁迫导致植物细胞程序化凋亡(Programmed Cell Death, PCD)的重要原因, 遗传上抗氧化酶表达水平高的品种或农艺上增强抗氧化酶活性的技术措施, 均表现为提高植物的耐盐性^[1]。

黑麦草(*Lolium perenne* L.)是早熟禾科(Poaceae)黑麦草属(*Lolium*)植物, 约 10 种, 包括欧亚大陆温带地区的饲草和草场禾草及一些有毒杂草(如毒麦(*L. temulentum*)其高约 0.3~1 m), 小穗长在“之”字形花轴上, 叶坚韧、深绿色, 须根发达, 但入土不深, 丛生, 分蘖很多, 幼苗活力高, 抗逆性强, 即使在不良条件下, 也可以迅速生长, 它形成的草坪致密, 质地细腻, 耐践踏性, 密度高, 颜色浓绿亮泽, 是综合性状十分优异的草坪型多年生植物, 其在公园、庭院及小型绿地上常把黑麦草用作“先锋草种”, 以便迅速形成急需的草坪, 或早日改变环境面貌。

水杨酸(Salicylic Acid, 简称 SA)是植物体内普遍存

在的一种简单的小分子酚类化合物, 化学名称为“邻羟基苯甲酸”, 是肉桂酸的衍生物, 在植物体内以游离态和结合态 2 种形式存在, 被认为是一种新型的植物内源激素和植物对胁迫应答的一种信号传递分子^[2], 近年来引起了人们的特别关注。目前已有大量的研究发现水杨酸对植物许多生理活动都有显著的调节作用^[3-5], 因此研究使用水杨酸提高黑麦草的抗盐性胁迫能力在理论和生产上都将有重要意义。现以不同浓度水杨酸(SA)处理的黑麦草为研究对象, 通过比较 1% 盐胁迫条件下 5 d 内丙二醛(MDA)含量、脯氨酸(Pro)含量、电解质渗出率(EL)、叶绿素含量及参与活性氧代谢的重要酶类如超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和过氧化物酶(POD)等相关生理生化指标的变化, 分析 SA 对黑麦草抗盐能力的影响。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验采用黑麦草品种爱神特(Accent), 购自哈尔滨绿色和平种子子公司。

1.2 试验方法

1.2.1 盐胁迫处理 试验在实验室内进行, 种子混细沙播种于 30 cm×40 cm×15 cm 塑料钵中, 钵内基质为普通土, 筛后使用。待苗高 5 cm 左右, 使用 0、100、200 和 300 mg/L 浓度 SA 喷施处理。处理方法: 使用喷雾器喷叶, 每钵 50 mL, 24 h 后重复喷施 1 次。1 d 后进行盐胁迫, 每钵浇灌 200 mmol/L NaCl(分析纯)一定体积, 使土壤中的 NaCl 含量达到 1%, 3 次重复。

1.2.2 生理指标的测定 丙二醛含量测定采用硫代巴比妥酸(TBA)法^[68]。以 0.67% TBA 溶液为空白对照测定并记录在 450、532 和 600 nm 处的吸光值(OD 值)。

第一作者简介: 付丽娟(1983-), 女, 在读硕士, 研究方向为植物抗逆生理与分子生物学。E-mail: fulijuan19850327@126.com.

通讯作者: 丁国华(1963-), 男, 博士, 教授, 研究方向为植物抗逆生理与分子生物学。E-mail: hsdldgh@hrbnu.edu.cn.

基金项目: 黑龙江省自然科学基金资助项目(C200844); 黑龙江省教育厅科研资助项目(11551142)。

收稿日期: 2011-01-11

脯氨酸含量测定采用磺基水杨酸茚三酮比色法^[6-8]。以加入 2 mL 水, 2 mL 冰乙酸和 3 mL 显色液的试剂为对照, 在波长 520 nm 下比色并记录 OD 值。叶绿素含量测定采用分光光度法^[6]。剪取 0.5 cm 长叶片 1 g 左右, 称重, 加 80% 丙酮, 低温下匀浆、离心, 于分光光度计下测定其 OD 值。细胞膜透性采用电导仪法^[7], 以电解质渗透率表示。POD 活性测定采用愈创木酚显色法^[6,9], 以 470 nm 波长下光密度值每 1 min 升高 0.01 为 1 个酶活性单位。SOD 活性测定采用氮蓝四唑(NBT)法^[6,9], 以单位时间内抑制光化还原 50% 的氮蓝四唑为一个酶活性单位 U, 测定波长为 560 nm。CAT 活性测定采用紫外吸收法^[6,10], 以 1 min 内 OD₂₄₀ 减 0.1 的酶量为 1 个酶活性单位。

1.2.3 酶液的提取 称取 0.5 g 叶片剪碎, 加入预冷的酶提取液 3 mL 和少许石英砂, 充分冰浴研磨。然后转入离心管中, 再用 2 mL 酶提取液冲洗研钵, 于 4℃ 下 10 000 r/min 离心 30 min, 分装上清液。冷冻保存待测。如果长时间不测量于液氮冷冻后在 -85℃ 保存。

2 结果与分析

2.1 不同浓度 SA 处理对黑麦草电解质渗出率的影响

植物组织受到逆境伤害时, 由于膜的功能受损或结构破坏, 而使透性增大, 离子渗出率上升。伤害愈重, 电导度的增加也愈大^[5]。因此, 常把质膜透性的测定作为植物抗性研究中的一个重要生理指标, 通过测定外渗导电率的变化, 反映质膜受损害的程度^[7]。

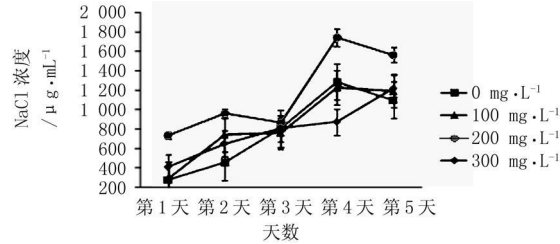


图 1 水杨酸对盐胁迫下黑麦草电导率的影响

从图 1 可看出, 200 mg/L SA 浓度曲线位于最上方, 明显高于对照值 0 mg/L SA 曲线, 说明此浓度的 SA 未发挥作用, 植物体电导率过大, 受盐胁迫伤害严重; 100、300 mg/L 浓度曲线与 0 mg/L 曲线接近, 多处交叉位于下方, 说明盐胁迫下 SA 喷施对黑麦草发挥一定作用, 提高了植物抗逆性, 抑制了电导率的逐渐增大。

2.2 不同浓度 SA 处理对黑麦草 MDA 含量的影响

MDA 是植物细胞膜遭受逆境胁迫后产生的过氧化产物^[11], 正常条件下植物细胞内 MDA 含量很少, 但当植物遭受逆境胁迫时细胞发生膜质过氧化, MDA 含量显著增加, 且胁迫程度与 MDA 含量呈正相关。因此, MDA 已成为衡量植物受环境胁迫危害程度的重要指标, 用于表示细胞膜脂过氧化程度和植物对逆境条件反

应的强弱^[12]。

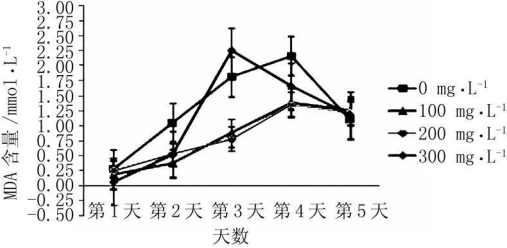


图 2 水杨酸对盐胁迫下黑麦草 MDA 含量的影响

在盐胁迫下, 经 100、200、300 mg/L 浓度的 SA 处理后黑麦草的 MDA 含量如图 2 所示, 以 0 mg/L 浓度 SA 处理的黑麦草曲线为对照, 300 mg/L SA 虽在第 1 和第 5 天喷施效果较好, 但是在第 3 天其 MDA 的含量却明显超出了对照值 2.17 mmol/L, 达到 5 d 内这 3 种浓度中的最高值 2.25 mmol/L, 而 100 和 200 mg/L 的 SA 处理的黑麦草 MDA 含量是最低、喷施效果最好的。因此研究表明, 喷施 SA 能降低膜脂过氧化产物含量, 缓解盐胁迫对植物细胞膜系统的伤害, 增强黑麦草对盐胁迫的适应性, SA 适宜处理浓度为 100 和 200 mg/L。

2.3 不同浓度 SA 处理对黑麦草 Pro 含量的影响

当植物遭受渗透胁迫而造成生理性缺水时, 植物体内脯氨酸会大量积累, 因此, 植物体内脯氨酸含量在一定程度上反映了植株体内的水分状况, 可作为植株缺水诊断的参考指标^[13]。

该试验参照磺基水盐酸法提取黑麦草体内的游离 Pro, 不仅大大减少了其它氨基酸的干扰, 快速简便, 而且不受样品状态限制。在酸性条件下, Pro 与茚三酮反应生成稳定的红色缩合物, 用甲苯萃取后, 此缩合物在波长 520 nm 处有一最大吸收峰^[10]。以下是经不同 SA 浓度处理后黑麦草 Pro 含量的变化。

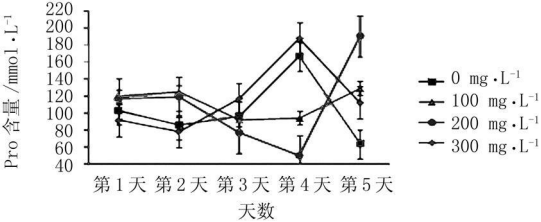


图 3 水杨酸对盐胁迫下黑麦草 Pro 含量的影响

由图 3 可看出, 经不同浓度 SA 处理的黑麦草在 5 d 内的 Pro 含量变化是不同的, 仍以喷施 0 mg/L SA 的数据为对照, 在前 2 d 喷施 100 和 200 mg/L SA 的效果较好, Pro 含量比对照值高出 13 ~ 40 mmol/L; 在第 4 天时 3 种浓度差异较为显著: 浓度为 300 mg/L SA 处理的黑麦草 Pro 含量超出对照值 20.95 mmol/L; 相比之下, 100 和 200 mg/L SA 都明显比对照值低很多, 尤其是 200 mg/L SA 浓度处理的黑麦草 Pro 含量, 与对照值相比差 116.39 mmol/L, 但在第 5 天时 200 mg/L SA 呈直线上

升, Pro 含量高出对照值 2.98 倍, 说明喷施 SA 后有效的促进了 NaCl 胁迫下黑麦草叶片 Pro 积累, 使植物含水量保持在一个较高的水平。

2.4 不同浓度 SA 处理对黑麦草叶绿素含量的影响

植物体内的另一个重要的生理指标就是叶绿素。叶绿素的含量可以作为衡量光合能力强弱的一个指标, 亦可用来表征植物在逆境下受伤害的程度^[14], 大量研究表明盐胁迫处理可使叶绿素含量降低。由图 4 可看出, 以 0 mg/L 的 SA 曲线为对照标准, 100 mg/L 的 SA 曲线在第 2 天开始叶绿素含量逐渐上升, 并将高含量的叶绿素指标持续到第 4 天, 达到 3.10 mmol/L 的高峰; 其余 SA 喷施效果均不显著。但仍可得出结论: SA 起到缓解叶绿素含量降低的作用, 且 200 mg/L SA 处理后的黑麦草叶绿素含量比对照值高出约 1~2 倍。

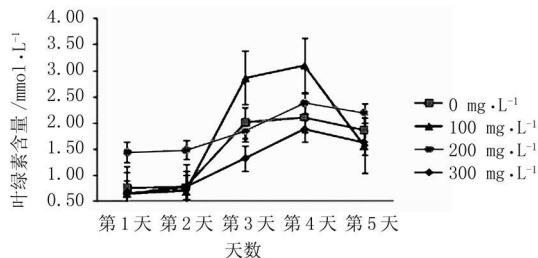


图 4 水杨酸对盐胁迫下黑麦草叶绿素含量的影响

2.5 不同浓度 SA 处理对黑麦草酶活性的影响

SOD、POD、CAT 是植物体内普遍存在的, 活性较高、与细胞 ROS 水平及氧化伤害发生与否有直接关联的 3 种酶。在植物体内的抗氧化防御体系中, 这 3 种酶是最重要的保护酶类, 负责清除植物体内的氧自由基, 使植物免受逆境胁迫的伤害^[15]。

由图 5 可看出, 4 条曲线呈现出上升趋势, 即黑麦草体内的 SOD 活性逐渐增强。随着盐胁迫天数的增加, 可以观察到 100、200、300 mg/L 的 SA 浓度曲线均比对照值 0 mg/L 的曲线高, 这就表明 NaCl 胁迫下喷施 SA 后可显著提高黑麦草 SOD 的活性, 缓解盐胁迫对细胞膜系统的伤害, 但研究发现不一定 SA 浓度越高越好, 只有当喷施适当的 SA 浓度时, 其效果才能达到最佳, 活性值达到最大。

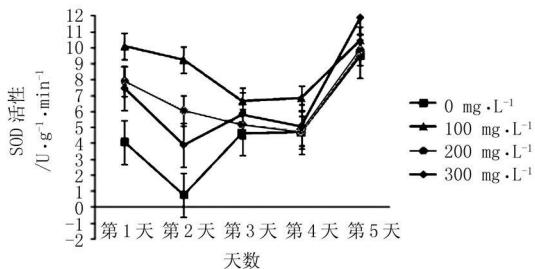


图 5 水杨酸对盐胁迫下黑麦草 SOD 活性的影响

下黑麦草体内 POD 活性升高(图 6)。SA 在 100、300 mg/L 浓度时 POD 活性升高不明显, 而在 200 mg/L 时其活性逐渐增强, 并成抛物状凸起, 由此说明, 适当浓度的 SA 能大大提高 POD 的活性, 提高植物抗逆性。

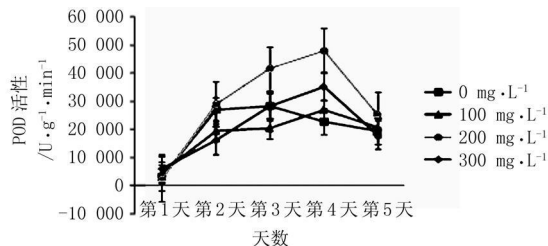


图 6 水杨酸对盐胁迫下黑麦草 POD 活性的影响

CAT 主要存在于植物过氧化物酶体与乙醛酸循环体中, 可清除经盐胁迫后生成的有害物质 H_2O_2 , 在 CAT 的作用下催化如下反应: $2H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H_2O$, 从而起到保护植物的作用。试验结果表明(图 7), 从抗氧化酶种类看, SA 处理对 NaCl 胁迫黑麦草叶片 SOD 和 POD 的作用要大于 CAT, 其活性都有较显著的提高; 而 CAT 随着 SA 浓度和胁迫天数的增加呈现出不同程度的变化, 效果较为显著的是胁迫后第 3 天 CAT 活性值达到 $0.09 U \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$ 。

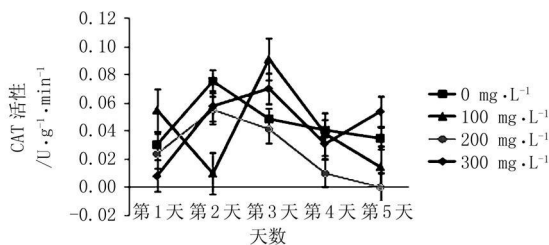


图 7 水杨酸对盐胁迫下黑麦草 CAT 活性的影响

3 讨论

ROS 是化学性质活泼、氧化能力很强的几种含氧物质的总称, 包括超氧自由基(O_2^-)、过氧化氢(H_2O_2)、羟自由基($\cdot OH$)等^[1]。在正常条件下, 植物细胞 ROS 处于低水平的(产生和清除)动态平衡之中, 体内的 ROS 不足以使植物受到伤害, 因为植物有一套行之有效的清除系统, 但在逆境胁迫条件下会打破这种平衡, 造成植物细胞 ROS 积累, 与不饱和脂肪酸发生氧化作用, 引发脂质的过氧化, 进而损害膜结构和功能的完整性, 严重时会导致植物细胞死亡。同时, ROS 还对 DNA、蛋白质、叶绿素等几乎所有的生命分子构成伤害^[2]。ROS 积累及其过氧化作用被认为是盐胁迫伤害的又一重要机制^[13]。

目前, SA 已成为一种经济安全的常用化学试剂, 具有广泛的生理功能, 可以提高植株的抗病性、耐盐性、抗冻性、耐热性等^[2]。试验结果表明, 在盐胁迫下, 高浓度 NaCl 降低植物根际水分渗透势, 导致植物吸水困难, 使

植物细胞水势下降,降低代谢活力,延迟植物生长发育。喷施 SA 后,有效地降低了黑麦草质膜透性(图 1),抑制了膜内不饱和脂肪酸过氧化产物 MDA 的积累(图 2),减缓盐害,维持细胞质膜的稳定性和完整性,提高植物体对盐分胁迫的适应性。另外经 SA 处理,大大提高了黑麦草叶片细胞渗透调节物质—Pro 含量(图 3),有利于增强细胞溶质的亲水吸附能力,进而发挥重要的渗透调节作用。作为衡量植物光合能力强弱的另一指标叶绿素在 NaCl 胁迫下其含量降低,主要是由于叶绿素酶对叶绿素 b 的降解所致,而外施 SA 则可解决这一问题,有效地缓解了 NaCl 胁迫对其造成的伤害(图 4)。

现已证明提高植物体内抗氧化酶类活性及增强抗氧化代谢水平是增强植物耐盐性的途径之一^[14]。SOD、POD、CAT 作为主要的抗氧化酶,与还原型谷胱甘肽(GSH)、抗坏血酸、α-生育酚、类胡萝卜素等还原型物质的协同作用,担负淬灭 ROS 的任务^[15]。SOD 催化超氧自由基歧化反应生成 O₂ 和 H₂O₂,产生的 H₂O₂再由 POD 和 CAT 除去^[16]。该研究中,SA 施用显著提高了 NaCl 胁迫后黑麦草叶片的抗氧化酶活性,SOD、POD 和 CAT 活性增强,起到提高黑麦草抵抗 NaCl 胁迫的作用。

综上所述,喷施 SA 对黑麦草的叶绿素含量没有显著影响,但能够提高 Pro 含量,降低细胞电解质渗透率和 MDA 含量,提高细胞 SOD、POD、CAT 3 种抗氧化酶的活性。因此喷施 SA 能够提高黑麦草抗渗透胁迫能力和抗氧化能力,对黑麦草的抗盐性有较好的促进作用,其最佳有效处理浓度为 200 mg/L。

参考文献

[1] 代其林,王劲,万怀龙,等.水杨酸对干旱胁迫下豇豆幼苗抗氧化酶

活性的影响[J].四川大学学报,2008,45(5):1258-1262.
[2] 孟雪娇,邱昆,丁国华.水杨酸在植物体内的生理作用研究进展[J].中国农学通报,2010(15):207-214.
[3] 尚庆茂,宋士清,张志刚,等.水杨酸增强黄瓜幼苗耐盐性的生理机制[J].中国农业科学,2007,40(1):147-152.
[4] 李德红,潘瑞焱.水杨酸在植物体内的作用[J].植物生理学通讯,1995,31(2):144-149.
[5] 池春玉,连永权,赵岩,等.水杨酸浸种对紫羊茅抗冷性的影响[J].中国农学通报,2009,25(14):186-189.
[6] 李玲.植物生理学模块实验指导[M].北京:科学出版社,2009:35-38,86-88,95-100.
[7] 汤章城.现代植物生理学实验指南[M].北京:科学出版社,2004:302-303,314-315.
[8] 张志良.植物生理学实验指导[M].3版.北京:高等教育出版社,2003:258-260,268-270,274-277.
[9] 李忠光,李江鸿,杜朝坤,等.在单一提取系统中同时测定五种植物抗氧化酶[J].云南师范大学学报,2002,22(6):44-48.
[10] 邹琦.植物生理学实验指导[M].北京:中国农业出版社,2000:161-162,168-169.
[11] 陈少裕.膜脂过氧化与植物逆境胁迫[J].植物学通报,1989,6(4):211-217.
[12] 汪月霞,孙国荣,王建波,等.盐胁迫下星星草幼苗 MDA 含量与膜透性及叶绿素荧光参数之间的关系[J].生态学报,2006,26(1):122-129.
[13] Mc Cord J M. The evolution of free radicals and oxidative stress[J]. The American Journal of Medicine, 2000, 108: 652-659.
[14] Fadzila N M, Finch R P, Burdon R H. Salinity, oxidative stress and antioxidant responses in shoot cultures of rice[J]. Journal of Experimental Botany, 1997, 48(307): 325-331.
[15] 李兆亮,原永兵,刘成连,等.水杨酸对黄瓜叶片抗氧化剂酶系的调节作用[J].植物学报,1998,40(4):356-361.
[16] 李汝佳,李雪梅.水杨酸、脱落酸和过氧化氢对镉胁迫小麦幼苗光合及抗氧化酶活性的影响[J].生态学杂志,2007,26(12):2096-2099.

Effects of Spraying Salicylic Acid on Salt Resistance of *Lolium perenne* L.

FU Li-juan, DU Hong-dou, WANG Rui, CHEN Xi, CHI Chun-yu, DING Guo-hua
(College of Life Science and Technology, Harbin Normal University, Harbin, Heilongjiang 150025)

Abstract: In this study, *Lolium perenne* L. were treated with 1% NaCl solution, and then sprayed with three kinds different concentrations of salicylic acid (SA) solution, which concentrations were 100, 200, and 300 mg/L respectively. In the following 5 days, some factors of *Lolium perenne* L. were measured, such as cell membrane permeability, content of malonaldehyde, proline and chlorophyll, and the enzyme activity of superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD) and catalase (CAT). The results showed that spraying salicylic acid had no significant impact on chlorophyll content of *Lolium perenne* L.. However, the content of proline, and the activity of SOD, POD, CAT was increasing, and the cell membrane permeability and MDA content was reduced. In the consequence, spraying 200 mg/L salicylic acid can effectively improve the ability of *Lolium perenne* L. resistance to osmotic stress, antioxidant capacity and salt tolerance.
Key words: *Lolium perenne* L.; salicylic acid; salt stress; salt resistance