

水杨酸对低氧胁迫下花叶万年青逆境指标的研究

赵兰枝, 孙 丽, 蔡祖国, 张霏霏, 李鹏鹤

(河南科技学院 园林学院, 河南 新乡 453003)

摘 要:采用营养液水培系统,以花叶万年青为试材,用叶面喷施的方法,研究了外源水杨酸对根际低氧胁迫下花叶万年青的几个逆境指标的影响。结果表明:低氧胁迫下花叶万年青叶片超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、丙二醛(MDA)的含量、细胞质膜透性均高于对照,外源 SA 明显抑制 MDA 的积累,降低了细胞膜透性,显著增强超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)的活性。说明 SA 作为化学诱抗剂,可抑制低氧胁迫下花叶万年青体内 ROS 的产生,提高抗氧化酶的活性,降低膜脂过氧化水平,从而提高植株对低氧胁迫的抵抗能力。

关键词:水杨酸;低氧胁迫;花叶万年青;逆境指标

中图分类号:S 682.36 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)08-0115-04

低氧胁迫是高等植物主要的非生物胁迫因素之一。低氧逆境胁迫会影响许多植物的生长发育和生理代谢,近年来国内外已对低氧胁迫条件下黄瓜、沙棘、羽扇豆和大麦进行了研究^[1-4],表明低氧下植物体内 ROS 大量产生。水杨酸(Salicylic Acid, SA)是普遍存在于植物体内的内源生长调节物质,可诱导植物产生抗病性和调节气孔关闭。目前,有关 SA 生理作用报道较多的是抗病性研究,李兆亮等^[5]研究认为,SA 浸种或喷施能显著提高黄瓜叶片中超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化物(POD)活性,提高植物的抗逆性,其它也有一些关于不同环境胁迫下 SA 生理作用的研究^[6-7],水杨酸对植物抗低氧胁迫的研究比较少。

水培条件下营养液内供氧不足成为导致植物生长不良的主要因素,水培植物的技术关键是其对低氧胁迫的抗性能力。提高植物的抗低氧能力也成为水培技术的关键。现以水培花叶万年青为材料,研究 SA 对低氧胁迫下花叶万年青的生理特性变化的影响,进一步探讨如何提高水培植物对低氧伤害的抵抗能力,为利用外源物质提高植物对低氧逆境伤害的抵抗力提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料花叶万年青(*Dieffenbachia*)来自于河南科

技学院实习基地,材料株型均匀整齐,无病虫害与机械损伤,生长健壮。

将材料除去盆土,选取整齐一致的植株从盆中脱出剔除根际泥土。在水中冲洗干净泥土,剪除部分老根,为防止水培初期根系腐烂,促进新根生成,用 0.5%的高锰酸钾浸泡消毒 15 min。然后在清水中培养 7 d 后,在 1/2 倍 Hoagland 营养液 pH (6.3±0.1)的水槽中进行培养,预培养 15 d 后进行处理。

1.2 试验设计

试验采用随机区组设计,设 3 个处理,处理 1 为对照,用气泵正常通入空气(40 min/h),维持营养液中溶氧浓度(DO)(DO 值 8.0~8.5 mg/L)。处理 2 为低氧+清水,将氮气充入营养液中驱赶氧气,用溶氧调节仪(上海精密科学仪器有限公司产, JPSJ-605 型)调控 DO 值 1.5~2.0 mg/L;处理 3 为低氧+0.5 mg/L SA。维持营养液温度为 20~25℃,分别于处理 0、5、10、15、20 d 后采取植株生长点下第 2 片展开叶测定以下指标,每处理分别 5 株,3 次重复。

1.3 试验方法

1.3.1 超氧化物歧化酶(SOD)活力的测定 称取鲜茎样品鲜茎 0.5 g 于预冷的研钵中,加入 1 mL 0.05 mol/L 的磷酸缓冲液(pH 7.8)在冰浴上研磨成浆,加缓冲液使终体积为 5 mL。将提取液于 10 000 r/min 冷冻离心 20 min,上清液用于测定 SOD 的活力。反应总体积为 4 mL,4 000 lx 光照下反应 30 min,反应温度控制在 25~35℃之间,遮黑布终止反应,置 560 nm 处测定光密度。SOD 活性单位以抑制 NBT 光化还原 50%作为 1 个酶活性单位(U)^[8]。

第一作者简介:赵兰枝(1964-),女,本科,高级实验师,现主要从事园林植物的无土栽培与生理生化的教学与研究工作。E-mail: zhaolzl23@163.com。

基金项目:河南省科技厅普通攻关资助项目(0424490012)。

收稿日期:2011-01-25

1.3.2 过氧化物酶(POD)活力的测定 称取鲜茎样品 5.0 g 切碎于预冷的研钵中,加入 1.0 mL 0.05 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.0)在冰浴上研磨成浆,将匀浆液全部转入离心管中,以 3 000 r/min 冷冻离心 10 min,上清液转入 25 mL 容量瓶中,定容至刻度,低温下保存备用。酶活性反应体系包括:2.9 mL 磷酸缓冲液(pH 7.8)0.05 mol/L,1.0 mL 质量分数为 2%的 H_2O_2 ,1.0 mL 0.05 mol/L 的愈创木酚溶液和 0.1 mL 酶液,用加热煮沸 5 min 的酶液作为对照,反应体系加入酶液后,立即于 34℃ 水浴中保温 3 min,然后迅速稀释 1 倍,在 470 nm 波长下比色,每 1 min 记录 1 次吸光度值,连续记录 5 min,以每分钟内 ΔA_{470} 变化 0.01 为 1 个过氧化物酶活性单位(U)^[9]。

1.3.3 丙二醛(MDA)含量的测定 称取鲜叶 0.5 g,放入冰浴的研钵中,加入少许石英砂和 2 mL 0.05 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.8)分 2 次冲洗研钵,合并提取液;在提取液中加入 5 mL 0.5%的硫代巴比妥酸(TBA)(用 10%三氯乙酸配制)摇匀;将试管放于 100℃ 沸水浴中加热 10 min,到时间后立即将试管放入冷水浴中,迅速冷却,于 3 000 r/min 离心 15 min,提取上清液并量其体积,0.5%的硫代巴比妥酸溶液为空白,分别测定上清液在 450、532 及 600 nm 处的吸光度值^[10]。

1.3.4 细胞质膜透性的测定 称 0.25 g 叶(或茎),剪成 0.5 cm 长的小段,放入小烧杯中,加 20 mL 蒸馏水,置于 25℃ 的恒温箱浸泡 1 h,用 DDS-320 电导仪测电导率,再将其放入 100℃ 的沸水浴中煮 20 min。取出待冷却后,测煮后的电导率。测定中一直以蒸馏水做空白对照。细胞质膜透性用相对电导率表示。相对电导率=(处理电导率-对照电导率)/(处理煮沸电导率-对照煮沸电导率)^[11]。

1.3.5 数据分析 数据采用 Microsoft Excel 软件整理分析。

2 结果与分析

2.1 SA 对低氧胁迫下花叶万年青叶片超氧化物歧化酶(SOD)活性的影响

超氧化物歧化酶(SOD)主要功能是清除自由基、控制脂质过氧化和减少膜系统的伤害,它的活力变化直接影响植物体内 O_2^- 与 H_2O_2 的含量,植物组织中 SOD 活性的高低以及在逆境中的变化在一定程度上可以反映植物抗逆性的强弱^[12-13]。从图 1 可看出,低氧胁迫下的叶片随着处理时间的延长,SOD 活性的变化呈现先上升后下降的变化趋势,但变化幅度不大。在处理第 10 天时达到高峰,比通气对照增加了 17.7%,随后下降,这可

能是叶片对低氧胁迫的响应,而低氧胁迫下添加外源水杨酸(SA)能明显提高 SOD 的活性,在处理第 20 天达到 1 个峰值,比胁迫处理提高了 24.3%,其变化也是呈先上升后下降的变化趋势,但其变化幅度不大。

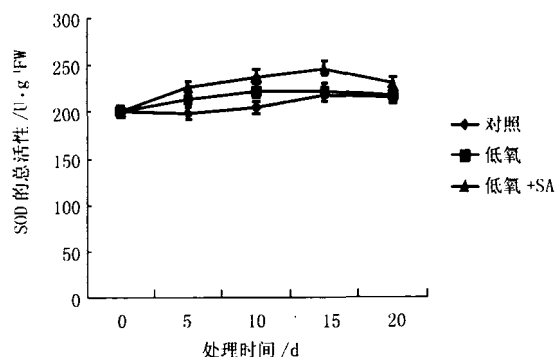


图1 SA对低氧胁迫下花叶万年青叶片SOD活性含量的影响

2.2 SA对低氧胁迫下花叶万年青叶片过氧化物酶(POD)活性的影响

过氧化物酶(POD)通过催化 H_2O_2 与其它底物反应以消耗 H_2O_2 ,减少 H_2O_2 对生物体的伤害作用,使植物免于受害^[14]。从图 2 可看出,低氧胁迫下的 POD 活性高于正常供养处理,POD 活性前期迅速升高,后期变化缓慢,在处理的第 5 天达到峰值,是正常通气对照的 1.39 倍,以后开始下降,外源水杨酸能明显提高低氧胁迫下花叶万年青 POD 活性,在处理的第 10 天达到高峰,是低氧胁迫处理的 1.68 倍,其变化也是先呈上升后下降的趋势。

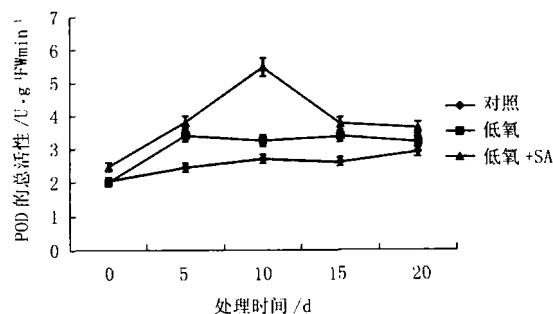


图2 SA对低氧胁迫下花叶万年青叶片POD活性含量的影响

2.3 SA对低氧胁迫下花叶万年青叶片丙二醛(MDA)含量的影响

丙二醛(MDA)是膜脂过氧化分解的产物,其 MDA 含量的多少可代表膜脂受损程度的大小,表示细胞膜脂过氧化程度和植物对逆境反应的强弱^[15]。从图 3 可看出,低氧胁迫处理前 MDA 的含量为 2.38,处理后 5、10 d 变化不大,随着处理时间的延长,各处理的 MDA 的含量均呈先上升后下降的趋势,低氧胁迫条件下花叶万年青叶片 MDA 含量显著提高,在处理的第 15 天时达到峰值,为正常通气条件下对照的 1.59 倍。低氧胁迫下添加

外源水杨酸 SA,抑制了低氧胁迫下引起的 MDA 含量增加,在处理的第 15 天 MDA 含量为胁迫下的 1.26 倍。

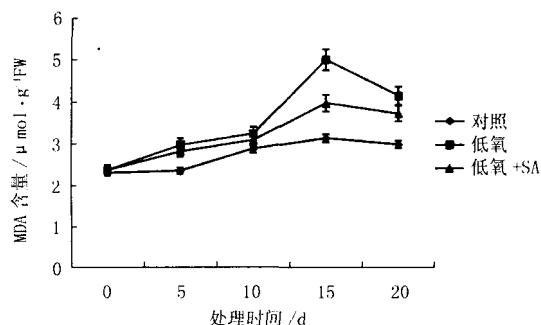


图3 SA对低氧胁迫下花叶万年青叶片MDA含量的影响

2.4 SA对低氧胁迫下花叶万年青叶片细胞质膜透性的影响

从图4可看出,随着处理时间的延长,各处理的相对电导率呈现上升的变化趋势,正常供氧情况下花叶万年青叶片的细胞膜透性变化不大,低氧胁迫条件下花叶万年青叶片的细胞膜透性随胁迫时间的延长而升高,在第10天时显著升高为正常通气的1.32倍,说明低氧胁迫加强了对细胞膜的破坏。而添加外源水杨酸SA后,在处理的第10天也升高,比低氧胁迫处理降低了1.15倍,从而大大加强了花叶万年青对低氧胁迫的抵抗力。

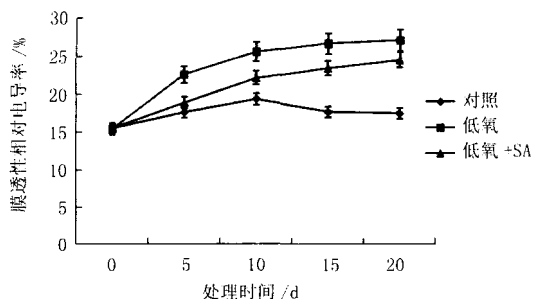


图4 SA对低氧胁迫下花叶万年青叶片细胞膜透性的影响

3 结论与讨论

3.1 结论

生物膜的稳定性及植物内源保护系统的抗胁迫力是决定植物对逆境胁迫的关键因素。近年来,随着对生物膜理论研究的深入和研究技术的发展,认为生物膜在植物抗性生理方面起着非常重要的作用^[16],膜伤害与植物的逆境胁迫具有极为密切的关系^[17]。细胞膜透性的变化是植物在逆境条件下受伤害的重要指标,与植物的伤害程度和抗性强弱有密切关系^[18]。在正常生长情况下,植物细胞内活性氧的产生和清除处于动态平衡,不会伤害细胞,而多种逆境胁迫都引发细胞内活性氧的过量生产、积累而打破了平衡,活性氧过量积累导致膜过氧化和脱酯化,丙二醛(MDA)含量增加,造成膜酯成分

改变,细胞膜透性增加,进而引起一系列生理生化代谢的变化,植物受到伤害,严重时死亡。

SOD可清除 O_2^- ,CAT、POD和ASA-POD,具有分解 H_2O_2 的作用,生成没有毒害的 H_2O ^[19]。所以,增加SOD活性或POD、CAT、ASA-POD的总体活性,均可降低自由基含量,减少细胞膜损伤。试验结果表明,低氧胁迫可以引起花叶万年青叶片SOD、POD活性的提高,而且随着胁迫时间的延长,其变化呈先上升后下降的趋势,抗活性氧系统内的酶的活性升高表明细胞内产生大量的活性氧,而活性氧含量的升高又诱导清除活性氧的酶类活性和物质含量增大^[20],添加SA后其活性增加明显,这可能是SA诱导提高了SOD和POD活性(图1、2),自由基清除能力加强。王利军等^[21]研究结果表明,当植物某部位受到高温胁迫时,SA向外输出即受到抑制,而其它部位SA则向此部位积累,从而可以证明SA作为一种信号物质调节植物对逆境的适应。

低氧胁迫过程中,细胞内自由基代谢平衡被破坏,从而有利于自由基的产生,引起和加剧膜脂过氧化作用,作为膜脂氧化的最终产物MDA,则有上升趋势。试验结果表明,低氧胁迫下MDA含量和细胞膜透性均高于对照,外源SA处理后MDA明显下降,说明膜脂过氧化程度减少,细胞受伤害程度降低这和相对电导率的变化基本是一致的,SA能够明显降低低氧胁迫处理下的膜透性,因此外源SA处理增加了低氧胁迫下花叶万年青叶片细胞质膜的稳定性。说明SA具有提高植物低氧能力的作用。王利军等^[22]研究认为,在逆境胁迫下,SA能诱导葡萄幼苗叶片SOD、CAT、POD、APX活性增大,并且MDA含量下降,启动一系列保护蛋白的表达,从而使葡萄幼苗获得较强的耐热性。

3.2 讨论

SA可能参与了植物对低氧胁迫适应性的调节,对低氧胁迫下膜结构和功能具有一定的保护作用,从而提高了植物的抗低氧性。至于SA如何提高抗氧化酶活性,其机理可能相似于植物的耐盐机理,即由于植物体内SA受体蛋白基因与过氧化物酶基因高度同源,外源SA进入体内能够激活SOD活性^[23-24]。Agarwal等^[25]认为SA通过激活抗氧化酶共同的转录因子诱导抗氧化酶的表达,但其间更深入的联系尚缺少直接的研究证据,有待深入研究。水杨酸在其它不同浓度下对花叶万年青的作用效果还有待进一步的研究和探讨,以研究出更适合水培植物抵抗低氧胁迫的水杨酸浓度。

参考文献

- [1] Bozena S, Malgorzata D, Anna M R. Factors affecting determination of superoxide anion generated by mitochondria from barley roots after anaerobiosis[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2004, 161:1339-1346.
- [2] Ma Igorzata G, Waldemar B. Effects of a short-term hypoxic treatment followed by re-aeration on free radicals level and antioxidative enzymes in lupine roots[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2004, 42:233-240.
- [3] Narayanan S, Ruma D, Gitika B, et al. Antioxidant activities of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) during hypoxia induced oxidative stress in glial cells[J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2005, 278:9-14.
- [4] 周国贤, 郭世荣, 王素平. 外源多胺对低氧胁迫下黄瓜幼苗光合特性和膜脂过氧化的影响[J]. *植物学通报*, 2006, 23(4):341-347.
- [5] 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.
- [6] 杨玲, 袁月星, 谢双琴. 次适温下水杨酸浸种对水稻种子萌发效应[J]. *植物生理学通讯*, 2001, 18(1):27-30.
- [7] 杨江山, 钟培芳, 费斌. 水杨酸对甜瓜种子萌发及其生理特性的影响[J]. *甘肃农业大学学报*, 2005, 40(1):38-41.
- [8] Kenneth B M. Salinity tolerance mechanism of six C4 turf grasses[J]. *Amer. Soc. Hort. Sci.*, 1994, 119(4):779-784.
- [9] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.
- [10] 高俊凤. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 2006.
- [11] 王守超, 王得祥, 彭少兵, 等. 盐胁迫对木本滨藜植物细胞膜透性及生理特性的影响[J]. *干旱地区农业研究*, 2007(4):281-285.
- [12] 李国婧, 周莹. 水杨酸与植物抗非生物胁迫[J]. *植物学通报*, 2001, 18(3):295-302.
- [13] 康国章, 孙谷畴, 王正询. 水杨酸在植物抗环境胁迫中的作用[J]. *广西植物*, 2004, 24(2):178-183.
- [14] 刘金文, 佟丹丹, 关利娅. NaCl 胁迫对不同苜蓿品种超氧化物歧化酶同工酶的影响[J]. *黑龙江八一农垦大学学报*, 2006(6):4-7.
- [15] 杨颖丽, 杨宁, 王莱, 等. 盐胁迫对小麦幼苗生理指标的影响[J]. *兰州大学学报(自然科学版)*, 2007(2):29-32.
- [16] 王洪春. 植物抗性生理[J]. *植物生理学通讯*, 1981(6):72-81.
- [17] 张福锁. 环境胁迫与植物营养[M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1993:71-100.
- [18] Siegel N, Hug A. Calmodulin dependent formation of membrane potential in barley root plasma membrane vesicles: A biochemical model of aluminum toxicity in plants[J]. *Physiol. Plant*, 1983, 59:2581.
- [19] 李兆亮, 原永兵, 刘成连, 等. 水杨酸对叶片抗氧化剂酶系的调节作用[J]. *植物学报*, 1998, 40(4):356-361.
- [20] 李延, 刘星辉, 庄卫民. 植物镁元素营养生理的研究进展[J]. *福建农业大学学报*, 2000, 29(1):74-80.
- [21] 王利军. 高温锻炼和水杨酸对葡萄抗热性的诱导及信号传递研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2001:101-102.
- [22] 王利军, 黄卫东, 李家永. 水杨酸对葡萄幼苗叶片膜脂过氧化的影响[J]. *中国农业科学*, 2003, 36(9):1076-1080.
- [23] Raskini E, Hamann A. Salicylic acid: A natural inducer of heat production[J]. *Science*, 1987, 23(7):1601-1602.
- [24] Jyoti S. The salicylic acid loop in plant defense[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2003, 6:365-371.
- [25] Agarwal S, Sairam R K, Srivastava G C, et al. Role of ABA, salicylic acid, calcium and hydrogen peroxide on antioxidant enzymes induction in wheat seedlings[J]. *Plant Science*, 2005, 169:559-570.

Study of Salicylic Acid on Stress Indexes Species in *Dieffenbachia* under Hypoxia Stress

ZHAO Lan-zhi, SUN Li, CAI Zu-guo, ZHANG Pei-pei, LI Peng-he

(College of Horticulture and Landscape Architecture, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang, Henan 453003)

Abstract: By means of a system of nutrient solution culture, *Dieffenbachia* was used to study the effect of foliar application of exogenous salicylic acid (SA) on stress indexes species *Dieffenbachia* under hypoxia stress. The results showed that the content of superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD), malonaldehyde (MDA), membrane permeability under root-zone hypoxia stress were higher than the control. However, the level of ascorbic acid (AsA) were decreased. Exogenous SA significantly decreased the content MDA, increased the activities of superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD) under hypoxia stress. It was proposed that exogenous SA as a chemical activator could induce resistance, reduce production of reactive oxygen species, raise the activities of anti-oxidative enzymes, and decrease the membrane lipid peroxidation, therefore it improve the plants resistance to hypoxic stress.

Key words: salicylic acid; hypoxia stress; *Dieffenbachia*; stress indexes species