

水杨酸对葡萄幼苗叶片膜脂过氧化的影响

王利军^{1,2}, 黄卫东², 李家永¹

(¹中国科学院地理所, 北京 100101; ²中国农业大学园艺学院, 北京 100094)

摘要:以一年生京秀葡萄(*Vitis vinifera* cv. Jingxiu)扦插苗为试材,研究了外源水杨酸对葡萄叶片膜脂过氧化的影响。结果表明,喷施 1×10^{-4} mol·L⁻¹的水杨酸后,葡萄幼苗叶片的丙二醛含量下降,可溶性蛋白质含量升高,抗氧化酶——抗坏血酸过氧化物酶、谷胱甘肽还原酶活性和抗氧化剂——类胡萝卜素、谷胱甘肽、抗坏血酸含量显著升高。水杨酸可能通过提高葡萄叶片对膜脂过氧化的抗性来诱导其对胁迫的抗性。

关键词:葡萄;水杨酸;丙二醛;可溶性蛋白质;类胡萝卜素;抗坏血酸-谷胱甘肽循环

Effects of Salicylic Acid on the Peroxidation of Membrane-lipid of Leaves in Grape Seedlings

WANG Li-jun^{1,2}, HUANG Wei-dong², LI Jia-yong¹

(¹Institute of Geographical Science and Natural Resource, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101;

²College of Horticulture, China Agricultural University, Beijing 100094)

Abstract: The effect of exogenous salicylic acid (SA) on the peroxidation of membrane-lipid of one-year-old grape seedlings (*Vitis vinifera* cv. Jingxiu) was studied. The results showed that spraying on after grape plants with 10^{-4} mol·L⁻¹ SA, MDA content in leaves decreased significantly, but soluble protein contents increased, ascorbic acid peroxidase and glutathione reductase activities increased, contents of ascorbic acid, glutathione and carotenoid also increased. These results indicate that SA increased the resistance to stresses in plants by inducing the resistance to peroxidation.

Key words: Grape; SA; MDA; Soluble protein; Carotenoid; Cycle of ascorbic acid and glutathione

近些年,随着全球环境的恶化,各种灾害性天气频繁出现,给农业生产造成了巨大的损失,寻求简单有效的防御手段非常必要。而化学调控是一种有效的简便易行的方法,水杨酸(salicylic acid, SA)是一种广泛存在于植物体内的生长物质,也能化学合成,无毒而廉价,已被证明能够调节植物许多抗逆生理过程,如抗病性、抗盐性、抗冷性、抗旱性以及抗热性^[1-7]。除抗病性外,SA提高植物抗逆性的机理目前尚不清楚,已有的零星研究结果表明,SA可能通过调节活性氧水平的变化,改变抗氧化剂含量及其酶系活性来诱导植物的抗逆性^[4-6]。各种逆境对植物的伤害很大程度上是通过活性氧进行的,而抗坏血酸-谷胱甘肽循环是重要的活性氧捕捉系统,类胡萝卜素也是一种重要活性氧清除剂,可溶性蛋白质含量增加对提高细胞持水能力,提高抗性具有重要

意义,而丙二醛是评价植物受损的一个常用生理指标。葡萄是一种味道鲜美、营养丰富果品,在我国特别是西北地区广泛栽培,但生产中常常出现高温、低温、干旱等逆境对葡萄的生长发育造成了严重的损害。为此,笔者从膜脂过氧化这个角度就SA对葡萄的幼苗的影响进行研究,为SA诱导植物的机理研究和SA在葡萄上的推广应用提供理论依据。

1 材料与方法

供试材料为一年生京秀葡萄(*Vitis vinifera* cv. Jingxiu)扦插苗。2001年12月中旬,在温室中(最高温度27℃,最低温度18℃)把通过休眠的葡萄幼苗栽植到塑料盆中。盆高25 cm,盆底和盆口直径分别为15 cm和20 cm。盆栽用土为园土:草炭土=4:6。其它按常规管理。2002年3月下旬,从温室中选择

生长一致的葡萄幼苗(已经长有 10 片功能叶),以未喷的作为对照,立即采样,记为 0 h,同时对其它的幼苗喷施 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 SA,湿润为止(喷施过程仅需约 30 s),分别在喷后的 1、3、6、12 h 采样。处理结束,摘下叶片(从上往下数第 4 叶),立即在液氮中速冻,然后在 -40°C 的冰箱中保存待用。测定如下指标 (1)丙二醛和类胡萝卜素含量的测定,参考朱广廉等^[7]的方法进行 (2)可溶性蛋白含量的测定,参考张宪政等^[8]的方法进行 (3)抗坏血酸氧化酶(APX)活性测定,根据赵会杰^[9]的方法进行 (4)谷胱甘肽还原酶(GR)活性和谷胱甘肽(GSH)含量的测定,根据 Gurf^[10]的方法进行 (5)抗坏血酸(AsA)含量的测定,按照韩雅珊^[11]的方法进行。

2 结果与分析

2.1 外施水杨酸对葡萄叶片中丙二醛含量的影响

从图 1 可以看出,葡萄幼苗叶片喷施水杨酸 1 h 后,其丙二醛含量就有显著降低,之后虽有所增高,但直到喷施后 24 h,仍比未喷施的低。

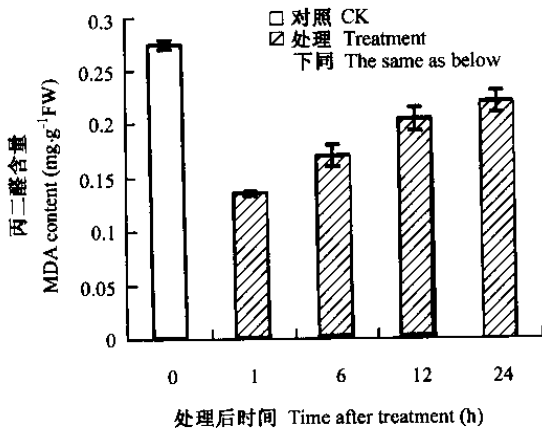


图 1 水杨酸喷施葡萄幼苗后叶片丙二醛含量的变化
Fig.1 Change of MDA content of leaves after grape seedlings was applied with SA

2.2 外施水杨酸对葡萄叶片中可溶性蛋白质含量的影响

从图 2 可以看出,葡萄幼苗叶片喷施水杨酸 1 h 后,其可溶性蛋白质含量就有显著增高,之后一直增高,直到喷施后 12 h 达到最高,到处理后的 24 h,有所下降,但仍比未喷施的高。

2.3 外施水杨酸对葡萄叶片的类胡萝卜素含量的影响

类胡萝卜素所吸收的光能传递给叶绿素 a,其中的胡萝卜素还能保护叶绿素 a,使其免于光氧化。

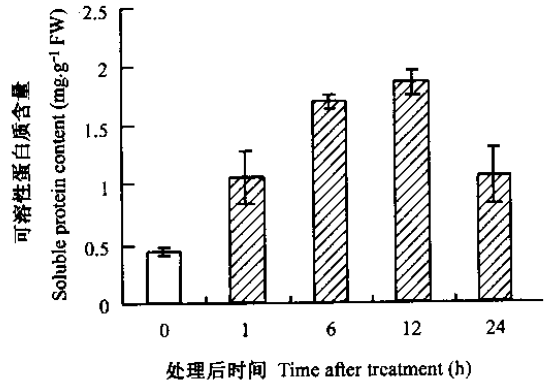


图 2 水杨酸喷施葡萄幼苗后叶片可溶性蛋白含量的变化
Fig.2 Change of soluble protein content of leaves after grape seedlings was applied with SA

类胡萝卜素还是类囊体膜上的必需成分,能有效地抑制叶绿素的三线态以及单线态氧^[12]。从图 3 中可以看出,葡萄幼苗叶片喷施 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 水杨酸后 1~12 h,类胡萝卜素含量逐渐升高,但变化缓慢,到 24 h,类胡萝卜素含量显著高于对照。

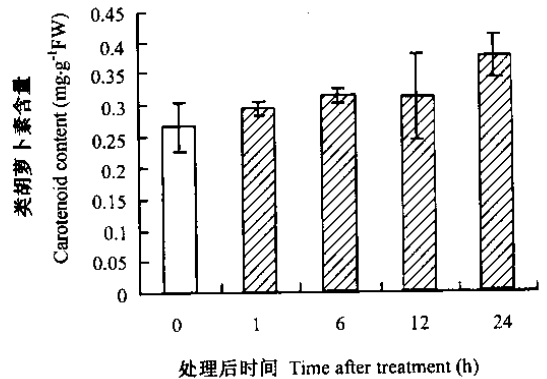


图 3 水杨酸喷施葡萄幼苗后叶片类胡萝卜素含量的变化
Fig.3 Change of carotenoid content of leaves after grape seedlings was applied with SA

2.4 外施水杨酸对葡萄叶片抗坏血酸过氧化物酶及抗坏血酸的影响

APX 氧化 AsA 成 DHA(脱氢抗坏血酸),在 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SA 处理葡萄幼苗叶片 1 h 后,APX 活性逐渐升高,至 6 h 形成高峰,以后逐渐下降(图 4);而葡萄幼苗叶片中抗坏血酸含量则在 SA 处理后 1 h,达到高峰,至 6 h,则显著下降,以后又逐渐升高,呈波浪式变化(图 5),但均比未喷施的要高。

2.5 外施水杨酸对葡萄叶片的谷胱甘肽还原酶(GR)活性及谷胱甘肽(GSH)含量的影响

葡萄幼苗叶片的 GR 活性在 SA 处理后 1 h 显著

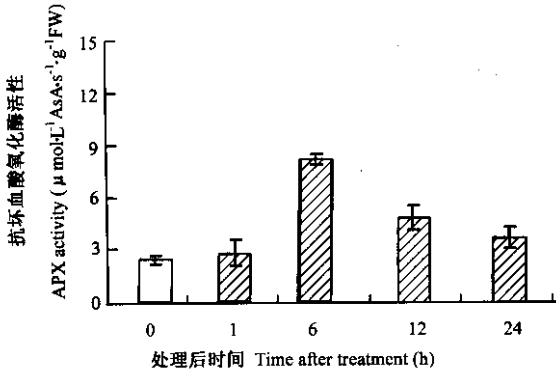


图 4 水杨酸喷施葡萄幼苗后不同时间叶片抗坏血酸过氧化物酶活性的变化

Fig.4 Change of APX activity of leaves after grape seedlings was applied with SA

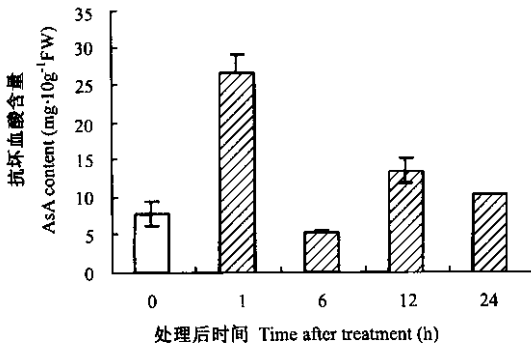


图 5 水杨酸喷施葡萄幼苗后不同时间叶片抗坏血酸含量的变化

Fig.5 Change of AsA content of leaves after grape seedlings was applied with SA

升高,并一直持续高水平状态(图6),而GSH含量在SA处理后1h达到最高,至6h又迅速下降至低谷,以后又逐渐上升(图7),但始终明显高于未喷施的。

3 讨论

3.1 SA与丙二醛

丙二醛是脂质过氧化的产物,其含量的多少可代表膜损伤程度的大小。SA与丙二醛关系的研究,已有一些报道,不同浓度的SA可使黄瓜、小麦的丙二醛含量下降,具有缓解它们受盐伤害的效应^[2],采后的苹果喷施SA,可使丙二醛含量下降,延长储藏期^[13]。扬花期的小麦喷施SA,可降低丙二醛含量^[14],笔者的试验结果,也证明了这一点。看来,一定浓度的SA确能使植物中丙二醛含量降低,提高植物的抗逆性。

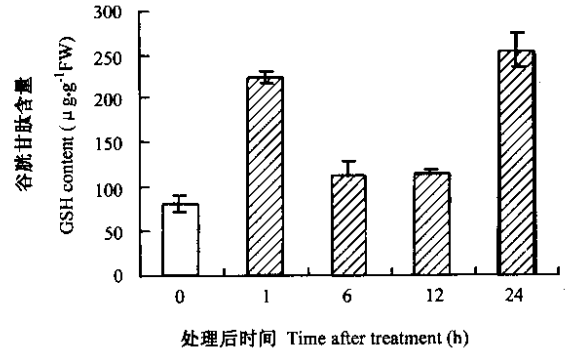


图 6 水杨酸喷施葡萄幼苗后不同时间叶片谷胱甘肽含量的变化

Fig.6 Change of GSH content of leaves after grape seedlings was applied with SA

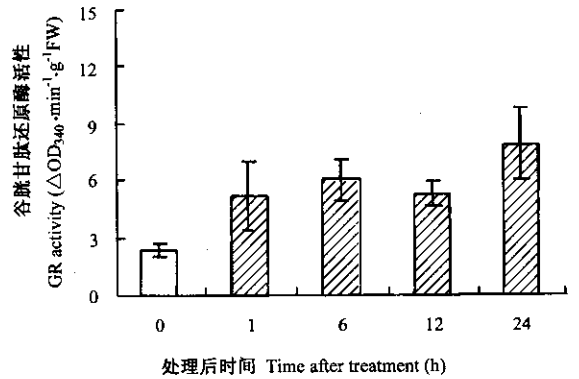


图 7 水杨酸喷施葡萄幼苗后不同时间叶片谷胱甘肽还原酶活性的变化

Fig.7 Change of GR activity of leaves after grape seedlings was applied with SA

3.2 SA与可溶性蛋白

蛋白质作为生命活动的体现者,它的含量、特征以及变化是由植物发育进程所决定的,植物对胁迫反应的结果,必然会在蛋白质含量和组成上有所体现,如果通过其它方法诱导出这些变化,则可能就诱导了抗逆性。SA诱导蛋白质的合成目前主要集中于SA对病程相关蛋白(PRPs)诱导的研究。一系列研究证明SA可以诱导植物产生某些PRPs^[15]。现在认为PRPs的产生是植物诱导抗病性的生化机制之一。SA还能够诱导过氧化物酶同工酶的合成^[16]及蛋白激酶^[17],SA能否诱导其它蛋白质的合成尚未见报道。本文结果表明,SA能够诱导葡萄幼苗叶片可溶性蛋白质含量的升高,可能与抗逆蛋白质新的合成或更多的表达有关。

3.3 SA和抗坏血酸-谷胱甘肽循环

APX对AsA有高度分解特性,在植物细胞的叶

绿体和细胞质中是主要捕捉 H_2O_2 的酶, 尽管 CAT 能够捕捉大量的 H_2O_2 , 但它在过氧化物酶体系中的位置以及相对较低的 K_m 限制了它能够保证足够低的 H_2O_2 浓度阻止叶绿体的损伤。 H_2O_2 可由抗坏血酸-谷胱甘肽循环捕捉^[18], 在这个系统中, APX 利用了 H_2O_2 去氧化 AsA 成单脱氢抗坏血酸自由基, 单脱氢抗坏血酸还原酶(MDHAR)利用 NAD(P)H 来产生 AsA, DHAR 利用 GSH 形成 GSSG 而产生 AsA。 GSH 是由 GR 利用 NADPH 产生的, 是这个循环的限速步骤。 人们已经知道这个循环主要负责清除叶绿体中的 H_2O_2 , 但它在细胞质和非光合作用组织中也变得越来越明显了^[19]。 Pinbero 等^[20]表明, 在对冷敏感和耐冷的玉米苗进行冷驯化时, 发现 APX 活性升高。

笔者的试验表明, SA 处理后 1 h, AsA 显著升高而 APX 活性虽有上升, 但并不明显, 到 6 h, APX 活性显著升高。 这与 Dat 等^[21]报告的基本一致。 而 Dat^[22]和 Janda 等^[4]报告, SA 处理对烟草和玉米的 APX 活性没有显著诱导作用。 这可能和不同的试材以及 SA 浓度有关, APX 的作用值得进一步探讨。

GR 能够还原 GSSG 成 GSH, 高的 GR 活性维持着谷胱甘肽库处在还原状态下, 在不同的胁迫下, GR 的活性增加^[23~27], 而过量表达 GR 的转基因植株在某些情况下可以更好地保护植株免受非生物胁迫。 GSH 是一种硫醇类化合物, 而硫醇类化合物是重要的抗氧化剂, 它们涉及到 DNA 和蛋白质的合成, 即 GSH 能选择性地激发防御基因的表达, 是防御基因的诱导者^[28]。 曾韶西等^[29]也报告, 水稻幼苗内 GSH 的含量随低温胁迫时间的延长而逐渐减少, GSH 的预处理可减缓水稻幼苗因低温引起的 AsA 含量的下降。 笔者试验结果表明, SA 处理葡萄幼苗 1 h 后, GR 活性和 GSH 水平显著升高, 并一直维持高水平。 这与 Dat 等^[22]在白芥苗、Janda 等^[4]在玉米幼苗的研究结果相同。 SA 提高植物的抗逆性可能和其能够诱导 GR 活性和 GSH 水平升高关系密切。

总之, 水杨酸可能通过诱导抗氧化剂和抗氧化酶的变化以及抗逆基因的表达来诱导植物的抗性。

References

- [1] Raskin I. Salicylic acid: a new plant hormone. *Plant Physiology*, 1992, 99: 799.
- [2] 张士功, 高吉寅, 宋景芝. 水杨酸和阿斯匹林对盐胁迫下小麦种子萌发的作用. *植物生理学通讯*, 1999, 35(1): 29 - 32.
- [3] 汪晓峰, 张宪政. AsA 提高小麦抗旱性生理效应的研究. *植物学通报*, 1998, 15(3): 48 - 50.
Wang X F, Zhang X Z. The study on physiological effects of water drought-resistance ability enhanced by AsA. *Chinese bulletin of Botany*, 1998, 15(3): 48 - 50. (in Chinese)
- [4] Janda T G, Szalai I T, Padi E. Hydroponic treatment with salicylic acid decrease the effects of chilling injury in maize (*Zea mays* L.) plants. *Planta*, 1999, 208: 475 - 480.
- [5] Dat J F, Lopez-Delgado H, Foye C H. Parallel change in H_2O_2 and catalase during thermotolerance induced by salicylic acid or heat acclimation in mustard seedlings. *Plant Physiology*, 1998, 116: 1351 - 1357.
- [6] Senaratna T, Touchell D, Bunn E. Acetyl salicylic acid (aspirin) and salicylic acid induce multiple stress tolerance in bean and tomato plants. *Plant Growth Regulation*, 2000, 30: 157 - 161.
- [7] 朱广廉, 钟海文, 张爱琴. *植物生理学实验*. 北京: 北京大学出版社, 1990: 245 - 248.
Zhu G L, Zhong H W, Zhang A Q. *The Experiments of Plant Physiology*. Beijing: Beijing University Press, 1990: 245 - 248. (in Chinese)
- [8] 张宪政. *作物生理研究法*. 北京: 农业出版社, 1990: 75 - 77.
Zhang X Z. *Research Methods of Crops' Physiology*. Beijing: Agricultural Press, 1990: 75 - 77. (in Chinese)
- [9] 汤章诚. *现代植物生理学试验指南*. 北京: 科学出版社, 1999, 314 - 315.
Tang Z C. *Guide of Experiments on Modern Plant Physiology*, Beijing: Science Press, 1999: 314 - 315. (in Chinese)
- [10] Guri A. Ozone effect on glutathione and ascorbic acid in beans. *Canadian Journal of Plant Science*, 1983, 63: 733 - 736.
- [11] 韩雅姍. *食品化学试验指导*. 北京: 中国农业大学出版社, 1992: 81 - 83.
Han Y S. *Guide of Experiments on Food Chemistry*. Beijing: China Agricultural University Press, 1992: 81 - 83. (in Chinese)
- [12] Knox J P, Dodge A D. Singlet oxygen and plants. *Phytochemistry*, 1985, 24: 889 - 896.
- [13] 韩涛, 李丽萍. 水杨酸对短期贮藏苹果的生理效应. *植物生理学通讯*, 1997(5): 347 - 348.
Han T, Li L P. Physiological effects of salicylic acid on storage of apple in short period. *Plant Physiology Communication*, 1997, 33(5): 347 - 348. (in Chinese)
- [14] 周春菊, 王林权, 李生秀. 有机酸和维生素对小麦某些生理生化特性的影响. *西北植物学报*, 1999, 19(4): 623 - 628.
Zhou C J, Wang L Q, Li S X. Effect of organic acids and vitamin on some physiological and biochemical characteristics of wheat. *Acta Botanica Boreail-Occidentalia Sinica*, 1999, 19(4): 623 - 628. (in Chinese)
- [15] Hosokawa D, Ohashi Y. Immunochemical Localization of pathogenesis-related proteins secreted into the intercellular spaces of salicylated-

- treated tobacco leaves. *Plant Cell and Physiology*, 1998, 29(6): 1035 - 1040.
- [16] 蔡新忠, 郑 重. 水杨酸诱导水稻幼苗抗病性的生化机制. *植物病理学报*, 1997, 27(3): 231 - 236.
Cai X Z, Zheng Z. Biochemical mechanisms of salicylic acid-induced resistance to rice seedling blast. *Acta Phytopathologica Sinica*, 1997, 27(3): 231 - 236 (in Chinese)
- [17] Chasan R. Eliciting phosphorylation. *The Plant Cell*, 1995, 7: 589 - 598.
- [18] Foyer C H, Halliwell B. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta*, 1976, 133: 21 - 25.
- [19] Alscher R G. Biosynthesis and antioxidant function of glutathione in plants. *Physiology of Plant*, 1989, 77: 457 - 464.
- [20] Pinhero R G. Changes in activities of antioxidant enzymes and their relationship to genetic and paclobutrazol-induced chilling tolerance of maize seedlings. *Plant Physiology*, 1997, 114: 695 - 704.
- [21] Dat J F, Foyer C H, Scott I M. Change in salicylic acid and antioxidants during induced thermotolerance in mustard seedlings. *Plant Physiology*, 1998, 118: 1455 - 1461.
- [22] Dat J F, Lopez-Dolgado H, Foyer C H, Scott I M. Effects of salicylic acid on oxidative stress and thermotolerance in tobacco. *Journal of Plant Physiology*, 2000, 156: 659 - 665.
- [23] Krause T E, Fletcher R A. Paclobutrazol protects wheat seedlings from heat and paraquat injury: is detoxification of active oxygen involved? *Plant Cell and Physiology*, 1994, 35: 45 - 52.
- [24] Wang C Y. Temperature preconditioning affects glutathione content and glutathione reductase activity in chilled zucchini squash. *Journal of Plant Physiology*, 1995, 145: 148 - 152.
- [25] Walker M A, Mckersie B D. Role of ascorbate-glutathione antioxidant system in chilling resistance in tomato. *Journal of Plant Physiology*, 1993, 141: 234 - 239.
- [26] Kocsy G. Glutathione synthesis in maize genotypes with different sensitivities to chilling. *Planta*, 1996, 198: 365 - 370.
- [27] Noctor G. Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transgenic plants. *Journal of Experimental Botany*, 1998, 49: 623 - 647.
- [28] Wingate V P M. Glutathione causes a massive and selective induction of plant defense genes. *Plant Physiology*, 1988, 87: 206 - 210.
- [29] 曾韶西, 王以柔, 刘鸿先. 低温胁迫对水稻幼苗抗坏血酸含量的影响. *植物生理学报*, 1987, 13: 365 - 370.
Zeng S X, Wang Y R, Liu H X. Effects of low temperature stress to contents of ascorbic acid in rice seedlings. *Acta of Plant Physiologica*, 1987, 13: 365 - 370. (in Chinese)

(责任编辑 王红艳)