

水杨酸处理对干旱胁迫下丹参幼苗抗氧化能力的影响

罗明华^{1,2}, 罗英², 王璞²

(1. 绵阳师范学院生物制药与分子生物学重点实验室, 四川 绵阳 621000;

2. 绵阳师范学院生命科学与技术学院, 四川 绵阳 621000)

摘 要:以丹参幼苗为试验材料,研究了叶面喷施 0.75 mmol/L 的水杨酸(SA)对干旱胁迫下丹参幼苗相对含水量、电解质渗漏率、H₂O₂ 和丙二醛含量、4 种抗氧化酶活性等生理指标的影响。结果表明:随着干旱胁迫的进行,丹参幼苗叶片相对含水量降低,H₂O₂ 含量增加,电解质渗漏率和丙二醛含量升高,水杨酸处理则延缓了这些参数变化;尽管 SA 处理后,CAT、APX 活性暂时降低,但在随后的胁迫过程中,丹参幼苗叶片 SOD、POD、CAT、APX 活性显著高于对照。由此可知:水杨酸处理提高了丹参幼苗抗氧化酶活性,增强了植株对干旱胁迫的抵抗能力。

关键词:丹参;干旱胁迫;水杨酸;抗氧化能力

中图分类号: Q945.78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7601(2010)04-0102-04

丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bunge)为唇形科药用植物,具有活血祛瘀、消肿止痛、养血安神的功能^[1]。丹参是川产地道药材,主产于四川省中江县,栽培于海拔 400~800 m 的丘陵低山区,每年春末夏初的季节性干旱是限制川丹参栽培的重要因素,目前产区正在多方面寻求解决的办法。水杨酸(Salicylic acid, SA)是一种广泛存在于植物体内的简单小分子酚类物质,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。SA 不仅可以诱导植物体内病程相关蛋白基因表达及产生系统获得抗病性^[2],而且能提高植物对干旱等多种逆境的抗性^[3]。有文献报道了外施水杨酸可以提高豇豆^[4]、大麦^[5]等多种作物抗干旱胁迫的能力,但对丹参尚无报道。为此,我们以丹参为材料,模拟干旱条件,结合外源水杨酸处理,测定水杨酸对干旱胁迫下丹参幼苗生理指标,特别是抗氧化酶活性的影响,探讨水杨酸提高丹参幼苗抗氧化能力和缓解干旱对丹参幼苗造成伤害的机理,以期农业生产提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与处理

丹参及其土壤取自中江县小牛坡。以盆栽(陶瓷盆直径 33 cm,高 28 cm)的方式于 2009 年元月 6 日在绵阳师范学院植物园进行试验。以种根为繁殖材料,将取回的土壤混合均匀,每盆装土壤 15 kg,每盆种植 1 个种根段(根段长 3~3.5 cm),每次定量浇水保持土壤含水量基本一致。试验作 3 组处理,

每组处理 5 次重复:第一组为干旱胁迫组(DS),丹参幼苗正常浇水施肥到三叶期(4 月 20 日),开始干旱处理;第二组为水杨酸处理后干旱胁迫组(DS+SA):丹参幼苗正常浇水施肥到三叶期(4 月 20 日),开始干旱处理,在轻度干旱胁迫(停止浇水 7 d)前两天(土壤相对含水量下降到 74%左右),连续两天叶面喷洒 0.75 mmol/L 水杨酸处理;第三组为对照组(CK),正常浇水,土壤含水量保持在 70%~85%。整个干旱处理时间共 28 d。

1.2 土壤相对含水量测定及胁迫程度的确定

取盆土 15~20 cm 处土壤(根系集中分布区,每盆取 3 个点)测定其相对含水量^[6],土壤相对含水量=土壤含水量/土壤饱和含水量。测定得到:停止浇水 5、7、14、21、28 d 土壤相对含水量分别为 74.45%、68.52%、45.38%、32.44%、12.78%。根据参考文献^[7],土壤相对含水量在 60%~70%为轻度干旱胁迫,40%~60%为中度干旱胁迫,40%以下为重度干旱胁迫。因此确定,停止浇水 7 d 达到轻度干旱胁迫,14 d 为中度胁迫,21 d、28 d 为重度干旱胁迫。

1.3 水杨酸处理浓度的确定与丹参叶片生理指标的测定方法

水杨酸处理浓度的选择参照黄清泉等^[8]方法,利用叶片电解质渗漏率(EL)反映膜伤害程度,作为干旱胁迫伤害强弱的依据,以 0、0.25、0.5、0.75、1.0、1.25、1.5 mmol/L 水杨酸喷施叶面预处理,24 h 后再用含 10%(w/v)PEG-6000 的培养液模拟干旱进行胁迫处理,测定 1、2、3 d 时叶片的电解质渗漏率,选择 SA 的最佳处理浓度。实验结果表明:在 0~

收稿日期:2009-11-06

基金项目:绵阳师范学院科研启动基金(MQD2007A005)

作者简介:罗明华(1964—),男,四川眉山人,博士,教授,主要从事药用植物的抗性生理研究。E-mail:mhemei@126.com。

0.75 mmol/L SA 处理的植株电解质渗漏率随 SA 处理浓度增大而减小,在 0.75 ~ 2.00 mmol/L SA 处理的植株电解质渗漏率随 SA 处理浓度增大而增加。说明低浓度 SA 减缓丹参幼苗干旱胁迫伤害效果不明显;较高浓度 SA 反而加重干旱胁迫伤害,所以选择 0.75 mmol/L SA 喷施叶面处理。

叶片含水量以相对含水量(RWC)表示,即:(鲜重 - 干重)/(饱和鲜重 - 干重);膜相对透性以电解质渗漏率表示,按李锦树等^[9]方法测定。丙二醛(MDA)含量参照 Velikova 等^[10]硫代巴比妥酸检测法测定;H₂O₂ 含量按林植芳等^[11]方法测定;POD 活性测定按 Omran 方法^[12]测定;CAT 活性按 Beers 和 Sizer 方法^[13]测定;SOD 活性参照邵从本等 NBT 光还原法^[14]测定;APX 按沈文颺等方法^[15]测定。

所有试验结果均为 5 次重复,试验结果采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 丹参叶片相对含水量的变化

叶片含水量直接反映干旱胁迫下植物叶片的失水程度。结果表明(表 1),在停止浇水 14、21、28 d 后,DS 处理叶片相对含水量(RWC)分别降低 8.58%、19.65%和 40.34%,干旱胁迫使丹参幼苗叶片失水严重。而用外源水杨酸处理后,叶片相对含水量虽然在前 14 d 与 DS 处理的植株差异不明显,但在 21、28 d 时为 14.19%和 24.98%,与同期的幼苗相比,SA 处理的幼苗 RWC 提高 6.37%和 16.27%,说明 SA 能显著延缓干旱胁迫下丹参叶片 RWC 的下降。

表 1 水杨酸处理对相对含水量、电解质渗漏率、丙二醛和 H₂O₂ 含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 1 Effects of exogenous SA treatment on RWC, EL, H₂O₂ and MDA content

指标 Index	处理 Treatments	干旱处理时间 Duration of drought stress(d)				
		0	7	14	21	28
相对含水量(%) Relative water content	CK	90.42 ± 1.04a	89.51 ± 0.89a	87.83 ± 0.43a	86.52 ± 0.72a	88.34 ± 0.38a
	DS + SA	89.83 ± 0.68a	87.54 ± 0.63a	82.12 ± 0.52b	75.64 ± 0.56b	64.85 ± 0.42b
	DS	88.92 ± 0.62a	87.86 ± 0.66a	80.34 ± 0.46b	69.27 ± 0.68c	48.58 ± 0.34c
电解质渗漏率(%) Electrolyte leakage	CK	11.08 ± 0.31a	11.62 ± 0.18a	11.57 ± 0.28a	12.23 ± 0.13a	12.33 ± 0.22a
	DS + SA	10.52 ± 0.26a	11.42 ± 0.22a	15.63 ± 0.32b	22.41 ± 0.43b	28.24 ± 0.25b
	DS	10.16 ± 0.55a	10.97 ± 0.46a	18.69 ± 0.23c	40.43 ± 0.56c	48.21 ± 0.66c
丙二醛含量 Malonyldialdehyde content (μmol/gDW)	CK	0.39 ± 0.07a	0.42 ± 0.06a	0.45 ± 0.02a	0.46 ± 0.09a	0.41 ± 0.03a
	DS + SA	0.39 ± 0.04a	0.41 ± 0.07a	0.47 ± 0.02ab	0.62 ± 0.11b	0.68 ± 0.11b
	DS	0.41 ± 0.04a	0.44 ± 0.08a	0.51 ± 0.03ab	0.72 ± 0.08c	0.83 ± 0.12c
H ₂ O ₂ 含量 H ₂ O ₂ content (μmol/gDW)	CK	11.56 ± 0.12a	11.44 ± 0.06a	12.18 ± 0.13a	11.85 ± 0.12a	12.25 ± 0.09a
	DS + SA	11.23 ± 0.11a	15.12 ± 0.12b	18.26 ± 0.07b	22.52 ± 0.05b	23.83 ± 0.16b
	DS	11.34 ± 0.08a	11.35 ± 0.13a	16.21 ± 0.11c	28.46 ± 0.14c	38.56 ± 0.23c

注:不同小写字母表示差异达 5% 显著水平。

Note: Different lowercase letters mean significant difference at $P < 0.05$.

2.2 丹参叶片电解质渗漏率和丙二醛含量的变化

电解质渗漏率可以反映干旱胁迫对植物细胞膜结构的破坏程度。丙二醛是植物细胞受到氧化伤害的重要标志。经过干旱胁迫 14、21、28 d 后,DS 处理的 MDA 含量相对于 0 d 的增加量分别为 0.10、0.31、0.42 μmol/gDW,电解质渗漏率分别增加 83.96%、298.5%、374.5%;SA 处理幼苗 MDA 含量相对于 0 d 的增加量则分别为 0.08、0.23、0.29 μmol/gDW,电解质渗漏率分别增加 48.6%、116.1%、168.5%,比同期对照组幼苗分别下降 26.4%、147.4%、162.1% (表 1)。这些数据显示,丹参幼苗叶片 MDA 含量和电解质渗漏率随渗透胁迫时间延长而增加,叶片细胞质膜过氧化作用加强,完整性遭到破坏;SA 处理

后提高了丹参幼苗质膜的稳定性和完整性,减轻了因干旱胁迫引起膜脂过氧化和细胞内物质的外泄,说明 SA 提高植物抗干旱胁迫的能力与其对质膜的保护作用有关。

2.3 丹参叶片 H₂O₂ 含量的变化

由表 1 可以看出,经过 SA 连续处理两天后的幼苗叶片(即干旱后 7 d)中,H₂O₂ 含量明显高于 CK 和 DS 处理的植株;随着干旱胁迫进行,DS 处理的植株叶片 H₂O₂ 含量随胁迫时间的延长迅速上升,CK 组维持低水平,DS + SA 处理初始 H₂O₂ 含量虽然高于对照组,但在胁迫过程中,H₂O₂ 含量的上升程度明显低于 DS 处理,在 21、28 d 时测定,与同期 CK 组幼苗相比,DS + SA 处理 H₂O₂ 的含量比 DS 处理减少

了 50.15%、120.25%，说明 SA 处理后降低了 H_2O_2 浓度，使活性氧的伤害减轻。

2.4 丹参叶片 4 种抗氧化酶活性的变化

SOD、POD、CAT、APX 是植物体内 4 种重要的抗氧化酶，能清除活性氧自由基，如 $OH^\cdot$ 、 1O_2 和 $O_2^{\cdot-}$ 。酶活性的大小反映了植物细胞抵御活性氧伤害的能力^[16]。从图 1 可以看出：SA 连续处理两天后，CAT、APX 的活性和对照组相比，分别下降了 12.65% 和 15.52%，这说明 SA 进入植株体内，抑制 CAT、APX

活性；随着干旱胁迫加剧，DS 处理 4 种抗氧化酶活性与同期的对照植株相比有明显下降，干旱胁迫至 28 d 时，POD、SOD、CAT、APX 酶活性分别为 CK 组的 35.12%、17.28%、26.85%、42.86%。而经过 SA 处理植株，则延缓了这几种酶活性的降低，提高了酶活性，在胁迫 28 d 时，POD、SOD、CAT、APX 酶活性分别比 DS 处理植株提高了 35.67%、39.38%、45.54%、14.28%。说明 SA 提高了抗氧化酶活性。

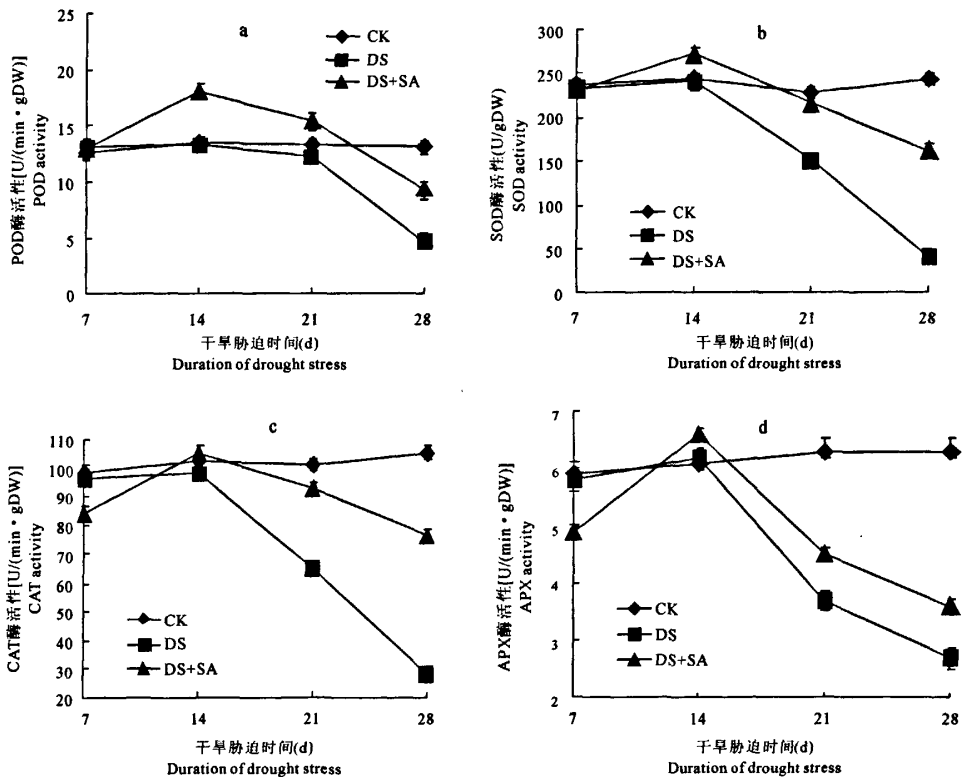


图 1 水杨酸处理对 4 种抗氧化酶活性的影响

(a) POD 酶活性的变化；(b) SOD 酶活性的变化；(c) CAT 酶活性的变化；(d) APX 酶活性的变化

Fig.1 Effects of exogenous SA treatment on activity of POD(a), SOD(b), CAT(c) and APX(d)

3 讨论

干旱胁迫导致环境水势降低而引起植物细胞脱水，其叶绿体利用 CO_2 的能力受到限制，能量消耗降低，光合电子传递到 O_2 的比例增加，因而可使植物体内各种活性氧（如： $O_2^{\cdot-}$ 、 H_2O_2 、 1O_2 ）含量大量增加^[4]。如果植物体内大量的活性氧不加以清除，植物体将受到严重的氧化伤害，于是植物体内形成酶性的和非酶性的抗氧化防御系统来保护自身细胞免遭伤害。

本研究结果显示，干旱胁迫使丹参叶片含水量

明显下降，叶片的电解质渗漏率明显上升，叶片中丙二醛含量增加，膜脂过氧化加剧，表明膜结构受到了严重破坏；叶片中 4 种抗氧化酶（SOD、POD、CAT、APX）活性都明显下降，表明丹参幼苗的抗氧化酶体系同样受到了严重破坏。外源水杨酸处理后，丹参幼苗的生理活动有所改善。与 DS 处理相比，叶片含水量下降变慢，减小了叶片的失水程度，叶片中 4 种抗氧化酶活性都有所提高，表明水杨酸在一定程度上保护了丹参幼苗的抗氧化酶体系，从而使电解质渗漏率、 H_2O_2 、丙二醛含量降低。本研究认为：施用的外源 SA 与 SA 结合蛋白（SA binding pro-

tein, SABP, 即 CAT) 结合, 降低了 CAT 活性^[8,16]; SA 同样抑制 APX 活性^[17], 导致 H_2O_2 含量上升, 从而引起轻度氧化胁迫, 随后 H_2O_2 作为胁迫信号, 诱导提高了抗氧化酶的活性, 增强抗氧化力^[18]。当然, 水杨酸提高植物抗性的作用是多方面的, 特别是在干旱胁迫下如何对丹参的非酶性的抗氧化防御系统产生影响, 还有待进一步作深入研究。

综上所述, 水杨酸能够缓解干旱对丹参幼苗造成的伤害。水杨酸价格低廉, 使用简单, 用量低, 进一步运用于生产, 具有较大的实际意义。

参考文献:

- [1] 郭宝林, 冯毓秀, 赵杨景. 丹参种质资源研究进展[J]. 中国中药杂志, 2002, 27(7): 492—494.
- [2] Raskin I. Role of salicylic acid in plants[J]. Plant Physiol Mol Biol, 1992, 43: 439.
- [3] 王利军, 战吉成, 黄卫东. 水杨酸与植物抗性[J]. 植物生理学通讯, 2002, 38(6): 619—624.
- [4] 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(自然科学版), 2008, 45(5): 1256—1262.
- [5] Luo M H, Yuan S, Chen Y E, et al. Effects of salicylic acid on the photosystem 2 of barley seedlings under osmotic stress[J]. Biologia Plantarum, 2009, 53(4): 663—669.
- [6] 王 磊, 胡 楠, 丁彦彦. 干旱和复水对大豆叶片光合及叶绿素荧光的影响[J]. 生态学报, 2007, 27(9): 3530—3534.
- [7] 苏 丹, 孙国峰, 张金政, 等. 水分胁迫对费菜和长药八宝生长及生物量分配的影响[J]. 园艺学报, 2007, 34(5): 1317—1321.
- [8] 黄清泉, 孙 歆, 张年辉, 等. 水杨酸对干旱胁迫黄瓜幼苗叶片生理过程的影响[J]. 西北植物学报, 2004, 24(12): 2202—2207.
- [9] 李锦树, 王洪春, 王文英, 等. 干旱对玉米叶片细胞透性及膜脂的影响[J]. 植物生理学报, 1983, 9(3): 223—229.
- [10] Velikova V, Yordanov I, Edreva A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants protective role of exogenous polyamines[J]. Plant Sci, 2000, 151: 59—64.
- [11] 林植芳, 李双顺, 林桂珠, 等. 衰老叶片和叶绿体中的 H_2O_2 的积累与膜脂过氧化的关系[J]. 植物生理学报, 1988, 14: 16—18.
- [12] Omran R G. Peroxide levels and activities of catalase, peroxidase and indoleacetic acid oxidase during and after chilling cucumber seedlings[J]. J Plant Physiol, 1980, 65(2): 407—408.
- [13] Beers P F, Sizer I W. A spectrophotometric assay for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase[J]. Biol Chem, 1952, 195: 133—138.
- [14] 邵从本, 罗广华, 王爱国. 几种检测超氧化物歧化酶活性反应的比较[J]. 植物生理学通讯, 1983, 19(5): 46—49.
- [15] 沈文庵, 徐朗来, 叶茂炳, 等. 抗坏血酸过氧化物酶活性测定的探讨[J]. 植物生理学通讯, 1996, 2(3): 203—205.
- [16] Chen Z X, Klessing D F. Identification of a soluble salicylic acid-binding protein that may function in signal transduction in the plant disease resistance response[J]. Proc Nat Acad Sci, 1991, 88: 8179—8183.
- [17] Duner J, Klessing D F. Salicylic acid is a modulator of tobacco and mammalian catalases[J]. J Biol Chem, 1996, 27: 28492—28501.
- [18] Kang G Z, Wang Z X, Sun G C. Participation of H_2O_2 in enhancement of cold chilling by salicylic acid in banana seedlings[J]. Acta Botanica Sinica, 2003, 45(5): 567—573.

Effects of exogenous salicylic acid on antioxidant capacity in *Salvia miltiorrhiza* seedlings under drought stress

LUO Ming-hua^{1,2}, LUO Ying², WANG Pu²

(1. Key Laboratory of Molecular Biology and Biopharmaceutics, Mianyang Normal University, Mianyang, Sichuan 621000, China;

2. College of Life Sciences and Biotechnology, Mianyang Normal University, Mianyang, Sichuan 621000, China)

Abstract: *Salvia miltiorrhiza* seedlings were employed to study the effects of exogenous salicylic acid (0.75 mmol/L) treatment on some physical characteristics of *S. miltiorrhiza* under drought stress, such as relative water content(RWC), electrolyte leakage (EL), content of H_2O_2 and malonyldialdehyde(MDA), and activity of superoxide dismutase(SOD), peroxidase(POD), catalase(CAT) and ascorbate peroxidase(APX). The results showed that with drought stress, RWC of leaves of *S. miltiorrhiza* seedlings decreased, and EL, content of H_2O_2 and MDA increased gradually, however, exogenous SA treatment alleviated these changes. Although the activity of CAT and APX decreased temporally at the beginning of SA treatment, the activity of SOD, POD, APX and CAT in the leaves of seedlings treated by SA was higher than that in single drought stress in the subsequent progress of drought stress. Therefore, these results indicated that SA enhanced the activity of anti-oxidative enzymes in leaves of *S. miltiorrhiza* seedlings and strengthened the tolerance of *S. miltiorrhiza* seedlings against drought stress.

Keywords: *Salvia miltiorrhiza* Bunge; salicylic acid; drought stress; antioxidant capacity