

## 葡萄幼苗在温度胁迫交叉适应过程中对水杨酸的应答

张俊环<sup>1,2</sup>, 黄卫东<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083; <sup>2</sup> 北京市农林科学院林业果树研究所, 北京 100093

**提要:** 在温度锻炼诱导葡萄幼苗对交叉温度逆境的适应过程中叶片内源SA变化的结果表明, 0℃低温胁迫期间, 葡萄幼苗叶片细胞膜系统受到严重伤害, 丙二醛(MDA)含量明显升高; 此时自由态SA含量呈波动性变化, 并随着胁迫进程的延长, 内源SA含量明显低于正常叶片水平。而经过高温锻炼的幼苗, 在低温胁迫初期自由态SA含量迅速达到一个高峰, 之后回落并保持在正常叶片的SA水平, MDA含量也相应降低且相对稳定。结合态SA的变化相对较平稳, 并且总SA含量变化趋势与自由态SA含量的变化趋势相吻合。在45℃高温胁迫期间, 经过低温锻炼的幼苗的上述各项指标的变化规律与经过高温锻炼的幼苗在低温胁迫期间的变化趋势相似。

**关键词:** 葡萄幼苗; 交叉适应; 水杨酸

## The Response of Salicylic Acid in Young Grape Plants during Cross Adaptation to Temperature Stresses

ZHANG Jun-Huan<sup>1,2</sup>, HUANG Wei-Dong<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China; <sup>2</sup>Institute of Forestry and Pomology, Beijing Academy of Agricultural and Forestry Science, Beijing 100093, China

**Abstract:** This research tested the influence of heat acclimation (HA) on chilling resistance and cold acclimation (CA) on heat tolerance and the parallel changes in endogenous SA in leaves of two-year-old young grape plants. The results showed that the leaf cell was damaged by cold stress (0℃) and the malondialdehyde (MDA) content was rapidly increased under cold stress, the free SA content fluctuated with the cold time and then dropped to a lower level than that in normal leaves. However, in HA plants, free SA level rapidly increased to a peak and then dropped back to the normal level. Correspondingly, the MDA concentration remained relative stability and lower than that in control plants during 0℃ cold stress. No obvious changes in conjugated SA occurred between HA and control plants, and the change trend of total SA content was in accordance with the free SA. It is important that, the change tendency of all those indexes in CA plants under 45℃ heat stress was consistent with that in HA plants under cold stress.

**Key words:** young grape plant; cross adaptation; salicylic acid

植物通过改变细胞代谢和激发不同的防御机制来应对生物和非生物胁迫。水杨酸(salicylic acid, SA)作为胞内信号分子, 参与调节植物的许多生理过程, 尤其在诱导植物的耐热性(Larkindal和Huang 2003; 孙艳和王鹏2003; 杜朝昆等2005)和耐冷性(康国章等2003; Tasgin等2006)中都有明显的作用。但这些研究大多是探讨外源SA提高植物耐受温度逆境能力的生理效应, 而有关内源SA对逆境应答的报道较少。有研究表明, 高温锻炼能够通过调节葡萄幼苗和芥菜苗内源SA含量而增强植物的耐热能力(Dat等1998; 王利军等2002)。另一方面, 温度逆境锻炼是提高植物抗

逆性的一种有效手段, 并且, 交叉适应现象在温度逆境锻炼中也有所体现。如黑麦经冷锻炼后, 其耐热性有明显提高(Fu等1998)。高温锻炼和低温锻炼均可提高黄瓜幼苗的抗高温能力(马德华等1998)。遗憾的是, 目前对植物这种交叉适应性的研究仅仅局限于对这一现象的确认, 而对其内在机制的研究甚少。我们以前的研究表明, 高温

收稿 2007-02-06 修定 2007-05-26

资助 国家自然科学基金(30471192)和北京市优秀人才培养项目(20061D0200500047)。

\* 通讯作者(E-mail: huanggwd@263.net; Tel: 010-62737024)。

锻炼和低温锻炼能够诱导葡萄幼苗对交叉温度逆境的适应能力, 保护叶绿体和线粒体等膜结构免受温度胁迫伤害(Zhang 等 2005), 并且微粒体膜 ATPase 参与这一适应性反应(Zhang 等 2006; 张俊环等 2006)。但在此种交叉适应性形成过程中是否有内源 SA 的参与呢? 至今未见报道。为此, 本文以葡萄幼苗为试材, 研究温度锻炼在诱导葡萄幼苗对交叉温度逆境的适应过程中叶片内源 SA 的动态变化, 以期进一步揭示温度锻炼所诱导的交叉适应性机制, 为采取有效措施减轻环境温度对植物的伤害提供参考。

### 材料与方法

材料为 2 年生葡萄 '京秀' (*Vitis vinifera* L. cv. 'Jingxiu') 幼苗。幼苗的温室培养在中国农业科学院植物保护研究所温室进行。2003 年 2 月底, 将取自中国科学院植物研究所葡萄园上一年通过嫁接繁殖培养的穴盘小苗移栽于盆口直径×盆底直径=16 cm×14 cm 的黑色塑料盆钵中, 盆栽用土为园土:草炭土:蛭石=1:1:1。放在温室中缓苗后, 培养一个营养枝。温室中昼夜温度为 25~27 /18~20, 相对湿度(RH)为 60%~70%。

试验处理有 2 种 (1) 高温锻炼与低温胁迫处理。2003 年 3 月上旬, 选择生长一致的葡萄植株(具 10 片功能叶), 在光照培养箱中进行(38±0.5) 的高温锻炼处理, 光照强度为 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , 相对湿度(RH)为 70%~80%。以正常生长的植株为对照, 高温处理 10 h 后, 在室温下恢复 2 h 后将经和未经高温锻炼的植株置于控温玻璃门冰柜中以(0±0.5) 的低温作胁迫处理, 不外加光照, 处理时间分别为 0、0.5、1、3、6 和 12 h。(2) 低温锻炼与高温胁迫处理。选择生长一致的葡萄植株(具 8 片功能叶), 在光照培养箱中以(8±0.5) 的低温作锻炼处理, 光照强度为 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , RH 为 70%~80%。以正常生长的植株为对照, 锻炼处理 2.5 d 后, 在室温下恢复 2 h, 然后将经和未经低温锻炼的植株置于光照培养箱中作(45±0.5) 的高温胁迫处理, 光照与相对湿度同上, 处理时间分别为 0、0.5、1、3 和 6 h。每个处理 6 株幼苗, 3 次重复。处理后, 摘取成熟叶片,

放在液氮中速冻后保存于 -80 的冰箱中, 用于丙二醛和 SA 的测定。

SA 含量测定参照李兆亮等(1997)的方法。取 2 g 叶片(18 棵植株的混合叶样), 加入 6 mL 冷甲醇(80%)研磨成浆, 于 4 下 10 000×g 离心 5 min, 残渣用 95% 甲醇研磨液重复提取一次。合并上清液, 在 -20 冰箱中放置 1 h, 然后再以 10 000×g 于 4 下离心 5 min, 将所得上清液经旋转真空干燥仪浓缩到原体积的 1/10。加重蒸水至 4 mL, 加入偏磷酸至终浓度为 2% (W/V), 用 2 mL 乙酸乙酯提取 3 次, 有机相用氮气吹干, 则得自由态的 SA 粗提液。向水相中加入 6  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 HCl 至终浓度为 1  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 密封后于 80 的水浴中水解 1 h, 冷却后按上述方法制备结合态 SA 粗提液。硅胶板层析纯化 SA 样品, 高效液相色谱(HPLC)法分析测定游离态和结合态 SA 含量。自由态 SA 色谱条件为: Waters224 型高效液相色谱仪, Diamonsil C18 柱(250 mm×4.6 mm), 检测温度为室温, 采用 UV 238 nm×0.1 UFS 检测器, 流动相为 60% 甲醇+5% 重蒸水, 流速为 0.7  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , 保留时间为 8 min。结合态 SA 色谱条件为: 检测器为 UV 265 nm×0.1 UFS, 流动相为 25% 甲醇+75% 重蒸水, 其他条件同自由态 SA。测定设 3 次重复。

丙二醛(MDA)含量的测定参照 Dhindsa 等(1981)的 TBA 比色法: 准确称取 1 g 叶片, 用 10 mL 10% 的三氯乙酸(TCA)研磨提取, 匀浆以 4000×g 离心 10 min, 上清液即为样品提取液。取 2 mL 上清液, 加入 2 mL 0.6% 的 TCA, 混匀物于沸水浴中反应 15 min, 迅速冷却后再离心, 取上清液测定波长 532、600 和 450 nm 处的消光度, 最后采用公式  $C(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})=6.45(D_{532}-D_{600})-0.56D_{450}$  计算 MDA 浓度, 并进一步换算出组织中的 MDA 含量 [ $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$  (FW)]。测定重复 3 次。

### 实验结果

#### 1 高、低温锻炼对葡萄幼苗叶片耐低、高温胁迫能力的影响

(1)图 1 的结果表明, 经过高温锻炼的葡萄幼苗叶片细胞内丙二醛含量略高于未作高温锻炼的。

但在低温胁迫过程中, 锻炼过的幼苗其MDA含量只在胁迫初期(0.5 h)有轻微的上升, 之后便又下降, 含量相对稳定且接近于正常叶中的水平。而未作高温锻炼的在胁迫 0.5~1 h 期间急剧上升, 1 h 时最高, 达到  $27.9 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$  (FW), 以后略有下

降, 但含量仍一直明显高于高温锻炼的叶片(图 1-a)。可见, 预先作高温锻炼可稳定细胞膜, 降低电解质外渗率, 减轻低温引发的膜伤害。

(2) 高温胁迫也可促进葡萄幼苗叶片的膜脂过氧化作用, 胁迫处理 0.5 h 后, 未作低温锻炼的

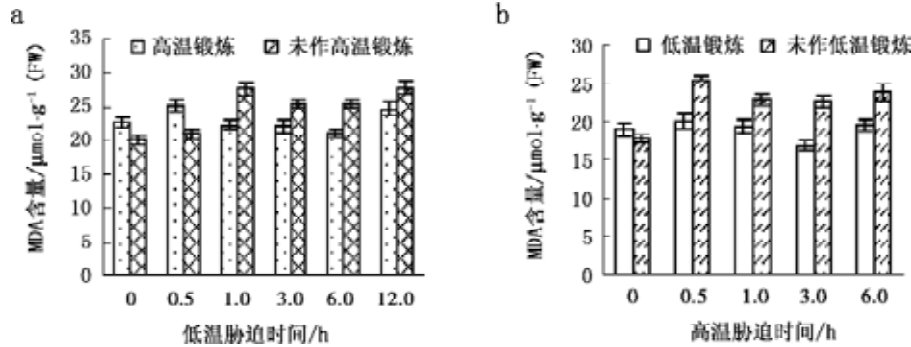


图1 温度胁迫下高温锻炼/低温锻炼预处理对葡萄幼苗叶中丙二醛含量的影响

Fig.1 Effects of heat-acclimation/cold-acclimation pretreatment on the malondialdehyde content in the leaves of young grape plants under cold/heat stress

叶中MDA含量比胁迫前大幅度增加, 之后虽又有所回落但仍一直明显高于胁迫前的正常含量。经过低温锻炼的葡萄幼苗叶片细胞内MDA含量在胁迫期间也略高于正常叶中的水平, 但在各个测定时期都明显低于相应的未作低温锻炼的叶中MDA含量(图 1-b)。可见, 低温锻炼可增加细胞膜的稳定性, 延缓高温引起的膜脂过氧化作用, 从而减轻高温对葡萄幼苗叶片细胞膜的损伤。

## 2 高温锻炼对低温胁迫下葡萄幼苗叶中内源SA含量的影响

(1) 如图 2 所示, 在 0 冷胁迫条件下, 未作高温锻炼的葡萄叶片内源自由态SA含量呈波动性变化, 先是急剧下降, 之后又迅速上升至一高峰, 接着又迅速而持续下降, 在 3 h 以后便明显低于正常叶中的 SA 水平。高温锻炼叶中 SA 含量在低温胁迫初期迅速增加, 在 0.5 h 达到一峰值  $2.01 \text{ mg}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$  (FW) 后又迅速下降到正常叶片 SA 含量  $1.33 \text{ mg}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$  (FW), 之后在此水平保持平稳状态, 并明显高于相应的对照水平(图 2-a)。

(2) 相对于自由态 SA 的变化而言, 高温锻炼叶中结合态 SA 含量变化较平稳。高温锻炼以后, 结合态 SA 含量高于未作高温锻炼的, 并在整个冷

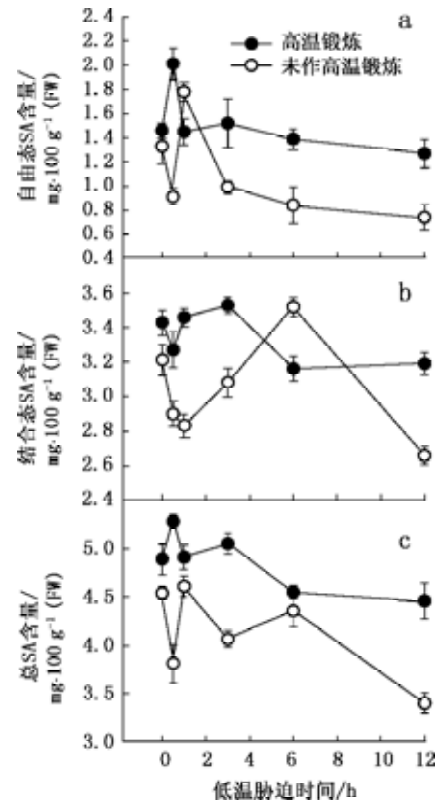


图2 低温胁迫下高温锻炼预处理对葡萄幼苗叶中SA含量的影响

Fig.2 Effects of heat-acclimation pretreatment on SA content in the leaves of young grape plants under cold stress

胁迫期间保持平稳, 胁迫后期(3~6 h)略有下降, 但仍接近正常叶中的含量。未作高温锻炼的叶片在低温胁迫后, 逐渐下降, 1 h后开始回升, 并在6 h达到一个高峰[3.52 mg·100 g<sup>-1</sup> (FW)]后又急剧下降。并且在整个低温胁迫期间的含量除5~8 h都显著低于高温锻炼处理叶片(图2-b)。

总的水杨酸含量变化趋势类似于自由态SA的变化(图2-c)。

### 3 低温锻炼对高温胁迫下幼苗叶中内源SA含量的影响

低温锻炼2.5 d后并未明显改变葡萄叶片内自由态SA含量, 但在随后的高温胁迫处理期间, 与高温锻炼幼苗在冷胁迫期间自由态SA含量的变化相似, 先是迅速上升至一峰值后又迅速下降至接近正常叶片的水平, 之后保持平稳状态。未作低温锻炼的叶片在高温胁迫处理期间呈波动性变化(图3-a)。低温锻炼叶中的结合态SA含量在高温胁迫期间呈平稳的缓慢增加趋势, 而未作低温锻炼的叶中的结合态SA呈波动性变化, 并在胁迫前期与自由态SA的变化呈几乎相反的趋势(图3-b)。

总SA含量的变化, 未作低温锻炼的与低温锻炼预处理的有所不同, 未作低温锻炼的叶中总SA的变化类似于自由态SA的变化趋势, 而低温锻炼预处理叶中总SA的变化接近于结合态的变化, 呈逐渐增加趋势(图3-c)。

## 讨 论

SA提高植物耐热性的机制之一就是减轻细胞的膜质过氧化作用。SA可作为信号物质诱导植物体内热激蛋白(HSPs)的合成(Clarke等2004; Pan等2006), 并保持较高的超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性, 增强植物的抗氧化胁迫能力(Dat等1998; He等2005; 刘悦萍等2005), 降低高温引起的氧化伤害, 维持细胞膜的稳定性, 从而提高植物的抗热性。关于低温锻炼对内源SA影响的研究较少, 仅见一篇报道。马德华等(1998)的研究指出, 低温锻炼后的黄瓜叶中自由态的水杨酸含量分别增加2.5倍。本文结果表明, 低温锻炼的葡萄幼苗在高温胁迫初期, 叶中自由态SA含量迅速达到一峰值后又迅速回落至正常水平, 表现

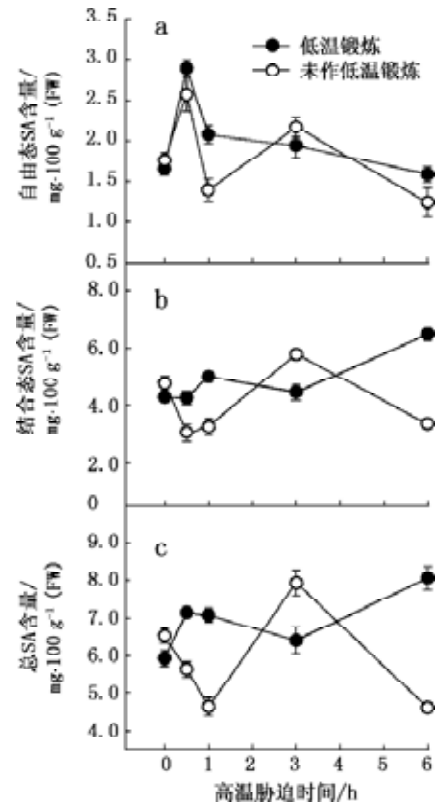


图3 高温胁迫下低温锻炼预处理对葡萄幼苗叶中SA含量的影响

Fig.3 Effects of cold-acclimation pretreatment on SA content in the leaves of young grape plants under heat stress

出SA分子的信号功能特征; 并在胁迫处理后期一直高于相应的未作低温锻炼的处理(图3-a), 与此相对应的是, 低温锻炼叶中代表细胞氧化伤害的MDA浓度总是低于相应的未作低温锻炼的处理, 并且SA的增加在时间上早于MDA的下降(图1-b和图3-a)。自由态SA可能作为胁迫初期的信号物质, 启动抗逆相关的防御反应。而未作低温锻炼的叶片虽在1 h时有一SA高峰, 但由于自身细胞器结构受到高温胁迫的破坏(Zhang等2005), 防御能力下降, SA的合成、转化或运转途径受阻, 所以自由态SA含量持续下降, 1 h后就明显低于正常叶片的SA水平。因此认为, 低温锻炼可能是通过诱导内源自由态SA的增加而诱导一系列的防御反应(Zhang等2006; 张俊环等2006), 减轻高温对葡萄幼苗的膜质过氧化伤害, 从而提高幼苗对高温胁迫的适应性。

关于SA与植物抗冷性的研究,多是集中在外源SA处理对植物的抗冷性影响方面。张玄兵等(2004)在龙船花中的研究表明,在低温胁迫下,外源SA能抑制脯氨酸形成和积累、使可溶性蛋白质降解,并能提高过氧化物酶活性,抑制MDA形成和积累,从而提高龙船花的抗寒性。对非洲菊冷敏感程度不同的2个基因型幼苗(陈小兰等2005)、玉米幼苗(黄丽华等2005)和冬小麦(Tasgin等2006)的研究表明,SA处理可增强低温胁迫下抗氧化酶系的活力,从而提高抗冷力。以上研究也表明,与提高耐热性的机制相似,SA主要也是通过增强植物的抗氧化能力而提高抗寒性的。本文中,高温锻炼预处理诱导的葡萄叶中自由态SA的增加在时间上早于MDA的降低变化,SA含量在低温胁迫的早期就高于相应的未作高温锻炼的,而MDA的减少发生在低温处理1h以后(图1-a和图2-a)。由此可见,高温锻炼诱导的自由态SA含量变化参与了葡萄幼苗抗冷性的增强过程。

相对于结合态SA来说,自由态SA含量变化与葡萄幼苗对温度逆境的抗性关系更密切。本文(图2和图3)结果显示,无论锻炼预处理与否,在胁迫条件下自由态SA的变化总是相对敏感而强烈的。并且,在胁迫处理期间,除了低温锻炼处理以外,其他处理总SA含量的变化趋势都与自由态SA的变化基本相一致;而低温锻炼叶中总SA含量的变化类似于结合态SA的变化,可能是由于结合态SA的基础含量比自由态高,因而掩盖了自由态SA的灵敏变化。因此认为,SA主要是以自由态的活性形式参与温度逆境锻炼诱导交叉适应性反应的。

高温锻炼诱导出现的自由态SA含量的快速增加来源于结合态SA向自由态的转化(Liu等2006),而Pan等(2006)的SA合成抑制剂试验表明,自由态SA的增加一部分来自SA的从头生物合成途径。根据本文结果也可初步认为,自由态SA的增加至少部分由结合态SA转化而来,因为无论是在高温胁迫还是低温胁迫期间,自由态SA的变化与结合态SA的变化几乎呈相反的趋势(图2、3)。

总之,不论是高温锻炼还是低温锻炼,都能

迅速诱导自由态SA的含量出现高峰,从而发挥其信号功能,诱导一系列防御反应,减轻温度胁迫对幼苗的氧化伤害,使葡萄幼苗对温度逆境的交叉适应能力得以产生。

### 参考文献

- 陈小兰,包媛,黄庆,史冬燕,陈善娜(2005).水杨酸诱导非洲菊不同基因型的抗冷性研究.西南农业学报,18(1):36~39
- 杜朝昆,李忠光,龚明(2005).水杨酸诱导的玉米幼苗适应高温和低温胁迫的能力与抗氧化酶系统的关系.植物生理学通讯,41(1):19~22
- 黄丽华,黄晓伟,麦焕铄(2005).水杨酸对玉米幼苗抗寒性的影响.作物杂志,(5):16~18
- 康国章,欧志英,王正询,孙谷畴(2003).水杨酸诱导提高香蕉幼苗耐寒性的机制研究.园艺学报,30(2):141~146
- 李兆亮,原永兵,李冬梅(1997).薄层层析和高效液相层析技术结合测定植物叶片水杨酸含量.植物生理学通讯,33(2):130~132
- 刘悦萍,黄卫东,张俊环(2005).钙-钙调素对水杨酸诱导葡萄幼苗耐热性的影响及与抗氧化的关系.园艺学报,32(3):381~386
- 马德华,庞金安,李淑菊,霍振荣(1998).温度逆境锻炼对高温下黄瓜幼苗生理的影响.园艺学报,25(4):350~355
- 孙艳,王鹏(2003).水杨酸对黄瓜幼苗抗高温胁迫能力的影响.西北植物学报,23(11):2011~2013
- 王利军,战吉成,黄卫东(2002).葡萄幼苗高温锻炼过程中与水杨酸相关的信号转导的初步研究.植物学通报,19(6):710~715
- 张俊环,张国强,刘悦萍,黄卫东(2006).温度逆境交叉适应过程中葡萄幼苗质膜Ca<sup>2+</sup>-ATPase的细胞化学定位与活性变化.中国农业科学,39(8):1617~1625
- 张玄兵,夏春华,黄碧兰,刘芳(2004).水杨酸对龙船花抗低温胁迫的影响.热带作物学报,25(3):85~88
- Clarke SM, Mur LAJ, Wood JE, Scott IM (2004). Salicylic acid dependent signaling promotes basal thermotolerance but is not essential for acquired thermotolerance in *Arabidopsis thaliana*. Plant J, 38: 432~447
- Dat JF, Foyer CH, Scott IM (1998). Changes in salicylic acid and antioxidants during induced thermotolerance in mustard seedlings. Plant Physiol, 118: 1455~1461
- Dhindsa RS, Plumb-Dhindsa P, Thorpe TA (1981). Leaf senescence: correlated with increased leaves of membrane permeability and lipid peroxidation and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. J Exp Bot, 32: 93~101
- Fu P, Wilen RW, Roertson AJ, Low NH, Tyler RT, Gusta LV (1998). Heat tolerance of cold-acclimated Puma winter rye seedlings and the effect of a heat shock on freezing tolerance.

- Plant Cell Physiol, 39: 942~949
- He YL, Liu YL, Cao WX, Huai MF, Xu BG, Huang BR (2005). Effects of salicylic acid on heat tolerance associated with antioxidant metabolism in Kentucky bluegrass. *Crop Sci*, 45 (3): 988~995
- Larkindale J, Huang B (2004). Thermotolerance and antioxidant systems in *Agrostis stolonifera*: Involvement of salicylic acid, abscisic acid, calcium, hydrogen peroxide, and ethylene. *J Plant Physiol*, 161: 405~413
- Liu HT, Liu YY, Pan QH, Yang HR, Zhan JC, Huang WD (2006). Novel interrelationship between salicylic acid, abscisic acid, and PIP2-specific phospholipase C in heat acclimation-induced the thermotolerance in pea leaves. *J Exp Bot*, 57 (12): 3337~3347
- Pan QH, Zhan JC, Liu HT, Zhang JH, Chen JY, Wen PF, Huang WD (2006). Salicylic acid synthesized by benzoic acid 2-hydroxylase participates in the development of thermotolerance in pea plants. *Plant Sci*, 171: 226~233
- Tasgin E, Atici O, Nalbantoglu B, Popova LP (2006). Effects of salicylic acid and cold treatments on protein levels and on the activities of antioxidant enzymes in the apoplast of winter wheat leaves. *Phytochemistry*, 67: 710~715
- Zhang JH, Huang WD, Liu YP, Pan QH (2005). Effect of temperature-acclimation pretreatment on ultrastructure of mesophyll cell in young grape plants under cross temperature-stresses. *J Integr Plant Biol*, 47 (8): 959~970
- Zhang JH, Liu YP, Pan QH, Zhan JC, Wang XQ, Huang WD (2006). Changes in membrane-associated H<sup>+</sup>-ATPase activities and amounts in young grape plants during the cross adaptation to temperature stresses. *Plant Sci*, 170 (4): 768~777