

苗卫东,王 萌,高换超,等. 外源褪黑素对低温胁迫下不同葡萄品种抗氧化酶活性和 AsA - GSH 循环的影响[J]. 江苏农业科学,2021,49(23):133 - 138.

doi:10. 15889/j. issn. 1002 - 1302. 2021. 23. 024

外源褪黑素对低温胁迫下不同葡萄品种抗氧化酶活性和 AsA - GSH 循环的影响

苗卫东^{1,2}, 王 萌¹, 高换超¹, 井朋伟¹, 李少东¹, 樊秀彩³

(1. 河南科技学院园艺园林学院,河南新乡 453003; 2. 河南省园艺植物资源利用与种质创新工程研究中心,河南新乡 453003;

3. 中国农业科学院郑州果树研究所,河南郑州 450009)

摘要:利用叶面喷施方法,探讨 100 $\mu\text{mol/L}$ 外施褪黑素(MEL)溶液对低温胁迫下不同葡萄品种抗氧化酶系统和抗坏血酸 - 谷胱甘肽循环(AsA - GSH 循环)的影响,以此推论 MEL 在葡萄受到低温胁迫时起到的作用。结果表明,外源 MEL 可以促进低温胁迫下葡萄抗坏血酸(AsA)和谷胱甘肽(GSH)含量的积累,降低 GSSG 含量。长时间(7 h)低温胁迫下,外源 MEL 可以降低脱氢抗坏血酸还原酶(DHAR)含量,能够维持较高的 AsA - GSH 循环系统中抗坏血酸过氧化物酶(APX)、DHAR、单脱氢抗坏血酸还原酶(MDHAR)、谷胱甘肽还原酶(GR)活性。喷施外源 MEL 促进了低温胁迫下葡萄 AsA - GSH 循环快速而有效的运转,降低了低温胁迫对葡萄植株的氧化伤害,从而缓解了低温胁迫对葡萄幼苗的伤害作用。

关键词:葡萄;低温胁迫;外源褪黑素;酶活性;抗坏血酸 - 谷胱甘肽循环;抗氧化酶

中图分类号: S663. 101 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002 - 1302(2021)23 - 0133 - 06

葡萄(*Vitis vinifera* L.)是我国及世界上的重要水果之一,但在葡萄栽培生产过程中常常遭遇低温胁迫。低温常常引起植物生理代谢紊乱,生长发育受到抑制,降低产量和品质。目前对低温胁迫的研究主要集中在膜伤害、光合、渗透调节物质、抗氧化酶活性等方面^[1]。褪黑素(melatonin,简称 MEL)是一种生物调节剂,它不仅在植物的正常生长和发育过程中扮演着必不可少的角色,而且它还可以通过提高抗氧化酶活性,降低活性氧(ROS)含量,提高植株抗性,以此缓解多种环境胁迫,如抗寒、干旱、盐渍、营养元素缺乏等^[2-3]。

近年来,MEL 介导植物对生物和非生物胁迫下的抗性研究越来越受到人们关注,已有研究表明,适宜浓度的 MEL 处理可以提高植物对低温的忍耐力,但效果却因 MEL 处理的浓度、逆境类型及植物种类而异。抗坏血酸 - 谷胱甘肽(AsA - GSH)循环系统是植物体内清除活性氧自由基的重要途径,但

关于 MEL 是否参与调节低温胁迫下葡萄体内 AsA - GSH 循环,缓解低温胁迫对葡萄植株的氧化伤害研究报道较少^[4-5]。本试验选取砧木品种 SO4 葡萄(SO4 grape)、红提葡萄(Red Globe grape)和无核白葡萄(Thompson Seedless grape)3 个葡萄品种的一年生盆栽自根苗为试验材料,研究外源 MEL 对低温胁迫下葡萄 AsA - GSH 循环的影响,为进一步研究外源 MEL 对葡萄植株抗低温胁迫能力的影响、MEL 缓解低温伤害等方面提供一定的理论依据,为葡萄防寒管理提供一定的理论依据和技术指导。

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料采集于河南科技学院葡萄种质资源圃(试验地点:35°16' 56"N,113°55' 49"E;试验时间:2021 年 3—9 月)。以 SO4 葡萄、红提葡萄、无核白葡萄 3 个葡萄品种的一年生自根苗为试验材料,采用盆栽方式,盆口直径为 30 cm、高为 25 cm。每盆装沙壤土 4.0 kg。

1.2 方法

1.2.1 材料处理 盆栽苗长势良好后进行试验处理,每个品种随机选取 10 盆,每盆种植 1 株一年生

收稿日期:2021 - 08 - 06

作者简介:苗卫东(1968—),男,河南遂平人,副教授,主要从事园艺植物栽培生理研究。E-mail:wangmeng991226@163.com。

通信作者:樊秀彩,硕士,研究员,主要从事葡萄遗传资源研究。

E-mail:fanxiucai@caas.cn。

自根苗,首先进行低温胁迫处理试验(- 15 ℃),常温温度为 25 ℃ ,24 h 后取材测定各项指标,每个处理重复 3 次;然后 09:00—10:00 时采用 100 μmol/L 外施褪黑素(MEL)溶液进行叶面喷施,MEL 溶液里添加 0.5% Tween - 20 增加表面附着。叶面喷施 3 d 后,测定各项指标。试验设计 4 个处理:(1)对照,喷施清水后进行常温处理;(2)低温,喷施清水后进行低温处理,处理 1、4、7、11、24 h;(3)MEL,常温的喷施 MEL;(4)低温 + MEL,低温处理的喷施 MEL。从每个处理的植株中上部选取叶片 3 张,所采样品生长势及管理水平一致。

1.2.2 抗氧化酶系统中抗氧化酶活性的测定 超氧化物歧化酶(SOD)活性采用 SOD 抑制氮蓝四唑(NBT)光化还原法进行测定,过氧化物酶(POD)活性采用愈创木酚法进行测定,过氧化氢酶(CAT)活性采用高锰酸钾滴定法进行测定^[6]。以上生理指标均采用北京索莱宝科技发展有限公司试剂盒进行测定,型号分别为 BC0700、PR1400、BC1340,每个指标类型重复测定 3 次。

1.2.3 AsA - GSH 循环代谢物指标的测定 还原型抗坏血酸(AsA)、氧化型抗坏血酸(dehydroascorbic acid,简称 DHA)含量的测定采用二联吡啶法^[7]。氧化型谷胱甘肽(GSSG)、还原型谷胱甘肽(GSH)含量的测定采用 Nagalakshmi 等的 DTNB 检测法^[8]。抗坏血酸过氧化物酶(APX)、脱氢抗坏血酸还原酶(DHAR)以及谷胱甘肽还原酶(GR)活性的测定参考 Nakano 等的方法^[9],单脱氢抗坏血酸还原酶(MDHAR)活性的测定参考 Krivosheeva 等的方法^[10]。以上生理指标均采用北京索莱宝科技有限公司试剂盒进行测定,型号分别

为 BC1170、BC1160、BC0195、BC0650、BC1230、BC1180,每个指标类型重复测定 3 次。

1.3 数据处理

采用 SPSS 22.0 软件进行数据处理。

2 结果与分析

2.1 褪黑素对低温胁迫下不同葡萄品种抗氧化酶活性的影响

2.1.1 低温胁迫下不同葡萄品种抗氧化酶活性的变化 由表 1 可知,低温胁迫处理后,3 个葡萄品种的 SOD 和 CAT 依然保持较高的酶活性,这可能是 SOD 和 CAT 保护酶活性的耐寒机制已形成,当处理 7 h 时,酶活性达到最高,与常温相比差异极显著($P < 0.01$),这是低温的一种适应性反应,使其比在常温下能更有效地清除体内的有毒物质,保护葡萄植株免受伤害或减少伤害。当低温胁迫 7 h 时,砧木 SO4 葡萄的 SOD 和 CAT 活性最高,分别达到 $(5.83 \pm 0.002\ 65)$ U/g 鲜质量(FW)和 $(65.20 \pm 0.072\ 1)$ U/g 鲜质量。但到 7 h 后,3 个葡萄品种的 SOD 和 CAT 活性均开始随着处理时间的增加呈下降趋势,说明随着低温处理时间的延长,葡萄植株有受冻害的可能,因此在葡萄栽植管理过程中,遇到低温胁迫时,葡萄品种、温度和时间都是必须要考虑的因素。随着低温胁迫时间的增加,3 个葡萄品种的 POD 活性均呈逐渐下降的趋势,低温处理 24 h,SO4 葡萄的 POD 活性降低到 $(70.00 \pm 1.100\ 0)$ U/g FW,红提葡萄的 POD 活性为 $(46.67 \pm 0.115\ 3)$ U/g FW,无核白葡萄的 POD 活性仅为 $(41.67 \pm 0.085\ 4)$ U/g FW。说明随着低温胁迫时间的延长,抗氧化酶的活性受到破坏,葡萄植株受到低温伤害。

表 1 低温处理下不同葡萄品种抗氧化酶活性的变化($\bar{x} \pm s$)							U/g
品种	指标	常温	低温处理时间				
			1 h	4 h	7 h	11 h	24 h
SO4 葡萄	SOD 活性	1.70 ± 0.069 3eE	2.17 ± 0.055 7cdCD	3.07 ± 0.036 1Bb	5.83 ± 0.026 5aA	2.42 ± 0.040 0cC	1.37 ± 0.020 0fF
	POD 活性	110.00 ± 2.645 8aA	105.00 ± 2.685 1bB	100.02 ± 0.017 3bcBC	97.33 ± 0.075 5dD	95.00 ± 0.672 7eE	70.00 ± 1.100 0fF
	CAT 活性	48.31 ± 0.036 1fF	50.16 ± 0.091 7eE	52.20 ± 0.036 1deDE	65.20 ± 0.072 1aA	61.87 ± 0.061 1bB	56.20 ± 0.264 6cC
红提葡萄	SOD 活性	1.57 ± 0.026 5eF	2.62 ± 0.026 5cC	3.25 ± 0.020 0bB	5.27 ± 0.020 0aA	2.22 ± 0.026 5edCD	0.93 ± 0.020 0fF
	POD 活性	90.00 ± 1.732 1aA	86.00 ± 1.053 6bB	77.00 ± 1.732 1cC	65.00 ± 0.888 8dD	55.00 ± 1.276 7eE	46.67 ± 0.115 3fF
	CAT 活性	27.00 ± 0.435 9fF	30.13 ± 0.036 1eE	37.27 ± 0.065 6dD	55.25 ± 0.043 6aA	44.50 ± 0.360 6bB	41.56 ± 0.045 8cC
无核白葡萄	SOD 活性	1.53 ± 0.036 1eE	1.84 ± 0.017 3dD	2.56 ± 0.043 6bB	4.14 ± 0.026 5aA	2.16 ± 0.026 5cC	0.62 ± 0.036 1fF
	POD 活性	80.13 ± 0.121 2aA	73.69 ± 0.075 5bB	63.11 ± 0.078 1cC	59.33 ± 0.045 8dD	49.99 ± 0.045 8eE	41.67 ± 0.085 4fF
	CAT 活性	22.77 ± 0.026 5eEF	34.38 ± 0.026 5dD	43.75 ± 0.034 6bB	55.13 ± 0.043 6aA	39.13 ± 0.026 5cC	23.13 ± 0.020 0eE

注:同行数据后不同大、小写字母表示在 0.01、0.05 水平上差异显著。下表同。

2.1.2 褪黑素对低温胁迫下不同葡萄品种抗氧化酶活性的影响 由表 2 可知,在 1~24 h 低温胁迫时间内,喷施外源 MEL,3 个葡萄品种 SOD 和 CAT 活性均呈现先升高后降低的趋势,在 7 h 时酶活性达到最高,与常温相比差异极显著 ($P < 0.05$);POD 活性呈现逐渐下降的趋势。在低温胁迫的整个过程中,喷施外源 MEL 显著提高了 SOD 和 CAT 活性。

表 2 褪黑素对低温胁迫下不同葡萄品种抗氧化酶活性的影响 ($\bar{x} \pm s$)

U/g

品种	指标	常温	低温处理时间				
			1 h	4 h	7 h	11 h	24 h
SO4 葡萄	SOD 活性	3.33 ± 0.026 5eE	3.67 ± 0.062 5cdCD	4.57 ± 0.020 0bB	6.65 ± 0.045 8aA	3.93 ± 0.036 1cC	2.67 ± 0.036 1fF
	POD 活性	130.33 ± 0.036 1aA	125.11 ± 0.070 0Bb	110.33 ± 0.043 6cC	101.33 ± 0.070 0dD	98.99 ± 0.045 8deDE	82.50 ± 0.264 6fF
	CAT 活性	52.00 ± 0.173 2fF	56.33 ± 0.020 0eE	62.69 ± 0.096 4cC	75.33 ± 0.020 0aA	70.67 ± 0.045 8bB	60.29 ± 0.087 2dD
红提葡萄	SOD 活性	1.99 ± 0.055 7eE	2.33 ± 0.034 6dD	4.88 ± 0.036 1bB	6.63 ± 0.026 5aA	3.33 ± 0.010 0cC	0.99 ± 0.036 1fF
	POD 活性	123.67 ± 0.043 6aA	110.53 ± 0.055 7bB	103.73 ± 0.020 0cC	100.13 ± 0.026 5dD	93.33 ± 0.052 0eE	80.11 ± 0.088 9fF
	CAT 活性	30.33 ± 0.062 4eE	39.99 ± 0.091 7dD	50.67 ± 0.045 8bB	65.67 ± 0.078 1aA	45.33 ± 0.020 0cC	30.67 ± 0.045 8eE
无核白葡萄	SOD 活性	1.67 ± 0.045 8eE	3.33 ± 0.026 5dD	4.00 ± 0.026 5bB	5.73 ± 0.026 5aA	3.67 ± 0.043 6cC	1.33 ± 0.017 3fF
	POD 活性	91.11 ± 0.052 9aA	80.33 ± 0.087 2bB	69.89 ± 0.105 8cC	61.11 ± 0.070 0dD	53.33 ± 0.072 1eE	47.67 ± 0.045 8fF
	CAT 活性	27.00 ± 0.108 2fF	36.13 ± 0.030 0eE	42.27 ± 0.050 0dD	64.33 ± 0.030 0aA	54.67 ± 0.043 6bB	45.99 ± 0.055 7cC

2.2 褪黑素对低温胁迫下不同葡萄品种 AsA - GSH 循环途径的影响

2.2.1 低温胁迫下不同葡萄品种 AsA - GSH 循环中酶活性和代谢物的变化 在抗坏血酸代谢中,APX 以 AsA 作为电子供体,催化 AsA 与 H_2O_2 反应,达到分解 H_2O_2 的目的;MDHAR 以还原型辅酶 II (NADPH) 作为电子供体,将单脱氢抗坏血酸 (MDHA) 还原为 AsA;脱氢抗坏血酸还原酶 (DHAR) 在碱性条件下催化 GSH 使脱氢抗坏血酸还原酶 (DHA) 还原为 AsA;谷胱甘肽还原酶 (GR) 是一种黄素蛋白氧化还原酶,能催化 GSSG 还原为 GSH,从而使细胞内的谷胱甘肽库保持在还原状态。

由表 3 可知,低温胁迫过程中,随着处理时间的延长,3 个葡萄品种 APX、GR、DHAR 和 MDHAR 活性呈现先升高后降低的趋势,而且低温 7 h 时极显著高于常温水平。低温处理 7 h 时,SO4 葡萄中 GR、DHAR 和 MDHAR 活性分别达到 ($6.27 \pm 0.010 0$) $\mu\text{mol/g}$ 、($10.86 \pm 0.020 0$) $\mu\text{mol/g}$ 和 ($6.27 \pm 0.026 3$) $\mu\text{mol/g}$,而 APX 活性在红提葡萄中达到 ($18.48 \pm 0.050 0$) U/g FW,是 3 个葡萄品种中 APX 活性最高的。值得注意的是,SO4 葡萄中 MDHAR 活性在低温处理 4 h 时达到峰值,这比红提葡萄和无核白葡萄中 MDHAR 活性峰值提早 3 h。结果表明,3 个葡萄品种在抵抗低温胁迫过程中

喷施外源 MEL 降低了低温胁迫下的 POD 活性,说明喷施外源 MEL 在低温胁迫下可以提高葡萄 SOD 和 CAT 活性,抑制 POD 活性,说明喷施外源 MEL 可以增加葡萄植株体内抗氧化酶活性,间接增加了抗氧化物质的含量,能有效地清除体内的自由基,提高葡萄植株抵抗低温胁迫的能力。

AsA - GSH 循环中各种酶活性明显增加,且 SO4 葡萄的增加幅度更大。但超过 7 h 低温胁迫后,3 个不同葡萄品种 APX、GR、DHAR 和 MDHAR 活性开始出现下降,说明低温胁迫一定时间内,葡萄自身会启动体内 AsA - GSH 循环系统中的酶活性,提高防御能力,但是随着低温胁迫时间的延长,这种能力会下降,AsA - GSH 循环系统中 APX、GR、DHAR 和 MDHAR 活性下降。

低温胁迫期间 3 个葡萄品种的 AsA 和 GSH 含量及 GSH/GSSG 比值的变化与酶活性变化一致,均表现为先上升后下降的趋势,而氧化型谷胱甘肽含量则为逐渐下降趋势,低温处理 24 h 后,SO4 葡萄、红提葡萄和无核白葡萄分别降低到 ($4.03 \pm 0.034 6$) mmol/g FW、($2.21 \pm 0.030 0$) mmol/g FW 和 ($2.05 \pm 0.020 0$) mmol/g FW。3 个葡萄品种的 AsA 和 GSH 含量在低温胁迫 7 h 时达到最大值,与对照相比差异极显著。3 个葡萄品种中 SO4 葡萄的 AsA 含量、GSH 含量以及 GSH/GSSG 值最高,分别达到 ($3.13 \pm 0.034 6$) mmol/g FW、($4.27 \pm 0.052 9$) mmol/g FW 和 57.74%;其次为红提葡萄,该品种的 AsA 含量、GSH 含量以及 GSH/GSSG 值分别为 (2.89 ± 0.0557) mmol/g FW、($1.21 \pm 0.036 1$) mmol/g FW 和 45.66%;无核白葡萄的 AsA 含量、GSH 含量以及 GSH/GSSG 值最低,依此

为 (1.55 ± 0.0346) mmol/g FW、(1.01 ± 0.0361) mmol/g FW 和 39.15%。说明低温胁迫期 7 h 之前,3 个葡萄品种中的 AsA 含量和 GSH 含量增加,GSSG 含量降低,促使 AsA 最大程度地保持在还原状态,有利于增强葡萄幼苗抵抗低温胁迫的能

力,而随着低温胁迫时间的延长,AsA – GSH 循环系统中 APX、GR、DHAR 和 MDHAR 活性降低,GSH 含量和 GSSG 含量降低,促使 AsA 含量下降,葡萄会受到低温伤害。

表 3 低温胁迫下不同葡萄品种 AsA – GSH 循环中酶活性和代谢物的变化($\bar{x} \pm s$)

品种	指标	常温	低温处理时间				
			1 h	4 h	7 h	11 h	24 h
SO4 葡萄	APX 活性($\mu\text{mol/g}$)	7.07 ± 0.036 1fF	9.30 ± 0.264 6dD	16.74 ± 0.095 4aA	17.46 ± 0.036 1bB	11.90 ± 0.036 1cC	7.81 ± 0.030 6eE
	GR 活性($\mu\text{mol/g}$)	2.47 ± 0.045 8dD	3.90 ± 0.500 0eC	5.91 ± 0.060 8bB	6.27 ± 0.010 0aA	1.75 ± 0.036 1eE	1.66 ± 0.026 5fF
	DHAR 活性($\mu\text{mol/g}$)	2.48 ± 0.032 1fF	4.33 ± 0.030 0eC	4.86 ± 0.017 3bB	10.86 ± 0.020 0aA	4.00 ± 0.264 6dD	3.21 ± 0.010 0eE
	MDHAR 活性($\mu\text{mol/g}$)	1.62 ± 0.020 0fF	2.89 ± 0.020 0dD	7.32 ± 0.043 6aA	6.27 ± 0.026 5bB	4.70 ± 0.043 6cC	2.01 ± 0.034 6eE
	抗坏血酸含量(mmol/g,FW)	1.72 ± 0.010 0dD	2.11 ± 0.036 1eC	2.96 ± 0.030 0bB	3.13 ± 0.034 6aA	1.13 ± 0.020 0eE	1.05 ± 0.020 0fF
	谷胱甘肽含量(mmol/g,FW)	1.54 ± 0.020 0e	2.01 ± 0.079 4d	2.71 ± 0.062 4b	4.27 ± 0.052 9aA	2.13 ± 0.036 1c	1.01 ± 0.072 1f
	氧化型谷胱甘肽含量(mmol/g,FW)	9.23 ± 0.045 8aA	8.96 ± 0.043 6bB	8.11 ± 0.045 8cC	7.66 ± 0.036 1dD	5.92 ± 0.062 4eE	4.03 ± 0.034 6fF
	还原型/氧化型谷胱甘肽(%)	16.68 ± 0.034 6fF	22.43 ± 0.026 5eE	33.42 ± 0.034 6cC	57.74 ± 0.030 0aA	35.98 ± 0.036 1bB	25.06 ± 0.026 5dD
红提葡萄	APX 活性($\mu\text{mol/g}$)	8.03 ± 0.010 0eE	9.25 ± 0.055 7dD	15.76 ± 0.055 7bB	18.48 ± 0.050 0aA	14.44 ± 0.043 6cC	6.56 ± 0.026 5fF
	GR 活性($\mu\text{mol/g}$)	1.58 ± 0.070 0fF	3.02 ± 0.020 0eC	3.96 ± 0.036 1bB	5.34 ± 0.040 0aA	2.72 ± 0.026 5dD	1.68 ± 0.043 6eE
	DHAR 活性($\mu\text{mol/g}$)	1.48 ± 0.017 3eE	2.64 ± 0.034 6dD	5.61 ± 0.020 0bB	10.52 ± 0.026 5aA	3.27 ± 0.010 0eC	1.24 ± 0.017 3fF
	MDHAR 活性($\mu\text{mol/g}$)	1.67 ± 0.045 8eE	2.67 ± 0.034 6cC	3.15 ± 0.026 5bB	5.33 ± 0.026 5aA	2.67 ± 0.017 3cC	2.00 ± 0.036 1dD
	抗坏血酸含量(mmol/g,FW)	1.89 ± 0.030 0dD	2.09 ± 0.079 4cC	2.23 ± 0.026 5bB	2.89 ± 0.055 7aA	1.05 ± 0.026 5eE	0.56 ± 0.026 5fF
	谷胱甘肽含量(mmol/g,FW)	0.75 ± 0.036 1deDE	0.99 ± 0.096 4cC	1.03 ± 0.020 0bB	1.21 ± 0.036 1aA	0.77 ± 0.020 0dD	0.43 ± 0.036 1fF
	氧化型谷胱甘肽含量(mmol/g,FW)	5.63 ± 0.017 3aA	5.41 ± 0.070 0bB	3.89 ± 0.020 0cC	2.65 ± 0.026 5dD	2.33 ± 0.026 5eE	2.21 ± 0.030 0fF
	还原型/氧化型谷胱甘肽(%)	13.32 ± 0.026 5fF	18.30 ± 0.036 1eE	26.48 ± 0.034 6cC	45.66 ± 0.026 5aA	33.05 ± 0.036 1bB	19.63 ± 0.026 5dD
无核白葡萄	APX 活性($\mu\text{mol/g}$)	7.07 ± 0.026 5eE	8.93 ± 0.026 5dD	14.88 ± 0.062 4bB	17.50 ± 0.075 5aA	14.61 ± 0.060 8bcBC	5.82 ± 0.036 1fF
	GR 活性($\mu\text{mol/g}$)	1.47 ± 0.036 1eE	2.33 ± 0.036 1cC	2.69 ± 0.026 5bB	3.67 ± 0.026 5aA	2.00 ± 0.030 0dD	1.33 ± 0.020 0fF
	DHAR 活性($\mu\text{mol/g}$)	0.99 ± 0.081 9fF	1.56 ± 0.026 5dD	3.57 ± 0.020 0bB	6.48 ± 0.026 5aA	3.22 ± 0.020 0cC	1.09 ± 0.020 0eE
	MDHAR 活性($\mu\text{mol/g}$)	1.11 ± 0.036 1eE	1.68 ± 0.043 6dD	2.72 ± 0.036 1bB	4.46 ± 0.026 5aA	1.57 ± 0.020 0cC	0.89 ± 0.026 5fF
	抗坏血酸含量(mmol/g,FW)	0.49 ± 0.026 5eE	0.93 ± 0.087 2dD	1.02 ± 0.052 9cC	1.55 ± 0.034 6aA	1.25 ± 0.017 3bB	0.36 ± 0.026 5fF
	谷胱甘肽含量(mmol/g,FW)	0.52 ± 0.017 3eE	0.79 ± 0.079 4cC	0.88 ± 0.036 1bB	1.01 ± 0.036 1aA	0.65 ± 0.020 0dD	0.38 ± 0.026 5fF
	氧化型谷胱甘肽含量(mmol/g,FW)	5.18 ± 0.026 5aA	5.07 ± 0.020 0bB	3.77 ± 0.020 0cC	2.58 ± 0.052 9dD	2.44 ± 0.020 0eE	2.05 ± 0.020 0fF
	还原型/氧化型谷胱甘肽(%)	10.04 ± 0.026 5fF	15.58 ± 0.036 1eE	23.34 ± 0.026 5bcBC	39.15 ± 0.036 1aA	25.33 ± 0.034 6bB	18.54 ± 0.030 0dD

2.2.2 褪黑素对低温胁迫下不同葡萄品种 AsA – GSH 循环途径的影响 GR、DHAR、MDHAR 对维持 AsA – GSH 循环的有效运行具有重要的作用。由表 4 可知,低温胁迫下喷施外源 MEL,APX、GR、DHAR 和 MDHAR 活性在 7 h 前逐渐增加,随后快速下降。低温胁迫 1 ~ 11 h 时喷施外源 MEL,APX、GR、DHAR、MDHAR 活性显著高于常温。喷施外源 MEL 在低温胁迫 7 h 时,SO4 葡萄中 DHAR 和 MDHAR 活性均高于红提葡萄和无核白葡萄,分别达到 (12.11 ± 0.0400)、(8.50 ± 0.0436) $\mu\text{mol/g}$;而 APX 和 GR 活性在红提葡萄中最高,分别达到 (29.33 ± 0.0458) U/g FW 和 (8.93 ± 0.0265) $\mu\text{mol/g}$ 。说明施用外源 MEL 能保持相对较高的 APX、MDHAR、

DHAR 和 GR 活性,增强植株对 H₂O₂ 等活性氧的清除能力。

GSH 不仅是一种抗氧化物质,而且是脱氢抗坏血酸还原酶(DHA)的电子供体,能清除生物体内的自由基从而解除毒害,它通过 AsA – GSH 循环可加快 AsA 再生^[1]。在低温胁迫时喷施外源 MEL 处理期间,3 个葡萄品种中 AsA 含量、GSH 含量、GSSG 含量和 GSH/GSSG 值的变化均表现为先上升后下降的趋势。低温胁迫中喷施外源 MEL 增加了 AsA、GSH、GSSG 含量,其中低温胁迫 7 h 时施加外源 MEL,AsA、GSH、GSSG 含量和 GSH/GSSG 值达到最大,与对照相比,效果差异极显著($P < 0.01$)。3 个葡萄品种中 SO4 葡萄的 AsA、GSH、GSSG 含量及

GSH/GSSG 值最高,分别达到(4.67 ± 0.062 4)、(5.67 ± 0.026 5)、(9.16 ± 0.045 8) mmol/g FW 和 61.90%;其次为红提葡萄,该品种 AsA、GSH、GSSG 含量以及 GSH/GSSG 值分别为(3.99 ± 0.020 0)、(2.33 ± 0.036 1)、(4.67 ± 0.045 8) mmol/g FW 和 49.89%;而无核白葡萄的 AsA、GSH、GSSG 含量以及 GSH/GSSG 值是 3 个品种中最低的,仅为(3.00 ±

0.026 5)、(1.79 ± 0.026 5)、(4.33 ± 0.010 0) mmol/g FW 和 41.34%。可见,低温胁迫下喷施适量 MEL 可显著提高 GSH 含量,降低 GSSH 含量,导致 GSH/GSSG 的比值明显提高。说明喷施外源褪黑素可通过提高 AsA – GSH 循环系统的代谢活动,减轻活性氧对葡萄幼苗的伤害,从而提高葡萄抵抗低温胁迫的能力。

表 4 褪黑素对低温胁迫下不同葡萄品种 AsA – GSH 循环途径的影响($\bar{x} \pm s$)

品种	指标	常温	低温处理时间				
			1 h	4 h	7 h	11 h	24 h
S04 葡萄	APX 活性(μmol/L)	8.67 ± 0.062 4f	10.88 ± 0.026 5dD	17.33 ± 0.020 0bB	18.67 ± 0.017 3aA	13.33 ± 0.026 5cC	9.89 ± 0.075 5eE
	GR 活性(μmol/L)	3.99 ± 0.075 5dD	5.33 ± 0.017 3cC	6.43 ± 0.030 0bB	7.33 ± 0.045 8aA	3.25 ± 0.020 0deDE	2.67 ± 0.050 0fF
	DHAR 活性(μmol/L)	4.12 ± 0.025 2eE	5.99 ± 0.036 1bcBC	6.22 ± 0.045 8bB	12.11 ± 0.040 0aA	4.77 ± 0.052 9dD	3.67 ± 0.040 0fF
	MDHAR 活性(μmol/L)	2.67 ± 0.040 0eE	4.33 ± 0.069 3dD	5.58 ± 0.052 0cC	8.50 ± 0.043 6aA	7.33 ± 0.055 7bB	2.33 ± 0.030 0efEF
	抗坏血酸含量(mmol/g,FW)	2.50 ± 0.030 0dD	3.00 ± 0.017 3bcBC	3.99 ± 0.017 3bB	4.67 ± 0.062 4aA	2.33 ± 0.043 6eE	1.67 ± 0.040 0fF
	谷胱甘肽含量(mmol/g,FW)	2.67 ± 0.026 5eE	3.50 ± 0.055 7cC	4.33 ± 0.020 bB	5.67 ± 0.026 5aA	3.33 ± 0.026 5cdCD	1.67 ± 0.050 0fF
	氧化型谷胱甘肽含量(mmol/g,FW)	11.33 ± 0.030 0aA	10.33 ± 0.026 5bB	8.67 ± 0.095 dD	9.16 ± 0.045 8cC	7.33 ± 0.036 1eE	6.00 ± 0.020 0fF
	还原型/氧化型谷胱甘肽(%)	23.57 ± 0.034 6efEF	33.88 ± 0.043 6dD	49.94 ± 0.026 5bB	61.90 ± 0.052 9aA	45.43 ± 0.026 5cC	27.83 ± 0.045 8eE
红提葡萄	APX 活性(μmol/L)	10.11 ± 0.036 1dD	12.33 ± 0.055 7cC	15.76 ± 0.026 5bB	29.33 ± 0.045 8aA	15.67 ± 0.043 6bB	9.96 ± 0.026 5eE
	GR 活性(μmol/L)	3.00 ± 0.045 8eE	4.55 ± 0.017 3cC	5.67 ± 0.020 0bB	8.93 ± 0.026 5aA	4.33 ± 0.095 4cdCD	2.00 ± 0.043 6fF
	DHAR 活性(μmol/L)	1.39 ± 0.060 8fF	3.00 ± 0.026 5dD	3.57 ± 0.010 0cC	7.67 ± 0.017 3aA	4.72 ± 0.055 7bB	2.67 ± 0.045 8eE
	MDHAR 活性(μmol/L)	2.60 ± 0.017 3deDE	3.11 ± 0.020 0cC	4.22 ± 0.036 1bB	6.2633 ± 0.577 7aA	2.99 ± 0.075 5dD	1.33 ± 0.034 6fF
	抗坏血酸含量(mmol/g,FW)	2.00 ± 0.017 3deDE	2.33 ± 0.026 5dD	3.00 ± 0.026 5bB	3.99 ± 0.020 0aA	2.50 ± 0.045 8cC	1.03 ± 0.010 0fF
	谷胱甘肽含量(mmol/g,FW)	1.20 ± 0.036 1eE	1.45 ± 0.036 1cC	1.99 ± 0.010 0bB	2.33 ± 0.036 1aA	1.50 ± 0.020 0dD	0.99 ± 0.020 0fF
	氧化型谷胱甘肽含量(mmol/g,FW)	7.33 ± 0.026 5aA	6.50 ± 0.036 1bB	5.33 ± 0.010 0cC	4.67 ± 0.045 8dD	3.67 ± 0.078 1eE	3.11 ± 0.045 8fF
	还原型/氧化型谷胱甘肽(%)	16.37 ± 0.026 5fF	22.91 ± 0.052 9eE	37.34 ± 0.030 0cC	49.89 ± 0.034 6aA	40.87 ± 0.043 6bB	31.83 ± 0.040 0dD
无核白葡萄	APX 活性(μmol/L)	7.99 ± 0.010 0eE	9.67 ± 0.020 0dD	16.99 ± 0.026 5cC	22.33 ± 0.034 6aA	19.00 ± 0.036 1bB	7.67 ± 0.026 5efEF
	GR 活性(μmol/L)	2.67 ± 0.036 1eE	3.99 ± 0.010 0cC	4.33 ± 0.045 8bB	5.67 ± 0.055 7aA	3.50 ± 0.060 8dD	1.67 ± 0.040 0fF
	DHAR 活性(μmol/L)	1.39 ± 0.060 8fF	3.00 ± 0.026 5cdCD	3.57 ± 0.010 0cC	7.67 ± 0.017 3aA	4.72 ± 0.055 7bB	2.67 ± 0.045 8eE
	MDHAR 活性(μmol/L)	2.60 ± 0.017 deDE	3.11 ± 0.020 0cC	4.22 ± 0.036 1bB	6.2633 ± 0.577 7aA	2.99 ± 0.075 5dD	1.33 ± 0.034 6fF
	抗坏血酸含量(mmol/g,FW)	1.33 ± 0.026 5eE	2.00 ± 0.020 0cC	2.50 ± 0.017 3bB	3.00 ± 0.026 5aA	1.67 ± 0.026 5dD	0.89 ± 0.010 0fF
	谷胱甘肽含量(mmol/g,FW)	0.85 ± 0.036 1eE	1.11 ± 0.036 1cC	1.50 ± 0.040 0bB	1.79 ± 0.026 5aA	0.98 ± 0.017 3dD	0.55 ± 0.026 5fF
	氧化型谷胱甘肽含量(mmol/g,FW)	6.00 ± 0.030 0aA	5.33 ± 0.043 6bB	4.98 ± 0.010 0cC	4.33 ± 0.010 0dD	3.00 ± 0.017 3eE	2.67 ± 0.026 5fF
	还原型/氧化型谷胱甘肽(%)	14.17 ± 0.026 5fF	20.83 ± 0.052 9dD	30.12 ± 0.036 1cC	41.34 ± 0.036 1A	32.67 ± 0.045 8bB	20.60 ± 0.052 9deDE

3 讨论与结论

低温胁迫会影响植物的光合作用和能量的产生,导致物质合成受阻,细胞内活性氧积累,代谢失衡从而引发膜脂过氧化、电解质失衡、细胞代谢紊乱等^[2,11],严重时会导致植物死亡。面对胁迫植物可以调动自身的抗氧化防御机制,产生 SOD、CAT、POD、APX、GR、DHAR、MDHAR 等抗氧化酶以及 AsA、GSH 等抗氧化剂^[7-10],通过直接或间接途径还原积累的活性氧^[9],从而减少低温对植物造成的伤害。

本试验主要探究低温胁迫下外源施用 MEL 对不同葡萄品种常规抗氧化酶及 AsA – GSH 循环代谢系统的影响,结果发现低温处理的 3 种葡萄, SOD、CAT、POD 活性随处理时间的延长均呈现先升后降的趋势,这与郑春芳等的研究结果^[5]一致。这可能是由于在胁迫初期,低温作为信号,启动了植物的应激反应,而在胁迫后期低温降低了抗氧化酶活性,大量积累的活性氧诱导丙二醛(MDA)等有毒代谢物质大量产生,进而抑制了保护酶的活性。喷施外源 MEL 的葡萄,遭受低温胁迫后 SOD、CAT、POD 活性与未喷施 MEL 的处理相比也呈现相同的

趋势,但是酶活性均高于低温处理植株,这也在其他研究^[12-15]中被证明,说明施用外源 MEL 可以提高 SOD、POD、CAT 这些常规抗氧化酶的活性,通过减少细胞膜脂过氧化,保持细胞膜完整性进而有效降低低温对葡萄植株造成的伤害。

AsA 和 GSH 可以维持蛋白质的稳定性,生物膜系统结构的完整性及防御膜脂过氧化,与 APX、DHAR、MDHAR、GR 共同构成了能有效清除自由基的循环系统,即 AsA - GSH 循环,在抗氧化机制中发挥重要作用,在 AsA - GSH 循环中 AsA 借助 APX 的催化作用与 H_2O_2 反应,接受来自 GSH 的 NADPH,把 H_2O_2 还原成 H_2O ,同时自身被氧化形成 MDHA,一部分的 MDHA 则在 MDHAR 的作用下被还原为 AsA,重新参与 AsA - GSH 循环,而另一部分的 MDHA 通过再次氧化形成 DHA,DHA 又以 GSH 为底物在 DHAR 催化作用下重新生成 AsA,而此反应所产生的 GSSG 在 NADPH 参与下又被 GR 催化还原成 GSH^[16-21]。在本试验中,低温胁迫初期,AsA - GSH 系统中的抗氧化酶活性及非酶抗氧化剂含量呈上升趋势,胁迫后期整体又呈下降的趋势,呈现这种趋势的原因推测与 SOD、CAT、POD 活性变化规律相同。而施用 100 $\mu\text{mol/L}$ 外源 MEL,APX、DHAR、MDHAR、GR 活性和 AsA、GSH 含量提高,GSH/GSSG 比值提升,说明施用外源 MEL 提高了 AsA 和 GSH 含量,为 AsA - GSH 循环系统提供了充足底物,加速了活性氧清除效率,减轻了活性氧对膜脂的伤害,保持了细胞完整性,从而缓解了低温对葡萄的伤害,为葡萄防寒管理提供一定的理论依据和技术指导。

参考文献:

- [1] 曲凌慧,车永梅,侯丽霞,等. 低温胁迫对葡萄品种梅鹿辄和贝达活性氧代谢的影响[J]. 青岛农业大学学报(自然科学版),2010,27(2):117-121,125.
- [2] 卞凤娥,唐翠花,邢浩,等. 外源褪黑素对于旱胁迫下葡萄内源褪黑素及叶绿素荧光特性的影响[J]. 植物生理学报,2018,54(10):1615-1623.
- [3] Zetterstrom R C, Eijkman C, Sir Hopkins F G. The dawn of vitamins and other essential nutritional growth factors[J]. Acta Padiatrica, 2006,95(11):1331-1333.
- [4] 尹永强,胡建斌,邓明军. 植物叶片抗氧化系统及其对逆境胁迫的响应研究进展[J]. 中国农学通报,2007,23(1):105-110.
- [5] 郑春芳,刘伟成,魏龙,等. 外施褪黑素对低温胁迫下红树植物秋茄光合作和抗坏血酸-谷胱甘肽循环的调控[J]. 植物生

理学报,2019,55(8):1211-1221.

- [6] 李小方,张志良. 植物生理学实验指导[M]. 5 版. 北京:高等教育出版社,2016:292.
- [7] Jiang M Y, Zhang J H. Effect of abscisic acid on active oxygen species, antioxidative defence system and oxidative damage in leaves of maize seedlings[J]. Plant and Cell Physiology, 2001, 42(11): 1265-1273.
- [8] Nagalakshmi N, Prasad M N V. Responses of glutathione cycle enzymes and glutathione metabolism to copper stress in *Scenedesmus bijugatus*[J]. Plant Science, 2001, 160(2):291-299.
- [9] Nakano Y, Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts[J]. Plant and Cell Physiology, 1981, 22(5):867-880.
- [10] Krivosheeva A, Tao D L, Ottander C, et al. Cold acclimation and photoinhibition of photosynthesis in Scots pine[J]. Planta, 1996, 200(3):296-305.
- [11] 黄娟,刘纪疆,高明华,等. 近 30 年伊宁县气候变化规律及其对冰葡萄种植可行性的影响[J]. 江苏农业科学, 2021, 49(15):136-142.
- [12] 王芳,王淇,赵曦阳. 低温胁迫下植物的表型及生理响应机制研究进展[J]. 分子植物育种, 2019, 17(15):5144-5153.
- [13] 郁万文,曹福亮,汪贵斌. 低温胁迫下银杏活性氧代谢与膜伤害的关系[J]. 东北林业大学学报, 2010, 38(7):46-48.
- [14] 丁红映,王明,谢洁,等. 植物低温胁迫响应及研究方法进展[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(14):31-36.
- [15] 雷雪峰,马爱生,李海翠,等. 8 种禾本科牧草低温胁迫的生理响应及抗寒性比较[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(9):218-222.
- [16] Tan D X, Manchester L C, Reiter R J, et al. Significance of melatonin in antioxidative defense system: reactions and products[J]. Neurosignals, 2000, 9(3/4):137-159.
- [17] Potters G, Horemans N, Bellone S, et al. Dehydroascorbate influences the plant cell cycle through a glutathione-independent reduction mechanism[J]. Plant Physiology, 2004, 134(4):1479-1487.
- [18] 吴锦程,梁杰,陈建琴,等. GSH 对低温胁迫下枇杷果实叶绿体 AsA - GSH 循环代谢的影响[J]. 林业科学, 2009, 45(11):15-19.
- [19] Wu X X, He J E, Ding H D, et al. Modulation of zinc-induced oxidative damage in *Solanum melongena* by 6-benzylaminopurine involves ascorbate-glutathione cycle metabolism[J]. Environmental and Experimental Botany, 2015, 116:1-11.
- [20] 韩敏,曹逼力,刘树森,等. 低温胁迫下番茄幼苗根穗互作对其抗坏血酸-谷胱甘肽循环的影响[J]. 园艺学报, 2019, 46(1):65-73.
- [21] Nahar K, Hasanuzzaman M, Alam M M, et al. Exogenous spermidine alleviates low temperature injury in mung bean (*Vigna radiata* L.) seedlings by modulating ascorbate-glutathione and glyoxalase pathway[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2015, 16(12):30117-30132.