

24-表油菜素内酯预处理对干旱胁迫下葡萄幼苗 抗氧化系统和渗透调节物质的影响

王雨婷¹, 王智真¹, 赵 婷¹, 惠竹梅^{1,2*}

(1 西北农林科技大学 葡萄酒学院, 陕西杨陵 712100; 2 陕西葡萄与葡萄酒工程中心, 陕西杨陵 712100)

摘 要:以酿酒葡萄‘雷司令’(Riesling)一年生营养袋扦插苗为材料,采用人工气候室水培试验,考察在聚乙二醇6000(PEG)模拟干旱条件下,不同浓度(0.05、0.10和0.20 mg/L)24-表油菜素内酯(EBR)预处理对‘雷司令’幼苗活性氧、抗氧化物质、渗透调节物质含量和抗氧化酶活性的影响,以揭示 EBR 预处理对干旱胁迫下葡萄幼苗的抗旱机理。结果显示:(1)与正常生长(对照)相比,干旱胁迫显著提高葡萄幼苗叶片中超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)、过氧化氢(H_2O_2)和丙二醛(MDA)含量;与干旱胁迫处理(PEG)相比,不同浓度 EBR 预处理均可降低叶片中 $O_2^{\cdot-}$ 、 H_2O_2 和 MDA 的含量。(2)与对照相比,PEG 处理显著降低葡萄幼苗叶片的抗坏血酸(AsA)和还原型谷胱甘肽(GSH)含量;与 PEG 处理相比,各浓度 EBR 预处理均可显著提高葡萄叶片 AsA 与 GSH 的含量,且以 0.10 mg/L EBR 处理效果最好。(3)随着干旱胁迫时间的延长,葡萄幼苗叶片中的超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)与抗坏血酸过氧化物酶(APX)活性均呈先上升后下降的变化趋势,而在正常生长条件下酶活性基本保持不变;EBR 预处理的葡萄叶片 SOD、CAT、POD 和 APX 活性均始终高于同期 PEG 处理。(4)PEG 处理条件下,渗透调节物质脯氨酸和可溶性蛋白的含量整体高于对照;与 PEG 处理相比,不同浓度 EBR 预处理在干旱胁迫中后期均能显著提高葡萄叶片中脯氨酸和可溶性蛋白含量。研究表明,在干旱胁迫下,外源 EBR 预处理能够提高葡萄叶片抗氧化系统酶活性和渗透调节物质含量,有效降低干旱胁迫诱导的活性氧过度积累及膜脂过氧化程度,提高葡萄幼苗的抗旱能力,且以 0.10 mg/L EBR 处理效果最佳。

关键词:葡萄;24-表油菜素内酯(EBR);干旱胁迫;抗氧化系统;渗透调节物质

中图分类号:Q945.78; S663.1

文献标志码:A

Effect of 24-Epibrassinolide Pretreatments on the Antioxidant System and Osmotic Adjustment Substance in *Vitis vinifera* Seedlings under Drought Stress

WANG Yuting¹, WANG Zhizhen¹, ZHAO Ting¹, XI Zhumei^{1,2*}

(1 College of Enology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2 Shaanxi Engineering Research Center for Viti-Viniculture, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: In this study, Riesling annual nutrition bag cuttings were used as experimental material. We conducted artificial climate chamber hydroponic experiments to investigate the effect of various concentrations EBR (0.05, 0.10 and 0.20 mg/L) pretreatments on active oxygen, antioxidants, antioxidant enzymes activities and osmotic adjustment substance contents in grape (*Vitis vinifera* L.) seedlings with

收稿日期:2018-09-29;修改稿收到日期:2019-03-08

基金项目:十三五重大研发项目(2017YFC1502806-4);国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-29-zp-6)

作者简介:王雨婷(1995—),女,在读硕士研究生,主要从事葡萄与葡萄酒学研究。E-mail:995614907@qq.com

* 通信作者:惠竹梅,博士,教授,主要从事葡萄逆境生理及果实品质调控研究。E-mail:xizhumei@nwsuaf.edu.cn

PEG simulating drought stress, revealing the mechanism of drought resistance of EBR on grape seedlings under drought stress. The results showed that: (1) compared with the growth control in normal, simulating drought stress significantly increased the contents of anion radical ($O_2^{\cdot -}$), hydrogen peroxide (H_2O_2) and malondialdehyde (MDA) in the leaves of grape seedlings. Compared with the PEG treatment alone, different concentrations of EBR pretreatment could reduce the contents of $O_2^{\cdot -}$, H_2O_2 and MDA in leaves. (2) Compared with the growth control in normal, the contents of ascorbic acid (AsA) and reduced glutathione (GSH) were significantly reduced in PEG-treated seedlings. Compared with PEG treatment, EBR pretreatment significantly increased AsA and GSH contents in grape leaves, and 0.10 mg/L EBR treatment was the best. (3) Superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POD) and ascorbate peroxidase (APX) activities in grape seedling leaves showed a trend of rising first and then decreasing in PEG treatment alone and it remained basically unchanged under normal growth conditions. Moreover, the activities of SOD, CAT, POD and APX in EBR pretreatment were always higher than those in PEG treatment. (4) The contents of proline and soluble protein in PEG treatment alone was higher than that growth control in normal. Different concentrations of EBR pretreatment could significantly increase the contents of proline and soluble protein in grape leaves during middle and late stages of drought stress. It was showed that under drought stress, EBR pretreatments could effectively reduce the excessive accumulation of reactive oxygen species (ROS) and the increase of membrane lipid peroxide level induced by drought stress through improving antioxidant defense system activities and osmotic adjustment substance contents in the leaves of grape seedlings, resulting in improving the drought resistance of wine grape seedlings. Among these, 0.10 mg/L EBR pretreatment got the most remarkable effect.

Key words: *V. vinifera* L.; 24-epibrassinolide (EBR); drought stress; antioxidant system; osmotic adjustment substance

葡萄是世界重要的经济类果树作物之一。西部地区是中国重要的葡萄与葡萄酒产区,但该地域年有效降雨量少,水资源严重缺乏,土壤多为盐碱土,对葡萄的生长发育产生生理障碍,造成葡萄细胞膜结构破坏、生长受到抑制、光合作用减弱、内源激素代谢失调等危害,同时也降低了葡萄果实品质和产量,严重制约着酿酒葡萄产业的发展^[1-2]。油菜素内酯(brassinosteroid,简称BR)是广泛存在于植物中类似于动物甾醇类激素的一种植物激素,在裸子植物、单子叶植物、双子叶植物、蕨类植物和藻类等植物类群中普遍存在,同时在根、茎、叶、花、果实和种子在内的各个组织器官中均能检测到^[3-4]。微量的BRs便可以影响植物生长发育过程^[5]。BRs不仅能够促进植物生长,增加作物产量,还在植物生物胁迫和非生物胁迫中发挥着重要的作用,如干旱胁迫^[6]、盐胁迫^[7]、低温胁迫^[8]、高温胁迫^[9]和病原体与病虫害入侵^[10]等。

干旱胁迫使植物细胞内积累大量的活性氧(reactive oxygen species, ROS),主要包括过氧化氢(H_2O_2)、超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot -}$)和羟自由基($\cdot OH$)等^[11]。ROS的过量产生会加剧植物细胞的膜脂过氧化程度,导致丙二醛(MDA)的积累与膜系统损伤,进而抑制蛋白质的合成。植物则通过提

高胞内非酶抗氧化物质含量和抗氧化酶活性缓解干旱胁迫造成的过氧化损伤;诱导增强叶绿素生物合成相关酶活性来保证光合作用正常进行;合成大量的渗透调节物质,如可溶性糖、脯氨酸、可溶性蛋白等,调节自身的渗透势,保持较好的叶片水分状况,维持新陈代谢的正常运行,减轻逆境胁迫对植物细胞与组织的伤害程度^[12]。Mahesh等^[13]研究表明外源BRs处理可缓解聚乙二醇-6000(PEG-6000)胁迫对萝卜种子萌发的影响,通过显著抑制萝卜脂质过氧化和MDA含量来促进发芽和幼苗生长。外源BRs还可以增加PEG-6000胁迫下木豆幼苗ABA、甜菜碱和脯氨酸积累量以改善幼苗的生长状况^[14]。此外,Shahana等^[14]研究表明外源BRs处理可以增强干旱胁迫下木豆幼苗过氧化物酶(POD, peroxidase)、过氧化氢酶(CAT, catalase)、超氧化物歧化酶(SOD, superoxide dismutase)、抗坏血酸过氧化物酶(APX, ascorbate peroxidases)和谷胱甘肽还原酶(GR, glutathione reductase)等抗氧化酶活性,从而清除有害物质过氧化氢和丙二醛含量,降低脂质过氧化程度和电解质渗透率,最终提高植物抗旱性。

目前,关于干旱胁迫下葡萄幼苗叶绿素含量、光系统Ⅱ参数和活性氧代谢等的研究表明,外源BRs可显著提高幼苗叶绿素含量和光合利用率,防止干

旱诱导的光抑制,同时提高抗氧化酶活性,降低活性氧的含量,提高幼苗的抗旱性;前期研究认为 ABA 参与调控 EBR 对干旱胁迫下‘赤霞珠’葡萄幼苗生理效应的缓解,但 EBR 仍可通过不依赖 ABA 的途径发挥作用^[1]。国内外已有大量关于 BRs 调节植物耐旱的生理机制与抗旱机理的研究,但关于 BR 在干旱胁迫下调控酿酒葡萄增强抗旱能力的生理机制还有待进一步探讨。因此,本试验以酿酒葡萄品种‘雷司令’幼苗为材料,研究不同浓度 EBR 预处理对葡萄幼苗抗氧化系统和渗透调节物质的影响,揭示 EBR 对干旱胁迫葡萄幼苗的缓解效应,为深入探讨 BRs 调控葡萄幼苗耐干旱胁迫的机理提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料培养与处理

本研究以欧亚种(*Vitis vinifera* L.)酿酒葡萄品种‘雷司令’(Riesling)的一年生营养袋扦插苗为试材。待幼苗长出 8~10 片真叶后,选取长势、大小基本一致的幼苗用自来水洗净根系泥土,用海绵条缠绕幼苗根部,移栽并固定在通气水培盆中。水培盆(50 cm×37 cm×15 cm)中装有 1/2Hoagland 营养液^[15],表面用钻孔的聚乙烯泡沫覆盖。最后从温室转移到人工气候室(AGC-D001P 顶置光气候室)中进行预培养。(1)添加营养液:水培盆中注入蒸馏水 17 L,400 倍大量元素营养液每种 21.25 mL,1 000 倍微量元素混合液加 8.5 mL,用 H_3PO_4 或 NaOH 溶液将营养液 pH 调至(6.5±0.1)。每 5 d 更换 1 次营养液。(2)环境调控:将通气管穿过泡沫板小孔,底部连接沙锤。每个水培盆用三通与通气管连接,再将主通气管和气泵相连,通气频率为 30 min/h。培养室内昼夜温度分别为(24±1)℃和(16±2)℃。光照时间 14 h/d(光源为日光灯),光照强度 160 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 。

1.2 试验处理

前期通过预实验并结合相关研究确定了 PEG-6000 的浓度和 EBR 的浓度范围与预处理天数^[16-17]。试验按照 EBR 浓度共设 5 个处理:(1)CK:正常生长对照组,葡萄幼苗未经 EBR 和 PEG-6000 处理;(2)PEG:干旱胁迫对照组,葡萄幼苗经质量分数 10% PEG-6000 处理(中度水分胁迫);(3)EBR_{0.05}:葡萄幼苗经 0.05 mg/L EBR+质量分数 10% PEG-6000 处理;(4)EBR_{0.10}:葡萄幼苗经 0.10 mg/L EBR+质量分数 10% PEG-6000 处理;(5)EBR_{0.20}:葡萄幼苗经 0.20 mg/L EBR+质量分

数 10% PEG-6000 处理。每处理均包含 2 盆,每盆 8 株葡萄幼苗。

供试幼苗先在 1/2Hoagland 营养液中培养 5 d,幼苗完全适应水培环境后,向营养液中加入不同浓度的 EBR,激素处理 5 d 后进行干旱胁迫处理,除无胁迫对照(CK)以外,每个水培盆中加入质量分数为 10%PEG-6000。其中,EBR 购自美国 Sigma 公司,Ruibio 分装。EBR 加入前先用 98%乙醇溶解后稀释到适宜浓度,乙醇最终含量为 0.1%(V/V),正常生长对照和干旱胁迫对照也加入同样体积的 98%乙醇。在干旱胁迫第 0、3、6、9、12 天时随机采集植株叶片测定相关指标,采集后立即将叶片混匀保存在-80℃冰箱。测定生理指标时各处理均进行 3 次重复,每重复进行 3 次平行试验。

1.3 测定指标及方法

1.3.1 活性氧及丙二醛含量 过氧化氢 H_2O_2 含量的测定参考 Patterson 等^[18]的方法;超氧阴离子自由基 $O_2^{\cdot-}$ 含量的测定方法参考 Elstner an Heupel^[19];丙二醛(MDA)含量的测定参考高俊凤^[20]的方法。

1.3.2 抗氧化物质含量 AsA 含量测定参考 Foyer 等^[21]的方法,GSH 含量测定参考 Anderson^[22]的方法。

1.3.3 抗氧化酶活性 超氧化物歧化酶(SOD)活性参考 Giannopolitis and Ries^[23]的方法测定,过氧化氢酶(CAT)活性测定方法参考 Aebi^[24]方法,过氧化物酶(POD)活性参考 Thomas^[25]方法测定,抗坏血酸过氧化物酶(APX)活性的测定参考 Nakano 等^[26]方法。

1.3.4 渗透物质含量 脯氨酸含量的测定参考 Bates 等^[27]的方法,可溶性蛋白粗酶液的含量测定采用 Bradford^[28]的考马斯亮蓝染色法。

1.4 数据处理

采用 SPSS18.0 和 SigmaPlot12.5 统计软件进行数据处理,采用 Duncan 新复极差法进行多重比较和差异显著性检测($\alpha=0.05$)。

2 结果与分析

2.1 EBR 处理对干旱胁迫下葡萄幼苗叶片活性氧代谢的影响

图 1 所示,在正常生长条件下(CK)下葡萄幼苗叶片中过氧化氢(H_2O_2)和超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)含量基本保持不变。随着干旱胁迫时间的延长,单独干旱胁迫处理(PEG-6000)‘雷司令’幼苗叶片中的 H_2O_2 和 $O_2^{\cdot-}$ 含量均呈先上升后下降的变化

趋势,且在胁迫处理 6 d 时达到最大值,这表明干旱胁迫诱导了葡萄幼苗氧化应激反应。与 PEG 处理相比,不同浓度 EBR 预处理均可显著降低干旱胁迫下葡萄叶片 H_2O_2 含量,且各处理 H_2O_2 平均含量表现为 $\text{EBR}_{0.05} > \text{EBR}_{0.10} > \text{EBR}_{0.20}$ (图 1, A);同时,不同浓度 EBR 预处理也能显著降低干旱胁迫下葡萄叶片 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 含量,但各浓度 EBR 预处理间无显著差异(图 1, B)。另外,随着干旱胁迫时间的延长,PEG 处理和 EBR 处理幼苗叶片中丙二醛(MDA)含量均呈先上升后下降的变化趋势,并均在处理 6 d 时达到峰值,且始终高于同期正常生长对照;各浓度 EBR 预处理葡萄叶片 MDA 含量在干旱胁迫处理期间均显著低于同期 PEG 单独处理,但不同浓度 EBR

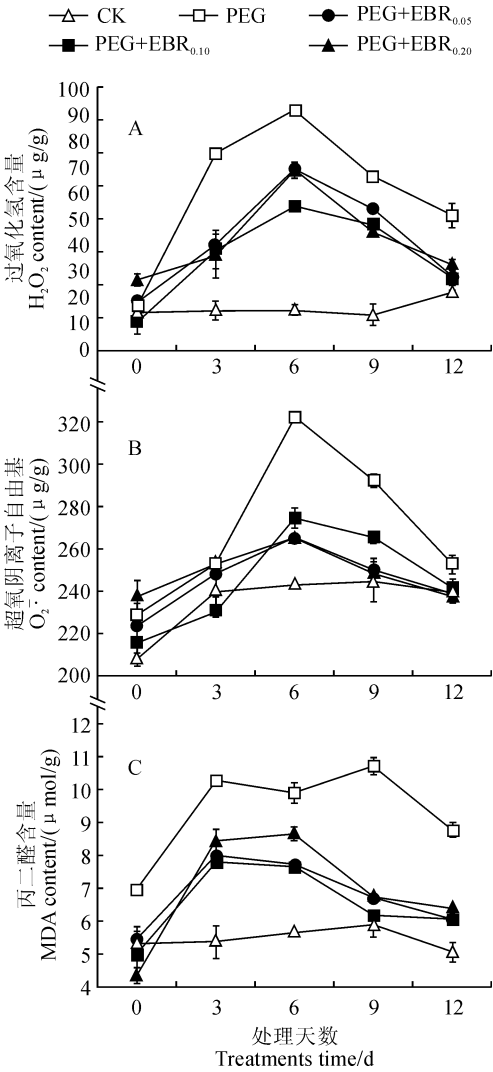


图 1 外源 EBR 预处理对干旱胁迫下葡萄幼苗叶片过氧化氢、超氧阴离子自由基和丙二醛含量的影响
Fig. 1 Effect of exogenous 24-epibrassinolide pretreatment on contents of H_2O_2 , $\text{O}_2^{\cdot -}$ and MDA in leaves of *V. vinifera* seedling under drought stress

预处理间无显著差异(图 1, C)。可见,在干旱胁迫条件下,不同浓度 EBR 预处理显著降低葡萄叶片活性氧($\text{O}_2^{\cdot -}$, H_2O_2)与膜脂过氧化产物(MDA)的含量,表明 EBR 预处理缓解了干旱胁迫诱导的氧化应激反应。

2.2 EBR 处理对干旱胁迫下葡萄幼苗叶片抗氧化物质含量的影响

由图 2 可知,在正常生长条件下(CK)下葡萄幼苗叶片中抗坏血酸(AsA)与还原型谷胱甘肽(GSH)含量基本保持不变。而在 PEG 处理条件下,随着胁迫时间的延长幼苗叶片中 AsA 与 GSH 总体均呈现降低趋势。此外,不同浓度 EBR 预处理使葡萄叶片 AsA 含量均显著高于 PEG 处理,且 AsA 平均含量表现为 $\text{EBR}_{0.10} > \text{EBR}_{0.20} > \text{EBR}_{0.05}$ 。EBR 预处理幼苗叶片中 GSH 含量随着干旱胁迫时间均呈先上升后下降的变化趋势,并在处理 6 d 时达到最大值;与 PEG 处理相比,各浓度 EBR 预处理均显著提高葡萄叶片 GSH 的含量,其中 GSH 平均含量依次为 $\text{EBR}_{0.10} > \text{EBR}_{0.05} > \text{EBR}_{0.20}$ 。可见,不同

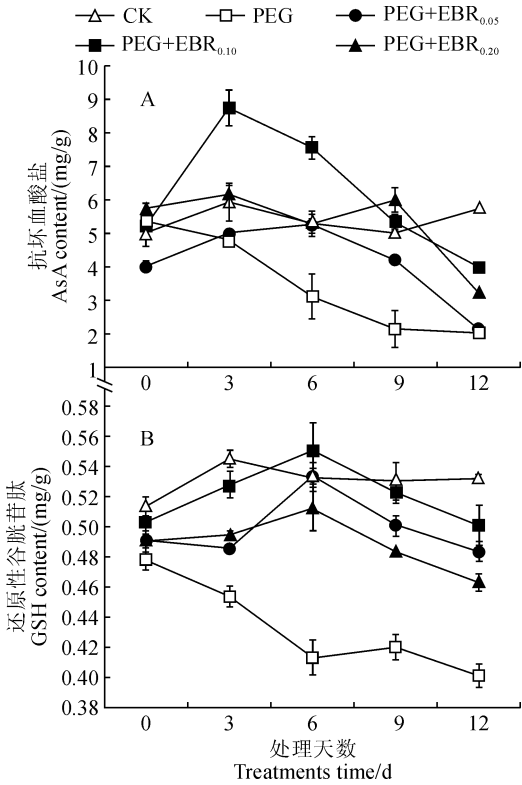


图 2 外源 EBR 预处理对干旱胁迫下葡萄幼苗抗坏血酸盐和还原型谷胱甘肽含量的影响
Fig. 2 Effect of exogenous 24-epibrassinolide pretreatment on contents of ascorbate (AsA) and glutathione (GSH) in leaves of *V. vinifera* seedling under drought stress

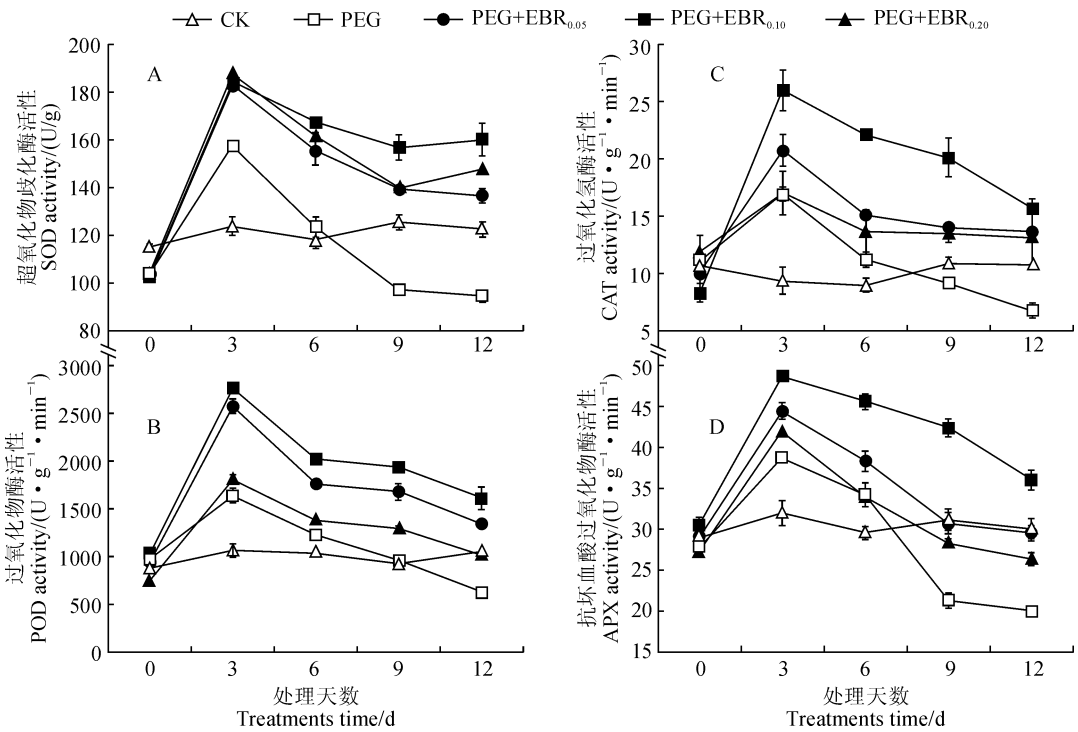


图 3 外源 EBR 预处理对干旱胁迫下葡萄幼苗抗氧化酶活性的影响
Fig. 3 Effect of exogenous 24-epibrassinolide pretreatment on activities of antioxidant enzymes in leaves of *V. vinifera* seedling under drought stress

浓度 EBR 预处理均可显著提高干旱胁迫下葡萄叶片抗氧化物质(AsA,GSH)含量,并以 0.10 mg/L EBR 处理效果最好。

2.3 EBR 处理对干旱胁迫葡萄幼苗叶片抗氧化酶活性的影响

如图 3 所示,葡萄幼苗叶片中抗氧化酶活性在正常生长条件下(CK)基本保持不变。在 PEG 处理和 EBR 预处理条件下,‘雷司令’葡萄幼苗叶片中的超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)与抗坏血酸过氧化物酶(APX)活性随着胁迫时间的延长均呈现先上升后下降的变化趋势,并在处理 3 d 时达到最大值,且 EBR 预处理始终高于同期 PEG 处理。不同浓度 EBR 预处理间相比较,葡萄幼苗叶片中平均 SOD 活性依次为 EBR_{0.10}>EBR_{0.20}>EBR_{0.05},平均 CAT、POD、APX 活性表现为 EBR_{0.10}>EBR_{0.05}>EBR_{0.20}。可见,干旱胁迫下葡萄植株自身存在氧化应激保护机制,能通过激活抗氧化酶的活性保护细胞免受氧化损伤;EBR 预处理能进一步诱导增强干旱胁迫下叶片内抗氧化酶活性,缓解胁迫后期抗氧化酶活性下降的速率,并以 0.10 mg/L EBR 处理效果最佳。

2.4 EBR 处理对干旱胁迫下葡萄幼苗叶片渗透调节物质含量的影响

在干旱胁迫处理期间,PEG 处理与 EBR 预处

理‘雷司令’幼苗叶片中的脯氨酸含量均呈先上升后逐渐下降趋势,并均明显高于同期正常生长对照,且均在处理 6 d 时达到最大值;与 PEG 处理相比,不同浓度 EBR 预处理均能显著提高幼苗叶片中脯氨酸含量,且脯氨酸平均含量依次为 EBR_{0.10}>EBR_{0.20}>EBR_{0.05}(图 4,A)。同时,随着干旱胁迫时间的延长,PEG 处理和 EBR 预处理‘雷司令’幼苗叶片中的可溶性蛋白含量均基本呈现先上升后下降的趋势,PEG 处理和 EBR 预处理分别在 3 d 和 6 d 时达到最大值;与 PEG 处理相比,EBR 预处理的幼苗叶片中可溶性蛋白含量在干旱胁迫 6~12 d 时均明显提高(图 4,B)。以上结果表明 EBR 预处理均能明显提高干旱胁迫中后期葡萄叶片中渗透调节物质脯氨酸和可溶性蛋白含量,且该效应在脯氨酸含量上表现得更突出。

3 讨论

3.1 外源 EBR 与干旱胁迫下葡萄幼苗活性氧的关系

活性氧(ROS)是生物体有氧代谢产生的一类活性含氧化合物的总称,主要包括 H₂O₂、O₂⁻和·OH等。低浓度的 ROS 参与细胞正常的生理过程,作为第二信使触发多种信号转导过程。高浓度的 ROS 则会导致光合色素及脂膜的过氧化,进一步

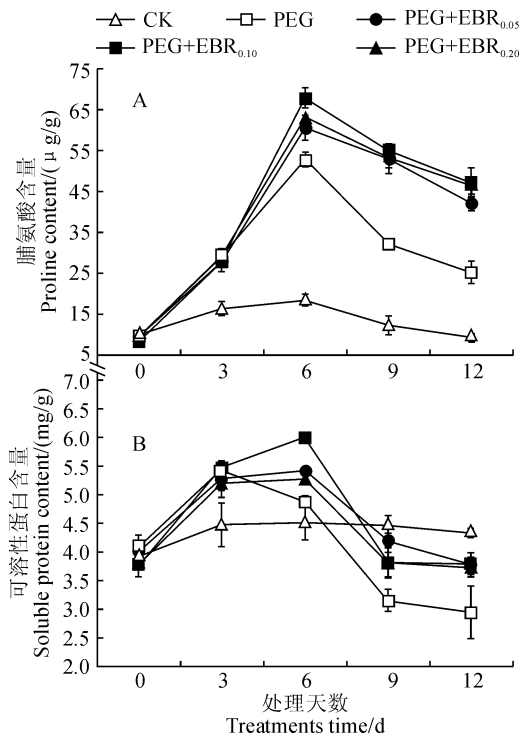


图 4 外源 EBR 预处理对干旱胁迫下葡萄幼苗脯氨酸含量和可溶性蛋白含量的影响

Fig. 4 Effect of exogenous 24-epibrassinolide pretreatment on the contents of proline and soluble protein in leaves of *V. vinifera* seedling under drought stress

导致细胞膜半透性丧失与功能的改变^[29]。ROS 的过量积累是植物氧化应激的指标之一^[30-31]。丙二醛(MDA)是植物细胞膜脂质过氧化的主要产物,过量产生能使磷脂及蛋白质发生交联,也可使蛋白质巯基氧化,生物膜变性,其含量的高低反映了膜损伤的程度^[32]。先前的研究表明干旱胁迫可诱导活性氧产生及氧化应激^[33-34]。本试验中,正常生长条件下葡萄幼苗中 H_2O_2 、 $O_2^{\cdot -}$ 和 MDA 含量基本保持不变,而干旱胁迫下则显著增加,这表明干旱胁迫诱导了严重的氧化应激反应。其中 MDA 和 $O_2^{\cdot -}$ 含量的增加幅度小于 H_2O_2 ,表明 H_2O_2 含量的变化可能在介导干旱信号转导途径中起着关键作用。同时,与单独干旱胁迫处理相比,EBR 预处理显著降低了 $O_2^{\cdot -}$ 、 H_2O_2 和 MDA 的含量,说明 EBR 可缓解干旱胁迫下葡萄叶片中 ROS 的生成与脂质过氧化,保护植物免受氧化损伤。然而,没有证据表明 EBR 可以直接清除 ROS(H_2O_2 和 $O_2^{\cdot -}$),EBR 降低 ROS 的含量可能取决于其与抗氧化系统间的反应。

3.2 外源 EBR 与干旱胁迫下葡萄幼苗抗氧化物质的关系

为清除过量生成的 ROS,植物在进化过程中形

成了完整而复杂的抗氧化防御系统,包括非酶抗氧化剂和抗氧化酶,以抑制 ROS 诱导的氧化应激^[35]。其中低分子量抗氧化剂,如抗坏血酸(AsA)、还原型谷胱甘肽(GSH),既可影响细胞内氧化还原状态,又可与多种细胞成分反应^[36]。首先,AsA 是普遍存在植物组织中的小分子抗氧化物质,可直接与 $O_2^{\cdot -}$ 、 $\cdot OH$ 、 1O_2 和 H_2O_2 等活性氧反应,也可以作为电子供体参与活性氧的清除^[37]。干旱胁迫可造成 AsA 含量的降低,植物清除活性氧的能力下降,影响抗坏血酸-谷胱甘肽(AsA-GSH)循环的正常运行。本试验中,与正常生长对照相比,干旱胁迫使‘雷司令’葡萄幼苗叶片 AsA 含量显著降低。此外,不同浓度 EBR 处理的 AsA 含量变化趋势一致,且均显著高于单独干旱胁迫处理,其中 0.10 mg/L EBR 处理效果最为显著。干旱胁迫下外源 EBR 处理能调节 AsA 含量来清除逆境下过量生成的 ROS,可能通过诱导增强 AsA-GSH 循环中参与 AsA 合成的酶(DHAR 和 MDHAR)活性来完成^[38]。这与先前 BR 对高温胁迫下榕树的影响一致,外源施加 EBR 显著增加了胁迫下的 AsA 含量和 GSH 含量,从而增强其抗氧化防御系统^[9]。其次,GSH 是植物抗氧化系统中另一种重要的化合物,它可以作为抗氧化剂直接清除 ROS 或作为抗氧化酶的底物间接清除 H_2O_2 ,降低逆境引起的细胞膜系统过氧化损伤^[39]。本试验中,与正常生长对照相比,干旱胁迫使葡萄幼苗 GSH 含量显著降低,而不同浓度 EBR 处理的 GSH 含量均显著高于单独干旱胁迫处理,其中 0.10 mg/L EBR 处理效果最为显著。谷胱甘肽还原酶(GR)是 ASA-GSH 循环中负责将 GSSG 转化为 GSH 的酶。EBR 预处理的 GSH 含量显著增加可能是通过诱导 GR 的合成,维持 GSH 的含量,平衡细胞内氧化还原状态^[40]。有研究发现 EBR 预处理抑制了谷胱甘肽的氧化,在锌胁迫下维持萝卜幼苗细胞的氧化还原状态^[41]。本试验结果表明,EBR 处理能够提高干旱胁迫下葡萄幼苗抗氧化物质 ASA 和 GSH 的含量,从而平衡植物体内的氧化还原状态,确保 AsA-GSH 循环的高速有效运转,但 EBR 对干旱胁迫下葡萄幼苗的缓解作用与处理浓度有关。

3.3 外源 EBR 与干旱胁迫下葡萄幼苗抗氧化酶活性的关系

非生物胁迫破坏了细胞内 ROS 的平衡,而植物清除 ROS 的机制与 ROS 清除酶密切相关。植物清除活性氧的酶促系统主要包括超氧化物歧化酶

(SOD)、抗坏血酸过氧化物酶(APX)、过氧化氢酶(CAT)和过氧化物酶(POD),它们之间的平衡对于清除活性氧自由基与维持过氧化氢的稳态水平至关重要^[42]。其中 SOD 是抗氧化系统的重要组成部分,主要功能是催化 $O_2^{\cdot-}$ 歧化生成 H_2O_2 。本试验中,与正常生长对照相比,葡萄叶片 SOD 活性在单独干旱胁迫 6 d 后显著降低,这可能与同时期 $O_2^{\cdot-}$ 的过量生成有关。而与单独干旱胁迫处理相比,不同浓度 EBR 预处理均显著提高了幼苗叶片中 SOD 活性,这与前人研究中 BR 能够提高干旱胁迫下玉米叶片中抗氧化酶 SOD、CAT 和 APX 的活性,最终增强植物抵抗逆境胁迫能力的结果一致^[43]。表明外源 EBR 处理能够通过提高 SOD 的活性来有效防止 $O_2^{\cdot-}$ 的过量产生,提高葡萄幼苗抵御干旱胁迫的能力。CAT、POD 和 APX 的主要作用则是分解过氧化氢。Li 等^[44]研究表明,外源施加 BR 能够提高干旱胁迫下刺槐(*Robinia pseudoacacia*)幼苗抗氧化酶(SOD、POD 和 CAT)活性,增强其抗旱能力,缓解干旱胁迫造成的不利影响。而在盐胁迫下,外源施加 28-HBR 能增强玉米(*Zea mays* L.)幼苗 SOD、POD、CAT 和 APX 的活性,显著降低盐胁迫对幼苗生长的毒害作用^[45]。本试验中,正常生长条件下葡萄幼苗叶片 SOD、CAT、POD 和 APX 活性基本保持不变,干旱胁迫下则呈现先上升后下降的趋势。此外与单独干旱胁迫对照相比,EBR 预处理的葡萄幼苗 SOD、CAT、POD 和 APX 活性都有不同程度增加,这表明植物自身具有应激保护功能,可通过激活抗氧化酶的活性保护细胞免受氧化损伤,而外源 EBR 可通过调节抗氧化系统来增强植株抵抗干旱胁迫的能力。而且,EBR 处理诱导抗氧化酶活性的增加可能是通过激活特定基因的转录和/或翻译介导酶的从头合成和/或活化来完成^[46]。

3.4 外源 EBR 与干旱胁迫下葡萄幼苗渗透调节物质的关系

渗透调节是植物适应干旱胁迫的重要生理机制。干旱会引起植物脱水造成渗透胁迫,植物则通过大量合成和积累渗透保护剂来缓解逆境胁迫,例如脯氨酸、甜菜碱、甘露醇和海藻糖^[25]。脯氨酸是植物体内广泛存在的渗透调节物质,是水溶性最大的氨基酸之一,水合能力很强。在胁迫条件下,脯氨酸可充当渗透保护剂、膜稳定剂和 ROS 清除剂^[47]。渗透调节是植物响应干旱胁迫生理机制的主要部分,细胞质和其他细胞器中蛋白质的积累均有助于

植物的渗透调节^[7]。最近的研究表明,外源施加 HBL(28-Homobrassinolide)和 EBL(24-epibrassinolide)促进了豌豆幼苗中 ABA、甘氨酸、甜菜碱和脯氨酸的积累,缓解了干旱胁迫对豌豆幼苗的伤害^[14]。先前的研究发现 EBR 通过改善叶片的光合作用来减轻不同胁迫对植物生长的不利影响,这主要是由于蛋白质和脯氨酸含量的积累^[48-49]。本试验中,与正常生长对照相比,干旱胁迫显著增加了葡萄叶片中脯氨酸和可溶性蛋白的含量。而与单独干旱胁迫处理相比,EBR 预处理则进一步显著提高葡萄幼苗中脯氨酸和可溶性蛋白的含量,说明 EBR 能够通过增强葡萄幼苗中的渗透调节系统功能来缓解干旱胁迫对植物造成的伤害。

外源 EBR 处理提高了干旱胁迫下葡萄幼苗抗氧化酶活性、抗氧化剂含量及渗透调节物质(游离脯氨酸、可溶性糖和可溶性蛋白)含量,清除过量的活性氧自由基,从而降低了 MDA 含量,减缓葡萄幼苗的氧化损伤,调节植物体内的渗透势,提高葡萄幼苗的干旱耐性,进一步降低干旱对葡萄幼苗的伤害,说明 BRs 对提高葡萄幼苗干旱抵抗力具有正向作用。先前的研究表明,BR 提高植物对致病疫霉感染和高温的耐受性是通过诱导内源 ABA 含量的升高引起的^[50-51]。Zhang 等^[52]研究指出,在干旱胁迫下,EBR 减轻干旱胁迫造成的膜脂过氧化损伤一部分也是由于 ABA 调节的作用。且 ABA 参与 BR 诱导的干旱胁迫耐受性,但 BR 不参与 ABA 诱导的干旱胁迫耐受性;BR 处理也能快速诱导 *vpl4* 基因的表达,该基因编码催化玉米叶片中 ABA 生物合成关键酶 NCED。关于 BRs 与植物生理代谢的关系及 BRs 提高葡萄幼苗耐干旱的机理,之后将从干旱胁迫下葡萄幼苗生理代谢的分子水平及 BRs 的信号转导途径进一步深入研究。

4 结 论

干旱胁迫使葡萄幼苗叶片中 $O_2^{\cdot-}$ 、 H_2O_2 和 MDA 含量升高;而在干旱胁迫条件下,EBR 预处理可降低 $O_2^{\cdot-}$ 、 H_2O_2 和 MDA 的含量,提高渗透调节物质脯氨酸和可溶性蛋白的含量,同时提高了葡萄叶片抗氧化系统中 SOD、CAT、POD 和 APX 的活性和非酶物质抗坏血酸和还原型谷胱甘肽的含量,提高了酿酒葡萄幼苗的抗旱能力,且浓度为 0.10 mg/L EBR 处理效果最为显著。

参考文献:

[1] 孟莹. 脱落酸在 24-表油菜素内酯缓解葡萄幼苗水分胁迫下生理效应中的作用研究 [D]. 陕西杨陵:西北农林科技大学, 2016.

[2] 惠竹梅, 孙万金, 张振文. 外源 Ca^{2+} 对水分胁迫下酿酒葡萄黑比诺主要抗旱生理指标的影响 [J]. 西北农林科技大学学报 (自然科学版), 2007, **35**(9): 137-140.

XI Z M, SUN W J, ZHANG Z W. Effect of exogenous Ca^{2+} on drought resistance physiological indexes of wine grape cultivar Pinot Noir under water stress[J]. *Journal of Northwest A&F University* (Natural Science Edition), 2007, **35**(9): 137-140.

[3] BAJGUZ A, HAYAT S. Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses [J]. *Plant Physiology & Biochemistry*, 2009, **47**(1): 1-8.

[4] TRAN L S, PAL S. Phytohormones: a window to metabolism, signaling and biotechnological application [M]. New York:Springer, 2014: 163-190.

[5] CLOUSE S D. A history of brassinosteroid research from 1970 through 2005: thirty-five years of phytochemistry, physiology, genes, and mutants[J]. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2015, **34**(4): 828-844.

[6] YUAN G F, JIA C G, LI Z, *et al.* Effect of brassinosteroids on drought resistance and abscisic acid concentration in tomato under water stress[J]. *Scientia Horticulturae*, 2010, **126**(2): 103-108.

[7] DONG Y J, WANG W W, HU G Q, *et al.* Role of exogenous 24-epibrassinolide in enhancing the salt tolerance of wheat seedlings[J]. *Journal of Soil Science & Plant Nutrition*, 2017, **17**(3): 554-569.

[8] LIU Y J, ZHAO Z G, SI J, *et al.* Brassinosteroids alleviate chilling-induced oxidative damage by enhancing antioxidant defense system in suspension cultured cells of *Chorispora bungeana*[J]. *Plant Growth Regulation*, 2009, **59**(3): 207-214.

[9] JIN S H, LI X Q, WANG G G, *et al.* Brassinosteroids alleviate high-temperature injury in *Ficus concinna* seedlings via maintaining higher antioxidant defence and glyoxalase systems [J]. *Aob Plants*, 2015, 7: plv009.

[10] SHARMA A, KUMAR V, SINGH R, *et al.* Effect of seed pre-soaking with 24-epibrassinolide on growth and photosynthetic parameters of *Brassica juncea* L. in imidacloprid soil [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2016, 133: 195-201.

[11] PERDOMO P, MURPHY J A, BERKOWITZ G A, *et al.* Physiological changes associated with performance of kentucky bluegrass cultivars during summer stress[J]. *Hortscience A Publication of the American Society for Horticultural Science*, 1996, **31**(7): 1 182-1 186.

[12] NAWAZ F, NAEEM M, ZULFIQAR B, *et al.* Understanding brassinosteroid-regulated mechanisms to improve stress tolerance in plants: a critical review[J]. *Environmental Science & Pollution Research*, 2017, **24**(19): 15 959-15 975.

[13] MAHESH K, BALARAJU P, RAMAKRISHNA B, *et al.* Effect of brassinosteroids on germination and seedling growth of *Radish* (L.) under PEG-6000 induced water stress[J]. *American Journal of Plant Sciences*, 2013, **4**(12): 2 305-2 313.

[14] SHAHANA T, RAO P A, RAM S S, *et al.* Mitigation of drought stress by 24-epibrassinolide and 28-homobrassinolide in pigeon pea seedlings [J]. *International Journal of Multidisciplinary and Current Research*, 2015, (3): 904-911.

[15] HOAGLAND D R, ARNON D I. The water culture method for growing plants without soil[J]. *Calif. Agric. Exp. Stn. Circ*, 1950, **347**(5 406): 357-359.

[16] 不同程度水分胁迫对赤霞珠葡萄幼树氮素吸收代谢的影响 [D]. 新疆石河子:石河子大学, 2015.

[17] WANG Z Z, ZHENG P, MENG J F, *et al.* Effect of exogenous 24-epibrassinolide on chlorophyll fluorescence, leaf surface morphology and cellular ultrastructure of grape seedlings (*Vitis vinifera* L.) under water stress[J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2015, **37**(1): 1-12.

[18] PATTERSON B D, MACRAE E A, FERGUSON I B. Estimation of hydrogen peroxide in plant extracts using titanium (IV)[J]. *Analytical Biochemistry*, 1984, **139**(2): 487-492.

[19] ELSTNER E F, HEUPEL A. Inhibition of nitrite formation from hydroxylammoniumchloride: a simple assay for superoxide dismutase[J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, **70**(2): 616-620.

[20] 高俊凤. 植物生理学实验指导 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2006.

[21] FOYER C H, HALLIWELL B. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: A proposed role in ascorbic acid metabolism[J]. *Planta*, 1976, **133**(1): 21-25.

[22] ANDERSON M E. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples[J]. *Methods in Enzymology*, 1985, **113**(4): 548-555.

[23] GIANNOPOLITIS C N, RIES S K. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants[J]. *Plant Physiology*, 1977, **59**(2): 309-314.

[24] AEBI H. Catalase *in vitro* [J]. *Methods Enzymol*, 1984, 105: 121-126.

[25] THOMAS HOW M F. Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms [J]. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 1990, 50: 571-599.

[26] NAKANO Y, ASADA K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in Spinach Chloroplasts [J]. *Plant & Cell Physiology*, 1981, **22**(5): 867-880.

[27] BATES L S, WALDREN R P, TEARE I D. Rapid determination of free proline for water-stress studies [J]. *Plant & Soil*, 1973, **39**(1): 205-207.

[28] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, **72**(1-2): 248-254.

[29] XU S, LI J L, ZHANG X Q, *et al.* Effects of heat acclimation pretreatment on changes of membrane lipid peroxidation, antioxidant metabolites, and ultrastructure of chloroplasts in two cool-season turfgrass species under heat stress [J]. *Environmental & Experimental Botany*, 2006, **56**(3):

- 274-285.
- [30] BHATTACHARJEE S. Reactive oxygen species and oxidative burst: roles in stress, senescence and signal transduction in plants [J]. *Current Science*, 2005, **89**(7): 1 113-1 121.
- [31] SUZUKI N, MITTLER R. Reactive oxygen species and temperature stresses: a delicate balance between signaling and destruction [J]. *Physiologia Plantarum*, 2006, **126**(1): 45-51.
- [32] 潘华珍, 冯立明, 许彩民, 等. 丙二醛对红细胞的作用 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 1984, (2): 36-39.
- PAN H Z, FENG L M, XU C M, *et al.* Effect of malondialdehyde on red blood cells [J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 1984, (2): 36-39.
- [33] KHOYERDI F F, SHAMSHIRI M H, ESTAJI A. Changes in some physiological and osmotic parameters of several pistachio genotypes under drought stress [J]. *Scientia Horticulturae*, 2016, 198: 44-51.
- [34] YILDIZ-AKTAS L, DAGNON S, GUREL A, *et al.* Drought tolerance in cotton: involvement of non-enzymatic ROS-scavenging compounds [J]. *Journal of Agronomy & Crop Science*, 2009, **195**(4): 247-253.
- [35] RAMAKRISHNA B, RAO S S R. 24-Epibrassinolide alleviated zinc-induced oxidative stress in radish (*Raphanus sativus* L.) seedlings by enhancing antioxidative system [J]. *Plant Growth Regulation*, 2012, **68**(2): 249-259.
- [36] FOYER C H, NOCTOR G. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses [J]. *Plant Cell*, 2005, **17**(7): 1 866-1 875.
- [37] MILLER G, SUZUKI N, CIFTCI-YILMAZ S, *et al.* Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses [J]. *Plant Cell & Environment*, 2010, **33**(4): 453-467.
- [38] HU W H, ZAN X H, YAN X H, *et al.* Effects of 24-Epibrassinolide on antioxidant system and expression of drought-tolerance relative genes in pepper seedlings under drought stress [J]. *Bulletin of Botanical Research*, 2015, **35**(6): 908-914.
- [39] NAHAR K, HASANUZZAMAN M, ALAM M M, *et al.* Exogenous glutathione confers high temperature stress tolerance in mung bean (*Vigna radiata* L.) by modulating antioxidant defense and methylglyoxal detoxification system [J]. *Environmental & Experimental Botany*, 2015, **112**(112): 44-54.
- [40] MA J H, XING G F, YANG X H, *et al.* Effects of exogenous EBR and NO signal on antioxidant system and low response gene expression under cold stress on maize embryo [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2015, **26**(5): 1 411-1 418.
- [41] RAMAKRISHNA B, RAO S S R. 24-Epibrassinolide maintains elevated redox state of AsA and GSH in radish (*Raphanus sativus* L.) seedlings under zinc stress [J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2013, **35**(4): 1 291-1 302.
- [42] LIMÓN-PACHECO J, GONSEBATT M E. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress [J]. *Mutata Res.*, 2009, **674**(1): 137-147.
- [43] TALAAT N B, SHAWKY B T, IBRAHIM A S. Alleviation of drought-induced oxidative stress in maize (*Zea mays* L.) plants by dual application of 24-epibrassinolide and spermine [J]. *Environmental & Experimental Botany*, 2015, **113**(13): 47-58.
- [44] LI K R, WANG H H, HAN G, *et al.* Effects of brassinolide on the survival, growth and drought resistance of *Robinia pseudoacacia* seedlings under water-stress [J]. *New Forests*, 2008, **35**(3): 255-266.
- [45] ARORA N, BHARDWAJ R, SHARMA P, *et al.* Effects of 28-homobrassinolide on growth, lipid peroxidation and antioxidative enzyme activities in seedlings of *Zea mays* L. under salinity stress [J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2008, **30**(6): 833-839.
- [46] ALI B, HAYAT S, FARIDUDDIN Q, *et al.* 24-Epibrassinolide protects against the stress generated by salinity and nickel in *Brassica juncea* [J]. *Chemosphere*, 2008, **72**(9): 1 387-1 392.
- [47] DONG Y J, WANG Z L, ZHANG J W, *et al.* Interaction effects of nitric oxide and salicylic acid in alleviating salt stress of *Gossypium hirsutum* L. [J]. *Journal of Soil Science & Plant Nutrition*, 2015, **15**(3): 561-573.
- [48] SHARMA I, CHING E, SAINI S, *et al.* Exogenous application of brassinosteroid offers tolerance to salinity by altering stress responses in rice variety Pusa Basmati-1 [J]. *Plant Physiology & Biochemistry*, 2013, **69**(8): 17-26.
- [49] ZHANG Y P, ZHU X H, DING H D, *et al.* Foliar application of 24-epibrassinolide alleviates high-temperature-induced inhibition of photosynthesis in seedlings of two melon cultivars [J]. *Photosynthetica*, 2013, **51**(3): 341-349.
- [50] KRISHNA P. Brassinosteroid-mediated stress responses [J]. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2003, **22**(4): 289-297.
- [51] KUREPIN L V, QADERI M M, BACK T G, *et al.* A rapid effect of applied brassinolide on abscisic acid concentrations in *Brassica napus* leaf tissue subjected to short-term heat stress [J]. *Plant Growth Regulation*, 2008, **55**(3): 165-167.
- [52] ZHANG A Y, ZHANG J, ZHANG J H, *et al.* Nitric oxide mediates brassinosteroid-induced ABA biosynthesis involved in oxidative stress tolerance in maize leaves [J]. *Plant & Cell Physiology*, 2011, **52**(1): 181-192.

(编辑:裴阿卫)