

低温胁迫下外源 SA 对酿酒葡萄幼苗抗氧化酶活性及内源 SA 含量的影响

王旺田¹, 李斌², 赵俊鹏³, 王宝强¹, 张芮⁴

(1. 甘肃省干旱生境作物学重点实验室, 甘肃农业大学生命科学技术学院, 甘肃 兰州 730070;

2. 甘肃省科学院生物研究所, 甘肃 兰州 730099; 3. 庄浪县自然资源局, 甘肃 庄浪 744600;

4. 甘肃农业大学水利水电工程学院, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 北方春季倒春寒限制了葡萄的栽种范围, 严重影响了葡萄的产量和品质。利用室内模拟低温处理研究低温胁迫对葡萄幼苗膜氧化程度、抗氧化酶活性及内源 SA 含量的影响, 结果发现, 4℃、12℃低温处理相较于 25℃而言, 葡萄幼苗叶片 MDA 含量分别增加 135.64% 和 68.38%, 保护酶 SOD、POD、CAT 活性以及内源 SA 含量显著上升, 4℃、12℃处理上升幅度分别为 133.05%、53.33%、129.17%、46.22% 和 59.65%、26.67%、29.17%、24.65%。4℃与 12℃处理相比, 抗氧化酶活性及内源 SA 含量均明显增加, SOD、POD、CAT 活性以及内源 SA 含量分别增加 45.97%、21.05%、77.42% 及 17.31%。恢复常温生长后低温处理幼苗叶片的抗氧化酶 SOD、POD、CAT 活性及内源 SA 含量没有明显降低, 对葡萄幼苗组织的修复具有持续作用, 且 4℃处理的幼苗抗氧化酶 SOD、POD、CAT 活性分别是 12℃处理的 1.29 倍、1.09 倍、1.30 倍。利用相关性及逐步回归分析法发现低温下叶片内源 SA 与 MDA 含量 ($R^2=0.648$)、SOD ($R^2=0.847$)、POD ($R^2=0.436$)、CAT ($R^2=0.584$) 活性呈正相关, SOD、CAT、POD 活性与内源 SA 含量存在线性回归关系, 保护酶活性受内源 SA 和低温信号的共同调控。外源 SA 和低温胁迫通过诱导内源 SA 的积累, 显著增加 SOD、POD 和 CAT 的活性而提高葡萄对低温胁迫的耐受性。

关键词: 酿酒葡萄; 低温; 水杨酸; 抗氧化酶系; 幼苗

中图分类号: S663.1; Q945.78; S143.8 **文献标志码:** A

Effects of exogenous SA on antioxidant enzyme activities and endogenous SA content in wine grapevine seedlings under low temperature stress

WANG Wangtian¹, LI Bin², ZHAO Junpeng³, WANG Baoqiang¹, ZHANG Rui⁴

(1. Gansu Provincial Key Laboratory of Aridland Crop Science, College of Life Science and Technology,

Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070, China;

2. Institute of Biology, Gansu Academy of Sciences, Lanzhou, Gansu 730099, China;

3. Administration of Natural Resources of Zhuanglang County, Pingliang, Gansu 744600, China;

4. College of Water Conservancy and Hydropower Engineering, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070, China)

Abstract: Spring inversions in north China limit the extent of grape planting and severely affect the yield and quality of grapes. The effects of low temperature stress on the degree of membrane oxidation, antioxidant enzyme activities and endogenous SA content of grape seedlings were investigated using indoor simulated low temperature treatments. The results showed that MDA content of grape seedling leaves increased significantly by 135.64% and 68.38% at 4℃ and 12℃, respectively, compared to 25℃, and the activities of protective enzymes SOD, POD, CAT and endogenous SA content increased significantly 133.05%, 53.33%, 129.17%, 46.22%, 59.65%, 26.67%, 29.17%, 24.65%. The antioxidant enzyme activities and endogenous SA content were increased significantly at 4℃ compared to 12℃, SOD, POD, CAT activities and endogenous SA contents increased by 45.97%,

收稿日期: 2022-06-17

修回日期: 2022-11-07

基金项目: 国家自然科学基金(31560552; 52169007); 甘肃省农业生物技术及应用开发项目(GNSW-2014-12); 甘肃省科技计划项目(17JR5RA151); 甘肃省水利科学试验研究与技术推广计划项目(甘水建管发[2021]71号)

作者简介: 王旺田(1975-), 男, 甘肃平凉人, 博士, 副教授, 研究方向为植物逆境生理。E-mail: wangw@gsau.edu.cn

通信作者: 张芮(1980-), 男, 张掖武威人, 博士, 教授, 研究方向为节水灌溉与水资源利用。E-mail: 873850358@qq.com

21.05%, 77.42% and 17.31%, respectively. The antioxidant enzymes SOD, POD, CAT activities and endogenous SA content of low temperature treated seedlings leaves did not decrease significantly after restoration of normothermic growth and had a sustained effect on the repair of grape seedling tissue, and the antioxidant enzymes SOD, POD and CAT activities of the seedlings treated at 4°C were 1.29, 1.09 and 1.30 times higher than those of the 12°C treatment. The correlation and stepwise regression analysis found that endogenous SA was positively correlated with MDA content ($R^2=0.648$), SOD ($R^2=0.847$), POD ($R^2=0.436$), and CAT ($R^2=0.584$) activities under low temperature. There was a linear regression relationship between the activities of SOD, CAT and POD, and the content of endogenous SA. Antioxidant enzyme activities were regulated by both endogenous SA and low temperature signal. The antioxidant enzymes and endogenous SA played a sustained role in mitigating the damage of seedlings by low temperature stress. Exogenous SA and low temperature stress induced the accumulation of endogenous SA, which significantly increased the activities of SOD, POD, and CAT and improved the tolerance of grapes to low temperature stress.

Keywords: wine grapes; low temperature; salicylic acid; antioxidant enzymes; seedlings

低温是限制植物生长发育和地理分布的主要环境因子,但是植物经过长期适应多变的环境温度已经进化出一系列生理和分子机制来抵御低温造成的伤害,例如通过低温驯化过程产生相应的反应,提高自身的耐冷性^[1]。当遭受低温胁迫时,植物体内积累大量的活性氧(ROS),通过启动自身的抗氧化防御系统,清除体内过多的 ROS 物质^[2],保护正常的生理代谢^[3-4]。植物抗氧化防御系统主要包含抗氧化酶类和非酶类物质。为了减轻低温胁迫引起的水分胁迫和渗透胁迫,植物有时还会显著增加体内的渗透物质积累,对低温信号产生应答,维持细胞稳态及正常生理代谢,从而提高自身的耐冷性及耐寒性^[5-8]。

葡萄(*Vitis vinifera* L.)是多年生落叶藤本植物,具有重要的经济价值、营养价值和药用价值,在世界上具有悠久的种植历史^[9]。目前我国酿酒葡萄主产区为冬季气候严寒干燥、全年降水较少的北方地区,而主要栽种酿酒葡萄品种是原产于西亚和地中海地区的欧亚种^[10],因此低温成为限制酿酒葡萄种植面积扩大的主要因素之一^[11]。低温除了影响葡萄细胞膜的稳定性,还会改变保护酶活性和内源物质的含量^[12-13]。近年来有大量报道表明激素参与了植物对低温的响应,调控植物在低温下的营养生长、生殖和发育,改善其在多种逆境下遭受的破坏^[14-15]。植物激素水杨酸(Salicylic acid, SA)在植物体内分布广泛,被认为是直接或间接影响植物对生物及非生物抗性的信号分子,参与植物对干旱、寒冷和高温等非生物胁迫的防御反应。在植物与生物及非生物胁迫的相互应答中,外源 SA 的应用是否也起到关键性作用? 这个问题逐渐成为研究热点。有研究发现 SA 及其衍生物处理能通过增强

抗氧化酶活性来提高铁皮石斛及椰子在不同程度低温下的抗寒性;同时,适当浓度的外源 SA 能够诱导苗期植物的冷敏感度降低,使植株耐寒性得到增强^[16-17]。研究也发现在不同环境条件下应用高浓度的外源 SA 会产生不良后果,例如常温下高浓度外源 SA 的喷施处理会导致玉米幼苗的各光合特征值显著降低,并对幼苗的生长产生不可逆的破坏^[18]。所以,外源 SA 的应用能否对植物产生有利的影响,与植物品种以及环境因素有关。

因此,通过分析低温胁迫下外源 SA 影响植物内源 SA 含量的变化来揭示 SA 响应低温胁迫机制有重要意义。本试验选择炼苗存活率高、低温下稳定性强且应用广泛的酿酒葡萄砧木品种‘贝达’,研究低温胁迫下葡萄幼苗内源 SA 含量、抗氧化酶活性以及 MDA 等生理指标的变化,并分析外源 SA 处理与低温逆境下葡萄幼苗叶片抗氧化酶与内源 SA 含量间的应答关系,以期水杨酸在葡萄逆境胁迫研究机理和应用方面提供一定的试验依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料和试验处理

试验在甘肃农业大学生命科学技术学院生物质能实验室进行,采用多因素试验设计。试验材料‘贝达’(*Vitis riparia*×*V. labrusca*, Beta)外植体由甘肃省干旱生境作物学重点实验室提供。SA(购自上海源叶科技有限公司)用蒸馏水配制成 100 mmol·L⁻¹的母液,4°C 保存,试验时根据需要进行稀释。

2021 年 10 月 25 日利用植物组织培养技术(图 1),选用 GS 培养基离体培养葡萄幼苗 30 d(培养条件:温度 25°C;湿度 65%;光照强度 8 000 lx;16 h 光照,8 h 黑暗)后,挑选生长至 6~10 片叶子的幼苗进

行炼苗,随后移入注有 Hoagland 营养液的培养盆(10 cm×10 cm×9 cm)内,并用泡沫板固定,置于人工气候培养箱中培育至泡沫板固定处葡萄苗直径达0.8 cm 以上备用。

组培苗炼苗、水培试验完成后,设置 2 组试验,第 1 组为低温胁迫试验,第 2 组为低温胁迫与外源 SA 喷施组合试验。其中第 1 组低温胁迫试验于 2021 年 12 月 15 日开始,选取培养盆中生长一致的幼苗分别转移到温度为 4℃ 和 12℃ 的培养箱进行低温胁迫,以常温(25℃)为对照,共 3 个处理,每个处理设置 3 次重复,每个重复 10 株葡萄幼苗。低温培养 4 d 后进行常温 4 d 的恢复生长,分别标记为低温胁迫阶段和恢复生长阶段,在低温胁迫 0 d(T)、低温胁迫第 4 天(T1)和恢复常温生长第 4 天(T2)分别采集葡萄幼苗顶端第 3 片幼嫩叶片,液氮冷冻后储存在-80℃ 冰箱备用。

第 2 组低温与外源 SA 喷施组合试验于 2021 年 12 月 25 日开始,用手摇喷雾器对葡萄幼苗进行外源 SA 喷施处理,喷施浓度分别为 0、0.5、1.0 mmol·L⁻¹,直到叶面喷施液滴开始脱落为止,每个处理 3 个重复,每个重复 10 株葡萄。在外源 SA 处理后,将幼苗转移到人工气候室(培养条件同上),在 4℃ 下处理 4 d。分别于第 0、2、4 天对幼苗顶端第 3 片叶进行取样,样品置于液氮冷冻后储存在-80℃ 冰箱,后续进行抗氧化酶活性的测定,对抗氧化酶活性影响最大的对应 SA 处理低温胁迫第 4 天的样品进行内源 SA 浓度的测定。

1.2 试验方法

叶片细胞膜稳定性通过测定电导率,用膜稳定指数来衡量^[14];CAT、SOD、POD 活性及 MDA 含量均使用生化试剂盒(购自北京索莱宝科技有限公

司,货号分别为 BC0200、BC0170、BC0090、BC0020)测定。内源 SA 含量的测定采用酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒(购自上海酶联生物科技有限公司,货号为 ml077224),具体步骤参考试剂盒说明书。

1.3 统计分析

采用 IBM-SPSS 23.0 统计软件和 Excel 2016 软件对各参数进行综合分析和绘图。对不同低温胁迫程度下的葡萄幼苗内源 SA 与保护酶活性及膜的损伤进行逐步回归分析,并得到回归方程,所有比较均在 95% 的概率水平上进行($P<0.05$)。

2 结果与分析

2.1 低温胁迫对酿酒葡萄幼苗叶片细胞膜稳定性和 MDA 含量的影响

植物遭受逆境时,细胞膜的稳定性会发生显著变化。如图 2A 所示,不同处理在常温(25℃)下生长的葡萄幼苗膜稳定指数无明显变化。与常温相比,12℃ 低温胁迫处理显著增加了酿酒葡萄幼苗叶片膜稳定指数,然而 4℃ 低温胁迫处理显著降低了叶片膜稳定指数,并显著低于 12℃ 处理。低温胁迫后的幼苗转移至 25℃ 恢复生长 4 d 后(第 8 天),膜稳定指数无明显变化,4℃ 处理的幼苗膜稳定指数最小,12℃ 处理的膜稳定指数仍高于常温对照,说明适宜低温增强了膜的稳定性。

如图 2B 所示,从低温胁迫前、低温胁迫 4 d 到恢复生长 4 d,常温条件(25℃)下生长的酿酒葡萄幼苗叶片丙二醛(MDA)含量变化不显著。在低温胁迫后,酿酒葡萄幼苗叶片 MDA 的含量显著增加,说明低温造成膜的损伤。此外,经 4℃ 低温胁迫处理的幼苗 MDA 含量高于 12℃ 下的含量。低温胁迫后的幼苗转移至 25℃ 恢复生长 4 d 后(第 8 天),各温

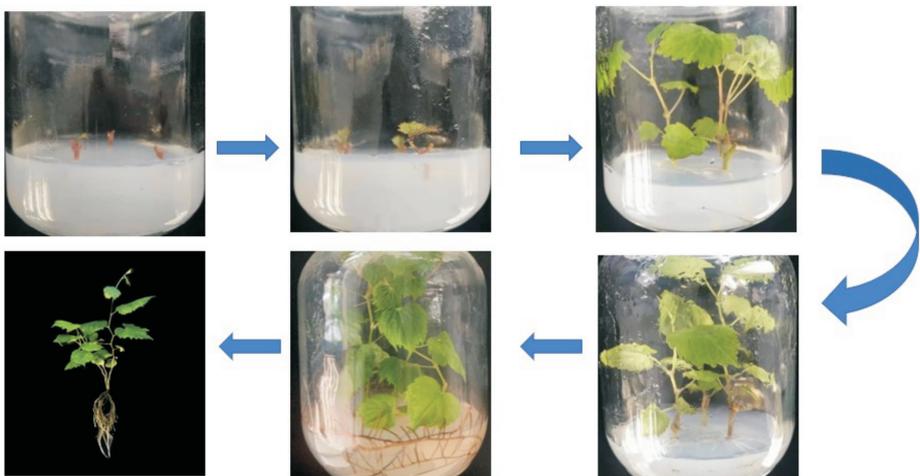


图 1 植物组织培养技术获取的试验材料

Fig.1 Plant tissue culture technique to obtain experimental materials

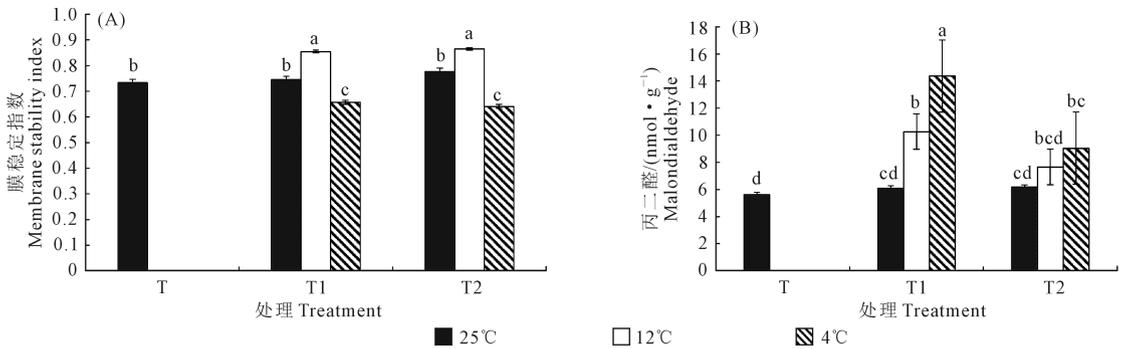
度下 MDA 的含量均降低,4℃ 处理的幼苗 MDA 含量显著降低,但仍高于常温对照及 12℃ 的 MDA 含量,恢复生长后在 25℃、12℃ 和 4℃ 处理之间 MDA 含量差异不显著。

2.2 低温胁迫对酿酒葡萄幼苗叶片抗氧化酶活性的影响

抗氧化酶具有将体内过氧化物转换为毒害较低或无害物质的功能。如图 3A 所示,低温胁迫后和恢复生长 4 d 后,常温条件下酿酒葡萄幼苗叶片的 SOD 活性无明显变化,但显著高于低温处理前叶片的 SOD 活性。低温胁迫均提高了酿酒葡萄幼苗

叶片 SOD 活性,但低温胁迫程度不同,叶片 SOD 活性的增加程度也不同。经低温 4℃ 处理的葡萄幼苗 SOD 活性显著高于 12℃ 处理。恢复生长 4 d 后(第 8 天),经过低温处理的葡萄幼苗叶片 SOD 活性均有所降低,与 12℃ 低温相比,4℃ 低温胁迫处理的幼苗 SOD 活性较高,而 4℃ 和 12℃ 处理的幼苗 SOD 活性显著高于常温生长 8 d 处理,说明低温程度加剧会诱导更高水平的 SOD。

如图 3B 所示,与低温处理 0 d 相比,低温胁迫 4 d 后和恢复生长 4 d 后常温条件下生长的酿酒葡萄幼苗叶片的 POD 活性差异不显著。低温胁迫 4 d



注:T为低温胁迫0 d,T1为低温胁迫第4天,T2为恢复常温生长第4天。不同小写字母表示处理间差异显著($P < 0.05$)。下同。

Note: T is before low temperature treatment, T1 is the 4th day of low temperature stress, T2 is the 4th day after returning to normal temperature. Different letters mean significant difference by Duncan's multiple range test ($P < 0.05$). The same below.

图 2 低温胁迫对酿酒葡萄幼苗细胞膜稳定性和 MDA 含量的影响

Fig.2 Effect of low temperature stress on membrane stability and MDA content of wine grape seedlings

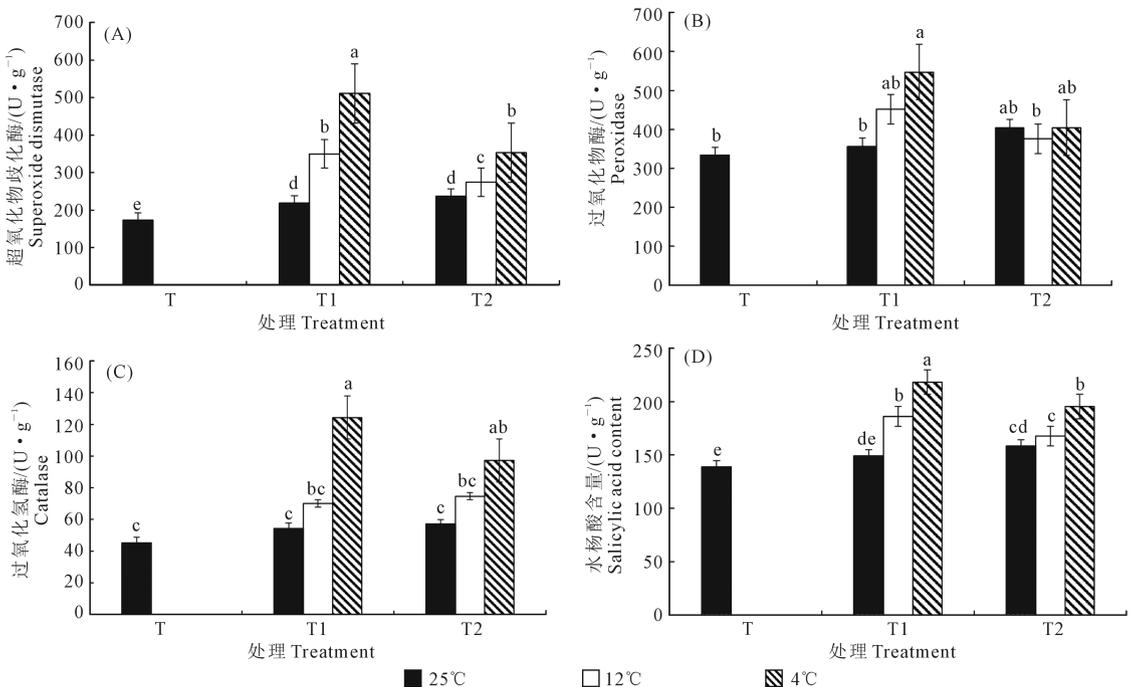


图 3 低温胁迫对酿酒葡萄幼苗抗氧化酶活性和内源水杨酸含量的影响

Fig.3 Effect of low temperature stress on antioxidant enzymes activity and endogenous salicylic acid content of wine grape seedlings

增加了叶片的 POD 活性,并且其活性随着低温程度的加剧而增加,但 4℃ 和 12℃ 低温胁迫处理间 POD 活性差异不显著。恢复生长 4 d 后(第 8 天),经过低温胁迫处理的葡萄幼苗叶片 POD 活性均有所降低,4℃ 低温胁迫处理的幼苗 POD 活性仍略高于 12℃ 处理,经低温胁迫后的所有幼苗的 POD 活性均低于对照组。

如图 3C 所示,常温条件下生长的酿酒葡萄幼苗叶片的 CAT 活性无明显变化,同 POD 活性变化趋势一致。低温胁迫均提高了酿酒葡萄幼苗叶片 CAT 活性,但低温胁迫程度不同,叶片 CAT 活性的增加幅度也不同,经 4℃ 低温处理的葡萄幼苗的 CAT 活性明显高于 12℃ 处理,12℃ 处理与常温处理之间 CAT 活性差异不显著。恢复生长 4 d 后(第 8 天),经过 4℃ 低温处理的葡萄幼苗叶片 CAT 活性降低,而 12℃ 处理的葡萄幼苗叶片 CAT 活性增加,但同低温胁迫后 CAT 活性相比差异不显著。低温胁迫处理后和恢复生长 4 d 后,4℃ 低温胁迫处理的幼苗 CAT 活性较 12℃ 低温高,显著高于常温生长 8 d 下的 CAT 活性,12℃ 处理幼苗 CAT 活性也高于对照组,但差异不显著。这说明不同的低温会诱导不同程度 CAT 的积累。

2.3 低温胁迫对酿酒葡萄幼苗叶片内源水杨酸含量的影响

如图 3D 所示,与低温处理前相比,常温条件(25℃,CK)下生长 4 d 和 8 d 后的酿酒葡萄幼苗叶片 SA 含量有所增加,但是差异不显著。低温胁迫显著增加了酿酒葡萄幼苗叶片 SA 的含量,经 4℃ 低温胁迫处理的幼苗 SA 含量显著高于 12℃ 处理的含量。低温胁迫处理的幼苗转移至 25℃ 恢复生长 4 d 后(T2),SA 的含量相对于低温胁迫阶段均显著降低,但仍高于常温对照。

2.4 低温胁迫下葡萄幼苗叶片各生理指标的相关性及回归分析

在不同程度的低温胁迫处理后,6 项抗寒指标两两相关性分析表明(表 1),SA 与 MDA、POD、SOD、CAT 均呈极显著正相关($P < 0.01$)。MDA 与膜稳定指数负相关,与 POD、SOD、CAT 均呈极显著正相关($P < 0.01$)。膜稳定指数与 CAT 显著负相关($P < 0.05$),与 SA、SOD、POD 呈负相关但不显著($P > 0.05$)。其他指标之间的相关性大部分达到极显著($P < 0.01$)或显著正相关关系。MDA 含量、SOD、CAT、POD 活性与内源 SA 含量的回归方程如表 2 所示,MDA 含量、SOD、CAT、POD 活性与内源 SA 含量之间存在线性回归关系,保护酶活性受内源 SA 和低温信号的共同调控。

表 1 葡萄叶片低温胁迫处理后各生理指标间相关系数

Table 1 Correlation coefficients among the physiological indicators of grapevine leaves after low temperature stress treatment

主要参数 Main parameter	水杨酸 SA	丙二醛 MDA	膜稳定 指数 EC	过氧化 物酶 POD	过氧化 氢酶 CAT	超氧化物 歧化酶 SOD
SA	1					
MDA	0.816**	1				
EC	-0.359	-0.297	1			
POD	0.681**	0.630**	-0.252	1		
CAT	0.778**	0.706**	-0.502*	0.499*	1	
SOD	0.925**	0.887**	-0.350	0.707**	0.864**	1

注: * 表明显著相关($P < 0.05$), ** 表示极显著相关($P < 0.01$)。

Note: * means significant difference at $P < 0.05$, ** means extremely significant difference at $P < 0.01$.

表 2 低温胁迫下葡萄幼苗叶片内源 SA 含量与 MDA、抗氧化酶活性间的逐步回归分析

Table 2 Stepwise regression analysis between endogenous SA content and MDA and antioxidant enzyme activities in leaves of grape seedlings at low temperature

因变量 Dependent variable	回归方程 Regression equation*	相关性系数 R^2	P 值 P value
MDA	$Y_1 = 0.097X - 8.34$	0.648	≤ 0.01
POD	$Y_2 = 13.689 + 2.287X$	0.436	≤ 0.01
SOD	$Y_3 = 3.617X - 324.63$	0.847	≤ 0.01
CAT	$Y_4 = 0.83X - 69.39$	0.584	≤ 0.01

注: $Y_1 - Y_4$ 分别指低温胁迫下的 MDA 含量、POD、SOD、CAT 活性; X 代表低温下的 SA 含量。

Note: $Y_1 - Y_4$ represent MDA content, POD, SOD, CAT activity under low temperature stress, respectively; X represents SA content under low temperature stress.

2.5 外源水杨酸处理对低温下葡萄幼苗叶片抗氧化酶活性的影响

如图 4A、4B、4C 所示,在葡萄幼苗叶片喷施 0.5、1.0 mmol · L⁻¹ 浓度的外源 SA 后,低温胁迫导致葡萄幼苗叶片中 SOD、POD 和 CAT 活性较对照显著增加。随着外源 SA 浓度的增加及低温胁迫持续时间的延长,SOD、POD 和 CAT 活性增加,在外源 SA 浓度为 1.0 mmol · L⁻¹ 时 SOD、POD 和 CAT 活性最强。温度、外源 SA 及两者的交互作用对 POD 和 SOD 活性产生了极显著的影响($P < 0.001$),两者交互作用对 CAT 活性影响不显著(表 3)。常温条件下喷施外源 SA 促进 SOD、POD 和 CAT 活性增加,但 SOD 活性在外源 SA 浓度为 0.5 mmol · L⁻¹ 与 1.0 mmol · L⁻¹ 之间差异不显著,与 0 mmol · L⁻¹ SA 浓度处理差异显著(图 4A),POD 和 CAT 活性在对照、不同 SA 浓度之间(常温)差异不显著(图 4B、4C)。

低温胁迫处理 2 d 和 4 d, SOD 和 POD 活性在不同浓度 SA 之间差异显著(图 4A、4B), 而低温胁迫处理 2 d 时 CAT 活性在 SA 浓度为 0.5 mmol · L⁻¹ 与 1.0 mmol · L⁻¹ 间差异不显著; 低温胁迫处理 4 d 时 CAT 活性增加, 在 SA 浓度为 0.5 mmol · L⁻¹ 与 1.0 mmol · L⁻¹ 之间差异不显著(图 4C)。低温胁迫 4 d 时, SOD、POD、CAT 活性在 SA 浓度为 1.0 mmol · L⁻¹ 时比对照分别增加 127.63%、190.00% 和 173.53%, 而在 SA 浓度为 0 mmol · L⁻¹ 时比对照在低温胁迫 4 d 后 SOD、POD、CAT 活性分别增加 102.88%、60.00% 和 137.5%, 说明外源 SA 调控 SOD、POD、CAT 活性响应低温胁迫, 其中 POD 活性

增加最多。

2.6 外源水杨酸处理对低温下葡萄幼苗叶片内源水杨酸含量的影响

如图 4D 所示, 在常温及低温条件(4℃)下喷施外源 SA 均增加了内源 SA 的含量。在对照组和外源 SA 处理组, 低温胁迫显著增加了酿酒葡萄幼苗叶片内源 SA 含量, 与常温处理相比, 对照内源 SA 含量显著增加 53.11%, 外源 SA 处理显著增加 80.36%。常温条件下外源 SA 处理比对照显著增加 18.97%, 而低温条件下 SA 处理组比对照组显著增加 40.14%。说明在低温胁迫下外源 SA 处理更能促进内源 SA 积累。

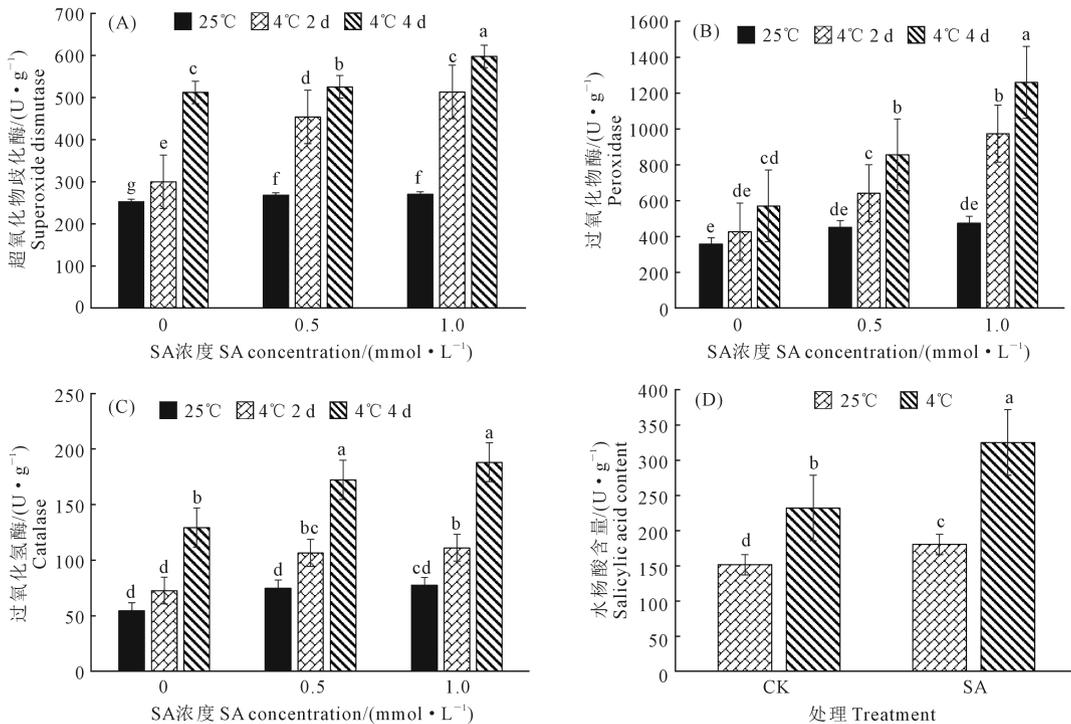


图 4 SA 处理对低温下葡萄幼苗叶片抗氧化酶活性及内源 SA 含量的影响

Fig.4 Effect of SA treatment on antioxidant enzyme activity and endogenous salicylic acid content of grape seedling leaves at low temperature

表 3 温度处理、外源 SA 及其交互作用对抗氧化酶活性影响的显著性分析

Table 3 Significance analysis of temperature, exogenous salicylic acid and their interactions on antioxidant enzyme activity

项目 Item	过氧化物酶 POD	过氧化氢酶 CAT	超氧化物歧化酶 SOD
T	**	**	**
SA	**	*	**
T×SA	**	ns	**

注: T—温度, SA—外源水杨酸, T×SA—温度与水杨酸的交互作用; “*”和“**”表示相关性分别在 0.05 和 0.01 水平上差异显著及极显著, “ns”表示差异不显著。

Note: T—temperature treatment, SA—exogenous salicylic acid treatment, T×SA—interaction between temperature treatment and exogenous salicylic acid treatment; “*”, “**” indicate significance levels at $P < 0.05$ and $P < 0.01$, ns is non-significant.

3 讨论

低温是限制葡萄种植面积扩大的主要因素之一, 由于北方冬季极端低温和春季冷害频发造成我国葡萄种植巨大的经济损失^[19]。植物的抗寒能力可以通过不同的生理机制得到增强, 其中抗氧化酶活性水平很大程度上影响植物对低温的耐受性, 这些保护酶例如 SOD、POD、CAT 等能够通过调节逆境条件下植株体内产生的活性氧水平使其达到正常的平衡状态, 进而增强植物抗寒性^[20]。此外, 活跃在植物体内微量的小分子物质也能诱导植物的耐受性, 大量研究表明, 外源 SA 可以诱导植物产生系

统获得性抗性,同时还能诱导植物对非生物胁迫的抗性^[21-22]。本试验通过研究不同程度低温对酿酒葡萄幼苗内源 SA、MDA 含量、保护酶活性以及细胞膜稳定性的影响,发现不同程度的低温均会诱导葡萄幼苗叶片细胞膜氧化程度加剧,膜稳定性减弱,抗氧化酶活性和内源 SA 含量逐渐积累。

MDA 和膜稳定指数能够反映低温造成细胞膜完整性破坏的程度^[23]。本研究发现低温逆境明显加剧了酿酒葡萄幼苗叶片细胞膜氧化程度,这与前人的研究结果基本一致^[24]。此外低温胁迫程度越高,MDA 的含量越多,细胞膜稳定指数下降越显著,这说明低温程度越高,细胞膜氧化损伤越大。植物体自身的抗氧化清除系统能够减缓非生物胁迫的危害,这是因为在低温信号的影响下,植物自身会积累超过稳态平衡的活性氧物质,对其生理产生极其严重的损害,此刻植物迅速提高抗氧化酶活性来清除过多的活性氧,但这种调节程度并不是无限制的^[21]。本试验中葡萄幼苗在遇到低温胁迫时抗氧化酶 SOD、POD、CAT 活性显著提高,低温胁迫水平不同变化趋势也不一致,温度越低时酶活性就越高。植株恢复生长后抗氧化酶活性仍高于对照,表明这些保护酶活性受低温的调控,同时在保护植物生长过程中可能发挥了持续性的作用。本研究发现,低温下葡萄幼苗叶片的 SA 含量显著增加,低温水平越高,SA 含量增加越显著。而在幼苗恢复生长时 SA 含量显著大于对照,由此表明低温逆境可能会调控葡萄植株体内 SA 的生物合成,这与李亮等^[25]对黄瓜的研究结果基本一致。

叶片上喷施 SA 显著提高了 SOD、POD、CAT 活性和内源 SA 含量。当 SA 浓度较低时,植物体内氧化和抗氧化作用会短期失衡,从而提高自身的抗氧化能力^[26-28]。激素 SA 是植物线粒体介导的防御信号和程序性细胞死亡(PCD)的关键调节因子,调节植物线粒体活性氧代谢。植物遭受病原菌感染时,SA 参与一系列细胞防御以及非生物胁迫反应,其内源 SA 含量受到多种因素的调节。在本研究中,低温和外源 SA 均诱导内源 SA 的积累,而低温胁迫条件下内源 SA 与 POD、SOD 和 CAT 活性呈正相关,通过提高 POD、SOD 和 CAT 的活性来减轻低温胁迫对植物的不利影响,这表明 SA 通过减少 ROS 的积累和提高抗氧化酶的活性来影响植物的抗性,使它们能够在低温条件下生存。而外源施用 SA 引起的内源 SA 调控植物减缓低温胁迫对葡萄幼苗生长及生理的损伤,提高其抗寒能力还需从叶片微观形态特征、光合作用、渗透调节及内源激素、转录组学测

序技术等方面进行后续的深入研究,分析 SA 信号与低温信号相关联共同调控葡萄抗逆性,揭示 SA 调控植物抗寒性的分子机制,并与大田试验相结合,细化外源 SA 喷施时间和喷施方式,确定最佳喷施方案,将是今后北方地区耐寒酿酒葡萄品种精准筛选和科学田间管理的重要研究领域和手段。

4 结 论

低温影响植物正常的生长和生理过程,并引起冷害和植物的死亡。本研究中不同程度低温胁迫导致葡萄幼苗叶片细胞膜稳定性下降,膜的氧化损伤加剧,诱导幼苗叶片抗氧化酶 SOD、POD、CAT 活性显著增加,内源 SA 含量积累;抗氧化酶活性和内源 SA 含量变化受低温胁迫水平的调节,在一定温度范围内,低温胁迫程度越大,幼苗叶片 POD、SOD、CAT 活性、内源 SA 含量增加越多。 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 外源性 SA 是缓解低温胁迫影响的较佳喷施浓度,外源性 SA 的应用明显增加了低温下葡萄叶片的 SOD、CAT 和 POD 活性和内源 SA 的积累,有效减轻了低温胁迫对葡萄幼苗伤害。结合低温胁迫及外源 SA 对抗氧化酶 SOD、POD、CAT 活性及内源 SA 含量的影响,本研究认为低温胁迫及外源 SA 诱导植物积累更多的内源 SA 调控保护酶活性,SA 在葡萄低温胁迫中发挥协同作用,降低 ROS 对细胞膜的伤害,提高葡萄对低温胁迫的耐受性。

参 考 文 献:

- [1] 王涛,梅旭荣,钟秀丽,等. 磷脂酶 D8 参与植物的低温驯化过程[J]. 植物学报, 2010, 45(5): 541-547.
WANG T, MEI X R, ZHONG X L, et al. Phospholipase D8 mediates the process of cold acclimation in *Arabidopsis thaliana* [J]. Chinese Bulletin of Botany, 2010, 45(5): 541-547.
- [2] 夏军,时晓娟,郝先哲,等. 低温对不同基因型棉种萌发过程中酶活性及激素含量的影响[J]. 植物生理学报, 2019, 55(9): 1291-1305.
XIA J, SHI X J, HAO X Z, et al. Effects of low temperature on enzyme activity and hormone content in germination of different genotypes of cotton seeds [J]. Plant Physiology Journal, 2019, 55(9): 1291-1305.
- [3] 李双铭,徐庆国,杨勇,等. 低温胁迫对结缕草抗氧化酶活性和脂肪酸含量的影响[J]. 草地学报, 2019, 27(4): 906-912.
LI S M, XU Q G, YANG Y, et al. Effects of low temperature stress on the antioxidant enzyme activities and fatty acid contents in zoysiagrass [J]. Acta Agrestia Sinica, 2019, 27(4): 906-912.
- [4] 赵悦,赵艳艳,黄霞,等. 夜间低温胁迫对番茄抗氧化酶活性的影响[J]. 青海大学学报, 2021, 39(3): 34-40.
ZHAO Y, ZHAO Y Y, HUANG X, et al. Effects of low temperature stress at night on the antioxidant enzyme activities of *Lycopersicon esculentum* Mill. [J]. Journal of Qinghai University, 2021, 39(3): 34-40.
- [5] 高青海,贾双双,苗永美,等. 亚低温条件下外源褪黑素对甜瓜幼苗氮代谢及渗透调节物质的影响[J]. 应用生态学报, 2016, 27(2): 519-524.
GAO Q H, JIA S S, MIAO Y M, et al. Effects of exogenous melatonin

- on nitrogen metabolism and osmotic adjustment substances of melon seedlings under sub-low temperature [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2016, 27(2): 519-524.
- [6] 邹凯茜, 商桑, 田丽波, 等. 低温胁迫对嫁接苦瓜幼苗渗透调节物质的影响[J]. 热带作物学报, 2018, 39(8): 1533-1539.
ZOU K X, SHANG S, TIAN L B, et al. Effects of low temperature stress on osmotic solutes of grafted bitter melon seedlings[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2018, 39(8): 1533-1539.
- [7] 刘南清, 林绍艳, 沈益新. 假俭草叶片渗透调节物质含量对冬前低温的响应及其与低温伤害的关系[J]. 草业学报, 2019, 28(3): 122-130.
LIU N Q, LIN S Y, SHEN Y X. Response of leaf osmolyte content to low temperature in autumn, and its relationship with chilling injury in centipede grass[J]. Acta Prataculturae Sinica, 2019, 28(3): 122-130.
- [8] 刘希元, 吴春燕, 张广臣, 等. 喷施外源 NO 对缓解辣椒幼苗低温伤害的机理研究[J]. 西北农林科技大学学报, 2020, 48(11): 63-70.
LIU X Y, WU C Y, ZHANG G C, et al. Mechanisms of spraying external nitric oxide to alleviate injury of pepper seedlings caused by low temperature[J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 2020, 48(11): 63-70.
- [9] 马麒龙, 鞠延仑, 李若兰, 等. 甘肃河西走廊酿酒葡萄晚霜冻害对葡萄品质的影响及预防措施[J]. 西北农业学报, 2016, 25(11): 1672-1678.
MA Q L, JU Y L, LI R L, et al. Effect of late frost on wine grape quality and preventive measures in the Hexi corridor of Gansu Province[J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica, 2016, 25(11): 1672-1678.
- [10] 谭伟, 李晓梅, 董志刚, 等. 5 个意大利酿酒葡萄品种与我国酿酒主栽品种果实品质特性比较[J]. 果树学报, 2018, 35(6): 729-740.
TAN W, LI X M, DONG Z G, et al. A comparison of the fruit quality among five wine grape varieties introduced from Italy and two main cultivated varieties in China[J]. Journal of Fruit Science, 2018, 35(6): 729-740.
- [11] 段晓凤, 张磊, 李红英, 等. 酿酒葡萄霜冻研究进展[J]. 山西农业科学, 2014, 42(10): 1148-1151.
DUAN X F, ZHANG L, LI H Y, et al. Research progress of wine grape frost injuries [J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2014, 42(10): 1148-1151.
- [12] IGNATENKO A A, TALANOVA V V, REPKINA N S, et al. Effect of salicylic acid on antioxidant enzymes and cold tolerance of cucumber plants[J]. Russian Journal of Plant Physiology, 2021, 68(3): 491-498.
- [13] ZHAO Y Y, SONG C C, BRUMMELL D A, et al. Salicylic acid treatment mitigates chilling injury in peach fruit by regulation of sucrose metabolism and soluble sugar content [J]. Food Chemistry, 2021, 358: 129867.
- [14] LI S M, ZHENG H X, LIN L, et al. Roles of brassinosteroids in plant growth and abiotic stress response[J]. Plant Growth Regulation, 2021, 93(1): 29-38.
- [15] ZHANG N, LI L J, ZHANG L R, et al. Abscisic acid enhances tolerance to spring freeze stress and regulates the expression of ascorbate - glutathione biosynthesis-related genes and stress-responsive genes in common wheat[J]. Molecular Breeding, 2020, 40(11): 108.
- [16] 丁久玲, 郑凯, 席刚俊, 等. 外源水杨酸和硒复配剂对低温胁迫下铁皮石斛抗寒性的影响[J]. 安徽农业科学, 2021, 49(22): 129-132.
- DING J L, ZHENG K, XI G J, et al. Effects of salicylic acid and selenium on cold resistance of *Dendrobium candidum* under low temperature stress[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2021, 49(22): 129-132.
- [17] 周丽霞, 曹红星, 肖勇. 外源水杨酸对低温胁迫椰子幼苗生理特性的影响[J]. 南方农业学报, 2017, 48(11): 2039-2045.
ZHOU L X, CAO H X, XIAO Y. Effects of exogenous salicylic acid on physiological characteristics of *Cocos nucifera* L. young seedlings under cold stress [J]. Journal of Southern Agriculture, 2017, 48(11): 2039-2045.
- [18] 孙玉珺, 秦东玲, 伊凡, 等. 外源水杨酸对低温胁迫下玉米幼苗生长及生理特性的影响[J]. 江苏农业学报, 2018, 34(4): 726-734.
SUN Y J, QIN D L, YI F, et al. Effects of salicylic acid on growth and physiological property of maize seedling under low temperature stress [J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2018, 34(4): 726-734.
- [19] 李桂荣, 连艳会, 程珊珊, 等. 低温胁迫对山葡萄等 6 个葡萄品种抗寒性的影响[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(8): 130-134.
LI G R, LIAN Y H, CHENG S S, et al. Effect of low temperature stress on cold resistance of several kinds of seedless grape cultivars [J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2019, 47(8): 130-134.
- [20] 肖东明, 王振平, 丁小玲. 不同低温胁迫下葡萄枝条抗寒生理指标的分析[J]. 湖北农业科学, 2015, 54(18): 4509-4513.
XIAO D M, WANG Z P, DING X L. Analysis on the physiological indexes of cold resistance of different grape branches under low temperature[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2015, 54(18): 4509-4513.
- [21] SENARATNA T, TOUCHELL D, BUNN E, et al. Acetyl salicylic acid (Aspirin) and salicylic acid induce multiple stress tolerance in bean and tomato plants[J]. Plant Growth Regulation, 2000, 30(2): 157-161.
- [22] KHAN W, PRITHIVIRAJ B, SMITH D L. Photosynthetic responses of corn and soybean to foliar application of salicylates[J]. Journal of Plant Physiology, 2003, 160(5): 485-492.
- [23] KUK Y I, SHIN J S, BURGOS N R, et al. Antioxidative enzymes offer protection from chilling damage in rice plants[J]. Crop Science, 2003, 43(6): 2109-2117.
- [24] TURANÖ, EKMEKÇI Y. Activities of photosystem II and antioxidant enzymes in chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars exposed to chilling temperatures[J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2011, 33(1): 67-68.
- [25] 李亮, 董春娟, 尚庆茂. 内源水杨酸参与黄瓜叶片光合系统对低温胁迫的响应[J]. 园艺学报, 2013, 40(3): 487-497.
LI L, DONG C J, SHANG Q M. Role of endogenous salicylic acid in responding of cucumber leaf photosynthetic systems to low temperature stress[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2013, 40(3): 487-497.
- [26] POÓR P. Effects of salicylic acid on the metabolism of mitochondrial reactive oxygen species in plants[J]. Biomolecules, 2020, 10(2): 341.
- [27] HE Y, ZHU Z J. Exogenous salicylic acid alleviates NaCl toxicity and increases antioxidative enzyme activity in *Lycopersicon esculentum* [J]. Biologia Plantarum, 2008, 52(4): 792-795.
- [28] MUTLU S, KARADAĞOĞLU Ö, ATICI Ö, et al. Protective role of salicylic acid applied before cold stress on antioxidative system and protein patterns in barley apoplast [J]. Biologia Plantarum, 2013, 57(3): 507-513.