

低温胁迫对葡萄保护酶和氧自由基的影响

刘 伟, 曲凌慧, 刘洪庆, 杨德翠, 刘 新

(青岛农业大学 生命科学院 山东 青岛 266109)

摘 要:选取3种抗寒性不同的葡萄品种(贝达(砧木)×赤霞珠×梅鹿辄)1a生枝条为供试材料,分别在-15℃、5℃、25℃下处理24 h,在处理0.3、6.9、12、24 h后,分别测量了叶片中3种保护酶的活性和氧自由基生成速率的变化。结果表明:低温处理后保护酶SOD、POD、CAT的活性均呈现先降低再升高后降低的变化趋势。贝达的保护酶活性高,且下降缓慢,梅鹿辄的保护酶活性低,下降迅速;氧自由基产生速率的变化趋势基本为先上升后下降,其中贝达的氧自由基产生速率最低,梅鹿辄的氧自由基产生速率最高。说明低温胁迫下葡萄1a生枝条的保护酶活性变化和氧自由基产生速率与其品种的抗寒性之间存在相关性。

关键词:葡萄;低温胁迫;抗寒性;保护酶

中图分类号:S 663.103.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2008)05-0021-04

葡萄是我国北方主栽的高效经济树种之一,因其味道鲜美,营养丰富而深受广大消费者的喜爱,具有极高的推广价值。然而,葡萄属于温带落叶果树,主要栽培品种抗寒性差,往北引种后遇冬季低温时易受冻害,而且不同种源之间的冻害差异很大。因此,建立一种便捷、快速的葡萄抗寒性鉴定方法具有很高的应用价值和经济价值。

在正常情况下,植物体内产生的活性氧处于一个较低的水平,不会对植物产生伤害。但当植株受到胁迫时,活性氧则会大量爆发,致使生物膜脂过氧化,对植物产生氧化伤害。植物通过超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)、过氧化物酶(Peroxidases, POD)、过氧化氢酶(Catalase, CAT)等保护酶的协同作用,使氧自由基维持在一个低水平,从而防止氧自由基伤害^[1-3]。研究表明:低温胁迫下保护酶与活性氧发生超氧化物歧化反应保护了膜,因此保护酶的活性与抗寒性有关^[4]。以保护酶活性的变化来鉴定赤苡木、厚皮甜瓜等的抗寒性强弱已被广泛报道^[5-6]。近几年来,以保护酶活性的变化来测量葡萄抗寒性的研究进展迅速^[7-9]。但多以鲜食葡萄的越冬休眠枝条作为供试材料^[9-10],以酿酒葡萄生长期1a生枝条作为供试材料测其抗寒性的研究至今尚未见报道。

试验选取了3种抗寒性不同的葡萄品种,以生长期1a生枝条作为供试材料,分别测定了不同温度下几种保

护酶活性和氧自由基变化。旨在从中筛选出在葡萄生长期与抗寒性密切相关的指标,为其引种北移筛选抗寒种源提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料均取材于青岛崂山华东百利酒庄,供试品种为贝达、赤霞珠和梅鹿辄的生长期1a生成熟枝条。其抗寒性强弱顺序是贝达(砧木)×赤霞珠×梅鹿辄。

1.2 方法

1.2.1 材料处理方法 取葡萄1a生枝条(至少有8个成熟叶片),光照2000 lx下整枝进行温度处理(-15℃、5℃和25℃),分别在处理0.3、6.9、12、24 h后取样,各设3次重复。取完材料后,放置超低温冰箱中保存。

1.2.2 超氧化物歧化酶(SOD)活性测定 采用氮蓝四唑(NBT)的光化还原法,酶活性单位(U)采用抑制光化还原NBT 50%为一个活性单位^[11]。

1.2.3 过氧化物酶(POD)活性测定 采用愈创木酚法测定,以每分钟内 ΔA_{470} 变化0.01为一个活性单位(U)^[11]。

1.2.4 过氧化氢酶(CAT)活性测定 采用高锰酸钾滴定法,以每分钟内 ΔA_{240} 变化0.1为一个酶活力单位(U)^[12]。

1.2.5 氧自由基生成速率的测定 采用王爱国的测量方法^[13]。

1.2.6 数据处理方法 采用DPS统计软件对平均数用Duncan's新复极方差进行多重比较

2 结果与分析

2.1 低温处理对3种葡萄品种1a生枝条叶片SOD酶

第一作者简介:刘伟(1982-),男,在读硕士,主要从事逆境生理方面的研究。E-mail: liuweish241@yahoo.com.cn.

通讯作者:刘新。E-mail: liuxin6080@yahoo.com.cn.

基金项目:农业部948计划资助项目(2006-G26)。

收稿日期:2007-12-31

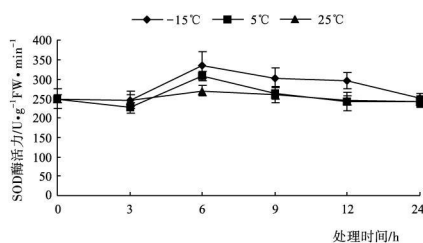


图1 低温处理对梅鹿辄1a生枝条叶片SOD酶活性的影响

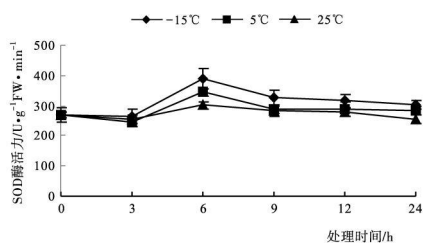


图2 低温处理对赤霞珠1a生枝条叶片SOD酶活性的影响

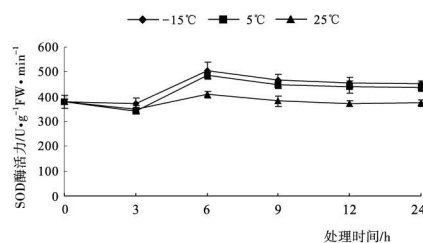


图3 低温处理对贝达1a生枝条叶片SOD酶活性的影响

活性的影响

如图1~3所示:与对照(25℃)相比, -15℃和5℃处理下的3种葡萄的1a生枝条叶片SOD酶活性明显增高。在处理0~3h之间,酶活性均下降,这可能是由于植物本身未来的及对伤害做出应激反应,从而导致了酶活性的下降。在处理6h时,各品种SOD酶活性达到顶点。其中贝达的SOD酶活性最高,赤霞珠次之,梅鹿辄的SOD酶活性最低。随后酶活性开始下降,不同品种的SOD酶活性下降幅度不同。在处理6~24h这段时间内,贝达的SOD酶活性下降最小,赤霞珠居中,梅鹿辄下降幅度最大。-15℃处理下的酶活性降幅分别为13.46%、27.3%、31.5%,5℃处理下的酶活性降幅分别为:11.43%、22.88%、27.45%。且与对照相比,-15℃处理和5℃处理下的3种葡萄SOD酶活性的降低量均达到显著水平($p < 0.05$)。这表明:SOD酶活性变化与葡萄的抗寒性有相关性。抗寒性强的葡萄品种SOD酶活性相对较高,且随着处理时间的延长变化缓

慢;抗寒性差的葡萄品种SOD酶活性相对较低,且随着处理时间的延长变化剧烈。

2.2 低温处理对3种葡萄品种1a生枝条叶片POD酶活性的影响

POD是一种重要的保护酶,主要起到降解 H_2O_2 的作用,从而使植物消除在逆境胁迫下产生的有害物质而避免对其细胞的伤害,由此表现出一定的抗逆性。如图4~6所示:低温处理后葡萄1a生枝条叶片的POD酶活性变化趋势与SOD相似,基本规律为先降低再升高后降低。POD酶活性的最高点出现在处理后6h,随后开始下降。不同品种在不同温度处理下,POD酶活性下降幅度不同,贝达在-15℃和5℃处理下的酶活性的降幅分别为11.91%和9.89%,下降幅度最小。梅鹿辄POD酶活性的降幅分别为14.5%和12.55%,下降幅度最大。且与对照相比,低温处理下3种葡萄POD酶活性的降低量均达到显著水平($p < 0.05$)。这表明:POD酶活性的变化与葡萄的抗寒性有相关性。

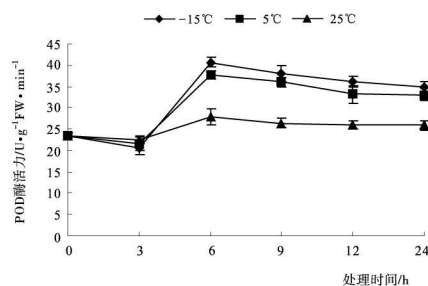


图4 低温处理对梅鹿辄1a生枝条叶片POD酶活性的影响

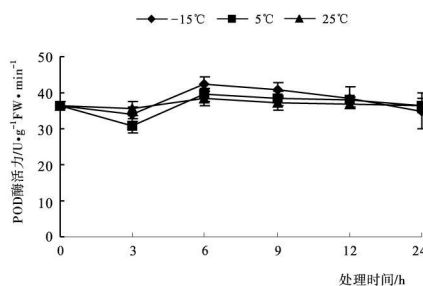


图5 低温处理对赤霞珠1a生枝条叶片POD酶活性的影响

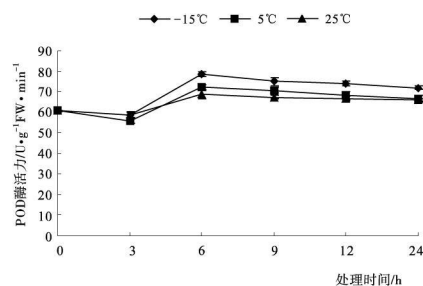


图6 低温处理对贝达1a生枝条叶片POD酶活性的影响

2.3 低温处理对3种葡萄品种1a生枝条叶片CAT酶活性的影响

CAT是另一种重要保护酶,主要作用是分解 H_2O_2 ,它与SOD、POD协同作用,使自由基维持在较低水平,从而防止自由基伤害。如图7~9所示:低温处理后葡萄1a生枝条叶片的CAT酶活性变化趋势与SOD、POD相似,基本规律为先降低再升高后降低。在整个低温处理

过程中,贝达的CAT酶活性一直较高,下降幅度较小,梅鹿辄的CAT酶活性则一直相对较低,下降幅度较大。与对照相比,-15℃处理和5℃处理下的3种葡萄CAT酶活性的降低量均达到显著水平($p < 0.05$)。这表明:CAT酶活性的变化与葡萄的抗寒性有相关性。

2.4 低温处理对3种葡萄品种1a生枝条叶片氧自由基生成速率的影响

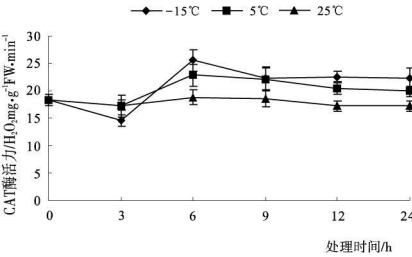


图 7 低温处理对梅鹿辄 1 a 生枝条叶片 CAT 酶活性的影响

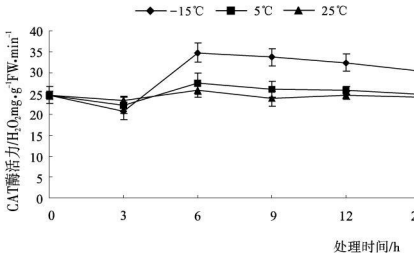


图 8 低温处理对赤霞珠 1 a 生枝条叶片 CAT 酶活性的影响

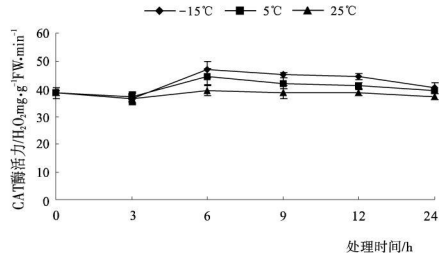


图 9 低温处理对贝达 1 a 生枝条叶片 CAT 酶活性的影响

由图 9~12 可知, 随着低温胁迫的加剧, 3 种葡萄叶片的氧自由基产生速率总趋势为先升高后降低。0~6 h 氧自由基产生速率不断增大, 在 6 h 时基本达到顶点, 结果表明 6 h 时植物体叶片受低温胁迫损伤最为严重。在低温胁迫后期, 氧自由基产生速率下降, 可能是植物体

对逆境产生应答反应。同时发现贝达的氧自由基产生速率最低, 变化最小, 梅鹿辄的产生速率最快, 变化最大。与对照相比, -15℃和 5℃处理下 3 种葡萄氧自由基产生速率的增加量均达到显著水平($p<0.05$)。

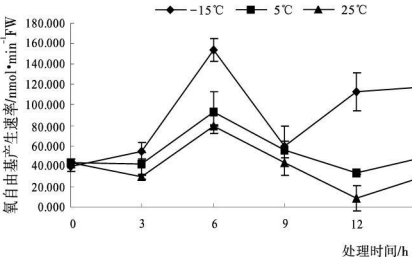


图 10 低温处理对梅鹿辄 1 a 生枝条叶片 氧自由基产生速率的影响

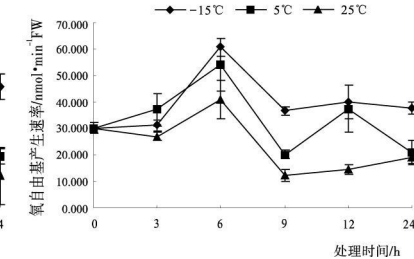


图 11 低温处理对赤霞珠 1 a 生枝条叶片 氧自由基产生速率的影响

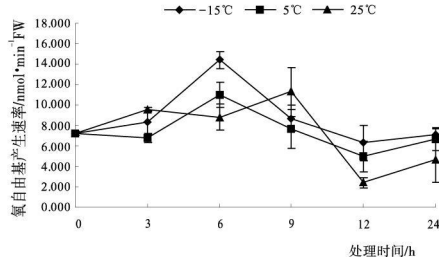


图 12 低温处理对贝达 1 a 生枝条叶片 氧自由基产生速率的影响

3 讨论

3.1 保护酶与葡萄抗寒性之间的关系

SOD、POD 和 CAT 是植物对膜脂过氧化的酶促防御系统中重要的保护酶。当植物体受到外界胁迫时, 植物会通过三者的协同作用, 使氧自由基维持在一个较低水平, 从而防止自由基伤害^[1-3]。在低温胁迫下, 保护酶与活性氧和自由基会发生超氧化歧化反应, 从而保护膜不受伤害, 因此保护酶与植物的抗寒性密切相关^[4]。SOD、POD、CAT 这 3 种保护酶都是影响和评价植物抗寒性的重要指标。

近几年来, 以保护酶活性的变化来测量葡萄抗寒性的研究进展迅速^[7-9]。但目前的研究大多采用鲜食葡萄的越冬休眠枝条作为供试材料^[9,10], 这种测量方法无法在越冬之前判断出引进品种抗寒性的强弱, 在优良葡萄引种移栽方面具有明显的滞后性。随着处理时间的延长, 保护酶 SOD、POD、CAT 的酶活性均呈现先降低再升高后降低的变化趋势。在处理 6 h 后, 保护酶的酶活性基本达到顶点, 随后开始下降。3 种葡萄的酶活性下降幅度不同, 基本规律为: 一定处理时间内, 贝达的下降幅

度为最小, 赤霞珠居中, 梅鹿辄下降幅度最大。即抗寒性强的葡萄品种 SOD、POD、CAT 酶活性高, 随着时间和温度的变化下降缓慢。抗寒性差的品种酶活性低, 随着时间和温度的变化下降剧烈。这与王淑杰^[7]在 BA 1, 康太, 巨峰和玫瑰香 4 种葡萄品种, 李国^[8]在 7 个鲜食葡萄品种乍娜, 里扎马特, 矢富罗莎, 奥古斯特, 美人指, 红地球和京秀上的研究结果一致。这说明, 抗寒性强的葡萄品种可以利用保护酶有效的阻止活性氧引起膜脂过氧化及其他伤害过程, 其体内较高的保护酶活性是其抗寒性强的原因之一。

试验同时表明, 在葡萄生长期利用保护酶活性的变化来测定其抗寒性强弱的方法是可行的。保护酶 SOD、POD 和 CAT 均可用来测定生长期酿酒葡萄的抗寒性。有研究表明: 在低温胁迫下, 3 种保护酶活性变化有差异。相对于 POD 和 CAT, SOD 的酶活性变化速度较快^[7]。该试验结果表明: 保护酶 SOD 酶活性高, 变化也更为明显, 且操作简便, 重复性好, 可以作为快速鉴定葡萄的抗寒性的主要指标之一。保护酶 POD 和 CAT 可作为辅助的测量指标。

3.2 氧自由基产生速率与葡萄抗寒性之间的关系

氧自由基是活性氧的一种,其产生可引起脂质过氧化,生物膜透性增加等伤害,因此氧自由基产生速率与植物体抗性强弱密切相关。保护酶可清除植物体内过多的氧自由基,其活性的提高是植物适应逆境的方式之一。随着处理时间的延长和低温胁迫的加剧,3种葡萄叶片的氧自由基产生速率变化明显,基本趋势为先升高后降低。这与李晶在低温处理下红松幼苗氧自由基产生速率的变化趋势基本一致^[4]。在0~6 h之间,各品种氧自由基产生速率不断增大,是由于植物体内的保护酶活性比较低,氧自由基的清除和产生失去平衡,从而引起了 $O_2^{\cdot -}$ 的大量积累。胁迫后期的下降可能由于保护酶活性的提高,分解氧自由基,促使其产生和清除达到平衡,有效的阻止了氧自由基引起的脂质过氧化,生物膜透性增加等伤害过程。试验发现在25℃正常生长条件下氧自由基也有一定变化,可能是由于植物体由活体变为离体,对植物体而言属于机械伤害,但保护酶的活性基本没有变化,而且氧自由基变化幅度较少,可能是由于植物体内其它清除氧自由基的酶对其进行的清除,是自由基未大量积累,从而没有诱导SOD活性的提高。据推测氧自由基的生成速率与葡萄抗寒性有一定相关性,抗寒性强的葡萄品种如贝达氧自由基产生的速率低,增幅小,抗寒性弱的葡萄品种如梅鹿辄氧自由基产生的速率高,增幅大。同时该试验发现氧自由基对逆境较为敏感,是否适合作为酿酒葡萄的抗寒指标,还需要进一步研究。

参考文献

- [1] Kuk Y I, Shin J S, Burgos N R, et al. Antioxidative enzymes offer protection from chilling damage in rice plant[J]. *Crop Sci*, 2003, 43: 2109-2117.
- [2] Trkan I, Bor M, Koca H. Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought-tolerant *P. acutifolius* Gray and drought-sensitive *P. vulgaris* L. subjected to polyethylene glycol mediated water stress[J]. *Plant Sci*, 2005, 168: 223-231.
- [3] Demiral T, Trkan I. Does exogenous glycinebetaine affect antioxidative system of rice seedlings under NaCl treatment[J]. *J Plant Physiol*, 2004, 161: 1089-1100.
- [4] 李荣富, 王丽雪. 葡萄抗寒性研究进展[J]. *内蒙古农业科技*, 1997(6): 24-26.
- [5] 魏来, 苏冬梅, 柳新红, 等. 低温锻炼对赤英木幼苗抗氧化酶活性和保护物质的影响[J]. *浙江林业科技*, 2007, 27(2): 45-47.
- [6] 武雁军, 刘建辉. 低温胁迫对厚皮甜瓜幼苗抗寒性生理生化指标的影响[J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2007, 35(3): 139-143.
- [7] 王淑杰, 王连君, 王家民, 等. 抗寒性不同的葡萄品种叶片中氧化酶活性及变化规律[J]. *中外葡萄与葡萄酒*, 2000(3): 29-30.
- [8] 李国, 牛锦凤. 鲜食葡萄枝条中氧化酶活性变化规律及抗寒性比较[J]. *北方园艺*, 2006(3): 21-23.
- [9] 马正君, 牛锦凤, 李国, 等. 几个葡萄品种枝条中氧化酶活性变化规律及抗寒性比较[J]. *农业科学研究*, 2006, 27(4): 16-19.
- [10] 牛锦凤, 王振平, 李国, 等. 几种方法测定鲜食葡萄枝条抗寒性的比较[J]. *果树学报*, 2006, 23(1): 31-34.
- [11] 张志良. *植物生理学实验指导*[M]. 北京: 高等教育出版社, 2003: 123-124, 268-269.
- [12] 陈建勋, 王小峰. *植物生理学实验指导*[M]. 广州: 华南理工大学出版社, 2002: 119-122.
- [13] Wang A G, Lou G H. Quantitative relation between the reaction of hydroxylamine and superoxide anion radical in plant[J]. *Plant Physiol Commun*, 1990(6): 55-57.
- [14] 李晶, 阎秀峰, 祖元刚. 低温胁迫下红松幼苗活性氧的产生及保护酶的变化[J]. *植物学报*, 2000, 42(2): 148-152.

Effects of Chilling Stress on Protective Enzymes Activities and Oxygen Free Radical of Grapes

LIU Wei, QU Ling-hui, LIU Hong-qing, YANG De-cui, LIU Xin

(College of Life Sciences, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109, China)

Abstract: Three one-year-old branches of grapes with different cold-resistance were treated 24 h under -15°C , 5°C and 25°C . The changes of the activities of several protective enzymes and the formation rate of oxygen free radical were measured after treatment 0, 3, 6, 9, 12, 24 h. The results showed that: (1) with the prolonged of the treatment, the activities of protective enzymes (SOD, POD, CAT) decreased at the earlier stage and increased then and decreased finally. Beida showed high activity of protective enzymes and decreased slowly, while Meiluzhe showed low activity of protective enzymes and decreased quickly. (2) Changes of the formation rate of oxygen free radical increased firstly and then decreased. The formation rate of oxygen free radical of Beida were higher than others, the last one was Meiluzhe. It suggested that there was correlation between cold-resistance of grapes and the activities of protective enzymes and the formation rate of oxygen free radical of one-year-old branches of grapes.

Key words: Grapes; Chilling stress; Cold-resistance; Protective enzymes