

24-表油菜素内酯对农药处理下葡萄叶片光合特性和抗逆性的影响

彭小琴, 惠竹梅, 张 晖, 高江曼

(西北农林科技大学葡萄酒学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要: 研究农药百菌清处理前用外源 24-表油菜素内酯(24-epibrassinolide, EBR)预处理对酿酒葡萄品种‘赤霞珠’(Cabernet Sauvignon)光合特性、抗氧化系统以及农药降解代谢的影响, 探讨 EBR 缓解农药对葡萄植株的伤害以及降低农药残留的作用。以酿酒葡萄品种赤霞珠盆栽苗为试材, 研究 EBR 处理对百菌清胁迫下葡萄叶片光合气体交换参数、叶绿素荧光参数、活性氧和丙二醛含量、抗氧化物质含量、解毒酶活性以及叶片百菌清残留量的影响。结果表明: 与对照相比, $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ EBR 单独处理可提高葡萄叶片的光合特性, CHT 处理(600 倍液的百菌清)抑制了叶片光合作用, 与 CHT 处理相比, EBR + CHT 处理可显著提高叶片净光合速率(P_n)、气孔导度(G_s)和胞间 CO_2 浓度(C_i), 以及叶片光合系统 II(PSII)原初光能转换率(F_v/F_m)、实际光化学效率(Φ_{PSII})和光化学猝灭系数(qP); 百菌清 CHT 处理使葡萄叶片过氧化氢(H_2O_2)、超氧阴离子($\text{O}_2^{\cdot-}$)和丙二醛(MDA)含量显著升高, 而 EBR + CHT 处理使 H_2O_2 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 和 MDA 含量分别比 CHT 处理降低 32.5%、15.8% 和 4.7%, 同时使还原型谷胱甘肽(GSH)和抗坏血酸(AsA)含量显著高于 CHT 处理; $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ EBR 单独处理以及 CHT 处理均使叶片过氧化物酶(POD)、谷胱甘肽转移酶(GST)和谷胱甘肽还原酶(GR)活性有所提高, 与 CHT 处理相比, EBR + CHT 处理使叶片解毒酶活性进一步增强; EBR 预处理加速了百菌清在叶片中的降解, 显著降低了叶片农药残留量。研究得出: $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ EBR 处理可促进葡萄叶片光合作用, 提高抗氧化物质含量以及解毒酶活性, 600 倍液百菌清处理损害了葡萄叶片正常的光合作用和氧化还原平衡, 外源 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ EBR 预处理能通过改善叶片光合特性, 减少活性氧物质和丙二醛的积累以及提高解毒酶活性以促进百菌清降解, 从而缓解农药对植株的伤害。

关键词: 葡萄叶片; 24-表油菜素内酯; 百菌清处理; 光合作用; 抗氧化物质

中图分类号: S663.1; S601 **文献标志码:** A

Effects of 24-epibrassinolide on photosynthetic characteristics and resistance system in grape leaves after pesticide treatment

PENG Xiao-qin, XI Zhu-mei, ZHANG Hui, GAO Jiang-man

(College of Enology, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi, 712100, China)

Abstract: This study was conducted to determine the influences of exogenous EBR (24-epibrassinolide) on the photosynthetic characteristics, antioxidant systems and pesticide degradation metabolism of wine grape variety Cabernet Sauvignon, and to explore EBR-induced alleviation of pesticide damage to the vines and its role in reducing pesticide residue. Using wine grape variety Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera* L.) potted seedlings as the experimental material, effects of EBR on the photosynthetic gas exchange characteristics, chlorophyll fluorescence parameters, reactive oxygen species and malondialdehyde contents, antioxidant substances content, detoxification enzyme activities and chlorothalonil residue in grape leaf were investigated. In comparison to the control, $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ EBR treatment alone could improve photosynthetic characteristics in grape leaf, and chlorothalonil treatment (600 times diluent) had an inhibiting effect. Compared with the CHT treatment, EBR + CHT treatment could improve leaf net photosynthetic rate (P_n), stomatal conductance (G_s), as well as intercellular CO_2 concentration (C_i) significantly, and it could also increase photosynthetic

收稿日期: 2014-05-13

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金项目(CARS-30); 陕西省自然科学基金项目(2011JM3004)

作者简介: 彭小琴(1989—), 女, 重庆铜梁人, 在读硕士, 主要从事葡萄与葡萄酒学研究。E-mail: 854800597@qq.com。

通信作者: 惠竹梅(1969—), 女, 陕西耀县人, 副教授, 主要从事葡萄与葡萄酒学研究。E-mail: xizhumei@nwsuaf.edu.cn。

system II (PSII), photochemical conversion rate (Fv/Fm), actual photochemical efficiency ($\Phi PSII$) and photochemical quenching coefficient (qP) significantly. Compared with the control, chlorothalonil treatment could cause significant increase of hydrogen peroxide (H_2O_2), superoxide anion ($O_2^{\cdot -}$) and malondialdehyde (MDA) contents in grape leaf, while EBR + CHT treatment made them decreased by 33.4%, 15.8% and 6% respectively compared with CHT treatment and also it made glutathione (GSH) and ascorbic acid (AsA) contents increased by 5.6% and 18.2% on average. Exogenous $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ EBR treatment alone and CHT treatment could both enhance activities of peroxidase (POD), glutathione-s-transferase (GST) and glutathione reductase (GR) in grape leaves significantly, and EBR + CHT treatment could further enhance enzyme activities compared with CHT treatment. EBR pretreatment accelerated the degradation of chlorothalonil in leaves and reduced the pesticide residues significantly. In conclusion, $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ EBR treatment alone could promote grape leaf photosynthesis and increase antioxidant contents as well as detoxification enzyme activities, and chlorothalonil treatment (600 times diluent) damaged the normal photosynthesis and redox balance of grape leaves, while exogenous $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ EBR pretreatment could improve leaf photosynthesis and reduce the accumulation of reactive oxygen species and MDA. It could also enhance detoxification enzyme activities to promote the degradation of chlorothalonil in leaves, so as to mitigate the harm of pesticide on plants.

Keywords: grape leaves; 24-epibrassinolide; chlorothalonil treatment; photosynthesis; antioxidant system

现代农业生产中农药仍然是控制作物病虫害、提高产量和品质最经济有效的方式,但这些有机物也能导致作物叶片萎黄、光合作用降低、营养物质缺乏以及生物量的减少^[1]。农药所带来的污染,不仅直接污染农产品,还对土壤、大气等周围环境以及人类健康形成持续的威胁^[2]。我国主要属于大陆性季风气候,雨热同季,在葡萄生长发育过程中容易发生真菌病害,因此葡萄栽培管理中通常会使用农药防治真菌病害,这些农药可以进入葡萄果实甚至还能通过发酵过程进入葡萄酒中,影响发酵进程及香气的形成^[3]。在长期进化中植物可以通过将农药代谢为毒性低的产物隔离储存从而起到解毒的目的,其中的代谢过程涉及各种酶类和解毒物质的协同作用^[4]。但由于植物自身解毒机制的运行可能需要较长的时间,所以通常可以通过物理、化学和生物手段加速农药残留的降解^[5]。油菜素内酯(brassinosteroids, BRs)是广泛存在于植物中的甾醇类激素,参与植株多种生长代谢和抗逆过程^[6-7]。因此,研究外源BRs对农药处理后葡萄叶片光合特性、抗氧化防御系统以及农药降解代谢的影响,探讨BRs与农药共同作用下葡萄叶片生理指标的变化,对于BRs在农业生产中的应用具有重要的意义。BRs具有较高的生理活性,可以提高植株对病害等生物胁迫以及一系列非生物胁迫的耐受性,从而缓解逆境对植株造成的损害^[8-9]。许多研究指出采收前使用少量油菜素内酯处理黄瓜^[10]、油菜^[11]、水稻^[12]等多种作物,能显著降低多菌灵、百菌清、毒死蜱和除虫菊酯等多种农药的残留。目前关于BRs参与植物逆境胁迫的生理机制及其信号转导途径的研究较多,而

BRs作为对环境无污染的植物激素,其缓解农药对植株的伤害以及促进农药降解代谢的研究在生产中具有重要意义,但有关外源BRs缓解农药对葡萄的伤害以及加速农药降解方面的研究国内外鲜见报道。本文以欧亚种(*V. vinifera* L.)酿酒葡萄品种赤霞珠(*Cabernet Sauvignon*)盆栽扦插苗为试材,研究外源EBR(24-Epibrassinolide)处理对农药百菌清胁迫下葡萄叶片光合作用,抗氧化系统以及农药降解代谢的影响,探讨EBR和农药共同处理对葡萄植株的生理影响,为生产中进一步利用EBR减轻农药对植株的伤害及促进农药降解提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

供试品种为欧亚种(*V. vinifera* L.)酿酒葡萄‘赤霞珠’(*Cabernet Sauvignon*)。葡萄枝条于2012年3月扦插于高18 cm、盆口直径26 cm、盆地直径14 cm的塑料花盆中,每盆种植1株,盆中土样重约4 kg,配比为原土(v):珍珠岩(v):腐殖质(v) = 2:1:1,当年冬季留芽修剪后,置于简易温室中进行正常的管理(温度 $10^{\circ}\text{C} \sim 25^{\circ}\text{C}$,自然光照)。2013年5月当赤霞珠幼苗长到13~15片完全展开叶时,选取生长势基本一致的植株进行处理。

1.2 试验设计

试验共设4个处理,如表1。

CK、EBR、CHT和EBR + CHT四个处理中,每个处理3个重复,每个重复8株葡萄苗。试验在晴朗无风的下午进行,用容量为250mL的喷壶喷施植株所有叶片的正反面,以叶面滴水为止。喷施前EBR

表 1 实验处理

Table 1 Experimental treatments

时间/h Time	处理 Treatment			
	CK	EBR	CHT (Chlorothalonil)	EBR + CHT
0	喷施清水 Spraying water	喷施 0.1 mg·L ⁻¹ EBR Spraying 0.1 mg·L ⁻¹ EBR	喷施清水 Spraying water	喷施 0.1 mg·L ⁻¹ EBR Spraying 0.1 mg·L ⁻¹ EBR
24	喷施清水 Spraying water	喷施清水 Spraying water	600 倍百菌清 Spraying chlorothalonil	600 倍百菌清 Spraying chlorothalonil

和 CHT 均用 98% 的乙醇溶解后稀释到适宜浓度,乙醇最终含量为 0.1% (v/v),用吐温-80 作为展开剂,最终含量为 0.1% (v/v),清水(对照)也加入同样体积的 98% 乙醇和吐温-80。EBR 购自加拿大 TRC 公司,百菌清为 75% 的可湿性粉剂,购自先正达苏州作物保护有限公司。记百菌清处理当日为 0 d,分别于百菌清处理后第 1、3、5、7、9 d 进行采样,采样时每个重复随机选取 5 株对其第 6~12 节位的叶片随机采样,每次每株采集一片叶片,采集的叶片去除主脉后剪成宽 2 mm 左右的细丝,每个样品混匀后放入 -40℃ 的冰箱中保存备用,供各项指标的测定。

1.3 试验方法

1.3.1 光合作用参数测定 采用便携式光合测定系统(LI-6400, USA),于 9:00—11:00 选取植株顶端下第 6~7 片叶片进行,采用开放式气路,使用红蓝光光源,控制光强为 1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,叶室温度为 25 ± 1℃,参比室 CO₂ 浓度为 400 ± 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,相对湿度(RH)为 60%~70%,测定指标包括净光合速率(P_n)、气孔导度(G_s)和胞间 CO₂ 浓度(C_i)。

1.3.2 叶绿素荧光参数测定 与光合作用测定同步进行,采用 PAM-2500 型便携式荧光仪(德国 Walz 公司)。叶片经过 30 min 充分暗适应后,照射测量光得到原初荧光(F_0),随后用饱和脉冲光(8 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)照射 0.8 s 后关闭,得到暗适应最大荧光(F_m)。接着用测量光(600 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)照射,待叶片光合作用达到稳态后得到光合稳态荧光(F_s),然后再次打开饱和脉冲光(8 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 20 kHz, 0.8 s)得到光化学作用下最大荧光 F_m' 。测定 PSII 的最大光合量子产量 F_v/F_m ,光化学猝灭系数 qP ,非光化学猝灭系数 NPQ ,PSII 实际光化学效率 Φ_{PSII} 。

1.3.3 超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)、过氧化氢(H_2O_2)和丙二醛(MDA)含量测定 $O_2^{\cdot-}$ 含量测定采用对氨基苯磺酸法, H_2O_2 含量测定采用硫酸钛比色法,MDA 含量测定采用硫代巴比妥酸法^[13],以单位鲜重计算。

1.3.4 抗氧化剂含量的测定 还原型谷胱甘肽

(GSH)测定用 5,5-二硫代对硝基苯甲酸(DTNB)显色法^[14],抗坏血酸(AsA)含量测定采用二联嘧啶分光光度法^[15]。

1.3.5 保护酶活性的测定 过氧化物酶(POD)和谷胱甘肽还原酶(GR)活性参照陈建勋和王晓峰^[16]的方法测定,谷胱甘肽-s-转移酶(GST)活性参照 Mauch^[17]的方法进行。以 OD 值每分钟变化 0.1 为 1 个活性单位(U),酶的活性以 $U\cdot\text{mg}^{-1}$ 蛋白表示。

1.3.6 百菌清残留量的测定 参照 NY/T761-2008^[18],采用 GC-2010(日本岛津),带 ECD 电子捕获检测器,色谱柱为 DB-5 型(30 m × 0.25 mm × 0.25 μm)。高纯度氮气作为载气,1.0 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ 恒流方式,恒压 103.4 kPa;进样模式为不分流进样,进样量为 1 μl ;程序升温为:进样口 200℃,检测器为 300℃,柱温起始温度为 150℃,保持 2 min,以 6℃· min^{-1} 升高到 270℃,保持 8 min。

1.4 数据处理

试验数据采用 Excel 和 DPS7.55 数据分析软件进行统计分析,并用 Duncan's 多重比较法进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 EBR 对农药处理下葡萄叶片气体交换参数的影响

从图 1(A~C)中可以看出,各处理净光合速率(P_n)变化比较稳定,后期有所波动,气孔导度(G_s)和胞间 CO₂ 浓度(C_i)基本呈现先下降后升高的变化趋势。与对照(CK)相比,EBR 与 EBR + CHT 两个处理均使葡萄叶片 P_n 、 G_s 和 C_i 升高,且与对照之间差异达显著水平,而这两个处理之间总体无显著差异($P > 0.05$);CHT 处理使 P_n 、 G_s 和 C_i 显著降低,但 EBR + CHT 处理使葡萄叶片 P_n 、 G_s 和 C_i 比单独 CHT 处理分别提高 40.9%、59.4% 和 37.0%,EBR + CHT 与 CHT 处理的 P_n 、 G_s 和 C_i 差异均达显著水平。说明 EBR 处理可缓解百菌清对葡萄光合作用的抑制,提高葡萄叶片的光合特性。

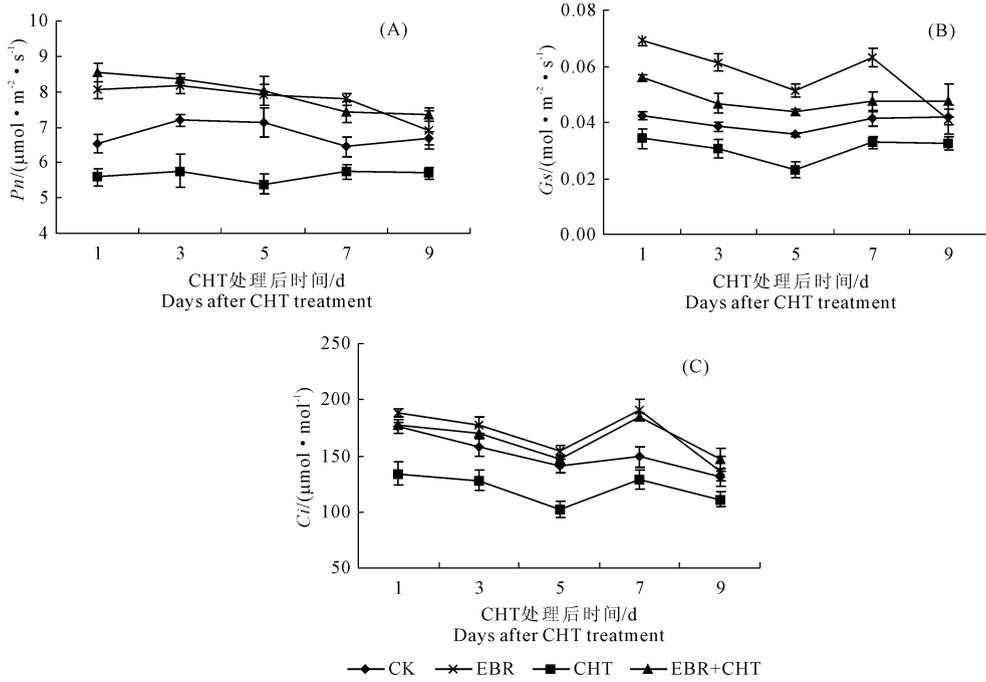


图 1 EBR 预处理对葡萄叶片光合气体交换参数的影响

Fig. 1 Effects of EBR pretreatment on photosynthetic characteristics of grapevine leaves

2.2 EBR 处理对农药处理下葡萄叶片叶绿素荧光参数的影响

如图 2A 所示,与对照(CK)相比,EBR 处理使 F_v/F_m 前 3 d 高于 CK,但后期无显著差异,CHT 处理使 F_v/F_m 显著降低而 EBR + CHT 处理使 F_v/F_m 显著高于 CK 和 CHT 处理 ($P > 0.05$)。与对照相

比,EBR 处理使 Φ_{PSII} 除在个别时期(第 5、9 d)显著低于对照外,其余时期与对照之间无显著差异,而 qP 平均低于对照 10.9%;CHT 及 EBR + CHT 处理均使叶片 Φ_{PSII} 和 qP 显著低于对照,但 EBR + CHT 处理显著缓解了农药处理下叶片 Φ_{PSII} 和 qP 的降低(图 2B,图 2C)。

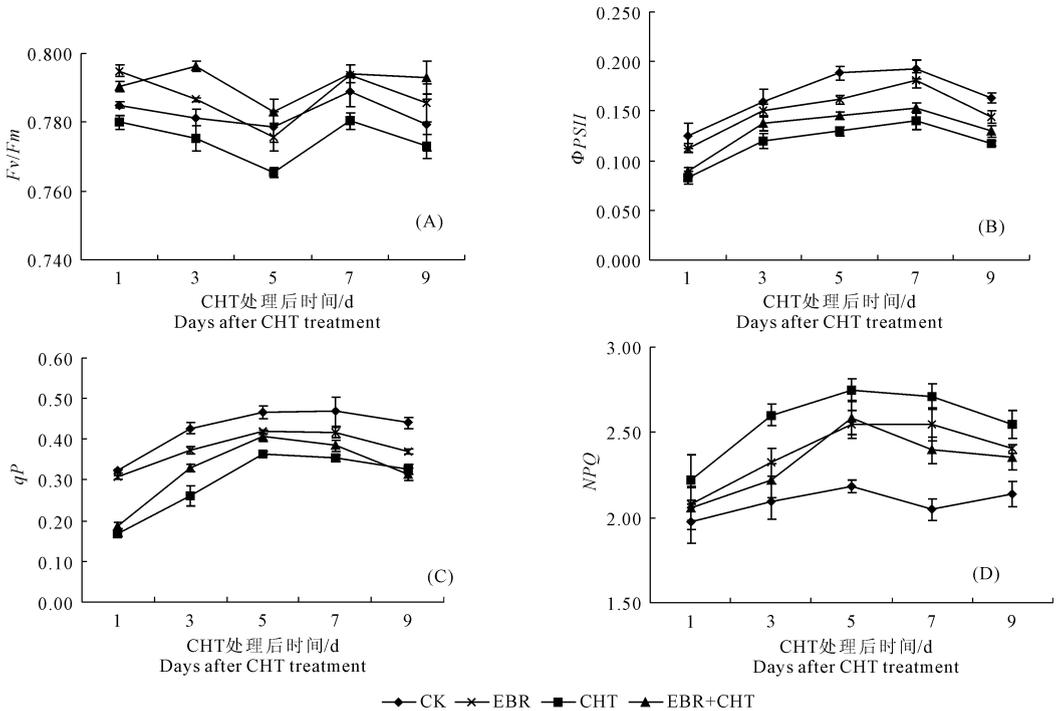


图 2 EBR 预处理对葡萄叶片叶绿素荧光参数的影响

Fig. 2 Effects of EBR pretreatment on chlorophyll fluorescence characteristics of grapevine leaves

NPQ 是非光化学猝灭系数,如图 2D 所示,与对照相比,各处理整体上有明显促进 NPQ 升高的作用,EBR、CHT 和 EBR + CHT 处理使 NPQ 平均高于对照 14%、22.9% 和 11.1%,其中 EBR + CHT 处理使 NPQ 显著低于 CHT 处理,说明 EBR 预处理可以缓解农药对叶片 PSII 的伤害。

2.3 EBR 处理对农药处理后葡萄叶片 H_2O_2 、 $O_2^{\cdot-}$ 及 MDA 含量的影响

由图 3A 可知,与对照相比,EBR 处理使过氧化氢(H_2O_2)含量降低,但与对照之间无显著差异,

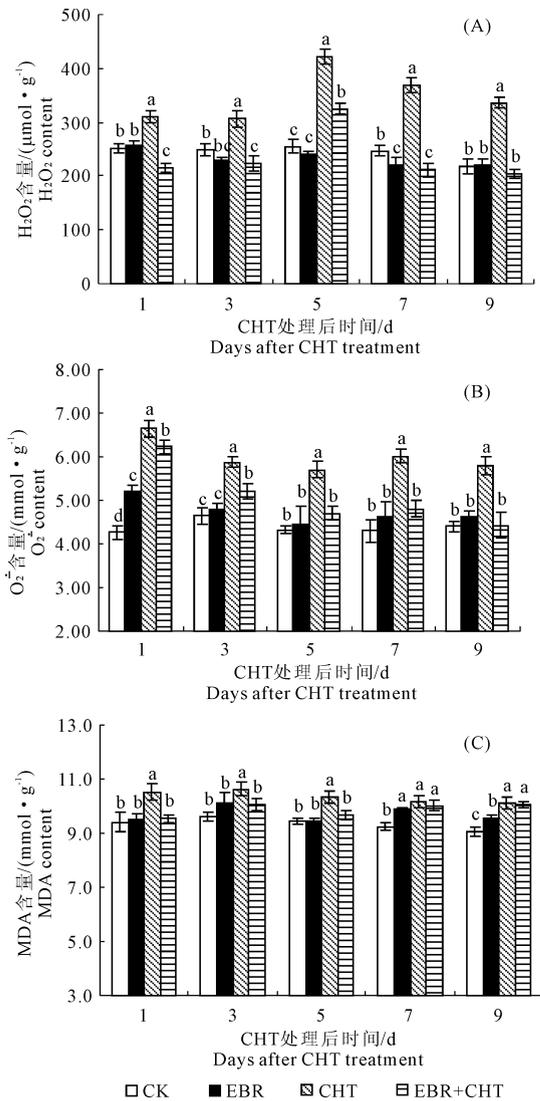


图 3 EBR 预处理对葡萄叶片 H_2O_2 、 $O_2^{\cdot-}$ 和 MDA 含量的影响

Fig.3 Effects of EBR pretreatment on H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$ and MDA contents in grapevine leaves

注:图中数值用平均值表示,用邓肯新复极差测验($P < 0.05$)。不同小写字母表示不同处理之间差异显著性。

Note: Each value represents mean of three replicates \pm SD (standard deviation). Different letters indicate significant differences between treatments ($P < 0.05$).

CHT 处理使 H_2O_2 含量显著升高 ($P > 0.05$),平均升高幅度为 43%,EBR + CHT 处理使 H_2O_2 含量总体低于对照和 CHT 处理,且与 CHT 处理之间差异达显著水平。

由图 3B 可知,EBR、CHT 与 EBR + CHT 三个处理均使葡萄叶片超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)含量升高,其中 EBR 处理与对照之间无显著差异,而 CHT 处理使 $O_2^{\cdot-}$ 含量平均升高 37.2%,差异达显著水平;EBR + CHT 处理使叶片 $O_2^{\cdot-}$ 含量显著低于 CHT 处理 ($P < 0.05$)。

由图 3C 可知,前期 EBR 和 EBR + CHT 处理使叶片丙二醛(MDA)含量与对照无显著差异,但第 7 d 后 MDA 含量有所增高;CHT 处理使叶片 MDA 含量显著高于对照,且比 EBR + CHT 处理平均升高 5%。

总体上 EBR 处理对活性氧物质(ROS)和 MDA 含量基本没有显著影响,CHT 处理使 ROS 和 MDA 含量明显增加,而 EBR + CHT 处理有显著缓解 ROS 和 MDA 含量升高的作用。说明农药胁迫打破了植株体内的氧化还原平衡,外源 EBR 可以缓解这种平衡的破坏。

2.4 EBR 处理对农药处理后葡萄叶片 GSH 和 AsA 含量的影响

还原型谷胱甘肽(GSH)和抗坏血酸(AsA)是植物重要的抗氧化物质。如图 4A 所示,与对照相比,EBR 处理使 GSH 含量升高 8.7%,差异达显著水平 ($P < 0.05$),CHT 处理使 GSH 平均比对照提高 3.4%;与 CHT 相比,EBR + CHT 处理使 GSH 含量平均升高 3.7%,后期差异达显著水平。与对照相比,EBR、CHT 及 EBR + CHT 处理使叶片 AsA 含量分别平均增高 24.9%、13.8% 和 33.1%,如图 4B。说明百菌清处理对葡萄叶片产生了损伤,植株产生应激反应,从而使抗氧化物质合成加强,而 $0.10 mg \cdot L^{-1}$ 的 EBR 预处理可进一步提高抗氧化物质的含量。

2.5 EBR 处理对农药处理后解毒酶活性的影响

如图 5A、图 5B 所示,与对照相比,各处理均使葡萄叶片过氧化物酶(POD)及谷胱甘肽-s-转移酶(GST)活性增强。总体上 EBR 及 EBR + CHT 处理使叶片 POD 和 GST 酶活性高于 CHT 处理,其中 EBR + CHT 处理使 POD 活性在第 5 天后显著高于 CHT 处理 ($P < 0.05$),同时使 GST 酶活性平均提高 20.1%。如图 5C 所示,各处理使谷胱甘肽还原酶(GR)活性均显著高于对照,前 3d 内 EBR + CHT 处理使叶片 GR 活性与 CHT 处理间无显著差异,但后期 GR 酶活性显著高于 CHT 处理。

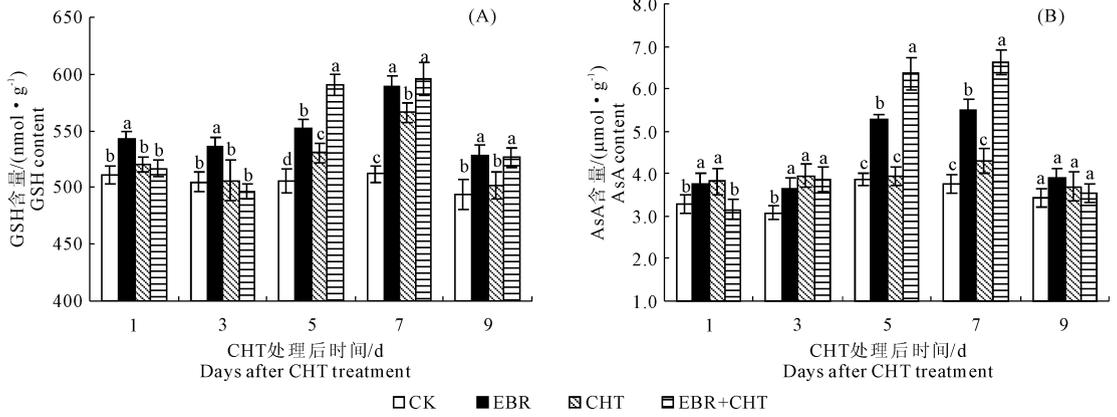


图4 EBR 预处理对葡萄叶片 GSH 及 AsA 含量的影响

Fig.4 Effects of EBR pretreatment on GSH and AsA contents in grapevine leaves

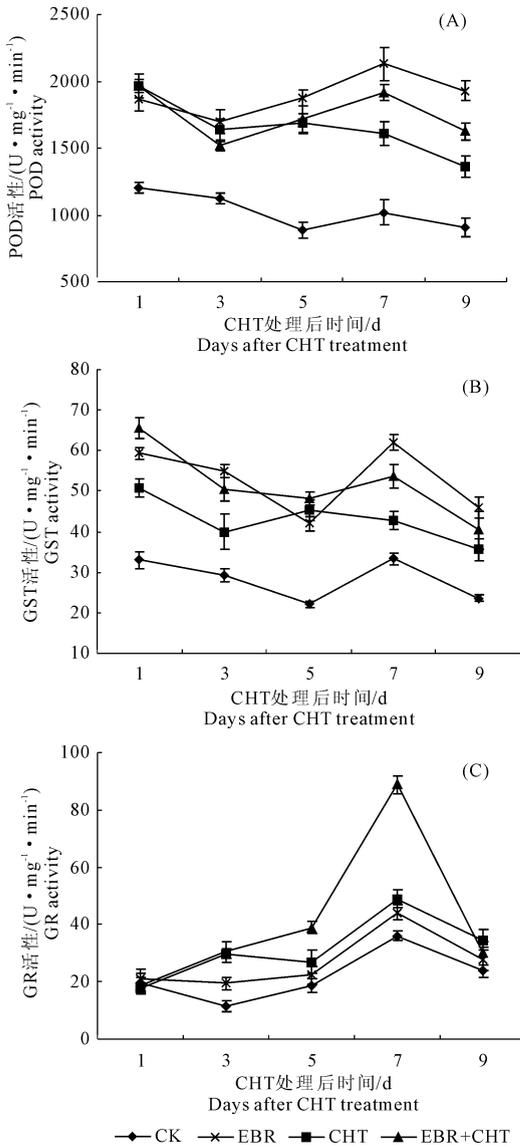


图5 EBR 预处理对葡萄叶片 POD、GST 和 GR 酶活性的影响

Fig.5 Effects of EBR pretreatment on POD, GST and GR activities in grapevine leaves

2.6 EBR 处理对农药处理后葡萄农药残留量的影响

如图 6 所示,农药处理后前期 EBR + CHT 和 CHT 处理之间百菌清残留量无显著差异,后期 EBR + CHT 处理的农药残留量显著低于 CHT 处理;在百菌清处理后第 216 小时,EBR + CHT 和 CHT 处理的百菌清除解率分别为 45% 和 34%,且其半衰期分别为 10.6 d 和 15.2 d。

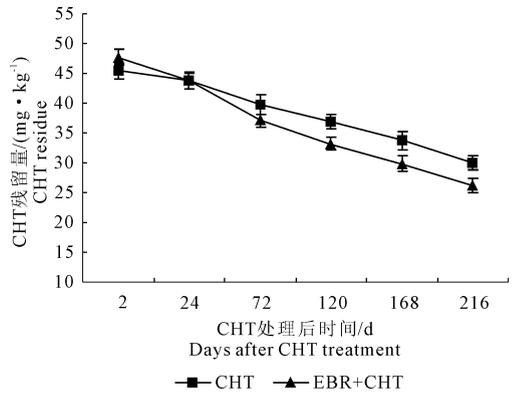


图6 EBR 对葡萄叶片百菌清残留量的影响

Fig.6 Effects of EBR on chlorothalonil residue in grapevine leaves

3 讨论

3.1 EBR 缓解农药对叶片光合参数的抑制

光合作用是植物物质和能量的重要来源,逆境通常会打破光合的固有平衡,导致光合降低的因子分为气孔因素和非气孔因素。当气孔导度 G_s 下降时,如果 P_n 和 C_i 都降低,表明光合速率下降主要是由于气孔因素的限制;当 G_s 和 P_n 下降,而 C_i 没有显著变化或呈现上升趋势,表明非气孔因素即叶肉细胞同化能力减弱是光合速率下降的主要原因^[19-20]。研究表明农药能造成叶片生理形态受损,进而破坏光合色素和光合系统,造成光合效率降低^[1]。杀菌剂能引起光合电子传递与光合磷酸化解

偶联,抑制 ATP 的形成或 ATP 能量的转移,同时促进假环式电子传递的运行而导致活性氧物质大量产生,造成光合系统受损^[21]。在本试验条件下,单独 EBR 处理显著提高了葡萄叶片的 Pn 、 G_s 和 C_i ,可能是因为该浓度下 EBR 通过对相关基因的调控,增大了气孔导度或叶肉导度从而对 C_i 产生了一定的影响,有利于叶片 Pn 的提高;百菌清处理使光合参数显著降低,这可能由于百菌清喷施到叶片上增加了气孔的扩散阻力,导致气孔导度下降,吸收的 CO_2 量减少,从而降低了光合速率,但是处理后期各参数呈现回升的趋势,这可能是由于随着时间的延长,农药逐渐降解,叶片光合作用开始恢复。EBR 预处理明显促进了农药处理后光合气体参数的上升,表明 EBR 预处理可以显著缓解农药对叶片光合的气孔限制,但并不排除它在叶片光合系统中的促进作用。汪季涛^[22]指出 2 倍推荐剂量的百菌清农药处理对番茄光合的抑制作用主要是非气孔因素造成的。这可能与喷施农药浓度的不同有关,可能低浓度如 600 倍液推荐剂量的百菌清可以通过气孔因素限制叶片光合作用,而较高浓度如 2 倍推荐剂量的百菌清则主要通过影响叶绿体活性、羧化效率等非气孔因素限制光合作用。

3.2 EBR 缓解农药对 PSII 反应中心活性及电子传递的抑制

通常叶片吸收的光能主要用于光合电子传递、叶绿素荧光发射和热耗散三种途径,彼此间存在着此消彼长的关系,因此可以通过检测叶绿素荧光来探究叶片光合和热能耗散情况^[23]。植物 PSII 反应中心是光合机制中较敏感部位,容易受到环境因素影响。 F_v/F_m 表示 PSII 的最大光能转换效率,反映了植株的光合潜能^[10]。本研究中单独 EBR 处理对 F_v/F_m 影响不大,农药处理导致 F_v/F_m 显著下降,表明产生了光抑制,导致 PSII 的潜在活性降低,能量捕捉效率下降,而 EBR 预处理可以显著缓解 F_v/F_m 的降低。 $\Phi PSII$ 是原初光能转化效率的度量指标,其值下降表明农药限制了 PSII 反应中心的电子传递, qP 用于反映 PSII 原初电子受体 Q_A 的氧化还原状态和 PSII 反应中心的开放比例,其值反映了 PSII 光合活性的高低^[24]。有研究表明,某些农药可以通过和质体醌竞争结合在 QB 位点,从而抑制 PSII 受体侧光合电子的传递^[25]。本研究中单独百菌清处理使 $\Phi PSII$ 和 qP 均有所降低,可能是因为叶片 PSII 受体侧电子传递受到伤害,总体上 EBR 预处理可以显著缓解农药导致的 $\Phi PSII$ 和 qP 的降低。此外光合参数中 EBR 组的 Pn 效果最好,而荧光参数

($\Phi PSII$ 和 qP) 中 CK 组表现较好,可能是由于光和荧光测定中使用的光照强度不同所致。当植物吸收的光能超出其光合作用可利用的范围时,通常会把过剩的能量以非光化学猝灭的方式消耗掉从而防止光抑制现象。因此一般而言,适宜条件下植物的 NPQ 较低,而逆境胁迫下其值增高。本试验条件下,单独 EBR 处理和农药处理的 NPQ 增幅较大,EBR 预处理可以显著降低农药处理后 NPQ 的增长幅度,这可能是因为喷施外源物 (EBR 或农药) 后植株光保护能力增强,加强了能量的热耗散,使用于光合作用的能量减少,而 EBR 可以缓解农药对植物的伤害。因此,本试验中农药处理后叶片 F_v/F_m 、 $\Phi PSII$ 、 qP 均有所下降而 NPQ 升高,表明百菌清影响了叶片 PSII 的潜在光合作用活力、原初光能转化效率、电子传递活性以及激发能分配方式等,使植物对光能的吸收、传递和转化受到影响,从而降低了光合速率,EBR 预处理可以显著减轻农药对 PSII 的伤害,这与前人的研究结果^[26-28]类似,EBR 可以通过调节光合作用中相关基因的表达,加强叶绿素合成和光合酶活性,增强光合碳同化能力以及光合电子传递效率等来促进叶片的光合作用。

3.3 EBR 提高农药处理下叶片抗氧化物质含量及保护酶活性

逆境条件下植株体内活性氧积累和清除间的平衡被打破,导致体内 ROS 的积累而破坏细胞膜结构,造成膜脂过氧化。本试验中单独 EBR 处理对 ROS、MDA 含量影响较小,农药处理显著提高了 H_2O_2 、 O_2^- 及 MDA 含量,使细胞膜结构和功能受到破坏而影响正常的生理代谢。农药对植物而言即是一种逆境,研究表明农药能影响植物的活性氧代谢,诱导植株产生更多的 ROS,造成膜脂过氧化^[29]。EBR 预处理显著降低了农药处理后叶片 ROS 和 MDA 的积累,可能是因为 EBR 提高了 POD、GR 等抗氧化酶活性以及 GSH、AsA 等抗氧化物质含量,从而加速了 ROS 的消耗,同时 EBR 可以缓解农药对光合系统的伤害,可能阻碍了假环式电子传递从而降低了光合活性氧物质的产生。但有研究提出 BR 处理可提高黄瓜叶片 NADPH 氧化酶活性以及 H_2O_2 水平,同时也能提高植株对氧化胁迫的耐性^[30-31],进一步研究指出 H_2O_2 作为 ROS 中毒性较低的物质,通常作为植物生长发育和环境适应力的重要信号分子,可能会通过改变细胞的氧化还原水平以诱导基因的表达,从而参与 BR 诱导的植物抗逆性调控^[32]。油菜素内酯可以通过阻碍植株产生过多的自由基或者通过诱导形成较多的自由基清除剂来减轻膜脂过氧化

作用,研究表明 EBR 处理显著抑制了低温导致的高山离子芥悬浮细胞中 H_2O_2 等 ROS 水平的增高^[33]。同样用 $0.1 \mu M$ 的 EBR 单独处理番茄幼苗后发现其对 H_2O_2 含量没有显著影响,但 EBR 预处理可以显著降低多环芳香烃(菲)引起的 H_2O_2 含量的增高^[34]。Jiang 等^[35]指出 H_2O_2 作为信号传递物质及其清除间存在相应的平衡,它的累积结果可能依赖于 H_2O_2 产生的位置以及时间和空间的变化规律。因此本文中单独 EBR 处理没有提高 H_2O_2 含量,而植株在接受 EBR 和农药双重信号后 H_2O_2 含量显著降低,这可能与相应的抗氧化酶如 POD 活性的加强以及抗氧化物质含量的增高有关。

GSH 和 AsA 是植物重要的抗氧化物质,可以还原 O_2^- 、清除 $\cdot OH$ 及歧化 H_2O_2 以减少 ROS 的积累,增强植株的抗逆性。同时 GSH 还是农药在植物体内降解的重要解毒物质,可以通过与农药形成轭合物,进而把有毒物质转变成活性低、亲水性强的化合物^[22]。有报道指出外源 EBR 处理可以增强低温胁迫下 GSH 和 AsA 含量,减轻低温对葡萄叶片的伤害^[36]。本试验中,百菌清处理一定程度上提高了还原型 GSH 和 AsA 的含量,可能是因为农药刺激了植物体内的防御机制,从而产生了更多的保护物质,而 EBR 处理均能使正常生长和农药胁迫下的葡萄叶片 GSH 和 AsA 含量进一步显著增高,这可能与 GR 活性的提高以及 EBR 对 GSH-AsA 循环的调节作用有关。

GR 和 GST 参与农药在植物体内的降解代谢:GR 可以催化 GSSG 还原成 GSH,对细胞内还原型 GSH 含量的保持很重要,因此 GR 活性的提高可以间接推动 GSH 和农药轭合物的形成,进而通过 GST 被运送到液泡或质外体中隔离储存,达到解毒的目的^[37]。本试验中百菌清处理后葡萄叶片保护酶 POD、GST 和 GR 酶活性显著增加,可能是因为植株接收到农药刺激的信号后,活性氧物质增加刺激植物体内大量合成保护酶或增强保护酶活性,以维持细胞的氧化还原平衡。但由于植物体内各种活性氧物质、酶促及非酶促保护系统间存在复杂的关系,ROS 的清除需要整个防御系统的协调作用,因此试验中虽然农药胁迫下叶片 POD、GR 活性有所增加,但 ROS 并没有被有效清除。这与康云艳等^[38]的研究结果类似,他们发现低氧胁迫下黄瓜幼苗根系抗氧化酶活性及过氧化氢和超氧阴离子含量均高于对照,外源 EBR 处理可以进一步促进酶活性的升高和 ROS 含量的降低。用 BR 处理高山离子芥悬浮细胞,然后置于 $0^\circ C$ 低温处理 5 d 后发现 BR 处理可以

缓解脂质过氧化水平,进一步提高 APX、CAT 等抗氧化酶活性,显著提高 AsA 和 GSH 的含量,最终提高植株的存活率^[34]。同样本试验中 EBR 预处理使农药胁迫下叶片 POD、GR 和 GST 酶活性显著上升。研究指出 BR 可以增强逆境下防御基因如 POD、CAT、PAL 等的表达,从而加强酶的合成或通过调节特定基因的转录与翻译进一步激活保护酶系统^[39-40]。

3.4 EBR 促进农药百菌清的降解

百菌清作为在葡萄生产管理中广泛使用的一种杀菌剂,可以防治葡萄霜霉病、白粉病及炭疽病等病害^[41]。但农药的过多使用会损害作物并且导致作物体内积累较高的农药残留。EBR 有利于推动农药在植株体内向低毒性物质降解的代谢过程,目前生产中可以合成大量有活性的 BR 类似物,它们已经被用于温室或田间试验中进行测试评估。本试验中 $0.1 mg \cdot L^{-1}$ 的 EBR 可以显著提高百菌清降解速率,缩短农药的半衰期,这可能是因为 EBR 可以促进农药降解代谢基因如 *P450* (*P450 monooxygenase*)、*GR* (*glutathione reductase*)、*GST* (*glutathione-s-transferase*) 和 *MRP* (*ABC-type transporter*) 等的表达^[42],增强解毒酶 GR 和 GST 的活性,从而加速农药的降解以减少农药在植物体中的残留。

4 结 论

600 倍液的百菌清处理使葡萄叶片光合气体交换参数 P_n 、 G_s 和 C_i 以及叶绿素荧光参数 F_v/F_m 、 $\Phi PSII$ 和 qP 显著降低, $0.1 mg \cdot L^{-1}$ EBR 预处理能有效缓解百菌清对叶片光合的抑制,促进叶片对光能的吸收传递与利用;EBR 预处理使农药处理下叶片 H_2O_2 、 O_2^- 及 MDA 含量显著降低,使抗氧化物质 GSH 和 AsA 含量显著升高,从而通过提高系统的抗氧化水平以增强植株的防御能力,缓解农药对葡萄植株的伤害; $0.1 mg \cdot L^{-1}$ EBR 预处理提高了解毒酶 (POD、GST 和 GR) 活性,使农药半衰期缩短 4.6 d,显著促进百菌清的降解代谢以降低叶片的农药残留。

参 考 文 献:

- [1] Kaňa R, Špundová M, Ilík P, et al. Effect of herbicide clomazone on photosynthetic processes in primary barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves [J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2004, 78(3):161-170.
- [2] 瞿哈屹,张 吟,彭亚拉.农业源头污染对我国农产品质量安全的影响[J]. *食品科学*, 2012, 33(17):331-334.
- [3] 李记明,司合芸,于 英,等.葡萄农药残留及其对葡萄酒酿造的影响[J]. *中国农业科学*, 2012, 45(4):743-751.
- [4] Coleman J, Blanke-Kalf M, Davies E. Detoxification of xenobiotics

- by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation[J]. Trends in Plant Science, 1997, (2):144-145.
- [5] 白立伟, 蒲全明, 李文涛. 果蔬有机农药残留降解方法研究进展[J]. 现代农业科技, 2012, (13):127-129.
- [6] Li J, Chory J. Brassinosteroid actions in plants[J]. Journal of Experimental Botany, 1999, 50(332):275-282.
- [7] Arteca J M, Arteca R N. Brassinosteroid-induced exaggerated growth in hydroponically grown Arabidopsis plants[J]. Physiologia Plantarum, 2001, 112(1): 104-112.
- [8] 王红红, 李凯荣, 侯华伟. 油菜素内酯提高植物抗逆性的研究进展[J]. 干旱地区农业研究, 2005, (23):213-219.
- [9] Bajguz A, Hayat S. Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2009, 47(1):1-8.
- [10] 夏晓剑. 油菜素内酯调控黄瓜光合作用, 抗逆性及农药代谢的生理与分子机理研究[M]. 杭州: 浙江大学, 2009.
- [11] 张琳, 唐敏, 王正, 等. 油菜素内酯对油菜中有机磷农药毒死蜱残留的降解效果[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(2):805-806.
- [12] Sharma I, Bhardwaj R, Pati P K. Mitigation of adverse effects of chlorpyrifos by 24-epibrassinolide and analysis of stress markers in a rice variety PusaBasmati - 1 [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2012, 85:72-81.
- [13] 高俊凤. 植物生理学试验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 2006.
- [14] 曹云英, 许锦彪, 赵华. 油菜素内酯生理效应的研究进展[J]. 种子, 2006, 25:39-44.
- [15] 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.
- [16] 陈建勋, 王晓峰. 植物生理学试验指导(第二版)[M]. 广州: 华南理工大学出版社, 2006.
- [17] Mauch F, Dudler R. Differential induction of distinct glutathione-S-transferases of wheat by xenobiotics and by pathogen attack[J]. Plant Physiology, 1993, 102(4):1193-1201.
- [18] 中华人民共和国农业部. NY/T 761-2008. 蔬菜水果中有机磷、有机氯、拟除虫菊酯和氨基甲酸酯类农药多残留的测定[S]. 北京: 农业出版社, 2008:16-25.
- [19] Farquhar G D, Sharkey T D. Stomatal conductance and photosynthesis[J]. Annual Review of Plant Physiology, 1982, 33:317-345.
- [20] 梁芳, 郑成淑, 孙宪芝, 等. 低温弱光胁迫及恢复对切花菊光合作用和叶绿素荧光参数的影响[J]. 应用生态学报, 2010, 21(1):29-35.
- [21] Untiedt R, Blanke M M. Effects of fungicide and insecticide mixtures on apple tree canopy photosynthesis, dark respiration and carbon economy[J]. Crop Protection, 2004, 23(10):1001-1006.
- [22] 汪季涛. 油菜素内酯调控番茄农药降解的生理与分子机制[D]. 杭州: 浙江大学, 2010.
- [23] 綦伟, 谭浩, 翟衡. 干旱胁迫对不同葡萄砧木光合特性和荧光参数的影响[J]. 应用生态学报, 2006, 17(5):835-838.
- [24] 罗海波, 马苓, 段伟, 等. 高温胁迫对‘赤霞珠’葡萄光合作用的影响[J]. 中国农业科学, 2010, 43(13):2744-2750.
- [25] Edelman M, Mattoo A K. D1-protein dynamics in photosystem II: the lingering enigma[J]. Photosynthesis Research, 2008, 98(1-3): 609-620.
- [26] 胡文海, 黄黎锋, 毛伟华, 等. 油菜素内酯对黄瓜苗期叶片光合机构调节作用的研究[J]. 园艺学报, 2006, 33(4):762-766.
- [27] Xia X J, Huang L F, Zhou Y H, et al. Brassinosteroids promote photosynthesis and growth by enhancing activation of Rubisco and expression of photosynthetic genes in *Cucumis sativus* [J]. Planta, 2009, 230(6):1185-1196.
- [28] Yu J Q, Hu L F, Hu W H, et al. A role for brassinosteroids in the regulation of photosynthesis in *Cucumis sativus* [J]. Journal of Experimental Botany, 2004, 55(399):1135-1143.
- [29] 刘井兰, 于建飞, 印建莉, 等. 化学农药对植物生理生化影响的研究进展[J]. 农药, 2006, 45(8):511-514.
- [30] Xia X J, Wang Y J, Zhou Y H, et al. Reactive oxygen species are involved in brassinosteroid-induced stress tolerance in cucumber[J]. Plant Physiology, 2009, 150(2):801-814.
- [31] Neill S, Desikan R, Hancock J. Hydrogen peroxide signalling[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2002, 5(5):388-395.
- [32] Xia X J, Chen Z, Yu J Q. ROS mediate brassinosteroids-induced plant stress responses[J]. Plant Signaling & Behavior, 2010, 5(5): 532-534.
- [33] 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 *Chorizopora lungeana* [J]. Plant Growth Regulation, 2009, 59(3):207-214.
- [34] Ahammed G J, Gao C J, Ogweno J O, et al. Brassinosteroids induce plant tolerance against phenanthrene by enhancing degradation and detoxification in *Solanum lycopersicum* L [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2012, 80:28-36.
- [35] Jiang Y P, Huang L F, Cheng F, et al. Brassinosteroids accelerate recovery of photosynthetic apparatus from cold stress by balancing the electron partitioning, carboxylation and redox homeostasis in cucumber[J]. Physiologia Plantarum, 2013, 148(1):133-145.
- [36] 惠竹梅, 王智真, 胡勇, 等. 24-表油菜素内酯对低温胁迫下葡萄幼苗抗氧化系统及渗透调节物质的影响[J]. 中国农业科学, 2013, 46(5):1005-1013.
- [37] Fujisawa T, Kurosawa M, Katagi T. Uptake and transformation of pesticide metabolites by Duckweed (*Lemna gibba*) [J]. Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(17):6286-6293.
- [38] 康云艳, 郭世荣, 段九菊. 外源 24-表油菜素内酯对低氧胁迫下黄瓜幼苗抗氧化系统及蛋白含量的影响[J]. 农业工程学报, 2005, 21(增刊):82-86.
- [39] Xia X J, Zhou Y H, Ding J, et al. Induction of systemic stress tolerance by brassinosteroid in *Cucumis sativus* [J]. New Phytologist, 2011, 191(3):706-720.
- [40] Ali B, Hasan S A, Hayat S, et al. A role for brassinosteroids in the amelioration of aluminium stress through antioxidant system in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilczek) [J]. Environmental and Experimental Botany, 2008, 62(2):153-159.
- [41] 董金皋. 农业植物病理学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001: 56-78.
- [42] Xia X J, Zhang Y, Wu J X, et al. Brassinosteroids promote metabolism of pesticides in cucumber [J]. Agriculture and Food Chemistry, 2009, 57(18):8406-8413.