

葡萄中褪黑素对NaHCO₃胁迫的响应及外源褪黑素缓解NaHCO₃胁迫的作用机制

付晴晴, 谭雅中, 翟衡, 杜远鹏*

山东农业大学园艺科学与工程学院/作物生物学国家重点实验室, 农业部黄淮地区园艺作物生物学与种质创制重点实验室, 山东泰安271018

摘要: 以一年生‘福客’(‘Frontenac’)葡萄(*Vitis* sp.)盆栽扦插苗为试材, 研究85 mmol·L⁻¹ NaHCO₃胁迫处理对葡萄不同器官褪黑素、5-羟色胺和2-羟基褪黑素含量的影响, 并进行外源浇灌褪黑素处理, 研究外源褪黑素对碱胁迫下有机渗透调节物质和离子含量及离子转运相关基因表达的影响。结果表明, NaHCO₃胁迫后, 葡萄根、茎和叶中的褪黑素含量降低, 以根和茎中的降低幅度较大, 葡萄根系中5-羟色胺的含量显著增加, 褪黑素的代谢产物2-羟基褪黑素在根中大幅降低, 却在叶片中大量积累; NaHCO₃胁迫下, 外源褪黑素显著降低了叶片O₂⁻产生速率和H₂O₂含量, 增加了有机渗透调节物质可溶性糖、可溶性蛋白和脯氨酸含量, 降低了叶片中Na⁺含量, 但增加了叶片中K⁺含量。褪黑素处理提高了NaHCO₃胁迫下葡萄叶片中*VvNHXP*和*VvHKT*家族基因的表达。综上, 碱胁迫下根系合成褪黑素代谢前体物质5-羟色胺, 并向地上部运输, 主要在叶片中清除自由基, 调节有机渗透调节物质含量, 并通过上调离子转运蛋白*VvNHXP*和*VvHKT*家族基因的表达, 维持胞内离子平衡, 进而缓解NaHCO₃对膜系统的伤害。

关键词: 葡萄; 褪黑素; NaHCO₃; 有机渗透调节物质; Na⁺; K⁺; *VvNHXP*; *VvHKT*

我国酿酒葡萄(*Vitis vinifera*)主产区主要分布在西北干旱和半干旱地区, 种植面积正大幅度增加, 但这些地区正面临着严峻的盐碱危害, 葡萄缺铁黄化已成为普遍现象, 盐碱胁迫中又以碱性盐胁迫对植物的危害更为严重(杜远鹏等2015), 因此探讨如何缓解葡萄碱性盐伤害具有重要的现实意义。

褪黑素(*N*-乙酰基-5-甲氧基色胺, melatonin, MT)最早是在牛(*Bos taurus*)松果体中发现的一种调节动物昼夜节律的动物激素。20世纪90年代以后才发现褪黑素在高等植物中广泛存在, 并且初期的研究多是褪黑素的测定方法, 之后褪黑素的生理功能才成为研究的热点。尽管褪黑素在植物体内含量甚微, 但在调节植物生理、增强植物抗逆方面起到重要作用, 已有的研究发现, 褪黑素有调节昼夜节律和光周期、延缓叶片衰老、促进生根及种子萌发等作用(Arno和Hernández-Ruiz 2009a, 2015; Koyama等2013), 还具有缓解高温、低温、干旱、紫外线、臭氧、重金属等非生物胁迫的作用(徐芳等2013); 其最基本的功能是作为第一道防线抵御体内和外界的氧化胁迫(Dubbels等1995)。褪黑素的抗氧化能力主要通过直接清除自由基、刺激抗氧化酶、增加其他抗氧化剂活性、保护抗氧化酶免受氧化损伤、增加线粒体电子传递链的效率、减轻电子泄漏等功能实现的(Galano等2011)。除

了抗氧化功能外, 目前对褪黑素的其他功能报道较少。其中, 高青海等(2016)的研究认为, 外源褪黑素能够增加亚低温胁迫下甜瓜(*Pedicellus melo*)幼苗渗透调节物质的含量; Li等(2012)的研究发现, 盐胁迫下的外源褪黑素可以缓解湖北海棠(*Malus hupehensis*)‘平邑甜茶’植株体内的离子平衡; 高青海等(2017)以甜瓜幼苗为试材, 也得出相似的结论。而褪黑素在碱性盐胁迫下的响应及缓解NaHCO₃胁迫的作用机制还鲜有报道。

本试验前期证明了外源褪黑素能够缓解‘福客’葡萄碱性盐NaHCO₃胁迫下葡萄叶片叶绿素的降解和对光系统II (photosystem II, PSII)活性的抑制, 清除过量积累的活性氧(reactive oxygen species, ROS), 维持膜系统的完整性(付晴晴等2017), 本实验进一步研究褪黑素在碱性盐胁迫下的响应以及外源褪黑素对碱性盐胁迫下渗透调节物质和Na⁺、K⁺平衡的影响, 探讨利用外源褪黑素缓解葡萄植株碱性盐胁迫的作用机制, 为生产上提高葡萄对盐碱胁迫的耐受性提供参考。

收稿 2017-07-03 修定 2017-09-25

资助 国家现代葡萄产业技术体系建设专项(CARS-30)、长江学者和创新团队发展计划项目(IRT15R42)和国家自然科学基金(31501738)。

* 通讯作者(E-mail: duyuanpeng001@163.com)。

材料与方法

1 试验材料与设计

试验于2017年2~5月在山东农业大学南校区试验站葡萄园冬暖棚内进行。选取长势一致的葡萄(*Vitis* sp.) ‘福客’ (‘Frontenac’, ‘89’×‘Landot 4511’)一年生枝条(直径0.8~1.0 cm)剪留两芽(上端平剪, 下端呈45°斜剪)扦插于棚内沙床上, 待长出2~3片真叶后定植于直径17 cm、高25 cm的花盆中, 采用营养液沙培的方式, 每隔3 d浇一次1/2Hoagland营养液, 待长至8~10片完全展开叶时开始进行NaHCO₃和褪黑素处理。

1.1 NaHCO₃胁迫对葡萄褪黑素、5-羟色胺和2-羟基褪黑素含量的影响

每天下午17:00~18:00进行处理, 每盆浇500 mL 1/2Hoagland营养液[含85 mmol·L⁻¹ NaHCO₃, 即处理2 (CK+NaHCO₃)], 浇至从盆底外流, 对照(CK)浇等量1/2Hoagland营养液。每个处理重复10株, 于处理的第10天进行整株取样, 迅速放入液氮中冷冻, 并存放在-40°C冰箱中备用, 用于测定根、茎和叶片中褪黑素、5-羟色胺和2-羟基褪黑素的含量。

1.2 外源褪黑素对葡萄渗透调节物质及离子平衡的影响

前期实验表明300 nmol·L⁻¹的外源褪黑素浇灌处理对NaHCO₃胁迫的缓解效果最佳(付晴晴等2017), 因此本试验确定以300 nmol·L⁻¹的褪黑素进行处理, 每天下午17:00~18:00进行处理, 每盆浇500 mL 1/2Hoagland营养液[即对照(CK)], 或含300 nmol·L⁻¹外源褪黑素的1/2Hoagland营养液[即处理1 (CK+MT)], 或含85 mmol·L⁻¹ NaHCO₃的1/2Hoagland营养液[即处理2 (CK+NaHCO₃)], 或含85 mmol·L⁻¹ NaHCO₃和300 nmol·L⁻¹外源褪黑素的1/2Hoagland营养液[即处理3 (CK+NaHCO₃+MT)], 浇至从盆底外流, 共浇施10 d, 每个处理重复10株, 于处理的0、2、4、6、8和10 d后对处理2和处理3的叶片进行取样, 置于-80°C冰箱用于基因表达量的测定; 其他指标的取样及测定均在处理后第10天进行。用于离子含量测定的样品用去离子水将叶片冲洗3遍, 并用滤纸擦干分别装入信封, 105°C杀青20 min后再80°C烘至恒重, 用磨样机磨碎待用, 同时取鲜样进行活性氧相关指标的测定。

2 测定项目和方法

2.1 褪黑素、5-羟色胺和2-羟基褪黑素的测定

提取方法参照尹丽媛(2014)并略有改动。葡萄植株根、茎和叶片在液氮冷却下用研磨机磨成冻干粉, 冷冻干燥机进行72 h冷冻干燥。称取0.5 g葡萄样品冻干粉, 置于10 mL离心管中, 加入5 mL色谱级甲醇, 涡旋振荡后浸提10 h。然后用超声波清洗机低温超声15 min, 随后在4°C、16 099.2×g下离心15 min, 收集上清液并用0.22 μm滤膜过滤, 置于新离心管中。再加入5 mL色谱级甲醇到原离心管中, 涡旋混匀进行二次离心。将两次上清液混合, 低温旋转蒸发(≤30°C)。将蒸干物用3 mL 5%的甲醇水溶液重新溶解, 涡旋振荡, 过0.22 μm有机滤膜。然后进行固相萃取, 将过滤好的上清液过C18 (Agilent Bond Elut)固相萃取小柱, 按活化、平衡、上样、淋洗、洗脱的顺序分别分5次加入共5 mL的甲醇、超纯水、样品、5%甲醇溶液和90%甲醇溶液, 速度控制在1 mL·min⁻¹, 最后将洗脱液定容到1 mL, 过0.22 μm的有机滤膜后加入到一次性的液相进样管中, 使用三重四级杆高效液相色谱质谱联用仪检测, 测定条件如表1。

2.2 活性氧代谢相关指标的测定

H₂O₂的测定采用林植芳等(1988)的方法; O₂⁻产生速率的测定采用李忠光和龚明(2005)的方法。各指标均重复测定3次。

2.3 有机渗透调节物质的测定

可溶性糖含量采用蒽酮比色法测定; 可溶性蛋白含量采用考马斯亮蓝G-250法测定; 脯氨酸和游离氨基酸采用茚三酮比色法测定。各指标均重复测定3次。

2.4 Na⁺、K⁺含量的测定

准确称取0.100 g样品于50 mL凯氏瓶内, 加入HNO₃:HClO₄为4:1 (V/V)的混合液10 mL浸泡过夜, 瓶口放一小漏斗, 置于电炉上加热消煮至溶液呈无色或清亮后, 继续消煮10 min, 溶液过滤并定容到50 mL容量瓶中, 用火焰光度计测定Na⁺、K⁺含量。各指标均重复测定3次。

2.5 NHXP和HKT家族基因的定量表达分析

用于定量分析的引物序列如表2所示, 总RNA的提取采用TIANGEN的多糖多酚植物总RNA提取试剂盒, 其中加入的DNase I可消除DNA的污染, 所

表1 测定条件

Table 1 Determination condition

检测参数	设定条件
流动相	甲醇:水(含0.05%乙酸)
色谱柱	Thermo Scientific (100 mm×2.1 mm, 粒径1.9 μm)
流速/mL·min ⁻¹	0.3
进样量/μL	5
柱温/°C	25
质谱模式	电喷雾离子化(electrospray ionization, ESI)正离子模式
检测方式	质谱多反应监测(mass spectrometry multiple reaction monitoring, SRM)
褪黑素母离子	233.087
褪黑素子离子	130.171、174.130
5-羟色胺母离子	177.122
5-羟色胺子离子	115.197、160.161
2-羟基褪黑素母离子	249.106
2-羟基褪黑素子离子	162.166、190.318
喷雾气介质	N ₂
喷雾气流速/L·min ⁻¹	10
毛细管温度/°C	300
喷雾电压/V	3 000
喷雾器温度/°C	300
辅助气压/V	15
鞘气压/V	35

表2 反转录PCR引物序列

Table 2 Reverse transcription PCR primer sequences

基因	引物序列(5'→3')
<i>VvUBIRQ</i>	正向: TCTCAACCCAAAGGCTAATC 反向: GCATAGAGGGAAAGAACAGC
<i>VvNHXP</i>	正向: GGTGTTTCCCTACAGAGCG 反向: CAAAGCGACGGTGTAAGG
<i>VvHKT1</i>	正向: GAGCATCGCCCTGGAAGTC 反向: TGCCGAGAACAGTGATACCC
<i>VvHKT2</i>	正向: ATTTTCAAGAAGAACTCGGG 反向: TTCCCCAGAACCCAGATGAC
<i>VvHKT3</i>	正向: TGCGGTGGAAATGGAGGTT 反向: AGGCCAAGCATGGAAGTGAA
<i>VvHKT4</i>	正向: CTTGTTTCCCTCCTGCCT 反向: CAGAATGAAGCCCAGAAC
<i>VvHKT5</i>	正向: CATCTTGGTGTTAGTCGTCGTA 反向: CTTTTTCTCTCCGTTATGC

提取RNA的OD_{260/280}均在2.0~2.2之间(比值为2.0是高质量RNA的标志),说明RNA的纯度较高;根据TaKaRa公司的反转录试剂盒的使用说明进行反转录;荧光实时定量染料采用UltraSYBR Mixture (Low ROX)试剂盒。20 μL体系包括10 μL的2×UltraSYBR Mixture (Low ROX)、8 μL的双蒸水(double distilled water, ddH₂O)、0.5 μL正向引物、0.5 μL反向引物

和1 μL浓度为100 ng·μL⁻¹的cDNA模板。以葡萄*VvUBIRQ*为内参基因。采用Livak和Schmittgen (2001)的方法计算基因的相对表达量。试验重复3次。

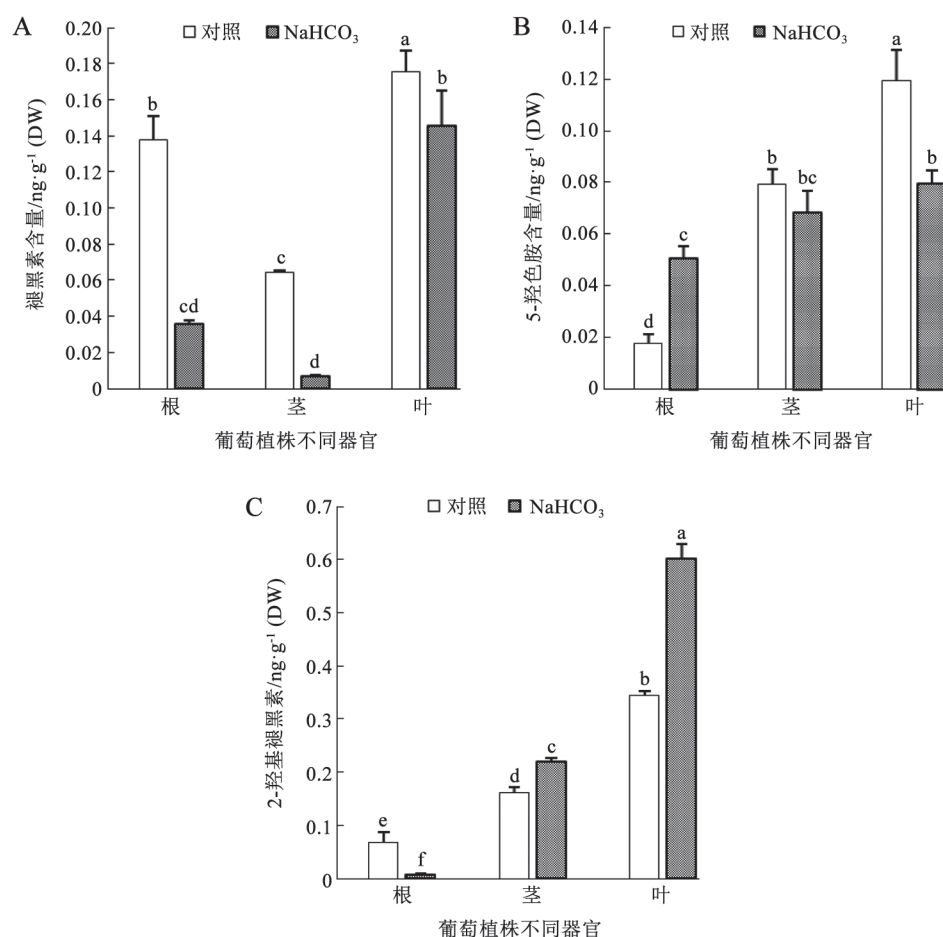
3 数据处理

采用Microsoft Excel 2013软件处理数据和制图,采用DPS软件进行方差分析,用最小显著差数(least significant difference, LSD)法进行差异显著性检验,显著水平 $P=0.05$ 。

实验结果

1 碱胁迫下葡萄植株各器官褪黑素、5-羟色胺和2-羟基褪黑素的含量变化

‘福容’一年生扦插植株各器官中褪黑素含量的分布为叶>根>茎, NaHCO₃胁迫10 d后的根系和茎中褪黑素含量显著降低,分别降低至对照的26.01%和10.56%,而叶片中变化幅度不大(图1-A)。从图1-B和C可以看出,5-羟色胺和2-羟基褪黑素含量在各器官的分布规律为叶>茎>根, NaHCO₃胁迫10 d后,根中的5-羟色胺含量显著升高,是对照的2.82倍,叶中的5-羟色胺含量显著降低,比对照降低了33.47%,而茎中无显著变化; NaHCO₃胁迫10 d后根中的2-羟基褪黑素显著降低,降低至对照

图1 NaHCO₃胁迫对葡萄植株不同器官中褪黑素(A)、5-羟色胺(B)和2-羟基褪黑素(C)含量的影响Fig.1 Effects of NaHCO₃ treatment on the contents of melatonin (A), serotonin (B) and 2-hydroxyalcy melatonin (C) in different organs of grape plant

图中不同字母标识表示差异显著($P < 0.05$), 下同。

的9.73%, 而胁迫后的叶片和茎中的2-羟基褪黑素含量显著升高, 分别比对照升高了74.49%和35.46%。

2 褪黑素处理对碱胁迫下葡萄叶片活性氧代谢的影响

H₂O₂和O₂⁻是引发细胞膜脂过氧化关键的ROS。与对照相比, NaHCO₃胁迫处理显著增加了H₂O₂含量和O₂⁻产生速率(图2-A和B), 增加幅度分别为1.34和1.53倍, 而外源褪黑素不同程度缓解了NaHCO₃胁迫下叶片ROS的增加, 使H₂O₂增幅降为对照的0.75倍, O₂⁻的增幅降为对照的0.81倍。

3 褪黑素处理对碱胁迫下葡萄叶片渗透调节物质的影响

植物为了适应NaHCO₃胁迫环境, 葡萄叶片中

大量积累可溶性糖、可溶性蛋白、脯氨酸和游离氨基酸等渗透调节物质(图3), 外源褪黑素处理进一步提高了NaHCO₃胁迫下渗透调节物质的含量, 叶片中可溶性糖、可溶性蛋白和脯氨酸含量分别比仅NaHCO₃胁迫处理升高了23.83%、11.41%和49.80%; 而游离氨基酸含量与仅NaHCO₃胁迫处理略有增加并未表现明显差异。由此说明外源褪黑素能够提高NaHCO₃胁迫下可溶性糖、可溶性蛋白和脯氨酸含量, 从而促进葡萄叶片细胞内水分平衡和保护膜系统的完整性, 减少对细胞的破坏。

4 褪黑素处理对碱胁迫下葡萄叶片Na⁺和K⁺平衡的影响

4.1 褪黑素处理对碱胁迫下葡萄叶片Na⁺、K⁺含量及K⁺/Na⁺的影响

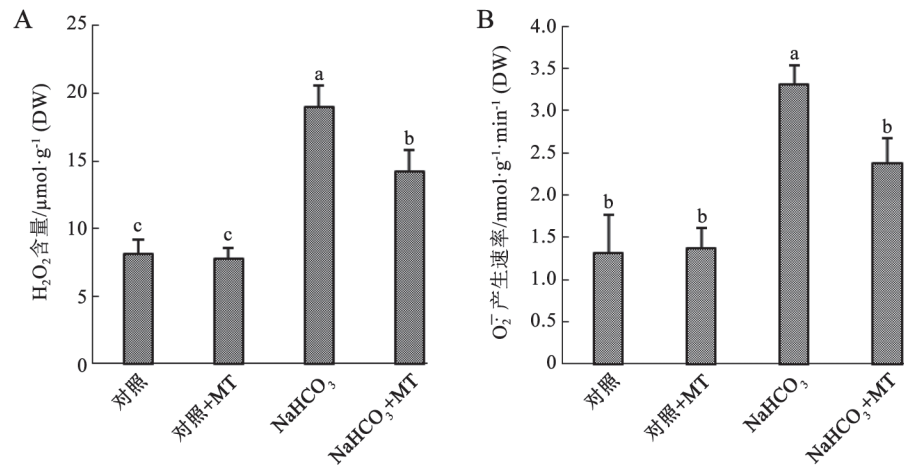


图2 外源褪黑素对NaHCO₃胁迫下葡萄叶片H₂O₂含量(A)和O₂⁻产生速率(B)的影响

Fig.2 Effects of exogenous melatonin on H₂O₂ content (A) and O₂⁻ production rate (B) of grapevine leaves under NaHCO₃ treatment

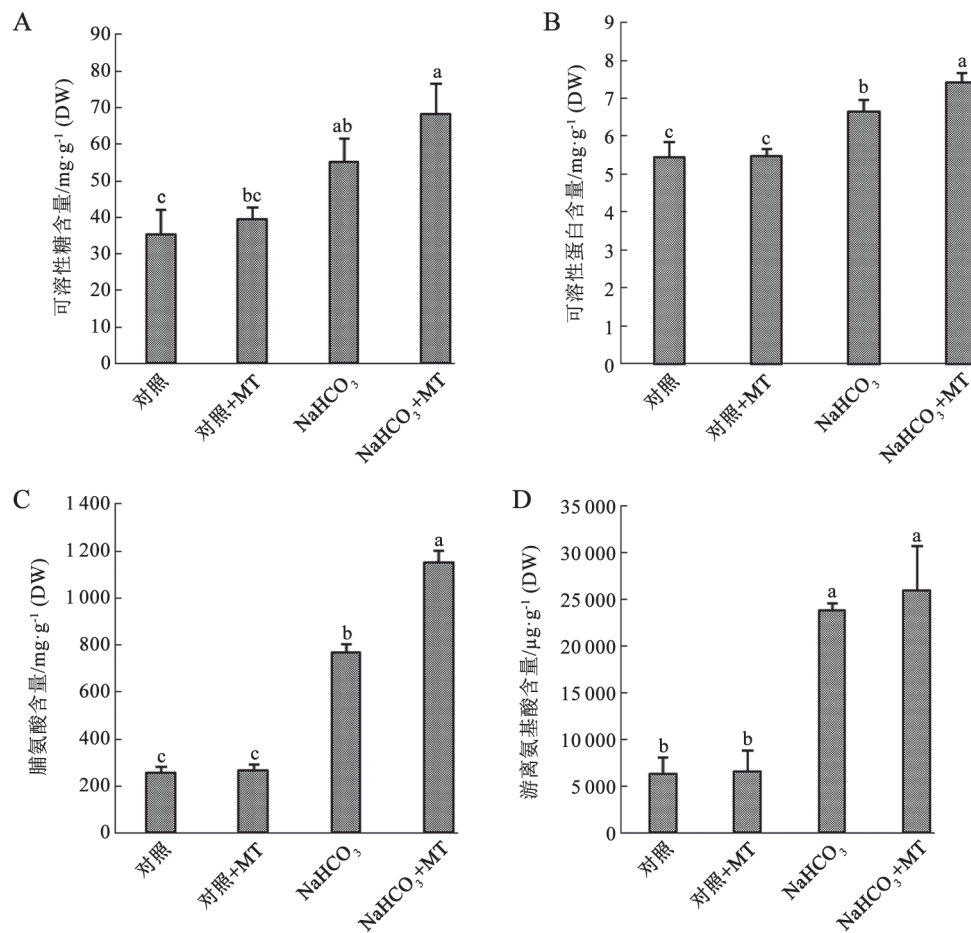


图3 外源褪黑素对NaHCO₃胁迫下葡萄叶片可溶性糖(A)、可溶性蛋白(B)、脯氨酸(C)和游离氨基酸(D)含量的影响

Fig.3 Effects of exogenous melatonin on soluble sugar (A), soluble protein (B), proline (C) and free amino acid (D) contents in grapevine leaves under NaHCO₃ treatment

盐碱胁迫下植物通常会积累大量的Na⁺, 并且将Na⁺区隔到液泡中使细胞质免受伤害(Parida和Das 2005)。另外, 植物在积累Na⁺的同时会抑制K⁺的吸收, 因此维持较高的K⁺/Na⁺是植物耐盐碱的关键。从图4-A和B可以看出, NaHCO₃胁迫显著增加了葡萄叶片Na⁺含量和降低了K⁺含量, Na⁺含量比对照升高了207.13%, K⁺含量比对照降低了25.69%, 而外源褪黑素处理不同程度的降低了NaHCO₃胁迫下Na⁺的积累和并增加了K⁺的吸收, 使Na⁺的升高幅度降为89.31%, K⁺的降低幅度减至6.34%。从图4-C可得, NaHCO₃胁迫下显著降低了K⁺/Na⁺, 下降幅度高达76.12%, 外源褪黑素处理显著缓解了NaHCO₃胁迫下K⁺/Na⁺的降低, K⁺/Na⁺降幅为对照的51.12%。

4.2 褪黑素处理对碱胁迫下葡萄叶片*VvNHXP*和*VvHKT*家族基因相对表达量的影响

从图5可以看出, NaHCO₃胁迫明显上调了葡萄叶片中*VvNHXP*和*VvHKT*家族基因的表达。NaHCO₃胁迫下, *VvNHXP*的表达量在胁迫后第8天上调了3.96倍, 外源褪黑素处理显著增加了NaHCO₃胁迫下*VvNHXP*基因的表达, 在胁迫后的第4天和第10天分别上调了15.61倍和7.32倍(图5-A); *VvHKT1*在NaHCO₃胁迫第4天达到高峰, 上调了8.13倍, 而外源褪黑素处理下的第4天和第10天分别上调了18.24倍和23.88倍(图5-B); NaHCO₃胁迫第4天的*VvHKT2*上调了6.65倍, *VvHKT2*在外源褪黑素处理下第6、8和10天的表达量分别上调了10.74倍、14.46倍和12.65倍(图5-C); 在NaHCO₃胁迫下的

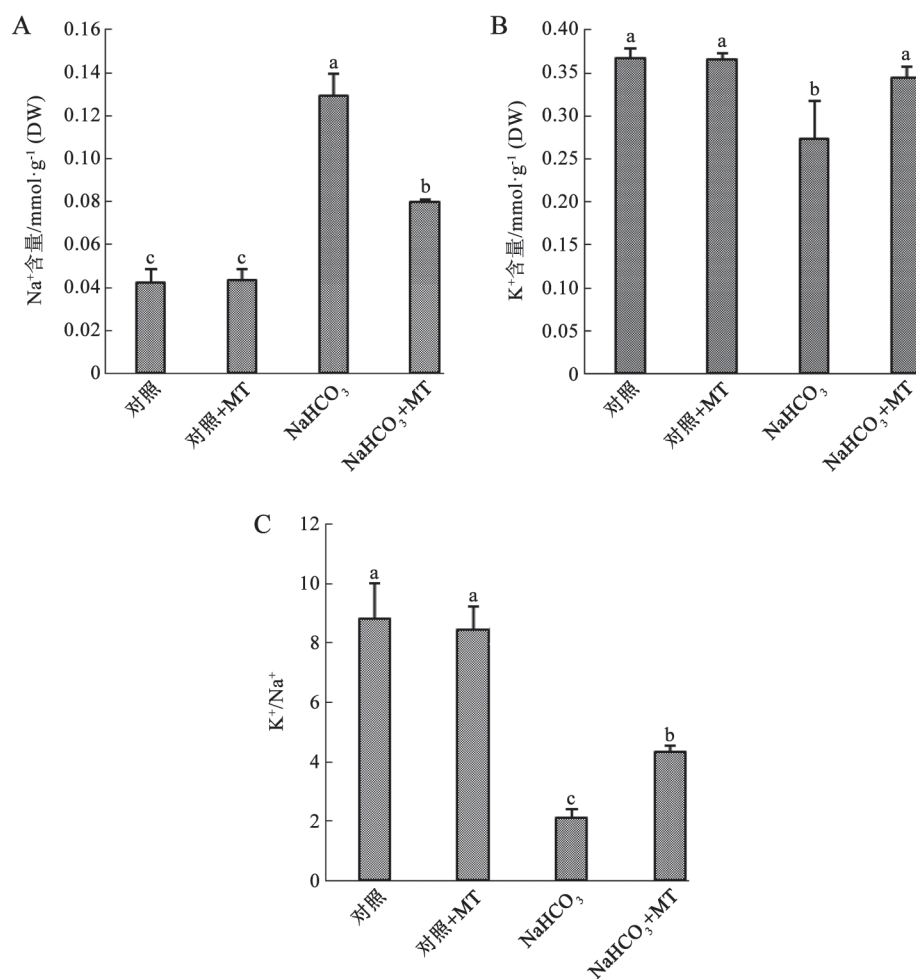


图4 外源褪黑素对NaHCO₃胁迫下葡萄叶片Na⁺含量(A)、K⁺含量(B)和K⁺/Na⁺比值(C)的影响

Fig.4 Effects of exogenous melatonin on Na⁺ content (A), K⁺ content (B) and K⁺/Na⁺ ratio (C) of grapevine leaves under NaHCO₃ treatment

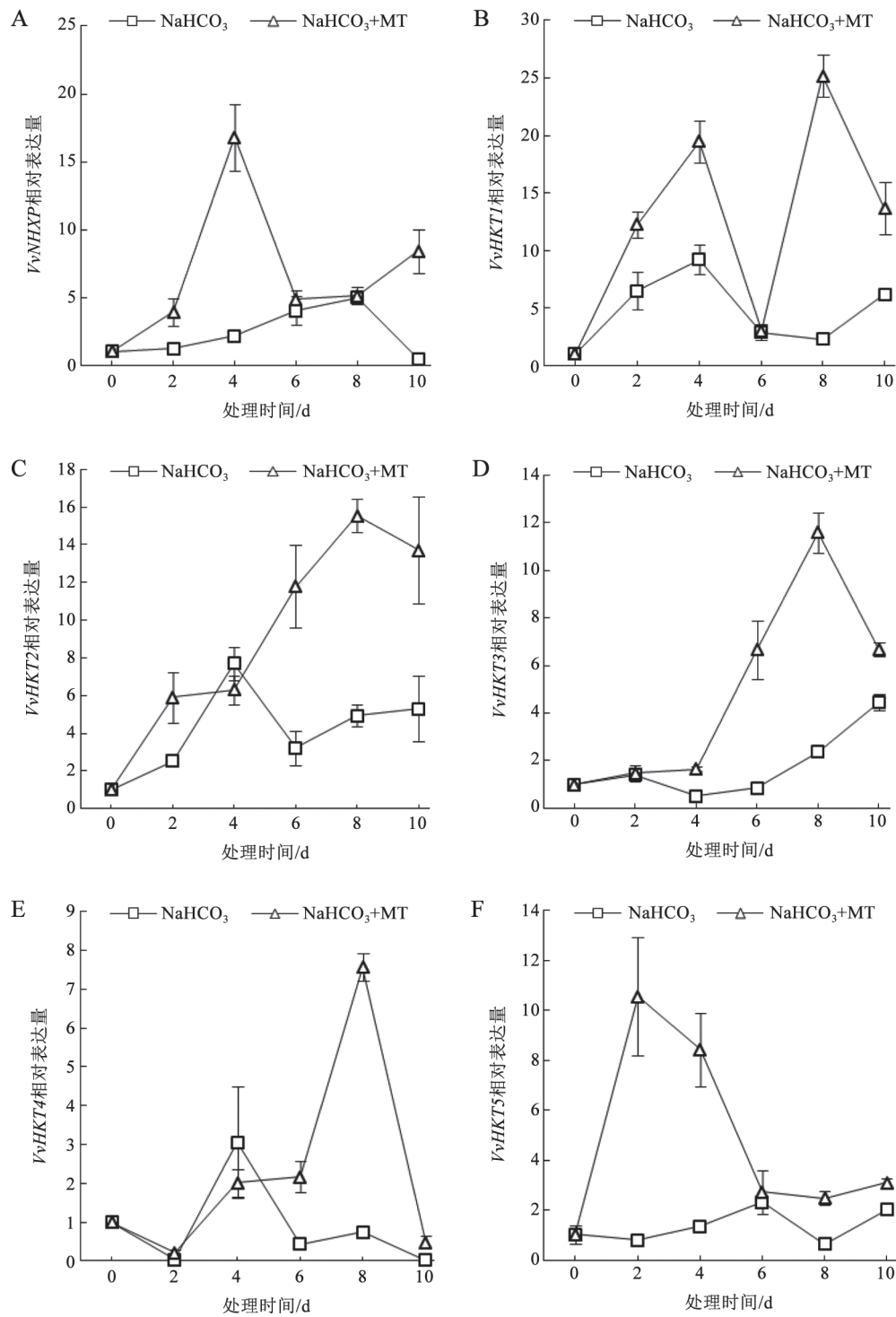


图5 外源褪黑素对 NaHCO_3 胁迫下葡萄叶片 $VvNHXP$ (A)和 $VvHKT$ (B、C、D、E和F)基因表达的影响
 Fig.5 Effects of exogenous melatonin on relative expressions of $VvNHXP$ (A) and $VvHKT$ (B, C, D, E and F) in leaves under NaHCO_3 treatment

$VvHKT3$ 相对表达量表现持续升高趋势,在胁迫第10天达到最大值,上调了3.43倍,外源褪黑素处理

下的 $VvHKT3$ 基因表达量仅在胁迫第8天就上调了10.52倍(图5-D); $VvHKT4$ 的表达量在 NaHCO_3 胁迫

下第4天上调了2.05倍, 在NaHCO₃胁迫下, 外施褪黑素处理后*VvHKT4*在第8天上调了6.55倍(图5-E); *VvHKT5*的表达量在仅NaHCO₃胁迫下波动不大, 上调幅度不超过1.24倍, 但外源褪黑素处理下的*VvHKT5*的表达量在第2天和第4天分别上调了9.54倍和7.42倍(图5-F)。

讨 论

越来越多的研究发现褪黑素在调控植物生理代谢以及抵御逆境胁迫过程中发挥重要作用(张娜等2012; 徐芳等2013)。褪黑素在不同植物和不同器官中的含量各有差异, 褪黑素代谢途径中5-羟色胺是褪黑素的合成前体物质, 而2-羟基褪黑素已被证明是褪黑素的主要代谢产物(Byeon等2014; Zuo等2014)。本研究数据显示, 在NaHCO₃胁迫下葡萄植株根、茎和叶中的褪黑素含量均表现降低的趋势(Arno和Hernández-Ruiz 2009b), 褪黑素代谢产物2-羟基褪黑素含量除在根中表现降低外, 在茎和叶片中均表现升高趋势, 这可能是大量的褪黑素在应对逆境胁迫过程中被消耗掉而导致的; 由NaHCO₃胁迫下5-羟色胺在根中集聚以及2-羟基褪黑素在根中减少且大量的2-羟基褪黑素在叶片中积累可以推测, 褪黑素可能通过在根部大量合成并运输至叶片中抵御逆境胁迫带来的危害。进而推测根系在葡萄植株应对碱性盐胁迫中可能起到感受碱胁迫刺激的作用, 合成褪黑素代谢前体物质5-羟色胺, 并运送到地上部茎和叶片, 在茎和叶片中发挥清除ROS及调节离子平衡的作用。

ROS作为信号转导的第二信使参与植物的生长和建成(Baxter等2014), 但高浓度的ROS能够触发细胞程序性死亡(Foyer和Noctor 2005)。大量研究发现, NaHCO₃胁迫能够大幅度增加叶片中的ROS, 进而引发细胞膜脂过氧化(Liu等2015), 有机物等大量流失, 导致胞内代谢紊乱, 最终导致植物受到伤害甚至死亡。本研究发现, NaHCO₃胁迫下, 外施褪黑素可以显著降低H₂O₂含量和O₂⁻产生速率, 从而有效缓解NaHCO₃胁迫对‘福客’葡萄叶片的生理伤害, 其原因之一是褪黑素作为自由基的清除剂可以有效清除过量产生的ROS (Nazar 等2011)。另外, 褪黑素还可能通过调节植物体内的渗透调

节物质而减轻ROS的伤害(Li等2012; 高青海等2016)。

渗透调节是植物适应盐碱胁迫的重要机制之一, 盐碱胁迫下植物会快速合成并积累一些有机小分子物质, 以增强植株自身的渗透调节能力, 维持胞内渗透压, 保证细胞的各项生理功能的正常运行(郭瑞等 2016)。本研究发现, NaHCO₃胁迫下葡萄幼苗叶片的可溶性糖、可溶性蛋白、脯氨酸和游离氨基酸含量均增加, 但外源褪黑素处理可显著提高葡萄叶片可溶性糖和脯氨酸含量, 有效增强‘福客’葡萄幼苗的渗透调节能力, 这可能是因为外源褪黑素亲水和亲脂的特性物质使其顺利进入细胞内(Shida等1994), 吸附在细胞膜上, 以维持细胞膜结构与功能的稳定(Turk等2014)。

NaHCO₃胁迫还会扰乱植物体内离子平衡, 离子的吸收和区隔化不仅对植物的生长起重要作用, 对碱性盐胁迫下各种生理机能的影响也是至关重要的(李雅男等2016)。叶片是植物代谢的重要器官, 叶片中积累或限制较低的Na⁺含量有助于植物生长和应对胁迫环境, 且细胞质较高的K⁺/Na⁺对维持细胞正常代谢至关重要(Zhu 2003)。盐胁迫环境下, 高浓度的Na⁺抑制根系K⁺的吸收, 将胞质内过量的Na⁺运输到液泡内或排除胞外是植物适应盐胁迫的重要机制之一(Munns和Tester 2008)。植物体内离子稳态的维持和重建依赖于参与离子跨膜运输的膜转运蛋白。液泡膜上Na⁺/H⁺逆向转运蛋白NHX是促进Na⁺向液泡内积累的关键(Dionisio-Sese和Tobita 1998), 质膜上的Na⁺/H⁺逆向转运蛋白可将细胞质中过多的Na⁺排出胞外, 从而减轻过量Na⁺对细胞器及细胞代谢造成的破坏(Munns和Tester 2008); 植物高亲和钾离子转运体HKT家族在维持Na⁺、K⁺稳态过程中发挥重要作用。植物HKT基因家族能够参与植物低钾环境下的钾离子吸收, 大量研究表明HKT蛋白可提高植物的耐盐性(Amtmann和Sanders 1998); Li等(2010)在苹果砧木M26上的研究发现, *MdNHX1*的过量表达显著增强了植株对盐胁迫的耐受性。本研究发现, 85 mmol·L⁻¹ NaHCO₃胁迫显著上调了葡萄叶片*VvNHXP*和*VvHKT*基因的表达, 而外源褪黑素处理显著增加了NaHCO₃胁迫下*VvNHXP*和*VvHKT*基因的表达。因此, 说明

褪黑素可以通过调控*VvNHXP*和*VvHKT*基因的表达,进而维持叶片内的离子平衡,从而缓解 NaHCO_3 胁迫引起的离子损伤。

碱胁迫下根系合成褪黑素代谢前体物质5-羟色胺,并运送至茎和叶片,在叶片中清除自由基,调节有机渗透调节物质含量,并通过调控离子转运蛋白*VvNHXP*和*VvHKT*家族基因的表达,维持胞内离子平衡,进而缓解 NaHCO_3 胁迫下的氧化伤害。

参考文献

- Arnao MB, Hernández-Ruiz J (2009a). Protective effect of melatonin against chlorophyll degradation during the senescence of barley leaves. *J Pineal Res*, 46 (1): 58–63
- Arnao MB, Hernández-Ruiz J (2009b). Chemical stress by different agents affects the melatonin content of barley roots. *J Pineal Res*, 46 (3): 295–299
- Arnao MB, Hernández-Ruiz J (2015). Functions of melatonin in plants: a review. *J Pineal Res*, 59 (2): 133–150
- Baxter A, Mittler R, Suzuki N (2014). ROS as key players in plant stress signalling. *J Exp Bot*, 65 (5): 1229–1240
- Byeon Y, Lee HY, Lee K, Park S, Back K (2014). Cellular localization and kinetics of the rice melatonin biosynthetic enzymes SNAT and ASMT. *J Pineal Res*, 56 (1): 107–114
- Du YP, Jin XJ, Guo SH, Fu QQ, Zhai H (2015). Effects of different salt and alkali stresses on ion distribution in Red globe/Beta grapevines. *Chin J Appl Ecol*, 26 (6): 1801–1806 (in Chinese with English abstract) [杜远鹏, 晋学娟, 郭淑华, 付晴晴, 翟衡 (2015). 不同盐碱类型胁迫对红地球/贝达葡萄植株离子分布的影响. *应用生态学报*, 26 (6): 1801–1806]
- Dubbels R, Reiter RJ, Klenke E, Goebel A, Schnakenberg E, Ehlers C, Schiwara HW, Schloot W (1995). Melatonin in edible plants identified by radioimmunoassay and by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J Pineal Res*, 18 (1): 28–31
- Foyer CH, Noctor G (2005). Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant Cell Environ*, 28 (8): 1056–1071
- Fu QQ, Geng QW, Zhai H, Du YP (2017). Effects of exogenous melatonin on physiological characteristics of 'Frontenac' grape roots and leaves under NaHCO_3 stress. *Plant Physiol J*, 53 (2): 248–256 (in Chinese with English abstract) [付晴晴, 耿庆伟, 翟衡, 杜远鹏 (2017). 外源褪黑素对 NaHCO_3 胁迫下'福客'葡萄根系和叶片生理特性的影响. *植物生理学报*, 53 (2): 248–256]
- Galano A, Tan DX, Reiter RJ (2011). Melatonin as a natural ally against oxidative stress: a physicochemical examination. *J Pineal Res*, 51 (1): 1–16
- Gao QH, Guo YY, Wu Y, Jia SS (2017). Alleviation effects of MT and Ca^{2+} on melon seedlings under salt stress. *Chin J Appl Ecol*, 28 (6): 1925–1931 (in Chinese with English abstract) [高青海, 郭远远, 吴燕, 贾双双 (2017). 盐胁迫下外源褪黑素和 Ca^{2+} 对甜瓜幼苗的缓解效应. *应用生态学报*, 28 (6): 1925–1931]
- Gao QH, Jia SS, Miao YM, Lu XM, Li HM (2016). Effects of exogenous melatonin on nitrogen metabolism and osmotic adjustment substances of melon seedlings under sub-low temperature. *Chin J Appl Ecol*, 27 (2): 519–524 (in Chinese with English abstract) [高青海, 贾双双, 苗永美, 陆晓民, 李慧敏 (2016). 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. *应用生态学报* 27 (2): 519–524]
- Guo R, Li F, Zhou J, Li HR, Xia X, Liu Q (2016). Eco-physiological responses of linseed (*Linum usitatissimum*) to salt and alkali stresses. *Chin J Plant Ecol*, 40 (1): 69–79 (in Chinese with English abstract) [郭瑞, 李峰, 周际, 李昊儒, 夏旭, 刘琪 (2016). 亚麻响应盐、碱胁迫的生理特征. *植物生态学报*, 40 (1): 69–79]
- Koyama FC, Carvalho TLG, Alves E, da Silva HB, de Azevedo MF, Hemery AS, Garcia CRS (2013). The structurally related auxin and melatonin tryptophan-derivatives and their roles in *Arabidopsis thaliana* and in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Eukaryot Microbiol*, 60 (6): 646–651
- Li C, Wang P, Wei Z, Liang D, Liu C, Yin L, Jia D, Fu M, Ma F (2012). The mitigation effects of exogenous melatonin on salinity-induced stress in *Malus hupehensis*. *J Pineal Res*, 53 (3): 298–306
- Li Y, Zhang Y, Feng F, Liang D, Cheng L, Ma F, Shi S (2010). Overexpression of a *Malus vacuolar Na⁺/H⁺* antiporter gene (*MdNHX1*) in apple rootstock M.26 and its influence on salt tolerance. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 102 (3): 337–345
- Li YN, Yuan SX, Xu LF, Yang PP, Feng YY, Hir YP, Ming J (2016). The physiological response of lily to NaHCO_3 stress. *Acta Horticult Sin*, 43 (6): 1126–1140 (in Chinese with English abstract) [李雅男, 袁素霞, 徐雷锋, 杨盼盼, 冯亚言, Hir YP, 明军 (2016). 百合在 NaHCO_3 胁迫下的生理响应机制. *园艺学报*, 43 (6): 1126–1140]
- Li ZG, Gong M (2005). Improvement of measurement method for superoxide anion radical in plant. *Acta Bot Yunnan*, 27 (2): 211–216 (in Chinese with English abstract) [李忠光, 龚明 (2005). 植物中超氧阴离子自由基测定方法的改进. *云南植物研究*, 27 (2): 211–216]
- Lin Z, Li S, Lin G, Guo J (1988). The accumulation of hydrogen peroxide in senescing leaves and chloroplasts in relation to lipid peroxidation. *Acta Phytophysiol Sin*, 14 (1): 16–22 (in Chinese) [林植芳, 李双顺, 林桂珠, 郭俊彦 (1988). 衰老叶片和叶绿体中 H_2O_2 的累积与膜脂过氧化的关系. *植物生理学报*, 14 (1): 16–22]
- Liu N, Jin Z, Wang S, Gong B, Wen D, Wang X, Wei M, Shi Q (2015). Sodium alkaline stress mitigation with exogenous melatonin involves reactive oxygen metabolism and ion homeostasis in tomato. *Sci Horticult*, 181 (2): 18–25
- Livak K, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. *Methods*, 25 (4): 402–408

- Meloni DA, Oliva MA, Martinez CA, Cambraia J (2003). Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress. *Environ Exp Bot*, 49 (1): 69–76
- Munns R, Tester M (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annu Rev Plant Biol*, 59: 651–681
- Nazar R, Iqbal N, Syeed S, Khan NA (2011). Salicylic acid alleviates decreases in photosynthesis under salt stress by enhancing nitrogen and sulfur assimilation and antioxidant metabolism differentially in two mungbean cultivars. *J Plant Physiol*, 168 (8): 807–815
- Parida AK, Das AB (2005). Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicol Environ*, 60 (3): 324–349
- Shida CS, Castrucci AML, Lamy-Freund MT (1994). Lamy-Freund MT. High melatonin solubility in aqueous medium. *J Plant Physiol*, 16 (4): 198–201
- Turk H, Erdal S, Genisel M, Atici O, Demir Y, Yanmis D (2014). The regulatory effect of melatonin on physiological, biochemical and molecular parameters in cold-stressed wheat seedlings. *Plant Growth Regul*, 74 (2): 139–152
- Verslues PE, Agarwal M, Katiyar-Agarwal S, Zhu J, Zhu JK (2006). Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *Plant J*, 45 (4): 523–539
- Xu F, Zhou H, Guo Z, Yu HA, Yuan Y, Gong Z, Wang Y (2013). The melatonin and its resistance to stress in plants. *Genom Appl Biol*, 32 (2): 260–266 (in Chinese with English abstract) [徐芳, 周海鹏, 郭早霞, 于宏安, 袁玉川, 巩智刚, 王玉华(2013). 植物褪黑素及其抗逆性研究. *基因组学与应用生物学*, 32 (2): 260–266]
- Yin L (2014). The establishment and application of the method for detection of melatonin in mulberry and mulberry wine (Master's thesis). Beijing: China Agricultural University (in Chinese with English abstract) [尹丽媛(2014). 桑葚果实及桑葚酒中褪黑素检测方法的建立与应用研究(硕士论文). 北京: 中国农业大学]
- Zhang N, Zhang H, Yang R, Huang Y, Guo Y (2012). The advances on functions study of melatonin in plants. *Chin Agr Sci Bull*, 28 (9): 16–20 (in Chinese with English abstract) [张娜, 张海军, 杨荣超, 黄韞宇, 郭仰东(2012). 褪黑素在植物中的功能研究进展. *中国农学通报*, 28 (9): 16–20]
- Zhao S, Shi G, Dong X (2002). *Techniques of Plant Physiological Experiment*. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press (in Chinese) [赵世杰, 史国安, 董新纯(2002). *植物生理学实验指导*. 北京: 中国农业科学技术出版社]
- Zhu JK (2003). Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Curr Opin Plant Biol*, 6 (5): 441–445
- Zuo B, Zheng X, He P, Wang L, Lei Q, Feng C, Zhou J, Li Q, Han Z, Kong J (2014). Overexpression of *MzASMT* improves melatonin production and enhances drought tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana* plants. *J Pineal Res*, 57 (4): 408–417

The response of melatonin to NaHCO_3 stress and the mechanism of exogenous melatonin treatment in alleviating NaHCO_3 stress in grapevine

FU Qing-Qing, TAN Ya-Zhong, ZHAI Heng, DU Yuan-Peng*

College of Horticulture Science and Engineering, Shandong Agricultural University / State Key Laboratory of Crop Biology; Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Horticultural Crops in Huanghuai Region, Ministry of Agriculture, Taian, Shandong 271018, China

Abstract: The one-year-old potted 'Frontenac' grapevines (*Vitis riparia*) were used as materials to investigate the effect of $85 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaHCO_3 stress on melatonin, serotonin and 2-hydroxy melatonin in different organs of grapevines, and exogenous melatonin was irrigated to study the effect of melatonin on the contents of organic osmotic adjustment substances and ions as well as the expression of ion transport-related genes under NaHCO_3 stress. The results show that melatonin content was reduced in leaves and especially in roots and stems under NaHCO_3 stress. In contrast, the content of serotonin in roots were significantly increased under NaHCO_3 treatment, 2-hydroxy melatonin in the roots were significantly reduced, and 2-hydroxy melatonin in leaves were increased. Under NaHCO_3 stress, O_2^- production rate and H_2O_2 content were significantly reduced, while contents of organic osmotic adjustment substances, soluble sugar, soluble protein, proline and K^+ , were increased by exogenous melatonin application; Na^+ content was significantly decreased; the expression levels of *VvNHXP* and *VvHKT* family genes were significantly increased in leaves by exogenous melatonin application. In conclusion, serotonin was produced in root and thereafter transported to aerial organs to scavenge free radicals and increase organic osmotic adjustment substances, additionally, the expression of ion transport-related genes, *VvNHXP* and *VvHKT*, were up-regulated to maintain ion balance and reduce the membrane injury under NaHCO_3 treatment.

Key words: grapevine; melatonin; NaHCO_3 ; organic osmotic adjustment substances; Na^+ ; K^+ ; *VvNHXP*; *VvHKT*

Received 2017-07-03 Accepted 2017-09-25

This work was supported by China's Agriculture Research System (Grant No. CARS-30), the Changjiang Scholars and Innovative Research Team in University Project (Grant No. IRT15R42), and National Natural Science Foundation of China (Grant No. 31501738).

*Corresponding author (E-mail: duyuanpeng001@163.com).