

王冬梅,张婕,殷璐,等.非生物胁迫对欧李叶片GABA积累及其生理生化特性的影响[J].华中农业大学学报,2025,44(1):50-61.
DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2025.01.006

非生物胁迫对欧李叶片GABA积累 及其生理生化特性的影响

王冬梅,张婕,殷璐,王鹏飞,穆霄鹏,张建成,张帅,杜俊杰

山西农业大学园艺学院,太谷 030801

摘要 为探究非生物胁迫下欧李(*Cerasus humilis*)叶片中 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)积累的调控策略及其内在机制,以“晋欧3号”欧李鲜叶为试验材料,采用浸泡、低温以及真空厌氧处理,测定各处理条件下叶片GABA含量、关键酶活性等生理生化指标。结果表明:谷氨酸钠(monosodium glutamate, MSG)、磷酸吡哆醛(pyridoxal phosphate, PLP)、NaCl浸泡处理和真空处理均对欧李叶片中GABA的积累、关键酶活性等生理生化指标有显著影响。MSG处理9 h,欧李叶片中GABA的积累效果最佳,其含量是未经处理(0 h)的2.3倍;真空处理15 h,−20 ℃处理6 h后,GABA含量分别是未经处理(0 h)的1.99倍、1.97倍;谷氨酸脱羧酶(glutamic acid decarboxylase, GAD)、二胺氧化酶(diamine oxidase, DAO)、多胺氧化酶(polyamine oxidase, PAO)活性均显著上升,GABA-T活性则显著降低;Glu、Ca²⁺、类黄酮、MDA、脯氨酸、可溶性蛋白含量显著上升,SOD、POD活性显著提高。结果表明,非生物胁迫使得欧李叶片渗透调节物质脯氨酸以及抗氧化酶活性增强,Ca²⁺含量积累,GAD活性增强,催化Glu合成GABA,降低GABA-T活性,减少GABA降解来达到欧李GABA富集的目的。

关键词 欧李; γ -氨基丁酸;非生物胁迫;代谢途径;积累机制

中图分类号 S662.5 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2025)01-0050-12

γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)是一种对生长发育有重要影响的非蛋白质氨基酸^[1]。在植物中有2条代谢途径:一是GABA支路(GABA shunt)^[2],谷氨酸(glutamate, Glu)经谷氨酸脱羧酶(glutamic acid decarboxylase, GAD)脱羧合成GABA;二是多胺降解途径^[3-4],在多胺氧化酶(polyamine oxidase, PAO)、二胺氧化酶(diamine oxidase, DAO)的作用下,多胺被催化生成4-氨基丁醛,最终形成GABA。GABA参与了人脑内超过40%的抑制性神经传导^[5],具有降血压、抗抑郁、镇静安神、治疗癫痫等保健作用。但人体内GABA合成能力会随着熬夜、人体衰老等因素而逐渐削弱,因此需要从外界摄入,但GABA在正常生长的植物组织中含量偏低,仅有0.3~32.5 μ mol/g。

迄今为止,关于非生物胁迫促进植物中GABA积累的报道已有很多。盐胁迫可提高番茄果实^[6]、烟草^[7]GAD酶活性,从而提高GABA含量;在低温环

境下荔枝叶^[8]、“龙井43”茶^[9]中GABA含量均不同程度升高;厌氧处理可以激活桑^[10]、茶^[11]等植物叶片中GAD活性,降低GABA-T活性,进而促进GABA合成,减少GABA降解。GABA是胁迫条件下的一个渗透调节物质,与活性氧增加密切相关。前期研究发现,外源GABA在清除氧自由基、降低丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量的同时,提高了超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化物酶(peroxidase, POD)和过氧化氢酶(catalase, CAT)的活性,增强植株对低氧的耐受能力^[12-13]。除此以外,植物还会产生大量的脯氨酸、多酚、黄酮类物质,从多方面清除活性氧,维护植物的正常生长。

欧李(*Cerasus humilis* (Bge.) Sok.)叶片营养价值较高,富含多种功能成分,各种元素含量远高于果实,100 g鲜叶中含有465 mg的钙和7%的粗蛋白质。此外,欧李叶片的抗氧化也非常强。乔羽佳^[14]的研究表明,叶片中的多酚含量可达67.76 mg/g,类黄酮

收稿日期:2024-05-28

基金项目:山西省回国留学人员科研资助项目(2020-062);山西农业大学学术恢复科研专项(2020xshf22;2020xshf23)

王冬梅,E-mail:wdm4560402@163.com

通信作者:杜俊杰,E-mail:djj738@163.com

含量达37.46 mg/g。制作的欧李茶有止咳镇喘、降三高、延缓衰老等功效,具有极高的保健功能。已有研究发现欧李叶片中GABA含量为0.6 mg/g^[15],但关于如何提高欧李中GABA含量还未有报道。目前国内外关于胁迫条件下欧李叶片的抗氧化功能研究主要还是集中在黄酮类和多酚类,并未联合GABA、抗氧化酶进行综合分析,对欧李叶片GABA积累机制与积累策略还鲜有报道。因此,本研究以欧李叶片为试验材料,探讨不同非生物胁迫下其GABA富集原理,以期为开发富含GABA的欧李叶茶提供理论依据和技术指导。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试欧李品种“晋欧3号”于2023年6月采自山西农业大学园艺研究站,选取基生新梢顶端往下7~12片成熟叶。

1.2 试验处理

1)浸泡处理。将鲜叶分别浸泡在25℃的不同溶液中:2%谷氨酸钠(monosodium glutamate, MSG)溶液、0.15 mol/L NaCl溶液、2.0 mmol/L 磷酸吡多醛(pyridoxal phosphate, PLP)溶液、蒸馏水(CK)中分别处理0、3、6、9、15 h,取出后用蒸馏水洗净,沥干表面的水分,液氮中研磨成粉末,−80℃保存备用。

2)真空厌氧处理。将欧李新鲜叶片分别经室温0.09 MPa真空处理0、9、12、15、18 h,取出后按上述方法粉碎存放。

3)低温处理。将欧李鲜叶分别置于4、−20℃低温环境中0、2、4、6、8 h,取出后按上述方法粉碎存放。

1.3 各项指标测定方法

1)GABA及其关键酶活、Ca²⁺、Glu含量的测定。GABA、GAD、GABA-T、DAO、PAO、Ca²⁺、Glu含量使用苏州格锐思生物科技有限公司的试剂盒进行测定。

2)类黄酮、总酚含量测定。利用NaNO₂-Al(NO₃)₃-NaOH比色法测定类黄酮含量^[16];采用Folin-Ciocalteu试剂法测定总酚含量^[17]。

3)膜脂过氧化、渗透调节物质含量、抗氧化酶活性测定。丙二醛(MDA)含量测定采用硫代巴比妥酸比色法^[18];游离脯氨酸(Pro)含量测定采用酸性茚三酮法^[19];可溶性蛋白(soluble protein, SP)含量测定采用考马斯亮蓝(G-250)法^[20];用氯蓝四唑光化还原法和愈创木酚法分别测定SOD、POD活性^[21]。

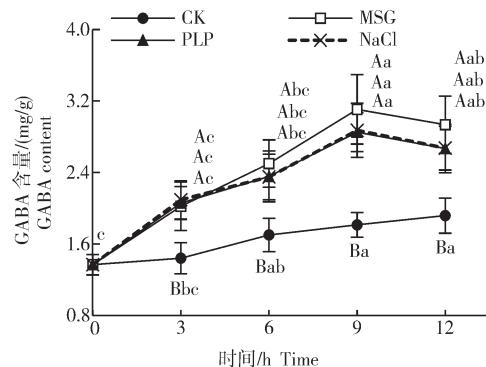
1.4 数据处理与统计分析

利用Microsoft Excel 2010和Origin作图,采用IBM SPSS Statistics 25进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 浸泡处理对欧李叶片GABA积累及相关生理生化特性的影响

1)浸泡处理对欧李叶片GABA含量的影响。由图1可知,不同浸泡处理有效促进了GABA积累,MSG、PLP、NaCl浸泡后GABA含量变化呈先上升后下降,总体含量呈增加趋势;对照组(CK)欧李叶片中GABA含量随时间延长呈现缓慢上升趋势;MSG、PLP、NaCl处理9 h后欧李叶片的GABA含量显著高于未经处理(0 h),分别增加了127.01%、108.02%、109.49%。



不同大写字母代表同一时间不同处理间存在显著差异($P<0.05$),不同小写字母代表不同时间同一处理下存在显著差异($P<0.05$),下同。Different uppercase letters represent significant differences under different treatments at the same time ($P<0.05$), different lowercase letters represent significant differences under the same treatment at different times ($P<0.05$), the same as below.

图1 浸泡处理下欧李叶片GABA含量变化

Fig. 1 Changes of GABA content in *C. humilis* leaves under soaking treatment

2)浸泡处理对欧李叶片GABA关键酶活性的影响。由图2A可知,不同浸泡处理后欧李叶片GAD活性呈现先升高后降低的变化规律。经MSG、NaCl、PLP浸泡处理后,叶片中GAD活性显著高于未经处理(0 h),其中NaCl、PLP处理9 h后GAD活性最高,分别是未经处理(0 h)的1.37倍、1.39倍,9 h后GAD活性逐渐降低,变化趋势与对照组(CK)相似;MSG浸泡处理6 h内GAD活性呈线性增长,并在6 h达到峰值,其活性是对照组(CK)的1.41倍,显著高于其他同期处理组。

由图2B可知,MSG、PLP和对照组(CK)处理条

件下,欧李叶片中GABA-T活性随浸泡处理时间的延长呈‘下降—上升—下降’趋势,NaCl处理下叶片GABA-T活性呈先下降后升高;随处理时间的延长,对照组(CK)和处理组叶片GABA-T活性整体呈下降趋势,各处理时间下叶片GABA-T活性均显著低于未经处理(0 h);3个处理组叶片浸泡处理12 h时,其GABA-T活性显著低于对照组(CK)。

由图2C可知,除NaCl处理欧李叶片DAO活性随处理时间延长逐渐提高外,其他处理的叶片DAO

活性变化呈先升后降趋势;3个处理组和对照组(CK)叶片DAO活性显著高于未经处理(0 h),MSG处理3 h和6 h时叶片DAO活性显著高于同期其他处理组和对照组(CK)。

由图2D可知,各处理组和对照组(CK)随时间的延长叶片PAO活性呈逐渐上升趋势,且3个处理组叶片PAO活性显著高于未经处理(0 h),其中MSG浸泡处理9 h时PAO活性增幅最高,是未经处理(0 h)的2.37倍,显著高于其他处理组和对照组(CK)。

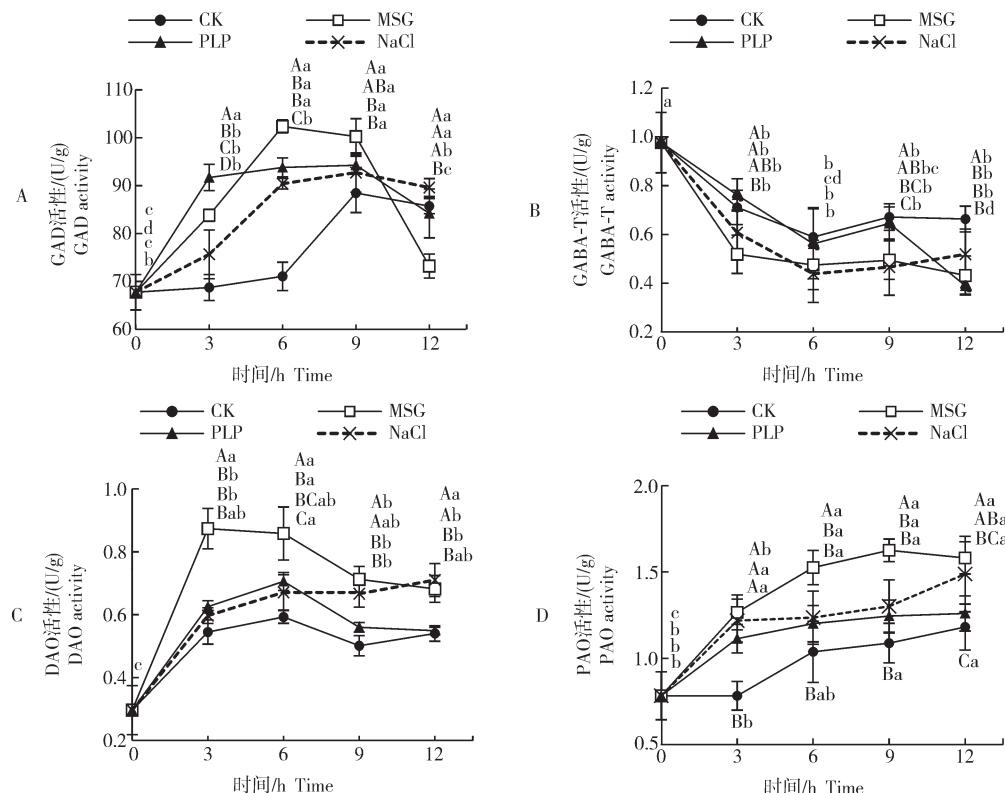


图2 浸泡处理下欧李叶片GABA关键酶活性变化

Fig. 2 Changes of GABA key enzyme activity in *C. humilis* leaves under soaking treatment

3)浸泡处理对欧李叶片GABA相关生理生化指标的影响。由图3A—G可知,3种浸泡处理均能有效提高欧李叶片中Glu、Ca²⁺、类黄酮、MDA、脯氨酸、可溶性蛋白含量,整体呈先升高后降低趋势,与GABA含量变化趋势相似,其中MSG处理6 h时Glu、Ca²⁺含量最高,分别是未经处理(0 h)的1.56、1.51倍,处理9 h时类黄酮、脯氨酸、MDA、可溶性蛋白含量最高,分别是未经处理(0 h)的1.23、1.91、1.28、1.72倍,显著高于同期其他处理组和对照组(CK);欧李叶片中总酚含量变化呈逐渐下降趋势,且MSG和PLP浸泡处理下叶片总酚含量显著低于对照组(CK)。

由图3H可知,随着处理时间的延长,NaCl、MSG浸泡处理下叶片SOD活性呈先上升后下降趋

势,NaCl浸泡处理6 h时SOD活性最高,MSG浸泡处理9 h时SOD活性增长幅度最大,分别是未经处理(0 h)的1.34倍、1.39倍,均显著高于同期对照组(CK);PLP处理叶片中SOD活性整体呈‘上升—下降—上升’趋势。

由图3I可知,MSG、PLP处理欧李叶片随处理时间的延长,POD活性呈先上升后下降趋势,且均在9 h时POD活性最高,分别是未经处理(0 h)的2.56倍、2.39倍,显著高于同期对照组;NaCl浸泡处理下叶片POD活性呈逐渐上升趋势。

4)浸泡处理下欧李叶片GABA含量和相关生理生化指标的相关性分析。由图4可知,浸泡处理下欧李叶片中GABA含量与GABA-T活性和总酚含量

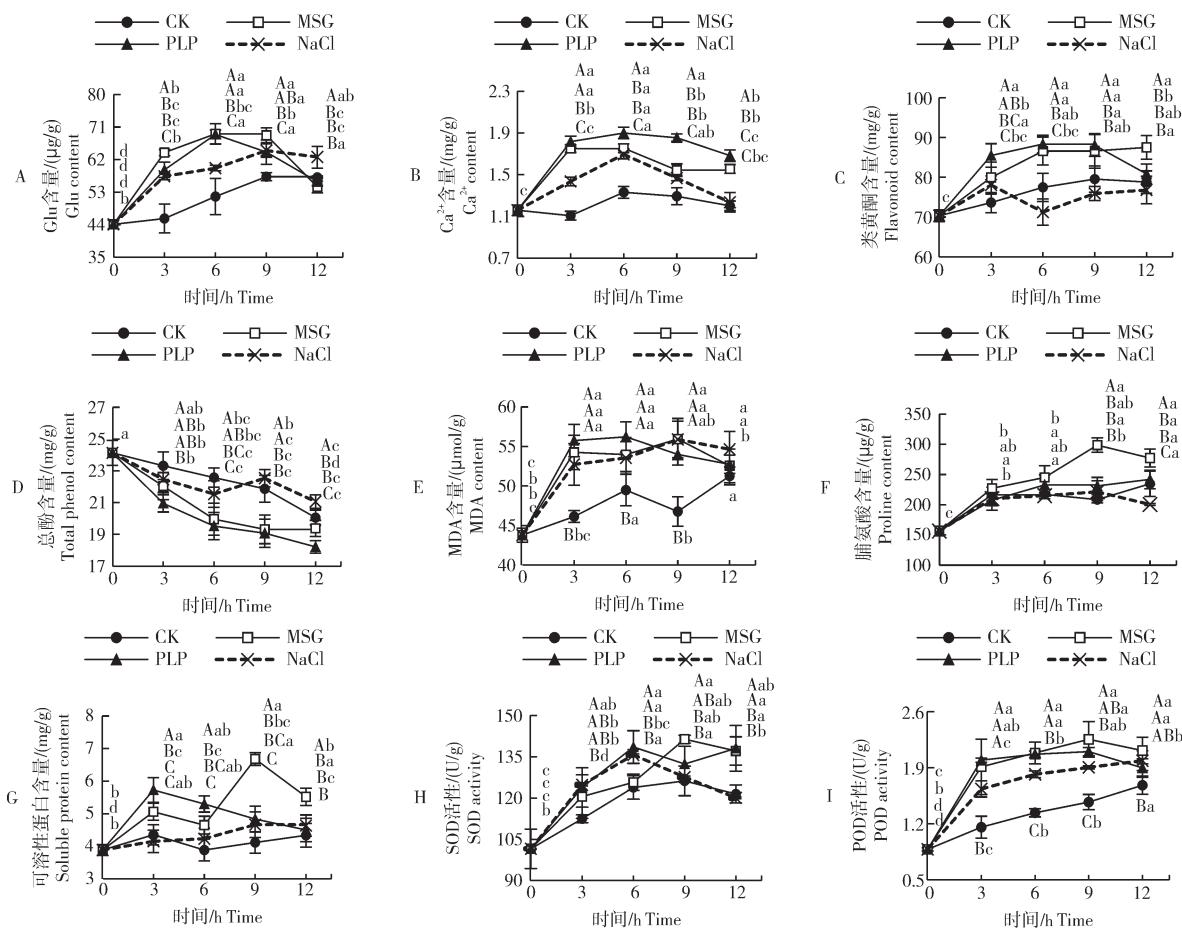


图3 浸泡处理下欧李叶片GABA相关生理生化指标的测定

Fig. 3 Determination of GABA-related physiological and biochemical indices in *C. humilis* leaves under soaking treatment

呈极显著负相关, 相关系数分别为 -0.57 、 -0.67 , 与其他11个指标均呈极显著($P\leq 0.001$)正相关, 相关系数范围为 $0.46\sim 0.75$, Ca^{2+} 与除Pro、GABA-T、总酚外的其他各项指标彼此间呈极显著($P\leq 0.01$ 或 $P\leq 0.001$)正相关; GABA-T活性与除总酚外的其他各项指标呈负相关关系, 但与类黄酮、SP相关性不显著($P>0.05$); 总酚含量与GABA-T活性呈极显著($P\leq 0.01$)正相关, 与DAO呈显著($P\leq 0.05$)负相关, 相关系数分别为 0.43 、 -0.30 , 与其他指标呈极显著($P\leq 0.01$ 或 $P\leq 0.001$)负相关。

2.2 真空厌氧处理对欧李叶片GABA积累及相关生理生化特性的影响

1) 真空厌氧处理对欧李叶片GABA含量的影响。由图5可知, 真空厌氧处理下欧李叶片中GABA含量随处理时间的延长呈先上升后下降趋势, 其GABA含量显著高于对照组(CK), 其中, 真空厌氧处理15 h GABA增长幅度最高, 相较于未经处理(0 h)增加了98.54%; 对照组(CK)叶片GABA含量

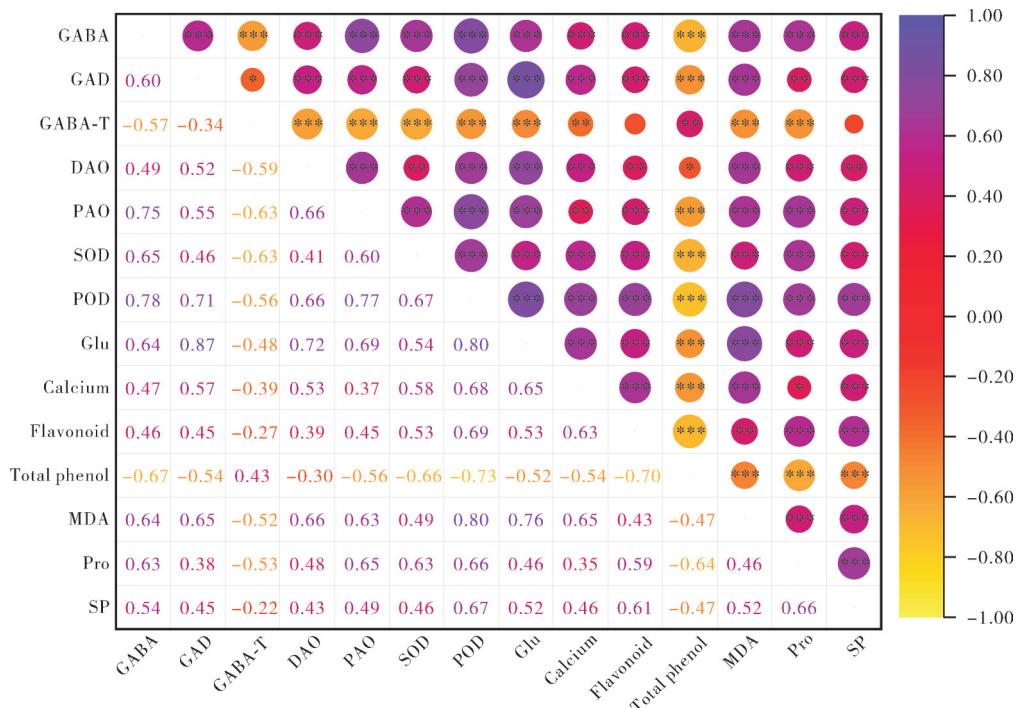
在真空厌氧处理12 h前呈缓慢上升, 处理12 h后GABA含量开始迅速下降。

2) 真空厌氧处理对欧李叶片GABA关键酶活性的影响。由图6A可知, 欧李叶片随真空厌氧处理时间的延长, GAD活性呈先上升后降低趋势, 显著高于对照组(CK), 真空厌氧处理15 h时GAD活性最高, 为 106.75 U/g , 分别是同期对照组(CK)、未经处理(0 h)的1.74倍、1.58倍, 15 h后GAD活性下降; 对照组叶片GAD活性呈下降趋势。

由图6B可知, GABA-T活性随真空厌氧处理时间的延长, 对照组(CK)和处理组均呈逐渐下降趋势, 与GABA含量变化趋势不一致, 且处理组GABA-T活性显著低于对照组(CK)。

由图6C可知, 真空厌氧处理后叶片DAO活性显著高于对照组(CK), 呈先上升后下降趋势, 在15 h时DAO活性最高, 分别是同期对照组(CK)、未经处理(0 h)的6.00倍、4.68倍, 差异显著。

由图6D可知, 真空处理后欧李叶片PAO活性显



*、**、***分别表示在0.05、0.01、0.001水平上显著相关，下同。*, **, *** indicate significant correlation at 0.05, 0.01, and 0.001 levels. The same as below.

图4 浸泡处理下GABA含量和相关生理生化指标的相关性分析

Fig. 4 Correlation analysis of GABA content with related physiological and biochemical indices under soaking treatment

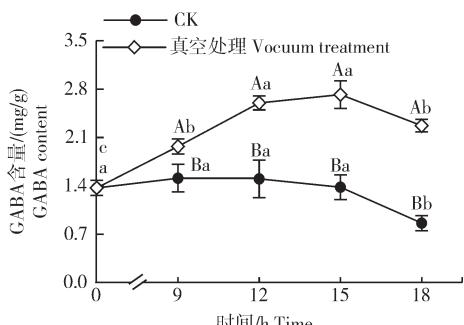


图5 真空处理下欧李叶片GABA含量变化

Fig. 5 Changes of GABA content in *C. humilis* leaves under vacuum treatment

著高于对照组(CK),呈先上升后下降趋势,与DAO活性变化趋势相似,在15 h时达到最大增幅,是未经处理(0 h)的2.65倍,显著高于同期对照组(CK)。

3) 真空厌氧处理对欧李叶片GABA相关生理生化指标的影响。由图7A—F可知,相较于对照组(CK),真空厌氧处理显著提高了欧李叶片中Glu、Ca²⁺、类黄酮、MDA、脯氨酸、可溶性蛋白含量,呈先上升后下降趋势,其中,真空厌氧处理15 h后Glu、Ca²⁺增长幅度较高,与GABA含量变化趋势一致;对照组(CK)叶片中相关生理生化指标含量整体呈缓慢

下降趋势。

由图7G可知,欧李叶片总酚含量随处理时间的延长呈逐渐下降趋势,且处理组和对照组(CK)随时间延长总酚含量均显著低于未处理(0 h)。

由图7H可知,对照组(CK)叶片SOD活性随处理时间的延长呈逐渐下降趋势,最终趋于平缓;真空厌氧处理下SOD活性显著提高,18 h时其活性是未处理(0 h)的1.37倍,显著高于同期对照组,与GABA含量变化趋势不一致。

由图7I可知,对照组(CK)叶片POD活性随时间的延长整体呈下降趋势;真空厌氧处理下POD活性在0~12 h逐渐升高,12 h达到峰值,分别是未经处理(0 h)和同期对照组(CK)的2.65倍、2.31倍,差异显著;12 h后活性逐渐下降并趋于平缓,与GABA含量变化趋势相似。

4) 真空处理下GABA含量和相关生理生化指标的相关性分析。如图8可知,真空处理下欧李叶片GABA含量变化与GABA-T活性呈极显著($P \leq 0.001$)负相关,相关系数为-0.65,与总酚含量相关性不显著,与其他各项指标呈极显著($P \leq 0.001$)正相关;GABA-T活性与总酚含量呈极显著($P \leq 0.01$)正相关,与其他

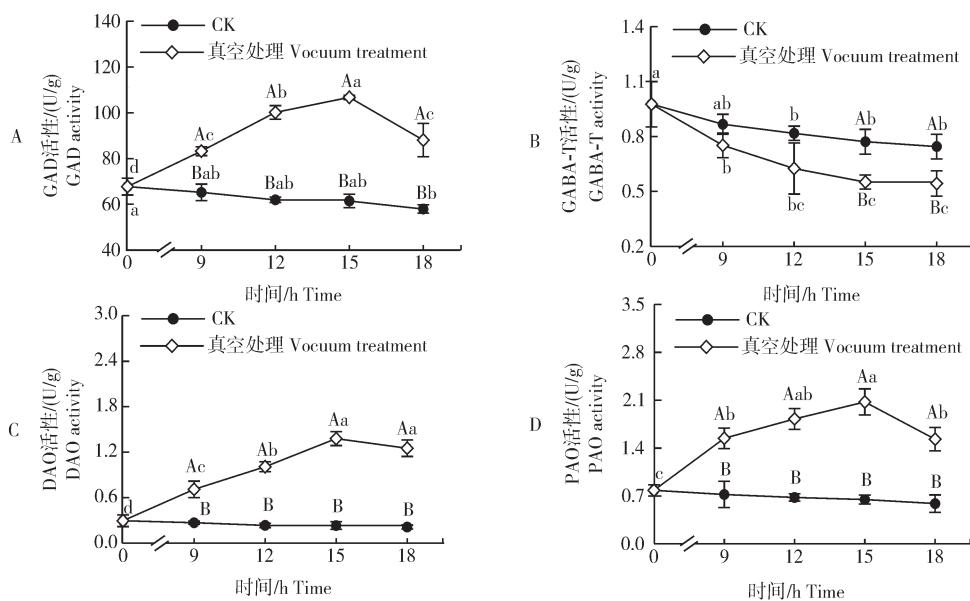


图6 真空处理下欧李叶片GABA关键酶活性变化

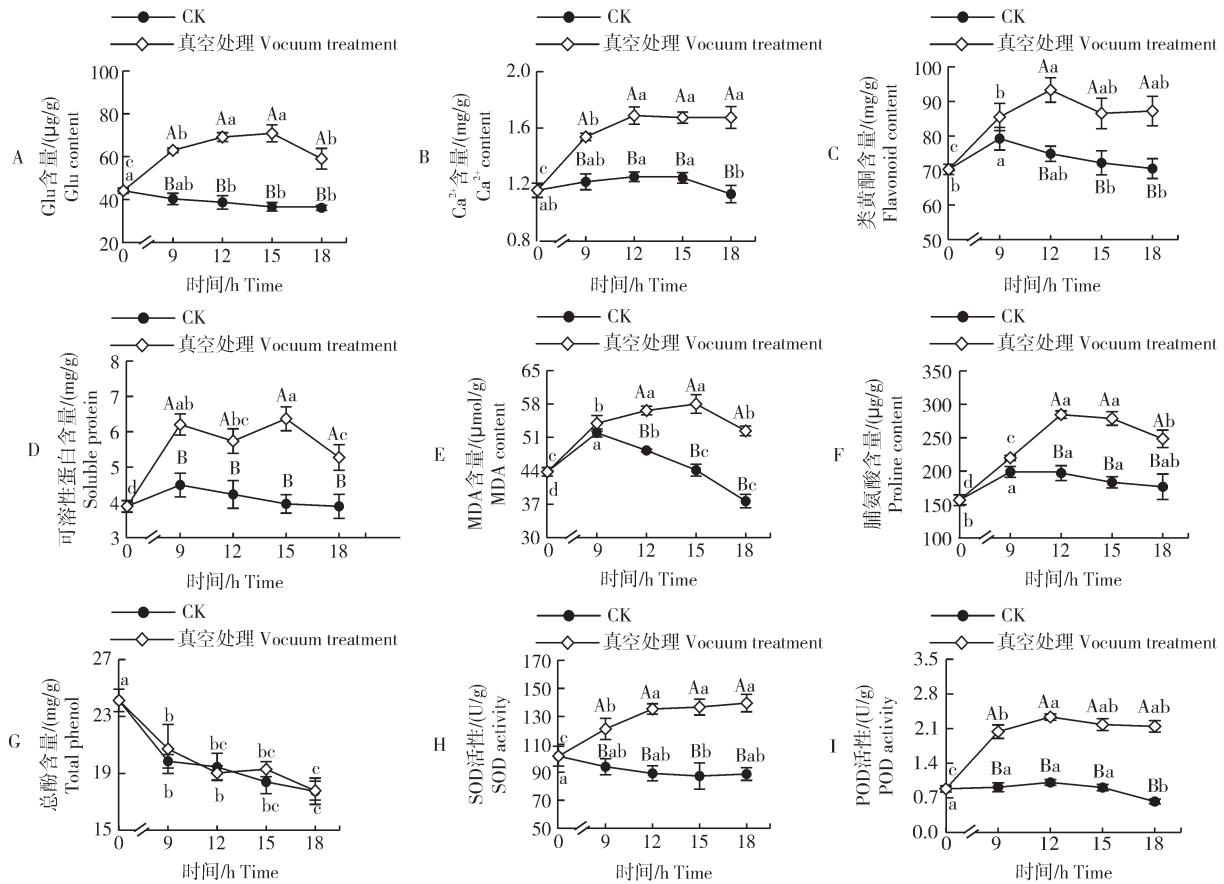
Fig. 6 Changes of GABA key enzyme activity in *C. humilis* leaves under vacuum treatment

图7 真空处理下欧李叶片GABA相关生理生化指标的测定

Fig. 7 Determination of GABA-related physiological and biochemical indices

in *C. humilis* leaves under vacuum treatment各项指标呈极显著($P \leq 0.01$ 或 $P \leq 0.001$)负相关;

2.3 低温处理对欧李叶片GABA积累及相关生理

总酚含量与其他各项指标相关性不显著($P > 0.05$); 生化特性的影响其余各项指标间均呈极显著($P \leq 0.001$)正相关。

1) 低温处理对欧李叶片GABA含量的影响。由



图8 真空处理下GABA含量和相关生理生化指标的相关性分析

Fig. 8 Correlation analysis of GABA content with related physiological and biochemical indices under vaccum treatment

图9可知,经4℃低温处理后,GABA含量呈逐渐上升趋势,但与对照组(CK)相比差异不显著;经-20℃冷冻处理2、4、6、8 h后,欧李叶片中的GABA含量比未经处理(0 h)增加44.53%、80.29%、97.08%、64.23%,呈先上升后下降趋势,且-20℃处理GABA含量显著高于同期对照组(CK)和4℃低温处理。

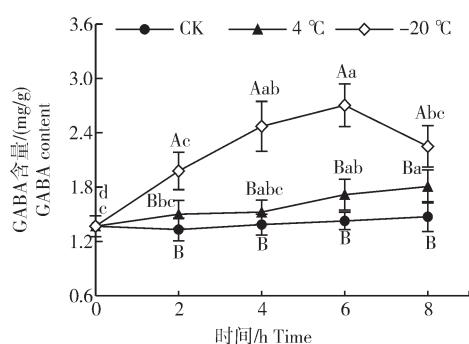


图9 低温处理下欧李叶片GABA含量变化

Fig. 9 Changes of GABA content in *C. humilis* leaves under low temperature treatment

2)低温处理对欧李叶片GABA关键酶活性的影响。由图10A可知,相较于对照组(CK)GAD活性逐渐下降,4℃低温处理后GAD活性变化呈逐渐上升趋势,与GABA含量变化趋势一致,且4℃低温处理的叶片GAD活性始终高于对照组(CK);-20℃处

理后GAD活性变化趋势与浸泡、真空处理相似,0~2 h处理时GAD活性缓慢增加,与对照组(CK)、4℃低温处理差异不显著,2 h后增长速度加快,并在4 h达到最高。

由图10B可知,对照组(CK)和处理组GABA-T活性均呈下降趋势,与GABA含量变化趋势不一致,其中,4℃低温处理组和对照组(CK)GABA-T活性差异不显著,-20℃处理GABA-T下降趋势最明显,与GAD活性变化趋势相反。

由图10C可知,4℃和-20℃低温处理下,叶片DAO活性均呈先上升后下降趋势,0~2 h 4℃和-20℃低温处理DAO活性迅速提高,与对照组(CK)差异显著,4 h后4℃低温处理下DAO活性逐渐下降,-20℃低温处理6 h时DAO活性显著高于同期对照组(CK)和4℃低温处理组。

由图10D可知,相较于对照组(CK)PAO活性逐渐下降,4℃低温处理下叶片PAO活性呈逐渐上升趋势,在8 h时活性最高;-20℃处理呈先上升后下降趋势,6 h时活性最高。

3)低温处理对欧李叶片GABA相关生理生化指标的影响。由图11A—G可知,低温处理均可显著促进欧李叶片中Glu、Ca²⁺含量增加,类黄酮、脯氨酸、

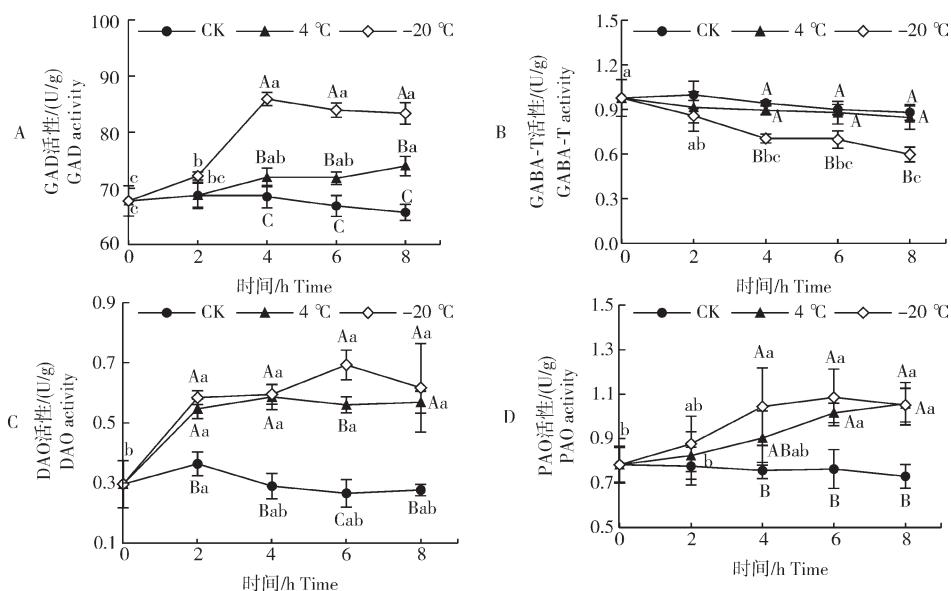


图10 低温处理下欧李叶片GABA关键酶活性变化

Fig. 10 Changes of GABA key enzyme activity in *C. humilis* leaves under low temperature treatment

可溶性蛋白质含量先上升后下降;处理组欧李叶片中总酚含量均呈下降趋势,与对照组相比相对较缓,处理4、6、8 h时总酚含量显著高于同期对照组(CK)。4 °C处理MDA含量逐渐上升,-20 °C处理MDA含量呈先上升后下降趋势。

由图11H可知,4 °C低温处理叶片随时间延长,SOD活性逐渐增加,-20 °C低温处理呈先上升后下降趋势,与MDA含量变化相似;但-20 °C处理后SOD活性始终高于对照组(CK)和4 °C低温处理。

由图11I可知,相较于对照组(CK),4 °C低温处

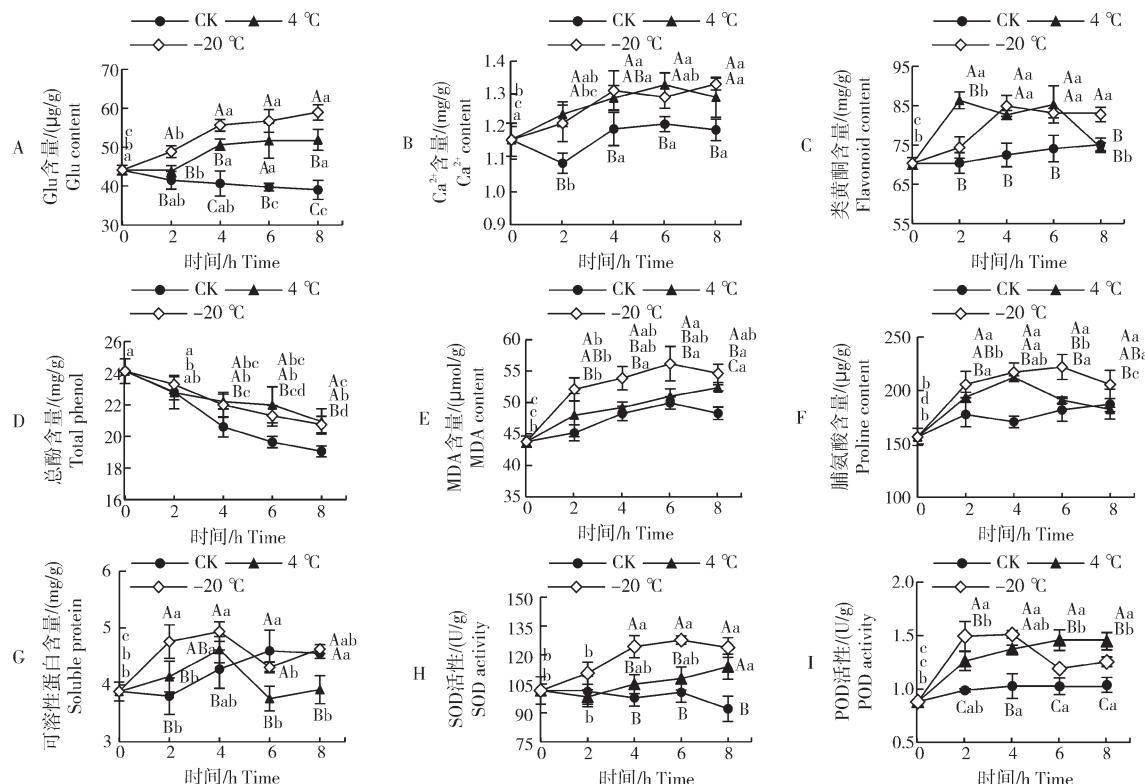


图11 低温处理下欧李叶片GABA相关生理生化指标的测定

Fig. 11 Determination of GABA-related physiological and biochemical indices

in *C. humilis* leaves under low temperature treatment

理叶片随时间延长,POD活性逐渐增加,与SOD变化相似,−20℃处理POD活性呈‘上升一下降一上升’的趋势;4℃、−20℃低温处理的POD活性显著高于同期对照组(CK)。

4) 低温处理下GABA含量和相关生理生化指标的相关性分析。由图12可知,低温处理下欧李叶片GABA含量与GABA-T活性呈极显著($P\leqslant 0.001$)负相关,与SP含量呈显著($P\leqslant 0.05$)正相关,与总酚含量相关性不显著($P>0.05$),与其他各项指标呈极

显著($P\leqslant 0.01$ 或 $P\leqslant 0.001$)正相关,相关系数范围为0.48~0.86;GABA-T活性与POD活性呈显著($P\leqslant 0.05$)负相关,与除总酚含量和POD活性外的其他各项指标均呈极显著($P\leqslant 0.01$ 或 $P\leqslant 0.001$)负相关;总酚含量与MDA含量呈显著($P\leqslant 0.05$)负相关,与其他指标相关性不显著($P>0.05$);SP含量与GAD活性、GABA、MDA含量呈显著($P\leqslant 0.05$)正相关,与Pro含量呈极显著($P\leqslant 0.01$)正相关,相关系数为0.52,与其他各项指标相关性不显著。



图12 低温处理下GABA含量和相关生理生化指标的相关性分析

Fig. 12 Correlation analysis of GABA content with related physiological and biochemical indices under low temperature treatment

3 讨 论

在逆境条件下,如高温、低温、低氧、盐胁迫以及机械损伤等,GABA的含量会显著上升,而在这些逆境中,低氧胁迫导致的GABA积累量最为显著。植物受到低氧胁迫后,会抑制三羧酸循环,琥珀酸半醛脱氢酶活性降低,进而抑制GABA-T活性,降低了GABA的降解率,逆向促使GABA累积^[22]。除此以外,低氧还可使细胞质pH下降,GAD在酸性条件下激活,促进了GABA合成^[23]。常用的低氧胁迫条件包括浸泡和真空处理。胁迫条件下,GABA合成和积累会随Glu浓度的升高而增加。毛清黎等^[24]将鲜叶浸泡在2.5% MSG中进行厌氧处理,能使茶叶中GABA含量明显增加。本研究发现,MSG浸泡处理

下Glu含量变化趋势与GABA相似,处理9 h对欧李叶片GABA积累效果最佳,是未处理叶片的2.3倍,且GABA、Glu、GAD三者间呈显著正相关。上述结果表明,GAD活性和GABA合成积累量与底物含量密切相关。PLP是GAD辅酶,用适当浓度的PLP溶液浸泡欧李叶片,GAD活性有效提高,促进GABA含量积累。

除此以外,植物在逆境条件下,胞内Ca²⁺浓度会迅速升高,Ca²⁺/CaM与GAD的5'-磷酸吡哆醛保守结构域结合,激活GAD活性并富集GABA^[25]。因此,Ca²⁺有促进植物GABA积累的作用。盐胁迫是最常见的环境胁迫之一。白青云^[26]研究表明,盐胁迫条件下,发芽粟谷培养液中加入Ca²⁺螯合剂-EG-

TA、 Ca^{2+} 通道阻断剂- LaCl_3 后,会阻碍SP和GABA合成。本研究发现,通过 NaCl 、MSG、PLP浸泡处理可有效提高欧李叶片 Ca^{2+} 含量,且与GAD、SP、GABA含量呈显著正相关。根据上述结果和前期的研究,推断 Ca^{2+} 通过调节细胞内可溶性蛋白含量和GAD活性,在低氧胁迫和盐胁迫下促进GABA合成。

前期研究表明,厌氧条件下黄茶的Glu含量下降,GABA含量增加20多倍^[27]。本试验与前人的研究存在一定的差异,即随真空厌氧时间延长,GABA和Glu含量均呈先上升后下降的变化规律,且显著高于对照组。低氧不仅影响GABA-T、GAD活性,也影响多胺降解途径。真空厌氧条件下,GAD、DAO、PAO活性变化与GABA含量变化趋势相似,且呈显著正相关关系。有研究表明,番茄在经 CO_2 厌氧处理后,多胺降解途径中的腐胺、精胺含量、DAO活性均显著提高,促进了GABA积累^[28],这与本研究结果相似。

低温环境可以有效提高GABA含量。本研究发现,随着 -20°C 低温处理时间的延长,GABA含量呈先升后降的趋势,6 h达到峰值, 4°C 低温处理呈缓慢上升趋势,且 -20°C 低温处理后GABA含量增幅显著高于 4°C 低温处理。夏兴莉等^[9]研究发现,茶叶GABA含量随 4°C 低温处理时间的延长呈先升后降趋势,处理6 h后GABA含量达到最高,试验结果与本研究略有不同,这可能是因为冻害使细胞内产生较大的冰晶体,细胞膜被损害,细胞间的区域化被打破,既能使 Ca^{2+} 、 H^+ 等进入细胞质,与细胞中的 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 结合,激活GAD活性,又能使得酶与底物充分反应,促使GABA含量持续积累。

当植物遭遇非生物胁迫时会积累大量以总酚、黄酮类为主的次生代谢物质,清除自由基、抗氧化,提高植物的抗逆性。研究表明,银杏体内氧化性物质ROS、NADH、 H^+ 随着胁迫程度增强而大量积累,导致类黄酮、酚酸类等还原性物质含量增加;当植株面临重度胁迫时,则会因气孔的关闭而导致生命活动的下降,供应给次生代谢的初生代谢产物不足,类黄酮物质含量减少^[29]。本研究结果发现,随胁迫时间的延长类黄酮含量为先增加后降低的变化规律。但与前人研究不一致的是胁迫条件下欧李叶片总酚含量均有不同程度下降,这可能是因为多酚氧化酶与多酚发生酶促反应,从而导致总酚含量有所降低。同时,本研究还发现低温处理促进了类黄酮合成。低温条件下, $\text{Ca}^{2+}/\text{ABA}$ 将信号传递给下游糖类物质及类黄酮合成酶基因,从而促进糖类的积累,为次生

代谢物质类黄酮提供物质基础,同时增强类黄酮代谢相关酶活性^[30]。

植物在遭受胁迫时,能激发SOD、POD等抗氧化酶活性,增加Pro等渗透调节物质,增强自身的抗逆性。研究表明,GABA能通过提高抗氧化酶活性、内源脯氨酸、甜菜碱和可溶性糖含量,降低相对电导率来提高抗盐性^[12]。本研究发现欧李叶片在胁迫条件下,膜脂过氧化程度随胁迫时间延长而先升高后降低,SOD、POD活性变化趋势与MDA一致,表明胁迫能够促欧李叶片抗氧化酶活性的提高。另有研究发现,多胺^[31]和GABA作用如同脯氨酸、甜菜碱,在胁迫条件下有较强的抗氧化活性,能有效地清除自由基,是逆境条件下的渗透调节物质。当GABA浓度为25~200 mmol/L时,可以稳定和保护离体类囊体膜免受盐胁迫下的冷冻损伤,其作用强于脯氨酸^[9]。本研究发现,胁迫条件下,GABA含量与SOD、POD、MDA、Pro、SP呈显著正相关。

本研究仅是对非生物胁迫下欧李叶片GABA的富集机制进行初探,并未从欧李植株整个生长发育过程的角度探索其GABA在逆境条件下的富集机制。除此以外,本研究只是从生理生化角度阐释欧李叶片GABA在非生物胁迫下的富集机制,对于各种非生物胁迫条件下GABA的合成,以及其与抗氧化酶等物质的相互作用,有待从分子水平进行深入探究。

参考文献 References

- [1] NIKMARAM N, DAR B, ROOHINEJAD S, et al. Recent advances in γ -aminobutyric acid (GABA) properties in pulses: an overview [J]. Journal of the science of food and agriculture, 2017, 97(9): 2681-2689.
- [2] SHELP B J, BOZZO G G, TROBACHER C P, et al. Hypothesis/review: contribution of putrescine to 4-aminobutyrate (GABA) production in response to abiotic stress [J]. Plant science, 2012, 193/194: 130-135.
- [3] GUO Y X, YANG R Q, CHEN H, et al. Accumulation of γ -aminobutyric acid in germinated soybean (*Glycine max* L.) in relation to glutamate decarboxylase and diamine oxidase activity induced by additives under hypoxia [J]. European food research and technology, 2012, 234(4): 679-687.
- [4] SHELP B J, MULLEN R T, WALLER J C. Compartmentation of GABA metabolism raises intriguing questions [J]. Trends in plant science, 2012, 17(2): 57-59.
- [5] 韩济生. 中枢神经介质概论[M]. 北京:科学出版社, 1980.
- [6] HAN J S. Introduction to central nervous medium [M]. Beijing: Science Press, 1980 (in Chinese).
- [7] ZUSHI K, MATSUZOE N. Salt stress-enhanced γ -aminobu-

- tyric acid (GABA) in tomato fruit[J].Acta horticulturae, 2007 (761):431-435.
- [7] AKÇAY N, BOR M, KARABUDAK T, et al. Contribution of Gamma amino butyric acid (GABA) to salt stress responses of *Nicotiana sylvestris* CMSII mutant and wild type plants[J]. Journal of plant physiology, 2012, 169(5):452-458.
- [8] 周沫霖,胡卓炎,赵雷,等.不同低温贮藏对荔枝 γ -氨基丁酸富集及贮藏品质的影响[J].现代食品科技, 2016, 32(3): 189-196.ZHOU M L, HU Z Y, ZHAO L, et al. Effect of different low-temperature storage methods on γ -aminobutyric acid accumulation and storage quality of litchi[J]. Modern food science and technology, 2016, 32(3): 189-196.
- [9] 夏兴莉,廖界仁,任太钰,等.低温处理对茶树叶片中 γ -氨基丁酸和其他活性成分含量的影响[J].植物资源与环境学报, 2020, 29(5):75-77.XIA X L, LIAO J R, REN T Y, et al. Effect of low temperature treatment on contents of γ -aminobutyric acid and other active components in leaf of *Camellia sinensis* [J]. Journal of plant resources and environment, 2020, 29(5): 75-77 (in Chinese with English abstract).
- [10] 陈庆.桑叶主要内含成分年动态变化及提高桑叶中 γ -氨基丁酸工艺研究[D].长沙:湖南农业大学, 2011.CHEN Q. Study on the annual dynamic changes of main components in mulberry leaves and the technology of improving γ -aminobutyric acid in mulberry leaves[D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2011 (in Chinese with English abstract).
- [11] LIAO J R, WU X Y, XING Z Q, et al. γ -Aminobutyric acid (GABA) accumulation in tea (*Camellia sinensis* L.) through the GABA shunt and polyamine degradation pathways under *Anoxia*[J].Journal of agricultural and food chemistry, 2017, 65 (14):3013-3018.
- [12] 李敬蕊,杨丽文,王春燕. γ -氨基丁酸对低氧胁迫下甜瓜幼苗抗氧化酶活性及表达的影响[J].东北农业大学学报, 2014, 45(11): 28-4. LI J R, YANG L W, WANG C Y. Effects of γ -aminobutyric acid on the activity and expression of antioxidant enzymes in muskmelon seedlings under hypoxia stress[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2014, 45(11): 28-42 (in Chinese with English abstract).
- [13] 高洪波,郭世荣.外源 γ -氨基丁酸对营养液低氧胁迫下网纹甜瓜幼苗抗氧化酶活性和活性氧含量的影响[J].植物生理与分子生物学学报, 2004, 30(6): 651-659. GAO H B, GUO S R. Effects of exogenous γ -aminobutyric acid on antioxidant enzyme activity and reactive oxygen content of muskmelon seedlings under hypoxia stress of nutrient solution [J]. Journal of plant physiology & molecular biology, 2004, 30 (6): 651-659 (in Chinese with English abstract).
- [14] 乔羽佳.欧李种质类黄酮和多酚含量分析及器官年动态变化研究[D].太谷:山西农业大学, 2019.QIAO Y J. Analysis of flavonoids and polyphenols in *Prunus humilis* germplasm and study on annual dynamic changes of organs[D]. Taigu: Shanxi Agricultural University, 2019 (in Chinese with English abstract).
- [15] 董姊怡,王安琪,李卫东.高效液相色谱法测定欧李不同部位 γ -氨基丁酸的含量[J].东北农业科学, 2017, 42(2): 60-64. DONG Z Y, WANG A Q, LI W D. Determination of the content of γ -aminobutyric acid in different parts of *Cerasus humilis* by high performance liquid chromatography method [J]. Journal of northeast agricultural sciences, 2017, 42(2): 60-64 (in Chinese with English abstract).
- [16] 乔羽佳,王鹏飞,张建成,等.光照强度对欧李果实成熟期及品质的影响[J].山西农业科学, 2019, 47(5):865-869.QIAO Y J, WANG P F, ZHANG J C, et al. Effects of light intensity on fruit mature period and quality of Chinese dwarf cherry[J]. Journal of Shanxi agricultural sciences, 2019, 47(5): 865-869 (in Chinese with English abstract).
- [17] 汪晓谦.红肉苹果酚类代谢及其对逆境的响应研究[D].杨凌:西北农林科技大学, 2015.WANG X Q. Phenolic metabolism of red-fleshed apple and its response to adversity [D]. Yangling: Northwest A & F University, 2015 (in Chinese with English abstract).
- [18] 赵世杰,许长成,邹琦,等.植物组织中丙二醛测定方法的改进[J].植物生理学通讯, 1994, 30(3): 207-210.ZHAO S J, XU C C, ZOU Q, et al. Improvement of determination method of malondialdehyde in plant tissues [J]. Plant physiology communications, 1994, 30(3): 207-210 (in Chinese).
- [19] 高俊凤.植物生理学实验指导[M].北京:高等教育出版社, 2006.GAO J F. Experimental guidance for plant physiology [M]. Beijing: Higher Education Press, 2006 (in Chinese).
- [20] 曹建康,姜微波,赵玉梅.果蔬采后生理生化实验指导[M].北京:中国轻工业出版社, 2007:54-76.CAO J K, JIANG W B, ZHAO Y M. Guidance on postharvest physiological and biochemical experiments of fruits and vegetables [M]. Beijing: China Light Industry Press, 2007:54-76 (in Chinese).
- [21] 郑国琦,许兴,徐兆桢,等.盐胁迫对枸杞光合作用的气孔与非气孔限制[J].西北农业学报, 2002, 11(3):87-90.ZHENG G Q, XU X, XU Z Z, et al. The effect of salt stress on the stomatal and non-stomatal limitation of photosynthesis of wolfberry[J]. Acta agriculturae boreali-occidentalis sinica, 2002, 11 (3):87-90 (in Chinese with English abstract).
- [22] SCOTT-TAGGART C P, VAN CAUWENBERGHE O R, MCLEAN M D, et al. Regulation of γ -aminobutyric acid synthesis *in situ* by glutamate availability [J]. Physiologia plantarum, 1999, 106(4):363-369.
- [23] CRAWFORD L A, BOWN A W, BREITKREUZ K E, et al. The synthesis of γ -aminobutyric acid in response to treatments reducing cytosolic pH [J]. Plant physiology, 1994, 104 (3): 865-871.
- [24] 毛清黎,代小梅,杨新河,等.真空及外源谷氨酸钠处理对茶叶中 γ -氨基丁酸富集作用研究[J].食品与机械, 2009, 25 (4): 49-51.MAO Q L, DAI X M, YANG X H, et al. Enrichment of γ -aminobutyric acid in tea by vacuum treatment and extrogenous sodium glutamate [J]. Food & machinery, 2009, 25(4):49-51 (in Chinese with English abstract).

- [25] PANDEY S, TIWARI S B, UPADHYAYA K C, et al. Calcium signaling: linking environmental signals to cellular functions [J]. Critical reviews in plant sciences, 2000, 19(4): 291-318.
- [26] 白青云. 低氧胁迫和盐胁迫下发芽粟谷 γ -氨基丁酸富集机理及抗氧化性研究[D]. 南京:南京农业大学, 2009. BAI Q Y. Study on enrichment mechanism and antioxidant activity of γ -aminobutyric acid in germinated millet under hypoxia stress and salt stress [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2009 (in Chinese with English abstract).
- [27] 章垚琪, 潘卫东, 傅玲琳, 等. 低氧处理对黄茶生物活性的影响及 γ -氨基丁酸富集的代谢组学分析[J]. 食品科学, 2023, 44(6): 65-73. ZHANG Y Q, QIAN W D, FUL L L, et al. Effect of anaerobic treatment on bioactive properties of yellow tea and metabolomic analysis of its promoting effect on γ -aminobutyric acid enrichment [J]. Food science, 2023, 44(6): 65-73 (in Chinese with English abstract).
- [28] DEEWATTHANAWONG R, ROWELL P, WATKINS C B. γ -Aminobutyric acid (GABA) metabolism in CO₂ treated tomatoes [J]. Postharvest biology and technology, 2010, 57 (2): 97-105.
- [29] WANG L, SHI H, WU J S, et al. Alternative partial root-zone irrigation enhances leaf flavonoid accumulation and water use efficiency of *Ginkgo biloba* [J]. New forests, 2016, 47 (3): 377-391.
- [30] REDDY V S, REDDY A S N. Proteomics of calcium-signaling components in plants [J]. Phytochemistry, 2004, 65 (12): 1745-1776.
- [31] KAO C. Physiological significance of stress-induced changes in polyamines in plants [J]. Botanical bulletin of academia sinica, 1997, 38(3): 141-144.

Effects of abiotic stress on accumulation of γ -aminobutyric acid and physiological and biochemical characteristics in leaves of *Cerasus humilis*

WANG Dongmei, ZHANG Jie, YIN Lu, WANG Pengfei,
MU Xiaopeng, ZHANG Jiancheng, ZHANG Shuai, DU Junjie

College of Horticulture, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China

Abstract Fresh leaves of *Cerasus humilis* ‘Jinou 3’ were used to study the regulatory strategies and underlying mechanisms of the accumulation of γ -aminobutyric acid (GABA) in leaves of *C. humilis* under abiotic stress. Using soaking, low temperature, and vacuum anaerobic treatment, The accumulation of GABA, the activity of the key enzymes for GABA, and the related physiological and biochemical indexes in leaves under the treatments including soaking, low temperature, and vacuum anaerobic method were measured. The results showed that soaking with monosodium glutamate (MSG), pyridoxal phosphate (PLP) and NaCl, and vacuum anaerobic method had significant effects on the accumulation of GABA, the activity of the key enzymes for GABA, and the related physiological and biochemical indexes in leaves of *C. humilis*. The GABA accumulation effect of soaking with MSG for 9 h on the accumulation of GABA in leaves of *C. humilis* was the best, with 2.3 times of that of untreated leaves (CK). The content of GABA in leaves of *C. humilis* after vacuum for 15 h and -20 °C for 6 h was 1.99 and 1.97 times higher than that of untreated leaves (CK). The activity of glutamic acid decarboxylase (GAD), diamine oxidase (DAO), polyamine oxidase (PAO), SOD and POD, and the content of Glu, Ca²⁺, flavonoids, MDA, proline and soluble protein all significantly increased, while the activity of GABA-T significantly decreased. It is indicated that abiotic stress enhances the content of proline as osmotic regulator and the activity of antioxidant enzymes, accumulates the content of Ca²⁺, increases the activity of GAD, catalyzes the synthesis of GABA by Glu, reduces the activity of GABA-T, and decreases GABA degradation in leaves of *C. humilis* to achieve the enrichment of GABA.

Keywords *Cerasus humilis*; γ -aminobutyric acid (GABA); abiotic stress; metabolic pathway; mechanism of accumulation

(责任编辑:葛晓霞)