

## 低温锻炼对草莓组培苗抗寒性及 抗氧化酶活性的影响

张勇, 汤浩茹, 罗娅, 蒋豪

(四川农业大学林学院园艺学院, 四川雅安 625014)

**摘要:**草莓组织培养苗经 4℃低温锻炼后抗寒性明显增强, SOD、CAT、POD 和 APX 活性明显提高, 可溶性蛋白质、脯氨酸和可溶性糖等渗透调节物质含量增加。同时, 低温锻炼对膜造成了一定程度的伤害, 表现为 MDA 含量的增加。脱锻炼后抗氧化酶活性和可溶性蛋白质、脯氨酸、可溶性糖及 MDA 含量略有下降, 但仍高于未锻炼植株。这些变化是草莓组织培养苗适应低温逆境的生理生化基础。

**关键词:**草莓; 低温锻炼; 抗寒性; 抗氧化酶

**中图分类号:** S668.4 **文献标识码:** A

### Effects of Cold-hardening on Freezing Tolerance and Antioxidant Enzyme Activities in Plantlets of Strawberry

Zhang Yong, Tang Haoru, Luo Ya, Jiang Hao

(Colleges of Forestry and Horticulture, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan 625014)

**Abstract:** To elucidate the freezing tolerance mechanism of perennial plants, Strawberry was used as model plant. Activities of antioxidant enzyme and solute contents were investigated in plantlets of Strawberry. Cold-hardening (4℃) increased the activities of SOD, CAT, POD and APX in plantlets. A similar increase was also observed in the protein, proline and soluble carbohydrates content. Meanwhile, low-temperature increased the MDA content. These results obtained suggest that the higher activities of SOD, CAT, POD and APX as well as the higher protein, proline, soluble carbohydrates and MDA content may be biochemical adaptation for freezing tolerance in cold-hardened Strawberry plantlets. Interestingly, deacclimation was slow; even after the plants were placed again under a temperature of (25±1)℃ for 3d. The higher freezing hardiness, enzyme activities, protein, proline and soluble carbohydrates content acquired after cold acclimation remained. In conclusion, our plantlet cultures have proved to be good materials for experimentation on freezing resistance in study of freezing-resistance mechanism in Strawberry.

**Key words:** *Fragaria xananassa*, cold-hardening, freezing-resistance, antioxidant enzyme

草莓 (*Fragaria xananassa* Duch) 属于蔷薇科 (Rosaceae) 草莓属 (*Fragaria*) 多年生草本植物, 是目前果树设施栽培中面积最大的一个树种, 然而由于中国的日光温室和塑料大棚结构一般比较简单, 在冬春严寒季节, 低温仍然是影响草莓产量和品质的主要因子<sup>[1]</sup>。因此, 研究提高草莓抗寒性, 降低低温造成的损失, 在

生产上有着重要的现实意义。目前, 已有许多学者对玉米<sup>[2]</sup>、番茄<sup>[3]</sup>、茄子<sup>[4]</sup>、油桃<sup>[5]</sup>等作物的抗寒性进行了研究, 但有关草莓抗寒性方面的研究还鲜见报道。由于多年生植物本身及环境条件的差异, 会导致田间取材的实验结果差异较大, 而采用试管苗, 在严格一致的条件下进行试验, 就可以避免植株和环境所带来的影响,

**基金项目:**教育部“新世纪优秀人才支持计划”项目 (NCET-04-0905); 高等学校全国优秀博士学位论文作者专项基金项目 (200253)。

**第一作者简介:**张勇, 男, 1981 年出生, 四川成都人, 博士, 主要从事生物技术在果树上的应用研究。通信地址: 625014 四川雅安 四川农业大学林学院园艺学院。Tel: 0835-2882293, E-mail: djzy1024@163.com。

**通讯作者:**汤浩茹, 男, 1963 年出生, 重庆市人, 教授, 博士生导师, 四川省学术技术带头人, 主要从事果树遗传育种与生物技术研究。通信地址: 625014 四川雅安 四川农业大学林学院园艺学院, Tel: 0835-2882515, E-mail: htang@sicau.edu.cn。

**收稿日期:** 2007-09-27, **修回日期:** 2007-10-22。

在研究植物体内细微变化方面更具有优势, 试验结果更加可靠<sup>[67]</sup>。因此, 笔者利用组织培养获得的草莓试管苗, 研究低温锻炼过程中草莓的抗寒性、抗氧化酶活性、脯氨酸以及可溶性蛋白质含量等的变化, 以探索草莓抗寒性形成的生理生化机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

试验于2006年9月在四川农业大学园艺植物生物技术研究室进行。试验选用培养室继代培养4周左右的草莓栽培品种‘丰香’(*Fragaria xananassa* cv. Toyonaka) 试管苗叶片为试材。继代培养基是MS+0.5mg/L BA+0.1mg/L IBA, 其中蔗糖20.0g/L, 琼脂粉6.0g/L, 培养温度(25±1)°C, 光强4800lx, 光照时间16h/d。

### 1.2 方法

**1.2.1 低温锻炼处理** 将试管苗放入4°C的人工气候箱中进行低温锻炼, 3d后放回培养室中进行脱锻炼。分别在低温锻炼2、4、6、8、12、24、48、72h和脱锻炼24h后取样进行各项生理指标的测定, 以没有进行低温锻炼的试管苗叶片为对照。

**1.2.2 酶活性的测定** 称取0.1g鲜叶于冰浴中充分研磨后加1ml酶提取液(50mmol/L, pH7.8磷酸缓冲液), 低温离心(4°C, 10000rpm, 20min), 上清液即为酶液, 于4°C冰箱中保存备用。

超氧化物歧化酶(SOD)活性测定参照南京建成生化公司的试剂盒测定方法进行。以每毫克组织蛋白在1ml反应液中SOD抑制率达50%时所对应的SOD量为一个SOD活力单位(U), 用U/mg·protein表示酶活性。过氧化氢酶(CAT)活性测定参照南京建成生化公司的试剂盒测定方法进行。以每毫克组织蛋白每秒钟分解1μmol的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的量为一个CAT活力单位(U), 用

U/mg·protein表示酶活性。

过氧化物酶(POD)活性测定参照Amako等<sup>[8]</sup>的方法采用愈创木酚法测定, 以每毫克组织蛋白每分钟催化0.01μmol的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的量为一个POD活力单位(U), 用U/mg·protein表示酶活性。抗坏血酸过氧化物酶(APX)活性的测定参照Nakano和Asada<sup>[9]</sup>的方法, 以每毫克组织蛋白每分钟催化1μmol抗坏血酸氧化的酶量为一个APX活力单位(U), 用U/mg·protein表示酶活性。

上述试验采用5株幼苗混合取样, 重复3次。

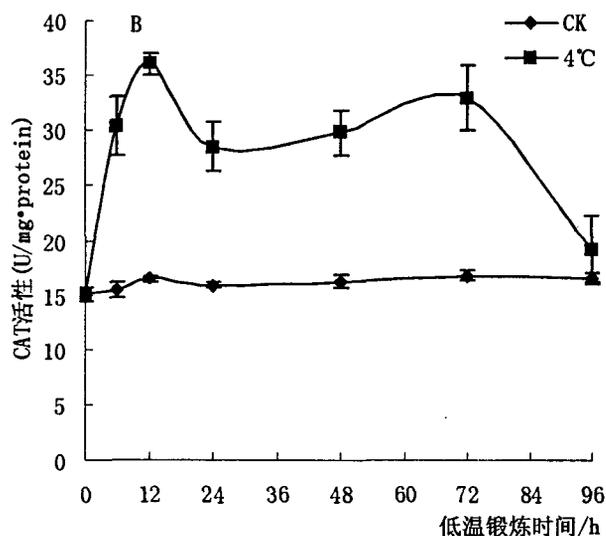
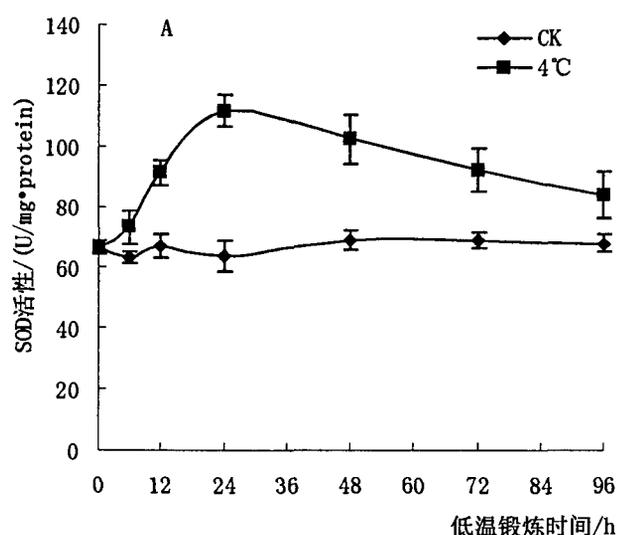
**1.2.3 蛋白质、脯氨酸、可溶性糖及丙二醛(MDA)含量的测定** 蛋白质含量采用考马斯亮蓝G-250法测定<sup>[10]</sup>, 用牛血清蛋白做标准曲线。脯氨酸含量的测定参照张殿忠等<sup>[11]</sup>的方法。可溶性糖含量采用蒽酮比色法测定<sup>[10]</sup>。丙二醛(MDA)含量的测定参照赵世杰和李德全<sup>[12]</sup>的方法。

上述实验采用5株幼苗混合取样, 重复3次。

## 2 结果与分析

### 2.1 低温锻炼后抗氧化酶活性的变化

SOD是植物体内清除活性氧自由基的重要酶之一, 广泛分布于各细胞器中, 其主要功能是歧化O<sub>2</sub><sup>·-</sup>为H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>和O<sub>2</sub>。SOD活性大小可以反映植物对低温逆境适应能力。在4°C低温锻炼过程中, SOD活性迅速上升, 之后缓慢下降(图1A); 4°C低温条件下, CAT活性呈波动上升的趋势, 低温处理72h后, 其活性较对照提高了10.33%(图1B); POD活性随低温锻炼时间的延长迅速增加, 脱锻炼后有所下降, 但仍高于对照(图1C); APX活性在低温锻炼6h达到最大值, 较对照提高了44%, 之后有所下降, 但仍维持在一个较高的水平(图1D)。



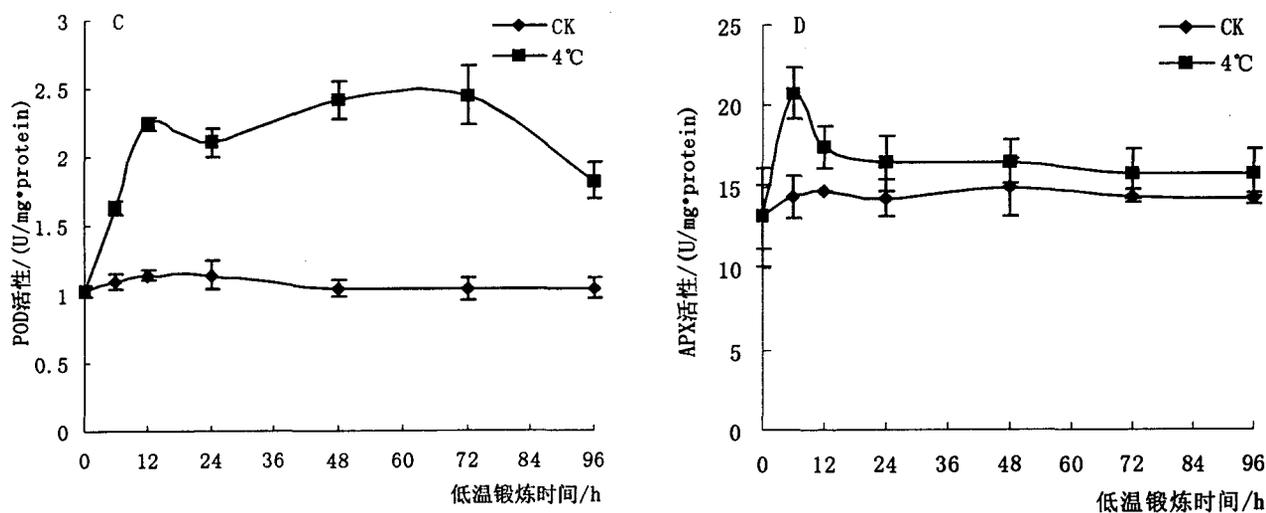


图1 低温锻炼和脱锻炼对草莓组培苗抗氧化酶活性的影响

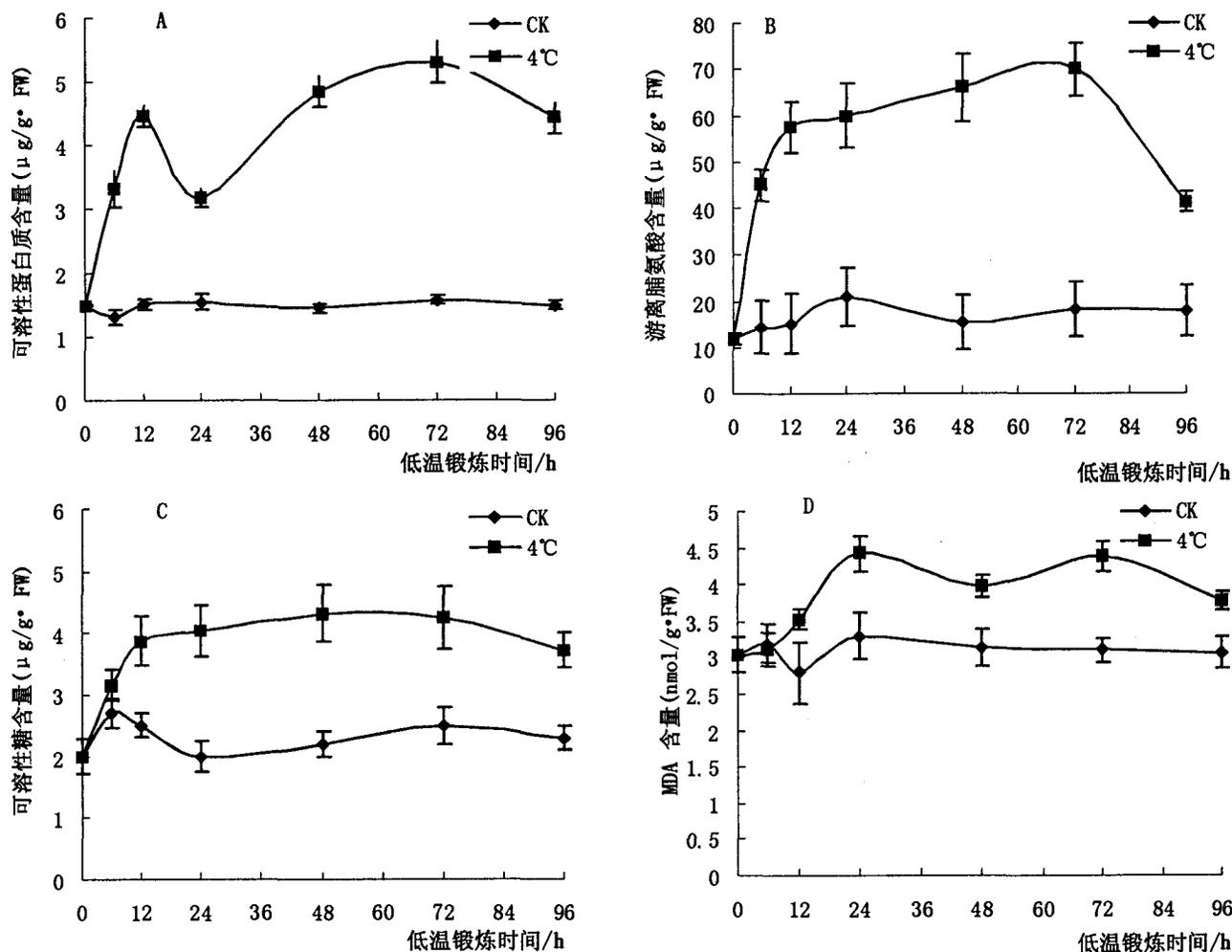


图2 低温锻炼和脱锻炼对草莓组培苗可溶性蛋白质、脯氨酸、可溶性糖及MDA含量的影响

## 2.2 低温锻炼后可溶性蛋白质、脯氨酸、可溶性糖及MDA含量的变化

可溶性蛋白质、游离脯氨酸与可溶性糖是植物细胞内渗透性调节物质,主要功能是降低植物细胞渗透势,有利于水分的吸收。在低温锻炼过程中,随着处理时

间的延长,可溶性蛋白质、游离脯氨酸和可溶性糖的含量不断增加,脱锻炼24h后,可溶性蛋白质、游离脯氨酸和可溶性糖含量虽然有所下降,但仍高于对照(图2A、图2B、图2C)。MDA含量在整个低温锻炼过程中呈波动增长,分别在24h和72h时达到最大值,较对照

增加了 49% 和 40% (图 2D)。

### 3 结论与讨论

草莓组培苗经 4℃ 低温锻炼, 各种抗氧化酶 (SOD、CAT、POD 和 APX) 的活性明显升高。脱锻炼 2d 后, 酶活性较低温锻炼时有所下降, 但仍高于常温生长植株的水平 (图 1)。低温逆境中 SOD、CAT、POD 和 APX 活性水平与植物的抗寒性强弱有着十分密切的关系, 并可以作为植物抗寒性检测的生理指标<sup>[13]</sup>。低温锻炼能提高植物抵御活性氧伤害的能力, 同时伴随着抗氧化酶活性的提高<sup>[14]</sup>。在低温胁迫下, 冷锻炼的菠菜与小麦的 SOD 活性高于未经锻炼的植株 SOD 水平<sup>[14,15]</sup>。Anderson 等<sup>[16]</sup>研究认为低温锻炼能有效提高玉米的 CAT 活性。Wang<sup>[17]</sup>认为, 植物抗冷性的增强与 SOD、CAT、POD 以及 APX 等酶活性的上升有关。笔者的结果也证实了这一点, SOD、CAT、POD 和 APX 在低温锻炼过程中其活性都有提高, 说明低温锻炼提高了保护酶的活性, 以清除植物细胞在低温逆境中活性氧的增加, 减轻膜脂过氧化程度, 提高膜结构的稳定性, 脱锻炼后幼苗还具有较强的清除活性氧的能力。

低温 (4℃) 锻炼后, 草莓组培苗可溶性蛋白质、脯氨酸及可溶性糖含量明显升高, 脱锻炼后可溶性蛋白质、脯氨酸及可溶性糖含量有所下降, 但明显高于未锻炼植株水平 (图 2)。可溶性蛋白质、脯氨酸及可溶性糖是植物细胞内重要的渗透调节物质, 被认为是提高植物抗寒性的重要因素之一<sup>[18]</sup>。陈杰忠等<sup>[19]</sup>研究表明, 可溶性蛋白含量随低温锻炼过程抗寒性的提高而增加。蛋白质含量的增加, 有助于提高细胞内的束缚水, 降低冰点, 并可能导致细胞过冷却的形成, 从而成为防止细胞内结冰, 避免细胞冰冻死亡的原因之一<sup>[20]</sup>。Hidekazu 等<sup>[21]</sup>研究认为植物体内糖含量与其抗性密切相关。Xin 等<sup>[22]</sup>对 esk1 拟南芥的研究表明, 高浓度的脯氨酸是其抗冻性较高的原因之一。低温锻炼使草莓组培苗可溶性蛋白质、脯氨酸和可溶性糖含量上升, 可能是其抗寒性增强的重要生理生化基础。

MDA 是膜脂过氧化作用产物之一, 其含量变化是质膜损伤程度的重要标志之一, 同时 MDA 的积累也会对机体细胞产生毒害作用<sup>[23]</sup>。在笔者试验中, MDA 含量在低温锻炼期间和脱锻炼后, 锻炼苗体内 MDA 含量均高于未锻炼植株。这与吕成群和黄宝灵<sup>[24]</sup>的研究一致。进一步比较分析发现, 在低温锻炼过程中, SOD 活性和 MDA 含量的变化趋势都是先升后

降, 即幼苗体内 SOD 活性的变化与 MDA 含量变化呈明显的正相关, 也就是说当幼苗具有较高的 SOD 活性时, MDA 含量也相对较高。这说明在低温锻炼前期, 由于是急剧降温, 造成植物体内 O<sub>2</sub> 的迅速积累, 因而引起 MDA 含量迅速增加, 然而随着低温锻炼时间的延长, 植物抗氧化防御体系的启动, 膜保护酶 SOD 活性逐渐增强, 清除细胞内自由基的能力加强, 从而对 O<sub>2</sub> 的产生起到了一定程度的抑制, 最终降低了植物体内 MDA 的含量, 减弱了膜脂过氧化作用。

### 参考文献

- [1] 四川农业厅经作处. 龙泉山脉枇杷、草莓受冻损失严重. 四川农业科技, 2005, 2: 41.
- [2] 吴建慧, 杨玲, 孙国荣. 低温胁迫下玉米幼苗叶片活性氧的产生及保护酶活性的变化. 植物研究, 2004, 24(4): 455-459.
- [3] 郑东虎, 葛晓光, 张宪政, 等. 冷胁迫对番茄膜脂过氧化与抗氧化酶系统的影响. 北方园艺, 2003, (4): 46-47.
- [4] 李建设, 耿广东, 程智慧. 低温胁迫对茄子幼苗抗寒性生理生化指标的影响. 西北农林科技大学学报 (自然科学版), 2003, 31(1): 90-96.
- [5] 杨春祥, 李宪利, 高东升, 等. 低温胁迫对油桃花器官膜脂过氧化和保护酶活性的影响. 果树学报, 2005, 22(1): 69-71.
- [6] 庞勇, 马锋旺, 徐凌飞. 抗坏血酸对苹果组培苗耐热性的生理效应. 果树学报, 2005, 22(2): 160-164.
- [7] 赵军营, 王利军, 牛铁泉, 等. 苹果幼苗部分根系水分胁迫对光合作用主要参数的影响. 果树学报, 2005, 22(5): 446-449.
- [8] Amako K, Chen G X, Asada K. Separate assays specific for ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase and for the chloroplastic and cytosolic isozymes of ascorbate peroxidase in plants. Plant Cell physiology, 1994, 35: 497-504.
- [9] Nakano Y, Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplast. Plant Cell Physiology, 1994, 22: 867-880.
- [10] 熊庆娥. 植物生理学实验教程. 四川: 四川科学技术出版社, 2003: 5-56.
- [11] 张殿忠, 汪沛洪, 赵会贤. 测定小麦叶片游离脯氨酸含量的方法. 植物生理学通讯, 1990, (4): 62-65.
- [12] 赵世杰, 李德全. 丙二醛的测定. 见: 中国科学院上海植物生理研究所. 上海植物生理学会. 现代植物生理学试验指南. 北京: 科学出版社, 1999: 305-306.
- [13] 李美茹, 刘鸿先, 王以柔. 植物抗冷分子生物学研究进展. 热带植物学报, 2000, 8(1): 70-80.
- [14] Scabbia F, Sebastiani L, Vitagliano C. Protective enzymes against activated oxygen species in wheat (*Triticum Aestivum* L.) seedlings under cold acclimation. Plant Physiol., 1999, 155: 762-768.
- [15] Schoner S, Krause G H. Protective systems against active oxygen species in spinach: Response to cold acclimation in excess light. Planta, 1990, 180: 383-389.

- [16] Anderson M D, Prasad T K, Stewart C R. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. *Plant Physiol*, 1995,109:1247-1257.
- [17] Wang C Y. Relationship between free radical scavengers enzymes and chilling to tolerance in Zucchini Squash. *Acta Horticulturae*, 1995,398:205-211.
- [18] 王燕凌,廖康,刘君,等.越冬前低温锻炼期间不同品质葡萄枝条中渗透性物质和保护酶活性的变化. *果树学报*,2006,23(3):375-378.
- [19] 陈杰忠,徐春香,梁立峰.低温对香蕉叶片中蛋白质及脯氨酸的影响. *华南农业大学学报*,1999,2(3):54-58.
- [20] 简令成.植物抗寒机理的研究进展. *植物学通报*, 1992,9(3):17-22.
- [21] Hidekazu S, Kazuo I, Masayuki O. Changes in sugar content during cold acclimation and deacclimation of cabbage seedlings. *Annals of Botany*,1996,78:365-369.
- [22] Xin Z, Browse J. Eskimol mutants of Arabidopsis are constitutively freezing tolerant. *Proc Natl Acad Sci USA*,1998,95(7):7799-7804.
- [23] 陈少裕.膜脂过氧化对植物细胞的伤害. *植物生理学通讯*,1991,27(2):84-90.
- [24] 吕成群,黄宝灵.低温胁迫对巨尾桉幼苗膜脂过氧化及保护酶的影响. *广西植物*,2004,24(1):64-68.

(责任编辑:刘艳鹏)